

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Antimikrobiální aktivita přírodních látek

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Květoslava Lysková
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Lucie Janovská, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Květoslava Lysková
Název práce	Antimikrobiální aktivita přírodních látek
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav mikrobiologie UP v Olomouci a FN Olomouc
Vedoucí práce	RNDr. Lucie Janovská, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Jazyk	Český
Klíčová slova	Antimikrobiální aktivita, antibiofilmová aktivita, přírodní látky, gentamicin, síran měďnatý, cystická fibróza
Počet stran	65
Počet příloh	4

Abstrakt

Diplomová práce je zaměřena na studium antimikrobiální aktivity 26 přírodních látek, gentamicinu a síranu měďnatého, pro srovnání antimikrobiálního účinku. Účinnost přírodních látek byla testována na 6 referenčních kmenech a 3 klinických izolátech vykultivovaných ze vzorků sputa od pacientů trpících cystickou fibrózou. Antimikrobiální aktivita testovaných látek byla stanovena mikrodiluční metodou. Dále byla testována antibiofilmová aktivita a přítomnost interference s tvorbou bakteriálního biofilmu. Nejúčinnější byl tropolon s hodnotou minimální inhibiční koncentrace $0,39 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. *Stenotrophomonas maltophilia* CF5/363 jako jediná z devíti testovaných bakteriálních kmenů netvořila bakteriální biofilm a ani jedna z testovaných látek nepůsobila na vyzrálý biofilm. Přínosem mé práce je zhodnocení účinnosti testovaných přírodních látek, gentamicinu a síranu měďnatého, které by napomohly vyřešit celosvětový problém s narůstající rezistencí bakterií k antibiotikům.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Květoslava Lysková
Title of thesis	Antimicrobial activity of natural substances
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Microbiology, Palacký University in Olomouc and Faculty hospital Olomouc
Supervisor	RNDr. Lucie Janovská, Ph.D.
The year of presentation	2018
Language	Czech
Keywords	Antimicrobial activity, antibiofilm activity, natural substances, gentamicin, copper sulphate, cystic fibrosis
Number of pages	65
Number of appendices	4

Abstract

The diploma thesis is focused on the study of antimicrobial activity of 26 natural substances, gentamicin and copper sulphate to compare the antimicrobial effect. The efficiency of natural substances was tested on 6 reference strains and 3 clinical isolates recovered from sputum samples from patients suffering from cystic fibrosis. The antimicrobial activity of tested substances was determined by the microdilution method. Furthermore, antibiofilm activity and the presence of interference with bacterial biofilm formation were tested. The most active substance was the tropolone with a minimum inhibitory concentration of $0.39 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. *Stenotrophomonas maltophilia* CF5/363 as the only one of the nine tested bacterial strains did not produce bacterial biofilm. None of the tested substances affected the mature biofilm. The benefit of my work is to evaluate the effectiveness of tested natural substances, gentamicin and cupric sulphate, that can help to solve the global problem with the increasing resistance of bacteria to antibiotics.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Lucii Janovské, Ph.D. za cenné rady, připomínky, trpělivost a odborné vedení během tvorby mé diplomové práce.

Tato diplomová práce byla řešena na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc s podporou interního grantu IGA LF UP (IGA_LF_2017_37).

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

OBSAH

OBSAH	6
SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Metody stanovení antimikrobiální aktivity	10
2.1.1 Difuzní metoda	10
2.1.2 Diluční metoda	11
2.2 Látky s antimikrobiální aktivitou	11
2.2.1 Gentamicin	12
2.2.2 Síran měďnatý	13
2.2.3 Přírodní látky s antimikrobiálním účinkem	13
2.2.3.1 Flavonoidy	13
2.2.3.2 Fenolové kyseliny	14
2.2.3.3 Karboxylové kyseliny	17
2.2.3.4 Ostatní přírodní látky	18
2.3 Bakteriální rezistence	20
2.3.1 Problémy při antimikrobiální terapii	21
2.4 Charakteristika vybraných bakteriálních druhů	23
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.4.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	23
2.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
2.4.4 <i>Burkholderia cenocepacia</i>	24
2.4.5 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	24
3 MATERIÁL A METODY	25
3.1 Bakteriální kmeny	25
3.2 Testované látky	26
3.3 Materiál	27
3.3.1 Média a chemikálie	27
3.3.2 Laboratorní vybavení a software	29
3.4 Metody	29
3.4.1 Kultivace bakterií	29
3.4.2 Identifikace bakterií metodou MALDI-TOF MS	30
3.4.3 Testování antimikrobiální aktivity	30

3.4.3.1	Difuzní disková metoda	30
3.4.3.2	E-test	31
3.4.3.3	Mikrodiluční metoda	31
3.4.4	Modifikovaná Christensenova metoda	32
3.4.5	Stanovení interference s tvorbou biofilmu.....	34
3.4.6	Stanovení antibiofilmové aktivity.....	34
4	VÝSLEDKY	36
4.1	Identifikace bakterií metodou MALDI-TOF MS	36
4.2	Testování citlivosti k antibiotikům	36
4.3	Antimikrobiální aktivita.....	39
4.4	Modifikovaná Christensenova metoda	44
4.5	Stanovení interference s tvorbou biofilmu.....	45
4.6	Stanovení antibiofilmové aktivity.....	48
5	DISKUZE	50
6	ZÁVĚR	55
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56
8	PŘÍLOHY	66
	Příloha 1: Informace o testovaných látkách	
	Příloha 2: Výsledek testování antimikrobiální aktivity v koncentracích $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u kmene <i>S. epidermidis</i> (CCM 7221), <i>S. aureus</i> (CCM 3953) a <i>S. aureus</i> (CCM 4223)	
	Příloha 3: Výsledky testování antimikrobiální aktivity v koncentracích $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u kmenů <i>B. cenocepacia</i> (LMG 16656), <i>B. cenocepacia</i> (CF5/358) a <i>S. maltophilia</i> (CF5/363)	
	Příloha 4: Výsledky testování antimikrobiální aktivity v koncentracích $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u kmenů <i>P. aeruginosa</i> (CCM 3955), <i>P. aeruginosa</i> (CNCTC 5537) a <i>P. aeruginosa</i> (CF5/362)	

SEZNAM ZKRATEK

BHI	bujón z mozkosrdcové infuze, <i>brain-heart infusion</i>
BCCM/LMG	Belgická sbírka mikroorganismů, Gent, <i>Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Laboratory of Microbiology Gent</i>
CCM	Česká sbírka mikroorganismů, <i>Czech collection of microorganism</i>
CNCTC	Česká národní sbírka typových kultur, <i>Czech National Collection of Type Cultures</i>
EUCAST	Evropská společnost klinické mikrobiologie a infekčních onemocnění, <i>European society of clinical mikrobiology and infectious diseases</i>
EPS	extracelulární polymerní látky, <i>extracellular polymeric substances</i>
HCCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová, <i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MBEC	minimální biofilm eradikující koncentrace
MBIC	minimální biofilm inhibující koncentrace
MBS	minimální bakteriostatická koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	meticilin-citlivý kmen <i>Staphylococcus aureus</i>
OD	optická denzita
PIA	polysacharidový intercelulární adhezín
TSB	tryptózo-sójový bujón

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Hlavní vlastností antimikrobiálních látek, které jsou užívány jako léčiva je schopnost usmrtit nebo inhibovat růst mikrobů v dávkách, které nepoškozují makroorganismus. Mezi antimikrobiální látky jsou řazeny antibiotika a chemoterapeutika (Votava, 2005).

Počátky používání antibiotik v klinické praxi se datují do první poloviny 20. století. Antimikrobiální látky umožnily obrat v terapii bakteriálních onemocnění, ale brzy se stala významným celosvětovým problémem narůstající rezistence bakterií k antibiotikům vlivem nadužívání a profylaktického užívání antibiotik. Proto jsem se ve své diplomové práci zaměřila na studium antimikrobiální aktivity přírodních látek, které by bylo možné využívat v terapii bakteriálních infekcí nebo používat v kombinaci s antibiotiky a mohly by tak pomoci k vyřešení zmíněného problému s narůstající rezistencí. Z uvedených důvodů je důležité monitorování výskytu rezistentních mikroorganismů v různých prostředích, zavádění pravidel správné antibiotické politiky, snižování spotřeby antibiotik a také vývoj nových antimikrobiálních látek (Dolejská, 2008).

Dalším problémem v terapii bakteriálních infekcí je schopnost růstu ve formě biofilmu, kdy jsou bakterie chráněny před vnějšími vlivy, tedy i lépe odolávají antibiotické terapii, desinfekčním látkám a mechanické očištění. Na druhou stranu biofilm střevní sliznice tvořený saprofytickými a symbiotickými bakteriemi člověka do jisté míry chrání před usazením patogenních mikroorganismů (Römling a Balsalobre, 2012; Votava, 2005; Schindler 2001).

Cíle práce:

1. Charakterizovat vybrané kmeny bakterií – ověřit identifikaci vybraných bakteriálních izolátů pomocí MALDI-TOF MS, stanovit citlivost k antibiotikům a otestovat schopnost tvorby biofilmu pomocí modifikované Christensenovy metody.
2. U vybraných přírodních látek stanovit antimikrobiální a antibiofilmovou aktivitu. Případnou aktivitu srovnat s působením antibiotik a mědi.
3. Vyhodnotit přítomnost interference s tvorbou bakteriálního biofilmu.
4. Zhodnotit potenciál a přínos přírodních látek jako antimikrobiálních preparátů, mimo jiné ve vztahu se stále se rozvíjející rezistencí bakterií.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Metody stanovení antimikrobiální aktivity

Vyšetření citlivosti na antibiotika poskytuje důležité informace pro léčbu a profylaxi pacienta. Výsledkem testování je tzv. antibiogram. Při selhání empirické léčby lze na základě vyšetření citlivosti vybrat vhodnou cílenou terapii. Rutinní testování citlivosti k danému antibiotiku také může varovat před rozvojem rezistence. Další využití stanovení citlivosti na antibiotika je v epidemiologických studiích.

Metody používané ke stanovení citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám lze rozdělit na difuzní a diluční. Výběr metod používaných v rutinní praxi je založen na typu mikroorganismu, požadované přesnosti, jednoduchosti provedení nebo na finanční nákladnosti použité metody (Scharfen, 2013).

2.1.1 Difuzní metoda

Difuzní testy poskytují informaci o citlivosti nebo rezistenci kmene k danému antibiotiku. **Diskový test** je standardní kvalitativní metoda pro vyšetření antibiotické citlivosti, kdy antibiotikum difunduje z disku položeného na povrchu naočkované agarové půdy. Testovaný kmen je vyhodnocen jako citlivý nebo rezistentní, podle toho, je-li průměr inhibiční zóny kolem disku na tuhé půdě alespoň roven, nebo menší, než stanovená hraniční koncentrace (tzv. breakpoint). Hraniční zóny jsou standardizovány ve formě tabulek, např. EUCAST (*European society of clinical microbiology and infectious diseases*). Na velikost zóny má vliv citlivost kmene, fyzikální vlastnosti antibiotika a půdy, tloušťka půdy a rychlost množení testovaného kmene (Scharfen, 2013; Koukalová a kol., 2009; Votava, 2005).

Určitou modifikací je **E-test**, který představuje reagenční proužky k přímému použití pro vyšetření antimikrobiální citlivosti určené ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) pomocí kalibrované stupnice. Po inkubaci se vytvoří v okolí proužku inhibiční zóna ve tvaru kapky. V místě, kde inhibiční zóna protíná diagnostický proužek je odečítána hodnota MIC. Metoda v sobě kombinuje výhody diskového difuzního testu, např. rychlost a jednoduchost provedení testu, s možností určení MIC. Nevýhodou je poměrně vysoká cena (Koukalová a kol., 2009; Votava 2005).

2.1.2 Diluční metoda

Diluční metoda je jednou z metod pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotika a minimální baktericidní koncentrace (MBC). Metodu je možné provádět v bujónu nebo na agarové plotně s obsahem antibiotika. Hodnota MIC je nejmenší naměřená koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje růst a množení nebo přímo usmrcuje bakteriální buňky. Hodnota MBC je nejnižší naměřená koncentrace antimikrobiální látky *in vitro*, která je schopna usmrtit exponovanou bakteriální kulturu v průběhu 24 hodin. Baktericidní účinek je prokázán následným kultivačním testem na agarových půdách, kde nepozorujeme nárůst kolonií bakterií (Mičuda a kol., 2002).

V jedné mikrotitrační destičce je obvykle testována citlivost ke 12 antibiotikům pro jeden testovaný kmen. Každá mikrotitrační destička obsahuje pozitivní a negativní kontrolu. Za pozitivní kontrolu je označována jamka obsahující inokulované živné médium bez antibiotika. Negativní kontrola, živná půda bez bakterie, slouží k odhalení případné kontaminace. Jamky kromě negativní kontroly se naočkují testovaným kmenem a po inkubaci se stanovuje hodnota MIC (Bursová a kol., 2014).

Mezi diluční metody se řadí také tzv. agarová diluční metoda, která je prováděna na agarových půdách obsahující vzestupnou koncentraci jednoho antibiotika. Na půdu v Petriho misce je možné naočkovat až 48 kmenů. Po inkubaci se stanovuje forma růstu bakteriálního kmene na půdě bez antibiotika a následně se vyhodnotí MIC (Koukalová a kol., 2009).

2.2 Látky s antimikrobiální aktivitou

Antimikrobiální látky se používají v takových dávkách, které inhibují růst mikroba nebo jej usmrcují, ale zároveň nepoškozují makroorganismus. Tyto látky jsou využívány při terapii infekčního onemocnění a profylaxi a dělí se dle původu na antibiotika a chemoterapeutika. Látky mikrobiálního původu se nazývají antibiotika. Stejné označení je i pro látky přírodního původu, které jsou chemicky modifikovány. Do skupiny chemoterapeutik patří látky připravené chemicky.

Důležitou vlastností antimikrobiálních léčiv je selektivní toxicita na mikroba, která se vyjadřuje tzv. chemoterapeutickým indexem, poměrem mezi dávkou toxickou pro hostitele a dávkou účinnou na mikroba (Votava, 2005).

Další dělení antimikrobiálních látek je dle jejich účinku na baktericidní a bakteriostatické. Látky, které způsobují usmrcení mikrobiální buňky, jsou označovány jako baktericidní. Látky s tímto účinkem působí ireverzibilně a klinický účinek se dostaví

obvykle do 48 hodin. Využívají se u pacientů se sníženou obranyschopností nebo se podávají pacientům v závažném klinickém stavu. Cílem bakteriostatických látek je inhibice růstu a množení mikrobů. Tyto látky působí reverzibilně a klinicky se projeví až za 3–4 dny (Votava a kol., 2007).

Antimikrobiální látky se také dají rozdělit podle místa jejich působení. Látky mohou působit na: (a) syntézu buněčné stěny; (b) syntézu bílkovin; (c) syntézu nukleových kyselin; (d) metabolické dráhy a (e) funkce buněčné membrány. Každé takové cílové místo může být specificky inhibováno antimikrobiálními látkami (Goering a kol., 2016).

Při antimikrobiální léčbě je nutné dodržovat řadu pravidel, jako jsou např. správné dávkovací intervaly nebo délka podání. Obecně se antibiotikum podává ještě 2–3 dny po vymizení klinických příznaků. U běžných infekcí je doba užívání antibiotik obvykle 7–10 dnů (Kolář a kol., 2002).

2.2.1 Gentamicin

Gentamicin je jedno z nejčastěji užívaných širokospektrálních aminoglykosidových antibiotik. Původně byl izolován z aktinomycety rodu *Micromonospora*. Gentamicin působí na většinu gramnegativních tyčinek, některé pseudomonády, acinetobakterie a serracie. Dále je účinný na stafylokoky i na některé kmeny rezistentní k oxacilinu.

Gentamicin má bakteriostatické i baktericidní účinky a využívá se například v chirurgii, kde je spolu s beta-laktamovými antibiotiky používán při výskytu závažnějších infekcí. Gentamicin má také řadu nežádoucích účinků, mezi které patří např. nefrotoxicita, změny krevního tlaku, zvýšení jaterních testů a další. Dodržování vhodné terapeutické dávky zabrání vzniku rezistence bakterií nebo toxickým projevům (Promsan a kol., 2016; Votava, 2005).

Ve studii Lebeaux a kol. (2015) byla prokázána antimikrobiální aktivita gentamicinu proti gramnegativním (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*) a grampozitivním (*S. aureus*, *S. lugdunensis*, *E. faecalis*) kmenům izolovaných z katétru. Gentamicin inhiboval růst bakterií rostoucích ve formě biofilmu. Ve studii bylo také zjištěno, že kombinací gentamicinu s kyselinou ethylendiamintetraoctovou nebo L-argininu se zvýšila účinnost antibiotika proti testovaným kmenům, což lze využít při terapii infekčních onemocnění.

2.2.2 Síran měďnatý

Síran měďnatý je celosvětově používaný fungicid v akvakultuře a zemědělství. Svým antimikrobiálním působením inhibuje růst celé řady bakterií jako např. *Salmonella* spp., *Pasteurella* spp., *Vibrio* spp., *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. a *Edwardsiella* spp. (Lasiené a kol., 2016).

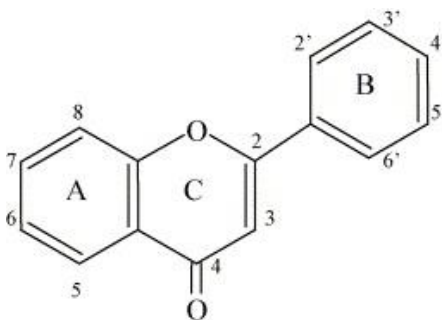
2.2.3 Přírodní látky s antimikrobiálním účinkem

Přírodní látky, jejichž antimikrobiální aktivita byla testována v rámci experimentální části, jsou rozděleny do skupin, dle jejich chemické struktury.

2.2.3.1 Flavonoidy

Flavonoidy se řadí mezi nízkomolekulární sekundární rostlinné fenolické látky. Chemická struktura je tvořena 2-fenyl-benzopyranem, který je složen ze dvou benzenových kruhů spojených heterocyklickým pyranovým kruhem (obrázek 1). Bylo identifikováno více než 4 000 flavonoidů vyskytujících se v listech, semenech, kůře a květech rostlin (Heim a kol., 2002). Mimo rostliny jsou obsaženy také v ovoci, zelenině, čaji, víně nebo medu. Flavonoidy jsou známé svými mnoha pozitivními vlastnostmi např. protizánětlivou, antioxidační a antimikrobiální aktivitou (Cushnie a Lamb, 2005).

Antimikrobiální aktivita flavonoidů je pravděpodobně způsobena schopností vytvořit komplex extracelulárních rozpustných proteinů se sloučeninami buněčné bakteriální stěny. Lipofilní flavonoidy mohou narušit cytoplazmatickou membránu (Cowan, 1999).



Obrázek 1: Základní struktura flavonidů.

Upraveno podle Cushine a Lamb (2005).

Do skupiny flavonoidů patří celá řada přírodních látek jako např. katechiny, hesperetin, naringenin a kurkumin (tabulka 1). Tyto látky většinou působí prostřednictvím narušení bakteriální membrány, což vede k jejich širokospektrému antibakteriálnímu působení (Tyagi a kol., 2015).

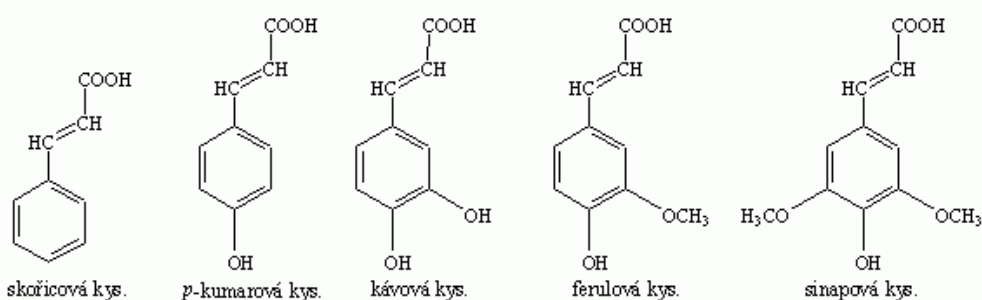
Tabulka 1: Flavonoidy

Látka	Účinek	Reference
Flavonoidy katechiny	antimikrobiální	Daglia, 2012 Ikigai a kol., 1993 Toda a kol., 1992
hesperetin	antimikrobiální protizánětlivý protinádorový antioxidační	Iransahi a kol., 2015 Bae a kol., 1999
naringenin	antimikrobiální	Dimkić a kol., 2016 Bae a kol., 1999
kurkumin	antimikrobiální	Tyagi a kol., 2015 De a kol., 2009

2.2.3.2 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny jsou aromatické hydroxykyseliny, které se řadí mezi polyfenoly. Na základě rozdílnosti v počtu a polohách hydroxylových skupin na aromatickém kruhu se fenolové kyseliny dělí do dvou hlavních skupin (tabulka 2). První skupina zahrnuje deriváty kyseliny skořicové, do které patří např. kyselina kávová, sinapová, p-kumarová, ferulová. Do druhé skupiny jsou řazeny deriváty kyseliny benzoové, např. kyselina gallová, syringová, protokatechová, salicylová (Goleniowski a kol., 2013; Marcaníková a Beňová, 2010).

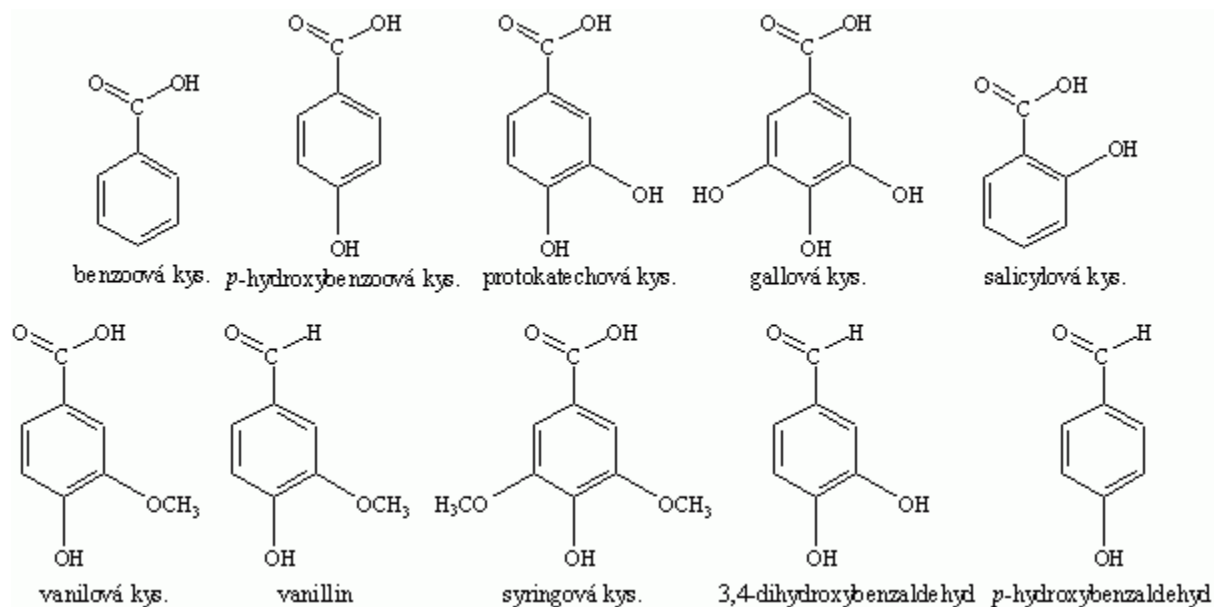
Kyselina skořicová je organická kyselina, která se vyskytuje v rostlinách a vyznačuje se širokou biologickou aktivitou. Její deriváty izolované z rostlin (obrázek 2, tabulka 2) se vyznačují antioxidační, antibakteriální, antivirovou a antifungální aktivitou (Sova, 2012).



Obrázek 2: Kyselina skořicová a její deriváty.

Upraveno podle Valentová (2012).

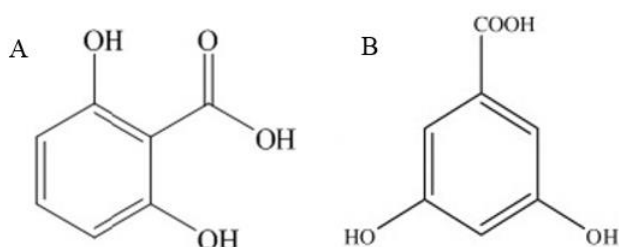
Druhou skupinou fenolových kyselin jsou deriváty kyseliny benzoové (obrázek 3, tabulka 2). **Kyselina benzoová** je aromatická karboxylová kyselina s antimikrobiální a antifungální aktivitou vyskytující se u rostlin a v živočišných tkáních. Mimo jiné je používána jako konzervační prostředek (del Olmo a kol., 2015).



Obrázek 3: Kyselina benzoová a její deriváty.

Upraveno podle Valentová (2012).

Dihydroxybenzoové kyseliny jsou aromatické sloučeniny obsahující 2 funkční skupiny fenolu a karboxylovou kyselinu. Skupina je tvořena 6 izomery dihydroxybenzoové kyseliny, kdy v rámci experimentální části této práce byly testovány 2 – kyselina 2,6-dihydroxybenzoová (obrázek 4A) a kyselina 3,5-dihydroxybenzoová (obrázek 4B).



Obrázek 4: Chemická struktura kyseliny (A) 2,6-dihydroxybenzoové; (B) 3,5-dihydroxybenzoové.

Upraveno podle Santoso a kol. (2016) a Anandha babu a kol. (2011).

Tabulka 2: Fenolové kyseliny

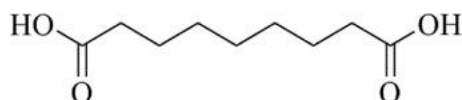
Látka	Účinek	Reference	
Deriváty kyseliny skořicové	kyselina 2,4-dihydroxyskořicová	antibakteriální protizánětlivý antioxidační	Tiveron a kol., 2016
	kyselina kávová kyselina sinapová	antioxidační antivirový protinádorový antioxidační bakteriostatický	Prasad a kol., 2011 Nićiforović a Abramovič, 2014
	kyselina p-kumarová	antibakteriální	Afrouzan a kol., 2018 Lou a kol., 2012
	kyselina felurová	antioxidační protizánětlivý antimikrobiální antitrombotický	Kumar a Pruthi, 2014
	kyselina isoferulicová	protizánětlivé antivirové antioxidační antidiabetický	Jairajpuri a Jairajpuri, 2016
Deriváty kyseliny benzoové	kyselina gallová	antioxidační antimikrobiální	Limpisophon a Schleining, 2017 Al-Zahrani, 2012
	kyselina protokatechová kyselina salicylová	antioxidační antimikrobiální antioxidační cytotoxický antiproliferační	Liu a kol., 2017a Sahoo a Paidesetty, 2015 Sedghi a Gholi-Toluie, 2013 Ghasemzadeh a kol., 2012
	kyselina syringová kyselina isovanilinová	antimikrobiální protizánětlivý analgetický	Dağdelen, 2016 Denny a kol., 2013
	kyselina 4-hydroxybenzoová	antimikrobiální antioxidační	Guillén-Román a kol., 2018
Dihydroxybenzoové kyseliny	kyselina 2,6-dihydroxybenzoová	antimikrobiální	Santoso a kol., 2016
	kyselina 3,5-dihydroxybenzoová	antioxidační	Sroka a Cisowski, 2003
Ostatní fenolové sloučeniny	kyselina 4-hydroxyfenyloctová	antimikrobiální	Flores a kol., 2017 Cueva a kol., 2010
	kyselina salicylhydroxamová	protizánětlivé a antipyretické	Al Azzam a El Kassed, 2017

Byl prokázán synergický vztah mezi fenolovými sloučeninami (např. kyselinou protokatechovou, gallovou), izolovaných z hroznových výlisků a antibiotiky (např. chinolony, fluorochinolony, tetracyklinem) na bakteriální kmeny *S. aureus* a *E. coli*. V experimentu byly použity klinické izoláty *S. aureus* (8298–2 a 8275), meticilin-rezistentní kmeny *S. aureus* (622–4 a 97–7) a *E. coli* (33.1, 16.1 a A2UC).

Jako kontrolní kmeny sloužily *S. aureus* ATCC 6538 a *E. coli* ATCC 25922. Díky interakcím fenolových sloučen a antibiotik se snížila hodnota MIC 4 až 75krát. Ze studie bylo také zjištěno, že hodnoty MIC fenolových sloučenin z extraktu hroznových výlisků byly menší, než výsledné MIC stanovené u samostatných fenolových sloučenin. Extrakt fenolových sloučenin z hroznových výlisků snížil hodnotu MIC 8–65krát u *S. aureus* a 4–125krát u *E. coli* (Sanhueza a kol., 2017).

2.2.3.3 Karboxylové kyseliny

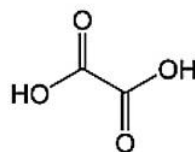
Do skupiny karboxylových kyselin patří ze zde testovaných látek kyselina azelaová, šťavelová a kynurenová. **Kyselina azelaová** (obrázek 5) je nasycená dikarboxylová kyselina, kterou tvoří některé druhy kvasinek, např. *Pityrosporum ovale* vyskytující se v normální kožní mikroflóře. V přírodě se také nachází v pšenici, žitě, ječmenu, ovesných semenech a čiroku. Kyselina je známá svým protizánětlivým a antibakteriálním působením proti bakteriím způsobujícím akné (*Propionibacterium acnes*) (Burchacka a kol., 2016; Muthulakshmi a Saravanan, 2013). Antibakteriální aktivita kyseliny azelaové byla testována na kmenech *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (DSM 20044) a *Propionibacterium acnes* (DSM 1897) ve studii Charnock a kol. (2004).



Obrázek 5: Chemická struktura kyseliny azelaové.

Upraveno podle Burchacka a kol. (2016).

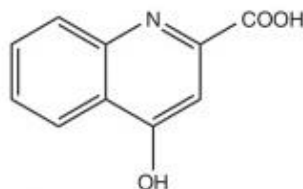
Kyselina šťavelová (obrázek 6) je organická kyselina izolovaná z houby houževnatec jedlý (*Lentinula edodes*). Nachází se také v tropickém ovoci, tzv. *Eleiodoxa conferta*. Antimikrobiální účinek tohoto ovoce byl testován na 5 bakteriálních kmenech (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Salmonella sp.*) (Mokhtar a Aziz, 2015).



Obrázek 6: Chemická struktura kyseliny šťavelové.

Upraveno podle Chanakul a kol. (2016).

Kyselina kynurenová (obrázek 7) je metabolitem aminokyseliny tryptofanu s protizánětlivou a antioxidační aktivitou. Vysoká koncentrace této kyseliny je obsažena v zelenině, zejména v brokolici a bramborech. Dále se může vyskytovat v medu a některých bylinkách, např. třezalce tečkované, kopřivě a mátě (Turski a kol., 2016).

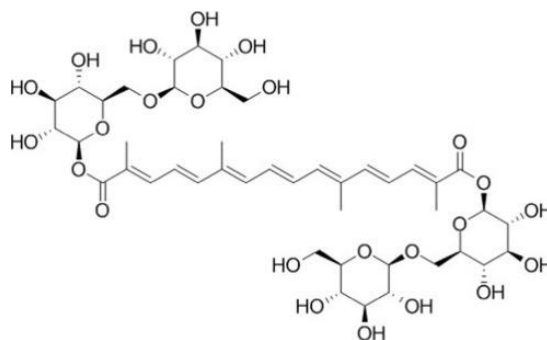


Obrázek 7: Chemická struktura kyseliny kynurenové.

Upraveno podle Smith a kol. (2016).

2.2.3.4 Ostatní přírodní látky

Krocín (obrázek 8) je přírodní látka vyskytující se v šafránu. Tato bylina je známá svými léčivými vlastnostmi, např. zmírňuje Alzheimerovu chorobu, premenstruační syndrom a depresi. Krocín je dobře rozpustný ve vodě a řadí se do skupiny karotenoidů. Působí jako antioxidant a chrání buňky před oxidativním stresem tím, že redukuje volné radikály (Hoshyar a kol., 2016). Antibakteriální aktivita krocínu obsaženého v šafránu byla testována na celkem 45 klinických izolátech *Helicobacter pylori* (Nakhaei, 2010).

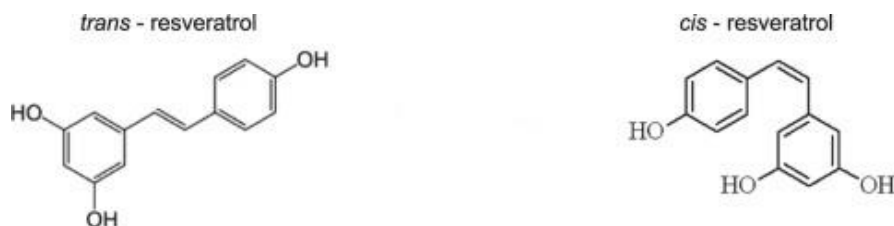


Obrázek 8: Chemická struktura krocínu.

Upraveno podle Hoshyar a kol. (2016).

Reveratrol (obrázek 9) je derivátem stilbenu a patří do skupiny přírodních polyfenolů. Nachází se v ovoci, zejména hroznech, a dále v ořechách. U resveratrolu jsou popsány antimikrobiální a antivirové účinky. Působí proti bakteriím, kvasinkám a plísním. Jedná se také o antioxidant se silnými protizánětlivými a antiproliferačními účinky (Lai a kol., 2017; Hwang a Lim, 2015; Popova a kol., 2014). Ve studii Lai a kol. (2017) byla testována

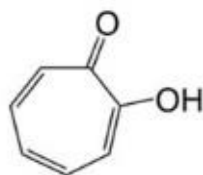
antibakteriální aktivita resveratrolu na kmenech *E. coli* (BCRC 10675, BCRC 15374) a *S. aureus* (BCRC 12655, BCRC 10780).



Obrázek 9: Chemická struktura *trans* a *cis* konformace resveratrolu.

Upraveno podle Popova a kol. (2014).

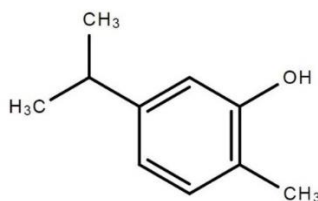
Tropolon (obrázek 10) je přírodní látka produkovaná fytopatogenní bakterií *Bulkholderia plantarii*, který způsobuje onemocnění rýžových sazenic projevující se chlorózou a inhibicí růstu kořene. Chelatační vlastnosti tropolonu přispívají k jeho širokospektrálnímu antimikrobiálnímu účinku. Tropolon kromě svého působení proti bakteriím a houbám má také antivirový, antioxidační, protizánětlivý a insekticidní účinek (Wang a kol., 2016).



Obrázek 10: Chemická struktura tropolonu.

Upraveno podle Wang a kol. (2016).

Karvakrol (obrázek 11) je esenciální olejová složka obsažená v oreganu, tymiánu a majoránce. Karvakrol je považován za antimikrobiální látku s širokospektrálním účinkem, která je účinná proti bakteriím, kvasinkám a houbám (Knowles a kol., 2005). Ve studii Liu a kol. (2017b) byla testována antimikrobiální aktivita karvakrolu a dalších látek proti *E. coli*.



Obrázek 11 : Chemická struktura karvakrolu.

Upraveno podle Liu a kol. (2017b).

2.3 Bakteriální rezistence

Rezistence bakterie k antimikrobiálním látkám je označována jako schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného antibiotika. Rezistenci lze rozdělit na přirozenou (primární) a získanou (sekundární) (Kolář a kol., 2002). Rezistence bakterií k antimikrobiálním přípravkům může být vyvolána celou řadou odlišných mechanismů: (a) bakteriálními enzymy, které narušují nebo modifikují strukturu antibiotik; (b) změnou bakteriální stěny, která vede ke snížení její permeability; (c) změnou cílových míst antibiotik; (d) modifikací bakteriálního mechanismu a (e) zvýšeným vylučováním antibiotik z bakteriálních buněk, tzv. effluxem (Kolář, 2000).

Antibiotická politika řeší problémy s narůstající rezistencí bakterií k antibiotikům, zvyšující se počet nozokomiálních nákaz a rostoucí spotřebu antimikrobiálních látek. Jedná se o souhrn opatření se snahou bezpečně a účinně aplikovat antimikrobiální přípravky. Cílem antibiotické politiky je udržení antibiotické léčby na vysoké úrovni, zahrnující také prevenci vzniku a dalšího šíření multirezistentních kmenů a udržení účinnosti stávajících antibiotik a chemoterapeutik (Kolář, 2000).

Rezistence bakterií vůči různým skupinám antimikrobiálních látek může vznikat buď mutacemi nebo přenesením genů pro rezistenci k určitému antibiotiku pomocí plasmidu a transpozonu. Příkladem vzniku rezistence mutací je rezistence ke streptomycinu, která vzniká změnou ribosomálního proteinu. Dalším příkladem je rezistence *Streptococcus pneumoniae* vůči penicilinu, změnou proteinů vázajících penicilin.

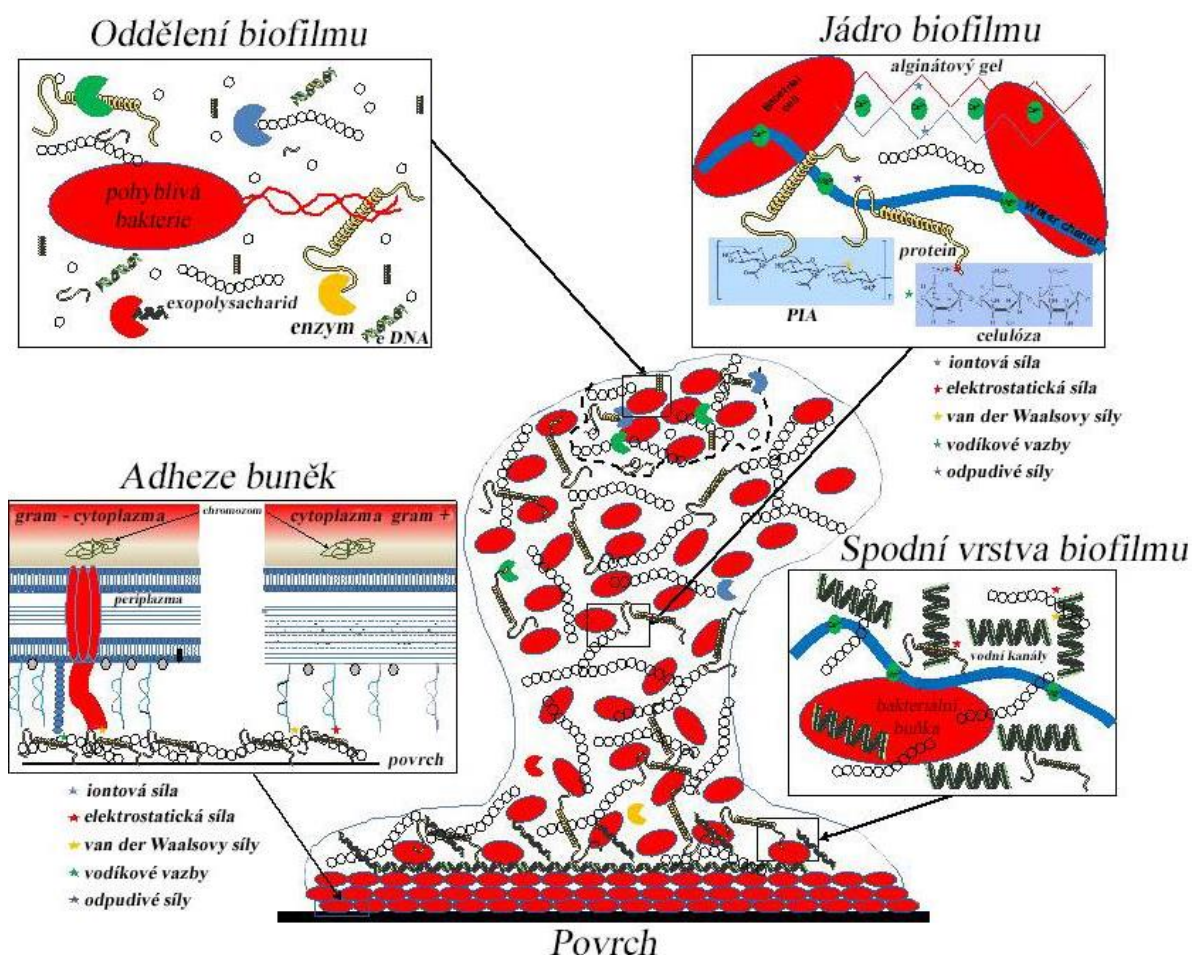
Účinnější možností vzniku rezistence než chromosomovou mutací je přenos pomocí plasmidů, ve kterém může být uložen např. gen kódující beta-laktamázu. Některé tzv. promiskuitní plasmidy překonávají mezidruhovou bariéru a jsou schopny přenášet gen pro rezistenci mezi různými druhy např. z *Escherichia coli* na ostatní enterobakterie, enterokoky nebo hemofily.

Geny rezistence nacházející se u transpozonů se nazývají jako tzv. 'skákácí geny', které díky replikačnímu procesu tvoří kopie a následně se integrují do chromosomu nebo do plasmidů (Goering a kol., 2016).

2.3.1 Problémy při antimikrobiální terapii

Účinnost antimikrobiálních látek je ovlivněna řadou faktorů. Jedním z významných faktorů je schopnost růstu mikroorganismů ve formě biofilmu. Mikroorganismy rostoucí ve formě biofilmu jsou vysoce odolné proti působení vrozené a adaptivní složky imunitního obranného systému makroorganismu. Také jsou rezistentní k působení antimikrobiálních látek a dezinfekčních prostředků (Römling a Balsalobre, 2012; Votava, 2005).

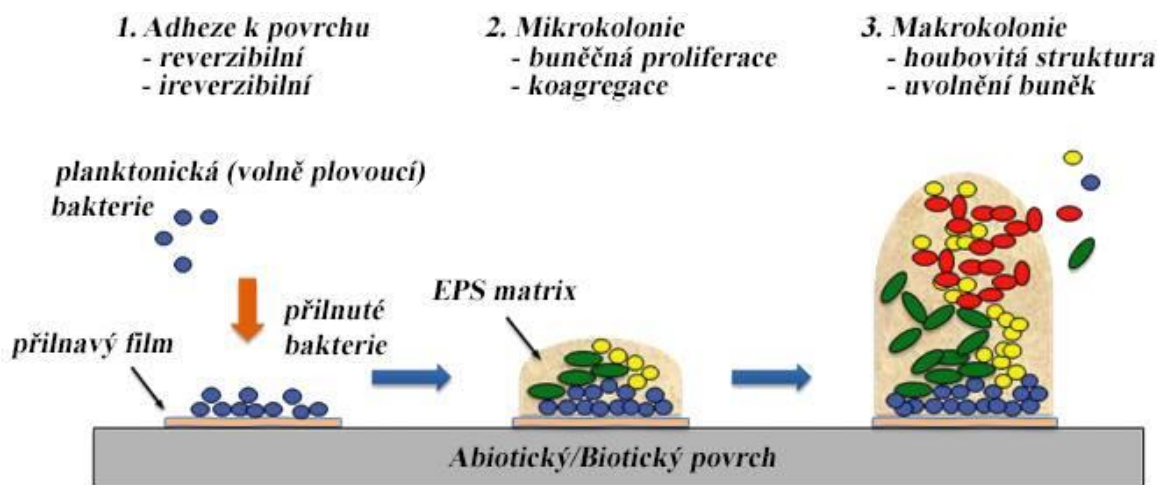
Biofilm je označován jako společenství buněk mikroorganismů se schopností přilnutí k pevnému povrchu obklopených maticí extracelulárních polymerních látek (EPS), do kterých patří převážně polysacharidy a dále proteiny, nukleové kyseliny, lipidy a huminové látky (obrázek 12). EPS vyplňují mezibuněčný prostor a slouží k zajištění počáteční adheze buněk na povrch a jako ochrana před dehydratací a vnějšími škodlivými vlivy (Vu a kol., 2009).



Obrázek 12: Schéma znázorňující zralý biofilm.

Upraveno podle Lembre a kol. (2012).

Vývoj mikrobiálního biofilmu je dynamický několikastupňový proces, který lze obecně rozdělit do 3 kroků: adheze buněk k pevnému povrchu, vznik mikrokolonií a zrání biofilmu (obrázek 13) (Dufour a kol., 2010).



Obrázek 13: Schématické znázornění tvorby biofilmu.

Upraveno podle Dufour a kol. (2010).

V místě kontaktu mezi bakteriemi a povrchem dochází k integraci mikrobiálních buněk s povrchem prostřednictvím několika proteinových a polysacharidových struktur (pili, flagella, lipopolysacharid a kapsulární polysacharidy) dle typu bakterie. Bakteriální buňky nacházející se v matici obsahují kromě proteinů, polysacharidů také vysokou koncentraci extracelulární DNA (eDNA), která hraje významnou roli v časně fázi tvorby biofilmu. V jádře biofilmu se nacházejí kanály iontů, které rozvádí živiny a vodu v biofilmové matici, kde se nachází vysoká koncentrace exopolymerních látek. Všechny uvedené exopolymerní látky tvoří ochranný obal kolem mikroorganismů.

V místě, kde působí enzymy na mikrobiální biofilm, dojde k rozrušení exopolymerní matrice a následnému uvolnění buněk. Buňky získají znovu svou mobilitu potřebnou pro kolonizaci nových povrchů (Lembre a kol., 2012).

Až v 80 % onemocnění hraje roli schopnost tvorby biofilmu. Zejména se to týká chorob močové soustavy a zánětů středního ucha (Römling a Balsalobre, 2012; Lopez a kol., 2010; Mangan a kol., 2002). Vhodné podmínky pro tvorbu biofilmu jsou na cizích tělesech v lidském těle, jako jsou kanyly, katétry či různé implantáty (Donlan, 2002).

Metody stanovení tvorby biofilmu lze rozdělit na fenotypové (Christensenova metoda, růst na agaru s kongo červení) a genotypové. Principem Christensenovy metody je schopnost bakterií rostoucí ve formě biofilmu adherovat na dno kultivační nádoby. Princip kultivace na agaru s kongo červení je morfologické rozlišení kolonií

biofilm pozitivních a negativních kmenů, kdy se kongo červeně specificky váže na polysacharidy, které jsou součástí EPS. Tímto způsobem lze rozlišit černě zbarvené biofilm pozitivní kmeny s krystalovou strukturou od červeně zbarvených biofilm negativních kmenů bakterií.

Genotypové metody slouží pro určení přítomnosti *ica* operonu, který kóduje produkci extracelulárního polysacharidového adhezínu, který se účastní při tvorbě biofilmu (Lee a kol., 2016; Solati a kol., 2015; Holá a kol., 2004; Freeman a kol., 1989).

2.4 Charakteristika vybraných bakteriálních druhů

Dále budou v textu popsány bakteriální druhy, se kterými bylo pracováno v rámci experimentální části diplomové práce.

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je gram pozitivní oportunní patogen, který způsobuje řadu onemocnění, jako jsou např. běžné kožní infekce, endokarditida, osteomyelitida a další. Příčinou závažných chronických onemocnění je tvorba biofilmu na lékařských implantátech, katétrech a poškozených tkáních (Chen a kol., 2016; Yarwood a kol., 2004).

Staphylococcus aureus může vytvářet vícevrstvý heterogenní biofilm (Archer a kol., 2014). Hlavní složkou biofilmové matrice je polysacharidový intercelulární adhezín (PIA) také označovaný jako polymerní N-acetylglukosamin, který se nachází u druhů *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. Syntéza PIA je založena na enzimech kódovaných geny intercelulárního adhezního operonu (*ica* operonu).

S. aureus produkuje několik extracelulárních proteáz, které štěpí extracelulární polymerní matici a umožní tak uvolnění buněk z biofilmu a tím kolonizaci nové lokality (Lister a Horswill, 2014; Kiedrowski a kol., 2011; Vuong a kol., 2005).

2.4.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis je součástí běžné mikroflóry lidské kůže. Na rozdíl od druhu *S. aureus*, který produkuje toxiny, souvisí patogenita *S. epidermidis* zejména se schopností tvořit biofilm. Jedná se o oportunního patogena kolonizujícího implantované zdravotnické pomůcky, např. centrální žilní katétr, umělé srdeční chlopně nebo umělé kloubní náhrady (Büttner a kol., 2015; Schommer a kol., 2011; Fey a Olson, 2010).

2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je gramnegativní nefermentující bakterie vyskytující se ve vodě, půdě, na rostlinách a v těle obratlovců. Jedná se o původce nozokomiálních nákaz, který může kolonizovat katétry, infuzní roztoky nebo dýchací přístroje. Onemocnění způsobené touto bakterií se nejčastěji týká pacientů se sníženou imunitou vlivem některých onemocnění, např. diabetes, autoimunitní choroby, cystická fibróza a pacientů s popáleninami. Mezi faktory, které přispívají k rozvinutí infekce, patří např. dlouhodobě zavedené cévky, tracheální kanyly a močové katétry (Jamal a kol., 2015; Votava, 2003).

P. aeruginosa vytváří tři typy exopolysacharidů (alginát, Pel a Psl), které stabilizují strukturu biofilmu. Význam a podíl každého exopolysacharidu v matrici se liší podle kmene. Například alginát je produkován mukoidními kmeny *P. aeruginosa*, které jsou často izolovány z plic pacientů trpících cystickou fibrózou (Lopez a kol., 2010). Pel a Psl jsou polysacharidy zapojené do počáteční fáze tvorby biofilmu (Rasamiravaka a kol., 2015).

2.4.4 *Burkholderia cenocepacia*

Burkholderia cenocepacia je gramnegativní nefermentující bakterie tyčinkovitého tvaru, řadící se do komplexu *Burkholderia cepacia*, který je složen z celkem 17 genomovarů. Tento oportunní patogen vyvolává infekci u pacientů s cystickou fibrózou nebo se sníženou imunitou (Fazli a kol., 2017; Loutet a Valvano, 2010). Nejznámější formou plicní exacerbace u nemocných s infekcí komplexem *B. cepacia* je tzv. cepacia syndrom. Jedná se o životu ohrožující septický stav při nekrotizující pneumonii (Fila, 2014).

2.4.5 *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia je gramnegativní nefermentující bakterie spojována s respiračními infekcemi. Vyskytuje se v různých prostředích např. ve vodě, půdě, na rostlinách. *S. maltophilia* se řadí mezi oportunní patogeny, které způsobují závažné infekce respiračního traktu, bakteriémie, infekce kostí, kloubů, močových cest a očí.

Patogenita *S. maltophilia* souvisí s produkcí proteáz, elastáz, a schopností adheze k syntetickým materiálům. Bakterie kolonizuje lékařské implantáty, katétry kde vytvářejí biofilm, který poskytuje ochranu před imunitním systémem hostitele nebo působením antimikrobiálních látek. Také se řadí mezi významné patogeny u pacientů s rakovinou, zejména u pacientů s obstrukčním karcinomem plic (Høiby a kol., 2017; Brooke, 2012; Nicodemo a Paez, 2007).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Bakteriální kmeny

Antimikrobiální aktivita byla testována na celkem 9 bakteriálních kmenech, které zahrnovaly 6 referenčních kmenů (tabulka 3) z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně (CCM, *Czech collection of microorganism*), České národní sbírky typových kultur (CNCTC, *Czech National Collection of Type Cultures*) a Belgické sbírky mikroorganismů (BCCM/LMG, *Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Laboratory of Microbiology Gent*) a 3 klinické izoláty (tabulka 4).

Tabulka 3: Referenční bakteriální kmeny

Druh	Číslo kmene	Materiál	Charakteristika kmene
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCM 7221	hemokultura	referenční kmen pro detekci biofilmu a <i>ica</i> operonu
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 3953	klinický izolát	referenční kmen pro testování citlivosti k antibiotikům
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4223	stěr z rány	referenční kmen pro testování citlivosti na meticilin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955	hemokultura	referenční kmen pro testování citlivosti k antibiotikům
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	LMG 16656	sputum, pacient s CF	elektroforetický typ ET12, genomvar IIIA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CNCTC 5537	klinický izolát	referenční kmen pro NEFERMtest 24, OXItest, mOXItest, ONPtest a ONPGtest

Klinické bakteriální kmeny byly vykultivovány ze vzorků sputa od pacientů trpících cystickou fibrózou (CF) v rámci mikrobiologického vyšetření na Ústavu mikrobiologie Fakultní nemocnice Olomouc (tabulka 4).

Tabulka 4: Klinické bakteriální kmeny

Druh	Číslo kmene	Materiál
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	CF5/358	sputum, pacient s CF
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CF5/362	sputum, pacient s CF
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CF5/363	sputum, pacient s CF

3.2 Testované látky

Byla testována antimikrobiální aktivita celkem 26 přírodních látek, gentamicinu a síranu měďnatého (tabulka 5). Počáteční molární koncentrace pro testování většiny látek byla $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, výjimkou byl krocin s počáteční koncentrací $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a gentamicin s $134 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tabulka 5: Přehled testovaných látek

Testované látky	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]
gentamicin	47,76	134
síran měďnatý	24,97	100
kyselina azelaová	18,82	100
kyselina kávová	18,02	100
karvakrol	15,02	100
katechin hydrát	29,03	100
p-kyselina kumarová	16,42	100
krocin B	97,70	10
kurkumin	36,84	100
kyselina 2,6-dihydroxybenzoová	15,41	100
kyselina 3,5-dihydroxybenzoová	15,41	100
kyselina 2,4-dihydroxyskořicová	18,02	100
kyselina gallová	17,01	100
hesperetin	30,23	100
kyselina 4-hydroxybenzoová	13,81	100
kyselina 4-hydroxyfenyloctová	15,22	100
kyselina isoferulicová	19,42	100
kyselina isovanilová	16,82	100
kyselina kynurenová	18,92	100
(±)-naringenin	27,23	100
kyselina šťavelová	9,00	100
kyselina protokatechuová	15,41	100
resveratrol	22,83	100
kyselina salicylová	13,81	100
kyselina salicylhydroxamová	15,31	100
kyselina sinapová	22,42	100
kyselina syringová	19,82	100
tropolon	12,21	100

3.3 Materiál

3.3.1 Média a chemikálie

Chemikálie

Acetonitril (kat. č. 271004, Sigma-Aldrich)

Bezvodá glukóza (lékárna Fakultní nemocnice Olomouc)

Deionizovaná voda

Ethanol p.a. (kat. č. 20025-A96, Lach-Ner)

Gentamicin (kat. č. G0124.0001, Duchefa)

Krystalová violet' (kat. č. C3886, Sigma-Aldrich)

Kyselina octová p.a. (kat. č. 19990-11000, Penta)

Matrice kyselina α -kyano-4-hydroxybenzoylová (kat. č. C8982-10X10MG, Sigma-Aldrich)

Methanol p.a. (kat. č. 20038-AT0, Lach-Ner)

Resazurin (kat. č. 199303, Sigma-Aldrich)

Síran měďnatý (kat. č. 451657, Sigma-Aldrich)

Šťavelan amonný p.a. (kat. č. 26750-30500, Penta)

Trifluoroctová kyselina (kat. č. 34957, Sigma-Aldrich)

Přírodní látky pro testování antimikrobiální aktivity

(\pm)-naringenin (kat. č. N5893, Sigma-Aldrich)

Hesperetin (kat. č. H4125, Sigma-Aldrich)

Karvakrol (kat. č. 282197, Sigma-Aldrich)

Katechin hydrát (kat. č. C1788, Sigma-Aldrich)

Krocin B (kat. č. 17304, Sigma-Aldrich)

Kurkumin (kat. č. C7727, Sigma-Aldrich)

Kyselina 2,4-dihydroxybenzoylová (kat. č. 663158, Sigma-Aldrich)

Kyselina 2,6-dihydroxybenzoová (kat. č. D109606, Sigma-Aldrich)

Kyselina 3,5-dihydroxybenzoová (kat. č. D110000, Sigma-Aldrich)

Kyselina 4-hydroxybenzoová (kat. č. 240141, Sigma-Aldrich)

Kyselina 4-hydroxyfenyloctová (kat. č. H50004, Sigma-Aldrich)

Kyselina azelaová (kat. č. 246379, Sigma-Aldrich)

Kyselina gallová (kat. č. G7384, Sigma-Aldrich)

Kyselina isoferulicová (kat. č. 05407, Sigma-Aldrich)

Kyselina isovanilová (kat. č. 220108, Sigma-Aldrich)

Kyselina kávová (kat. č. C0625, Sigma-Aldrich)

Kyselina kynurenová (kat. č. K3375, Sigma-Aldrich)
Kyselina protokatechuová (kat. č. 1579310, Sigma-Aldrich)
Kyselina salicylhydroxamová kat. č. S607, Sigma-Aldrich)
Kyselina salicylová (kat. č. S6271, Sigma-Aldrich)
Kyselina sinapová (kat. č. D7927, Sigma-Aldrich)
Kyselina syringová (kat. č. S6881, Sigma-Aldrich)
Kyselina šťavelová (kat. č. 241172, Sigma-Aldrich)
P-kyselina kumarová (kat. č. C9008, Sigma-Aldrich)
Resveratrol (kat. č. R5010, Sigma-Aldrich)
Tropolon (kat. č. T89702, Sigma-Aldrich)

Kultivační půdy a média

Brain heart infusion broth (kat. č. M210-100G, HiMedia)
Columbia agar s 7% ovčí krví (kat. č. PB5008A, Oxoid)
Kryobanka B (kat. č. PP64, ITEST)
Mueller-Hinton agar (kat. č. P00152A, Oxoid)

Antibiotika

Amikacin 30 µg (kat. č. 66148, Bio-Rad)
Ciprofloxacin 5 µg (kat. č. 68648, Bio-Rad)
Clindamycin 2 µg (kat. č. 66328, Bio-Rad)
Erythromicin 15 µg (kat. č. 66448, Bio-Rad)
E-test Gentamicin 0,016–256 µg·ml⁻¹ (kat. č. 512558, bioMérieux)
Gentamicin 10 µg (kat. č. 66608, Bio-Rad)
Ko-trimoxazol 25 µg (Trimethoprim + Sulfamethoxazol 1.25 + 23.75 µg, kat. č. 68898, Bio-Rad)
Levofloxacin 5 µg (kat. č. 66858, Bio-Rad)
Meropenem 10 µg (kat. č. 67048, Bio-Rad)
Oxacillin 1 µg (kat. č. 66888, Bio-Rad)
Tetracyklin 30 µg (kat. č. 67448, Bio-Rad)

3.3.2 Laboratorní vybavení a software

Analytické váhy KERN ABT (Kern)
Bambusová párátka (Spontex)
Biohazard Clean Air flow-box (Schoeller instruments)
Centrifugační zkumavky o objemu 50 ml (Biofil)
DEN-1B McFarland denzitometr (bioSan)
Hlubokomrazicí box s příslušenstvím (Sanyo)
Injekční stříkačka o objemu 10 ml (P-lab)
Kahan (Trystom s.r.o.)
Laboratorní inkubátor (termostat) Ecocell (BMT)
MALDI destička z leštěné oceli (Bruker)
MALDI TOF spektrometr Microflex™ LT Systém (Bruker)
MIC inokulátor (ježek) kalibrovaný na 1 µl (na zakázku, Trios)
Mikrotitrační destička P (Grama Group a.s.)
Mikrotitrační destička U (Grama Group a.s.)
Multikanálová pipeta (Eppendorf)
Petriho miska o průměru 9 cm (Gama Group a.s.)
Pipety o objemu 0,5–10 µl a 100–1000 µl (Eppendorf)
Program Flex Control 3.4 microflex MBT (Bruker)
Rukavice (P-lab)
Software Dynex technologies revelation 4.25 (Dynex technologies, Inc.)
Software MALDI Biotyper 3.1 (Bruker)
Sterilní plastové kličky (Helago)
Stojan na zkumavky (Inset)
Stříkačkový filtr millipore millex GP 0,22 µm (Merci)
Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

3.4 Metody

3.4.1 Kultivace bakterií

Bakteriální kmeny byly vočkovány z kryozkumavky (ITEST kryobanka B) sterilní bakteriologickou kličkou na Columbia krevní agar. Poté se plotna nechala kultivovat v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Bakteriální kmeny byly uchovávány v označených kryozkumavkách v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C.

3.4.2 Identifikace bakterií metodou MALDI-TOF MS

Identifikace pomocí MALDI-TOF MS byla prováděna na přístroji Microflex (Bruker) podle manuálu výrobce za použití matrice HCCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma-Aldrich). Matrice HCCA byla resuspendována v 1 ml standardního solventu (acetonitril 50%, voda 47,5% a trifluoroctová kyselina 2,5%) dle pokynů výrobce a následně homogenizována dokud nebyl roztok čirý.

Z 24 hodin staré bakteriální kultury byla pomocí bambusového párátko nanášena jedna bakteriální kolonie na terčík MALDI destičky. Po zaschnutí každého terčíku na destičce, byl vzorek převrstven 0,75 μ l roztoku matrice. Matrice se nechala zaschnout při pokojové teplotě. Takto připravená MALDI destička s jednotlivými vzorky byla vložena do hmotnostního spektrometru LT Microflex, kde bylo provedeno měření systémem MALDI-TOF MS. Identifikace bakteriálního kmene byla provedena porovnáním získaného hmotnostního spektra s databází typických spekter pomocí softwaru MALDI Biotyper 3.1.

Spolehlivost rodové a druhové identifikace bakterií byla určována pomocí hodnot skóre. Hodnota skóre ≥ 2 značila velmi spolehlivou identifikaci na úrovni rodu a pravděpodobnou identifikaci druhu. Hodnota skóre $\geq 1,7$ a < 2 udávala pravděpodobnou identifikaci na úrovni rodu. V případě nižší hodnoty než 1,7 byla identifikace bakterií považována za nespolehlivou.

3.4.3 Testování antimikrobiální aktivity

3.4.3.1 Difuzní disková metoda

Do zkumavky s 5 ml BHI bujónu (*Brain Heart Infusion*) byla sterilní bakteriologickou kličkou naočkována bakteriální kultura. Bakteriální suspenze byla homogenizována na vortexu. Zákal této suspenze byl změřen denzitometrem a případně upraven tak, aby vytvořený zákal odpovídal hodnotě 0,5 McFarlanda. Následně byla bakteriální suspenze inokulována přelitím na pevnou půdu, odpovídající kultivačním nárokům testované bakterie. Pro kmeny *Burkholderia cenocepacia* LMG 16656 a *Burkholderia cenocepacia* CF5/358 byl použit krevní agar, pro ostatní bakteriální kmeny Mueller-Hinton agar. Přbytek inokula byl slit do nádoby s dezinfekcí. Po zaschnutí bakteriální suspenze byly na půdu umístěny antibiotické disky.

Difuzní disková metoda sloužila pro stanovení citlivosti k vybrané sestavě antibiotik dle doporučení antibiotického střediska Ústavu mikrobiologie FN Olomouc. Sestava antibiotik pro grampozitivní bakterie byla složena z 8 antibiotik: erythromicin 15 μ g,

clindamycin 2 µg, ko-trimoxazol 25 µg, ciprofloxacin 5 µg, gentamicin 10 µg, tetracyklin 30 µg, levofloxacin 5 µg a oxacillin 1 µg. Sestava antibiotik pro gramnegativní bakterie obsahovala 5 antibiotik: gentamicin 10 µg, amikacin 30 µg, meropenem 10 µg, ciprofloxacin 5 µg a ko-trimoxazol 25 µg. Následně byly všechny misky inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 16–20 hodin.

Po inkubaci misek s antibiotiky byly změřeny průměry vytvořených inhibičních zón. Změřené průměry byly následně porovnány s tzv. klinickými breakpointy antibiotik (mezními hodnotami) uvedenými ve směrnici EUCAST.

Za citlivé bakteriální kmeny byly považovány ty, které měly průměr inhibičních zón větší nebo roven stanovené hranici. Bakterie, u kterých nebyla viditelná žádná inhibice růstu nebo průměr inhibičních zón byl menší než stanovená hranice, byla vyhodnocena za rezistentní k danému antibiotiku. V případě, když se změřený průměr inhibičních zón nacházel mezi mezními hodnotami, byla citlivost stanovena jako intermediární.

3.4.3.2 E-test

Další použitou metodou bylo stanovení citlivosti k antibiotikům pomocí diagnostických proužků E-test Gentamicin (0,016–256 µg·ml⁻¹, bioMérieux). Bakteriální suspenze byla připravena stejným způsobem jako při difuzní metodě (viz 3.4.3.1 *Difuzní disková metoda*). Poté byla bakteriální suspenze inokulována přelitím na pevnou půdu. Pro kmeny *Burkholderia cenocepacia* LMG 16656 a *Burkholderia cenocepacia* CF5/358 byl použit krevní agar, pro ostatní bakteriální kmeny Mueller-Hinton agar. Přebytek inokula byl slit do nádoby s dezinfekcí. Po zaschnutí bakteriální suspenze byl na půdu umístěn E-test. Následně byly všechny misky inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 16–20 hodin.

Po inkubaci byl vizuálně odečten výsledek E-testu a byla stanovena hodnota MIC. Inhibiční zóna má tvar elipsy, která protíná stupnici v místě odpovídající hodnotě MIC, kde koncentrace testovaného antibiotika inhibuje růst mikroorganismů.

3.4.3.3 Mikrodiluční metoda

Nejprve byl připraven BHI bujón, který byl následně rozpipetován po 50 µl do každé jamky mikrotitrační destičky v řadách B–H. Destičky byly do použití uchovávány při teplotě -60 °C. Dále byly připraveny zkumavky s 4 ml BHI, ve kterých byly resuspendovány testované látky. Výsledná koncentrace látek ve zkumavkách odpovídala 100 mmol·l⁻¹. Výjimkou byl krocin, jehož výsledná koncentrace ve zkumavce byla 10 mmol·l⁻¹ a gentamicin s výslednou koncentrací 134 mmol·l⁻¹.

Do jamek řady A bylo napipetováno 100 μl čistého BHI nebo BHI s testovanou látkou. Následně bylo provedeno ředění dvojkovou řadou pro připravení koncentrační řady 100–0,78 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrační řada u krocínu byla 10–0,078 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a u gentamicínu 134–1,05 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Dále byla připravena bakteriální suspenze. Koncentrace inokula byla upravena sterilní destilovanou vodou tak, aby bylo dosaženo koncentrace 1×10^8 buněk/ml. Inokulum bylo nalito do Petriho misky, ze které byla pomocí MIC inokulátoru, tzv. ježka, provedena inokulace jamek mikrotitrační destičky. Ježek byl před další inokulací vždy umístěn do 96% ethanolu a vyžhán. Mikrotitrační destičky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Po inkubaci byla vizuálně odečtena hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC). V destičce se stoupající koncentrací antimikrobiální látky se MIC stanovuje jako první jamka s čirým médiem bez zákalu.

Pro zjištění bakteriostatického a baktericidního působení byly jednotlivé jamky vyočkovány pomocí MIC inokulátoru na krevní agar. Pro každou destičku byly připraveny dva krevní agary, kde byly vyočkovány sloupce 1–6 a 7–12. Kmeny *Burkholderia cenocepacia* LMG 16656 a *Burkholderia cenocepacia* CF5/358 byly inkubovány při 30 °C po dobu 24 hodin. Ostatní testované bakteriální kmeny byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí inkubace byla odečtena hodnota minimální bakteriostatické koncentrace (MBS) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). Baktericidní účinek byl prokázán kultivačním testem na agarových půdách, kde nevyrostly žádné kolonie bakterií.

3.4.4 Modifikovaná Christensenova metoda

Pro průkaz tvorby biofilmu byla použita modifikovaná Christensenova metoda v mikrotitrační destičce. Schopnost biofilmu byla testována v bujónu (BHI, *Brain heart infusion*) bez příměsi glukózy a s přidavkem glukózy (0,25 % a 1 %). Médium s 0,25% přidavkem glukózy bylo následně použito při testování pro zvýšení schopnosti bakterií růst ve formě biofilmu. Byla připravena bakteriální suspenze. Zákal této suspenze byl změřen denzitometrem a případně upraven tak, aby vytvořený zákal odpovídal hodnotě 0,5 McFarlanda. Bakteriální suspenze byla rozpipetována po 200 μl do čtyř jamek mikrotitrační destičky typu P dle schématu (obrázek 14). Naočkované destičky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C v termostatu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK	CCM 3953	LMG 16656	CCM 3955	CF5/362							
B	NK	CCM 3953	LMG 16656	CCM 3955	CF5/362							
C	NK	CCM 3953	LMG 16656	CCM 3955	CF5/362							
D	NK	CCM 3953	LMG 16656	CCM 3955	CF5/362							
E	PK	CCM 4223	CF5/358	CNCTC 5537	CF5/363							
F	PK	CCM 4223	CF5/358	CNCTC 5537	CF5/363							
G	PK	CCM 4223	CF5/358	CNCTC 5537	CF5/363							
H	PK	CCM 4223	CF5/358	CNCTC 5537	CF5/363							

Obrázek 14: Schéma mikrotitrační destičky pro zjištění schopnosti růstu ve formě biofilmu. NK = negativní kontrola (BHI); PK = pozitivní kontrola (*Staphylococcus epidermidis* CCM 7221); *Staphylococcus aureus* (CCM 3953); *Staphylococcus aureus* (CCM 4223); *Burkholderia cenocepacia* (LMG 16656); *Burkholderia cenocepacia* (CF5/358); *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955); *Pseudomonas aeruginosa* (CNCTC 5537); *Pseudomonas aeruginosa* (CF5/362); *Stenotrophomonas maltophilia* (CF5/363).

Po inkubaci byla destička opatrně promyta vodou a po odstranění vody, byla provedena fixace methanolem po dobu 15 minut. Do každé jamky bylo přidáno 200 μ l 99% methanolu. Po odsátí methanolu a vysušení jamek mikrotitrační destičky bylo provedeno barvení fixované vrstvy biofilmu přidáním 160 μ l 1% roztoku krystalové violeti po dobu 10 minut. Roztok krystalové violeti (1%) byl připraven do 50ml zkumavky smícháním 20 ml zásobního roztoku krystalové violeti (5 g krystalové violeti a 200 ml ethanolu) a 30 ml šťavelanu amonného. Následně byla krystalová violet' uvolněna přidáním 160 μ l 33% kyseliny octové. Roztok kyseliny octové (33%) byl připraven také do 50ml zkumavky přidáním 16,5 ml kyseliny octové (99,8%) do 33,5 ml destilované vody.

Nárůst biofilmu byl hodnocen spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm a výsledkem byla hodnota optické denzity (OD). Hodnota OD odrážela akumulaci barviva na dně a stěnách jamky. Byla porovnávána OD jednotlivých jamek s tzv. 'cut off value', která byla vypočtena na základě naměřených hodnot OD negativních kontrol pomocí softwaru *Dynex technologie revelation 4.25*. Bakteriální kmeny s vyšší hodnotou 'cut off value' (+++) byly vyhodnoceny jako biofilmpozitivní. Kmeny s nižší hodnotou 'cut off value' (-/+ /++) byly považovány za biofilmnegativní.

3.4.5 Stanovení interference s tvorbou biofilmu

Byla testována interference testovaných látek s tvorbou bakteriálního biofilmu u referenčního kmene pro testování schopnosti tvořit biofilm *S. epidermidis* CCM 7221, tedy, že nedošlo k tvorbě biofilmu.

Nejprve byl po 50 μl rozpipetován BHI bujón s 0,25% příměsí glukózy do všech jamek v řadách B–H mikrotitrační destičky typu P. Destičky s bujónem byly do dalšího použití uchovávány při teplotě $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Do jamek řady A mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 μl čistého BHI jako negativní kontrola nebo 100 μl BHI s testovanou látkou. Následně bylo provedeno ředění dvojkovou řadou pro přípravu koncentrační řady $100\text{--}0,78\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrační řada u krocínu byla $10\text{--}0,078\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a u gentamicínu $134\text{--}1,05\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Poté byla připravena bakteriální suspenze s koncentrací 1×10^8 buněk/ml. Vzniklé inokulum bylo nalito na Petriho misku a pomocí MIC inokulátoru byly inokulovány jamky mikrotitrační destičky. Naočkované mikrotitrační destičky byly inkubovány při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin. Následující den byla odečtena hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC) a byla provedena modifikovaná Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách (viz kapitola 3.4.4 Modifikovaná Christensenova metoda).

Následně byla vizuálně zaznamenána minimální koncentrace látky inhibující růst ve formě biofilmu (MBIC), kdy bakterie netvořila biofilm, ale nacházela se v planktonické formě. A dále byla stanovena nejnižší koncentrace látky, která eradikovala biofilm (MBEC). Zda látka působí interferenčně na biofilm, bylo stanoveno srovnáním hodnot MBIC s hodnotou MIC. V případě zjištěné nižší koncentrace, než MIC, byla látka vyhodnocena jako účinná při zábraně růstu bakterií ve formě biofilmu.

3.4.6 Stanovení antibiofilmové aktivity

Testování antibiofilmové aktivity, tedy zda testovaná látka působí na narostlý biofilm, bylo provedeno u referenčního kmene pro detekci biofilmu *S. epidermidis* CCM 7221. Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50 μl BHI média s 0,25% přídavkem glukózy. Poté byla připravena bakteriální suspenze kmene *S. epidermidis* CCM 7221 stejným způsobem jako je popsáno v kapitole (viz 3.4.3.1 Difuzní disková metoda).

Připravená bakteriální suspenze byla použita k inokulaci všech jamek mikrotitračních destiček. Tyto destičky byly následně inkubovány při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin.

Dále byla připravena v mikrotitračních destičkách koncentrační řada testovaných látek. Nejprve byl po 100 μl rozpipetován BHI bujón do všech jamek v řadách B–H mikrotitrační destičky.

Do jamek řady A bylo napipetováno 200 μl BHI s testovanou látkou, které byly ředěny dvojkovou řadou pro přípravu koncentrační řady 100–0,78 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (krocin 10–0,078 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a gentamicin 134–1,05 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Po kultivaci při 37 °C po dobu 24 hodin bylo z každé jamky naočkovaných mikrotitračních destiček kmenem *S. epidermidis* CCM 7221 odsáto 50 μl média. Poté bylo do příslušných jamek destičky přidáno 50 μl média s testovanou látkou o určité koncentraci. Mikrotitrační destičky po výměně kultivačního média byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Následující den byl připraven 0,02% roztok resazurinu v destilované vodě (2 mg resazurinu bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody). Tento oxidoredukční indikátor byl sterilizován filtrací pomocí membrány millipore millex GP 0,22 μm . Viabilita buněk byla testována přidáním 20 μl resazurinu do všech jamek mikrotitrační destičky. Nakonec byla odečtena vizuální změna zbarvení jamek z modré na růžovou po 30 minutách a po 24 hodinové inkubaci při teplotě 37 °C. Životoschopné buňky účinněji redukovaly resazurin, což se projevilo změnou barvy na růžovou.

4 VÝSLEDKY

Výsledky v této diplomové práci byly získány v laboratořích na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc.

4.1 Identifikace bakterií metodou MALDI-TOF MS

Metodou MALDI-TOF MS bylo identifikováno celkem 9 bakteriálních kmenů, které byly použity pro testování antimikrobiální a antibiofilmové aktivity v rámci experimentální části práce. Výsledky identifikace s nejlepší shodou, která je vyjádřena hodnotou skóre, jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Výsledky identifikace metodou MALDI-TOF MS

Číslo kmene	Druh	Skóre
CCM 7221	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,969
CCM 3953	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,925
CCM 4223	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,086
LMG 16656	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	2,370
CF5/358	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	2,088
CCM 3955	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,331
CNCTC 5537	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,371
CF5/362	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,185
CF5/363	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,025

4.2 Testování citlivosti k antibiotikům

V rámci experimentů byla testována citlivost k antibiotikům pro stanovení antibiogramu testovacích kmenů. Diskovou difuzní metodou byla testována citlivost k sestavě antibiotik pro grampozitivní a gramnegativní bakterie. Pro stanovení citlivosti, respektive rezistence, k antibiotikům byly použity disky napuštěné antibiotiky o určité koncentraci a E-test Gentamicin (s koncentrací 0,016–256 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Pro interpretaci výsledků bylo použito srovnání s breakpointy dle EUCAST (Clinical breakpoints – bacteria verze 8.0, http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/, tabulka 7 a 8).

Naměřené průměry inhibičních zón jsou shrnuty v tabulce 9. Konečné vyhodnocení, tedy jestli je testovaný bakteriální kmen citlivý nebo rezistentní k danému antibiotiku, je uvedeno v tabulce 10. Odečtené hodnoty MIC z E-testu jsou uvedeny v tabulce 11.

Metodou E-test Gentamicin byla zjištěna citlivost ke gentamicinu u 4 bakteriálních kmenů: *S. aureus* CCM 3953, *S. aureus* CCM 4223, *P. aeruginosa* CCM 3955 a *P. aeruginosa* CNCTC 5537. Dle antibiogramu, byl kmen *S. epidermidis* CCM 7221

citlivý pouze ke dvěma testovaným antibiotikům: ko-trimoxazolu (25 µg) a tetracyklinu (30 µg).

Kmeny *B. cenocepacia* LMG 16656, *B. cenocepacia* CF5/358 a *P. aeruginosa* CF5/362 byly rezistentní ke všem testovaným antibiotikům. U bakteriálního kmene *S. maltophilia* CF5/363 byla stanovena pouze citlivost ke ko-trimoxazolu a k ostatním testovaným antibiotikům byl tento kmen rezistentní.

Tabulka 7: Klinické breakpointy dle EUCAST pro grampozitivní bakterie

Kmen	ERY	CMN	SXT	CIP	GMN	TET	LVX	OXC	GMN*
<i>S. epidermidis</i>	C _≥ 21	C _≥ 22	C _≥ 17	C _≥ 24	C _≥ 22	C _≥ 22	C _≥ 24	×	C _≤ 1
	R _{<} 18	R _{<} 19	R _{<} 14	R _{<} 24	R _{<} 22	R _{<} 19	R _{<} 24		R _{>} 1
<i>S. aureus</i>	C _≥ 21	C _≥ 22	C _≥ 17	C _≥ 21	C _≥ 18	C _≥ 22	C _≥ 22	×	C _≤ 1
	R _{<} 18	R _{<} 19	R _{<} 14	R _{<} 21	R _{<} 18	R _{<} 19	R _{<} 22		R _{>} 1

Sestava použitých antibiotik: ERY = erythromicin 15 µg; CMN = clindamycin 2 µg; SXT = ko-trimoxazol 25 µg; CIP = ciprofloxacin 5 µg; GMN = gentamicin 10 µg; TET = tetracyklin 30 µg; LVX = levofloxacin 5 µg; OXC = oxacillin 1 µg; * GMN= E-test Gentamicin (o koncentraci 0,016–256 µg·ml⁻¹); × = pro dané antibiotikum nejsou uvedeny ve směrnici EUCAST breakpointy

Tabulka 8: Klinické breakpointy dle EUCAST pro gramnegativní bakterie

Kmen	GMN	AKN	MEM	CIP	SXT	GMN*
<i>B. cenocepacia</i>	×	×	×	×	×	×
<i>P. aeruginosa</i>	C _≥ 15	C _≥ 18	C _≥ 24	C _≥ 26	×	C _≤ 4
	R _{<} 15	R _{<} 15	R _{<} 18	R _{<} 26		R _{>} 4
<i>S. maltophilia</i>	×	×	×	×	C _≥ 16	×
					R _{<} 16	

Sestava použitých antibiotik: GMN = gentamicin 10 µg; AKN = amikacin 30 µg; MEM = meropenem 10 µg; CIP = ciprofloxacin 5 µg; SXT = ko-trimoxazol 25 µg; * GMN= E-test Gentamicin (o koncentraci 0,016–256 µg·ml⁻¹); × = pro dané antibiotikum nejsou uvedeny ve směrnici EUCAST breakpointy

Tabulka 9: Naměřené průměry inhibičních zón (mm)

Kmen	ERY	CMN	SXT	CIP	GMN	TET	LVX	OXC	MEM	AKN
<i>S. epidermidis</i> CCM7221	0	0	25	0	15	26	0	0	–	–
<i>S. aureus</i> CCM 3953	30	27	27	22	22	29	27	0	–	–
<i>S. aureus</i> CCM 4223	30	27	27	22	22	29	22	0	–	–
<i>B. cenocepacia</i> LMG 16656	–	–	0	0	0	–	–	–	0	0

Tabulka 9: Naměřené průměry inhibičních zón (mm) – pokračování

Kmen	ERY	CMN	SXT	CIP	GMN	TET	LVX	OXC	MEM	AKN
<i>B.cenocepacia</i> CF5/358	–	–	0	0	0	–	–	–	0	0
<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	–	–	0	22	17	–	–	–	0	20
<i>P. aeruginosa</i> CNCTC 5537	–	–	0	35	17	–	–	–	0	22
<i>P. aeruginosa</i> CF5/362	–	–	0	20	13	–	–	–	0	11
<i>S. maltophilia</i> CF5/363	–	–	20	0	0	–	–	–	0	0

Sestava použitých antibiotik: ERY = erythromicin 15 µg; CMN = clindamycin 2 µg; SXT = ko-trimoxazol 25 µg; CIP = ciprofloxacin 5 µg; GMN = gentamicin 10 µg; TET = tetracyklin 30 µg; LVX = levofloxacin 5 µg; OXC = oxacillin 1 µg; MEM = meropenem 10 µg; AKN = amikacin 30 µg; – = nebylo testováno

Tabulka 10: Stanovení citlivosti/rezistence bakteriálních kmenů

Kmen	ERY	CMN	SXT	CIP	GMN	TET	LVX	OXC	MEM	AKN
<i>S. epidermidis</i> CCM7221	R	R	C	R	R	C	R	R	–	–
<i>S. aureus</i> CCM 3953	C	C	C	C	C	C	C	R	–	–
<i>S. aureus</i> CCM 4223	C	C	C	C	C	C	C	R	–	–
<i>B.cenocepacia</i> LMG 16656	–	–	R	R	R	–	–	–	R	R
<i>B.cenocepacia</i> CF5/358	–	–	R	R	R	–	–	–	R	R
<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	–	–	R	R	C	–	–	–	R	C
<i>P. aeruginosa</i> CNCTC 5537	–	–	R	C	C	–	–	–	R	C
<i>P. aeruginosa</i> CF5/362	–	–	R	R	R	–	–	–	R	R
<i>S. maltophilia</i> CF5/363	–	–	C	R	R	–	–	–	R	R

Sestava použitých antibiotik: ERY = erythromicin 15 µg; CMN = clindamycin 2 µg; SXT = ko-trimoxazol 25 µg; CIP = ciprofloxacin 5 µg; GMN = gentamicin 10 µg; TET = tetracyklin 30 µg; LVX = levofloxacin 5 µg; OXC = oxacillin 1 µg; MEM = meropenem 10 µg; AKN = amikacin 30 µg; R = rezistentní kmen; C = citlivý kmen; – = nebylo testováno; × = nebylo stanovení

Tabulka 11: Hodnoty minimální inhibiční koncentrace a stanovení rezistence/citlivosti ke gentamicinu dle E-testu

Kmen	MIC [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] *	Rezistence/citlivost
<i>S. epidermidis</i> CCM 7221	4	R
<i>S. aureus</i> CCM 3953	0,75	C
<i>S. aureus</i> CCM 4223	0,75	C
<i>B.cenocepacia</i> LMG 16656	>256	×
<i>B.cenocepacia</i> CF5/358	>256	×
<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	2	C
<i>P. aeruginosa</i> CNCTC 5537	3	C
<i>P. aeruginosa</i> CF5/362	8	R
<i>S. maltophilia</i> CF5/363	>256	×

* E-test Gentamicin (o koncentraci 0,016–256 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); R = rezistentní kmen; C = citlivý kmen; × = pro dané antibiotikum nejsou uvedeny ve směrnici EUCAST breakpointy

4.3 Antimikrobiální aktivita

Byla testována antimikrobiální aktivita gentamicinu, síranu měďnatého a 26 přírodních látek. Řada látek byla v BHI špatně rozpustná, což mohlo následně negativně ovlivnit jejich antimikrobiální působení (příloha 1). U látek byla mikrodiluční metodou zjištěna hodnota MIC. Po přeočkování na krevní agar bylo stanoveno, zda se jedná o látku s bakteriostatickým nebo baktericidním působením. Výsledky testování jsou shrnuty v tabulce 12–14. Výsledky testování antimikrobiální aktivity v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ koncentracích jsou uvedeny v příloze 2–4.

Gentamicin nevykazoval antimikrobiální účinky u 4 kmenů: *S. epidermidis* (CCM 7221), *B. cenocepacia* LMG 16656, *B. cenocepacia* CF5/358 a *S. maltophilia* CF5/363. Největší antimikrobiální účinky na všechny testované bakteriální kmeny vykazoval tropolon, kdy byla hodnota MIC $\leq 0,78 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Další účinnou látkou byl karvakrol. Růst gramnegativních kmenů inhibovala nejlépe kyselina salicylhydroxamová. Látky krocín, kurkumin, hesperetin, naringenin a resveratrol byly v testovaných koncentracích neúčinné na všechny testované bakteriální kmeny.

Výsledky testování antimikrobiální aktivity gentamicinu, síranu měďnatého a nejzajímavějších látek (kyseliny gallové, kyseliny salicylhydroxamové a tropolonu) za použití kmene *S. epidermidis* (CCM 7221) s označením hodnoty MIC jsou znázorněny na obrázcích 15 a 16. Všechny jamky byly pomocí inokulátoru vyočkovány na krevní agar pro stanovení MBS a MBC (obrázek 17).

Tabulka 12: Výsledky testování antimikrobiální aktivity mikrodiluční metodou v koncentracích $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ u kmene *Staphylococcus epidermidis* (CCM 7221), *Staphylococcus aureus* (CCM 3953) a *Staphylococcus aureus* (CCM 4223)

Látka	CCM 7221			CCM 3953			CCM 4223		
	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC
gentamicin	>134	–	–	4,19	–	4,19	8,38	–	8,38
síran měďnatý	6,25	6,25	12,50	6,25	6,25	12,50	6,25	6,25	12,50
k. azelaová	6,25	6,25	12,50	12,50	–	12,50	12,50	–	12,50
k. kávová	12,50	12,50	50	6,25	6,25	12,50	12,50	12,50	25
karvakrol	3,13	–	3,13	$\leq 0,78$	–	–	$\leq 0,78$	–	–
katechin hydrát	25	25	–	50	–	50	50	50	100
p-k. kumarová	12,50	–	12,50	50	–	50	50	50	100
k.2,6-dihydroxybenzoová	25	–	25	25	–	25	25	–	25
k.3,5-dihydroxybenzoová	25	–	25	12,50	12,50	50	25	25	50
k.2,4-dihydroxyskořicová	25	–	25	25	25	50	50	50	100
k. gallová	25	25	50	25	25	50	25	25	50
k. 4-hydroxybenzoová	12,50	–	12,50	25	–	25	25	25	50
k. 4-hydroxyfenyloctová	25	–	25	25	–	25	25	25	50
k. isoferulicová	50	50	–	50	50	–	50	50	–
k. isovanilová	12,50	12,50	–	12,50	12,50	–	12,50	12,50	–
k. kynurenová	25	–	25	25	25	–	25	25	–
k. šťavelová	6,25	6,25	12,50	12,50	12,50	25	12,50	12,50	25
k. protokatechuová	12,50	12,50	25	25	25	50	12,50	12,50	25
k. salicylová	12,50	12,50	25	12,50	12,50	25	12,50	12,50	25
k. salicylhydroxamová	12,50	12,50	–	25	25	–	25	25	–
k. sinapová	12,50	12,50	25	12,50	–	12,50	6,25	6,25	12,50
k. syringová	12,50	–	12,50	12,50	12,50	25	12,50	12,50	50
tropolon	0,39	0,39	3,13	$\leq 0,78$	$\leq 0,78$	6,25	$\leq 0,78$	$\leq 0,78$	12,50

MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBS = minimální bakteriostatická koncentrace; MBC = minimální baktericidní koncentrace

Tabulka 13: Výsledky testování antimikrobiální aktivity mikrodiluční metodou v koncentracích $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ u kmenů *Burkholderia cenocepacia* (LMG 16656), *Burkholderia cenocepacia* (CF5/358) a *Stenotrophomonas maltophilia* (CF5/363)

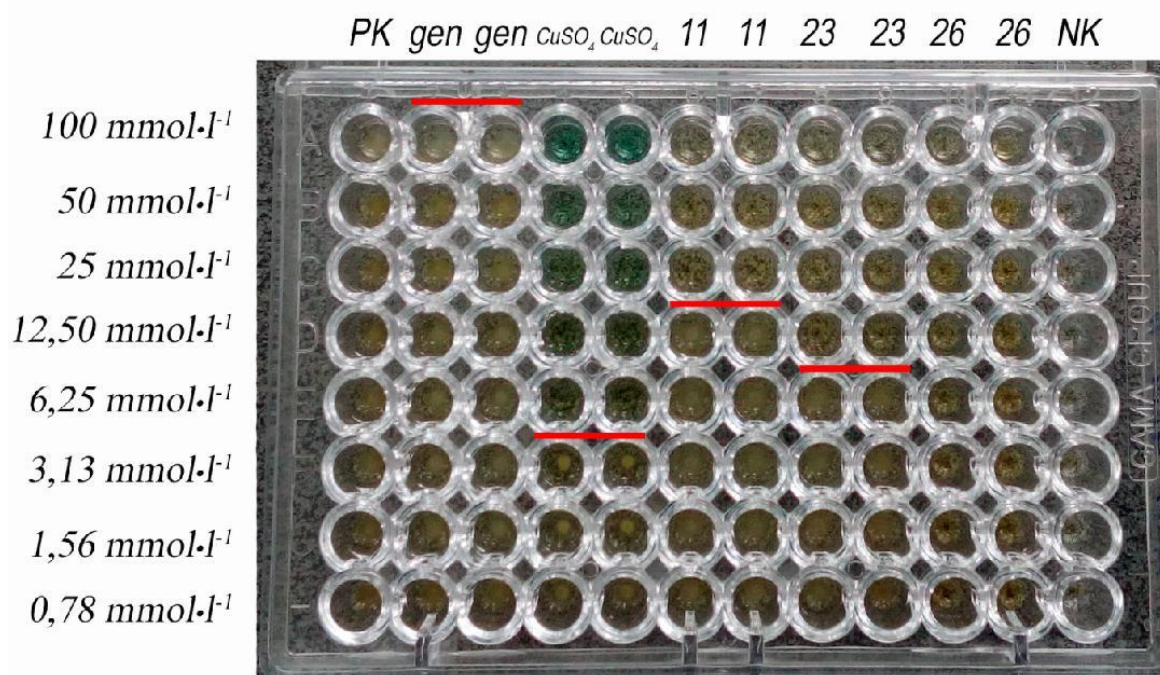
Látka	LMG 16656			CF5 358			CF5 363		
	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC
gentamicin	>134	–	–	>134	–	–	>134	–	–
síran měďnatý	12,50	–	12,50	12,50	–	12,50	6,25	6,25	12,50
k. azelaová	12,50	12,50	25	25	–	25	6,25	6,25	12,50
k. kávová	25	25	100	100	–	100	6,25	6,25	12,50
karvakrol	$\leq 0,78$	–	–	0,78	0,78	3,13	$\leq 0,78$	$\leq 0,78$	1,56
katechin hydrát	25	–	25	50	50	100	50	–	50
p-k. kumarová	50	–	50	50	50	100	6,25	6,25	12,50
k.2,6-dihydroxybenzoová	25	–	25	25	–	25	12,50	12,50	25
k.3,5-dihydroxybenzoová	12,50	12,50	25	25	–	25	12,50	12,50	25
k.2,4-dihydroxyskořicová	25	25	50	50	50	–	25	–	25
k. gallová	25	–	25	25	–	50	25	–	25
k. 4-hydroxybenzoová	25	–	25	25	–	25	12,50	12,50	25
k. 4-hydroxyfenyloctová	12,50	12,50	25	25	–	25	25	–	25
k. isoferulicová	25	25	50	50	50	–	25	25	50
k. isovanilová	12,50	–	12,50	12,50	12,50	25	12,50	–	12,50
k. kynurenová	12,50	12,50	25	25	25	–	25	–	25
k. šťavelová	12,50	–	12,50	12,50	–	12,50	6,25	–	6,25
k. protokatechuová	25	–	25	25	–	25	25	–	25
resveratrol	>100	–	–	>100	–	–	100	–	100
k. salicylová	12,50	–	12,50	12,50	12,50	25	6,25	6,25	12,50
k. salicylhydroxamová	$\leq 0,78$	–	–	3,13	3,13	6,25	3,13	3,13	25
k. sinapová	25	25	50	25	–	25	12,50	–	12,50
k. syringová	6,25	6,25	12,50	12,50	12,50	25	6,25	6,25	12,50
tropolon	$\leq 0,78$	–	–	$\leq 0,78$	–	–	$\leq 0,78$	–	–

MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBS = minimální bakteriostatická koncentrace; MBC = minimální baktericidní koncentrace

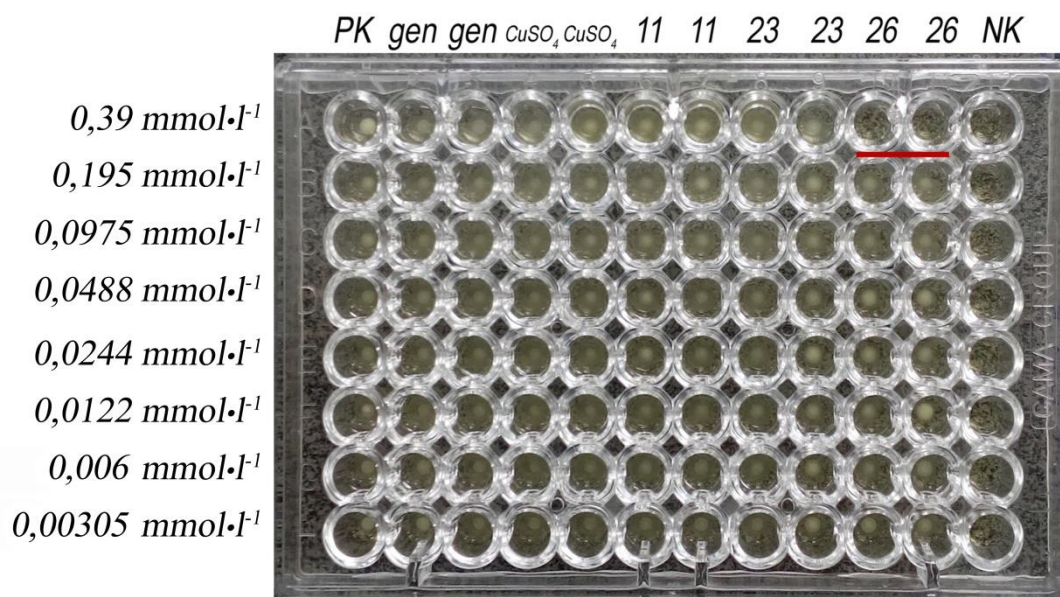
Tabulka 14: Výsledky testování antimikrobiální aktivity mikrodiluční metodou v koncentracích $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ u kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955), *Pseudomonas aeruginosa* (CNCTC 5537) a *Pseudomonas aeruginosa* (CF5/362)

Látka	CCM 3955			CNCTC 5537			CF5 362		
	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC
gentamicin	2,09	–	2,09	4,19	–	4,19	8,38	–	8,38
síran měďnatý	12,50	–	12,50	12,50	–	12,50	12,50	–	12,50
k. azelaová	25	–	25	25	–	25	12,50	–	12,50
k. kávová	100	–	100	100	–	100	50	50	100
karvakrol	12,50	–	12,50	3,13	–	3,13	12,50	–	12,50
katechin hydrát	100	100	–	50	50	100	50	–	50
p-k. kumarová	50	50	100	50	50	100	50	50	100
k.2,6-dihydroxybenzoová	25	–	25	25	–	25	25	–	25
k.3,5-dihydroxybenzoová	25	–	25	25	–	25	25	–	25
k.2,4-dihydroxyskořicová	50	50	100	50	50	–	50	50	–
k. gallová	25	–	25	25	–	25	25	–	25
k. 4-hydroxybenzoová	25	25	50	25	25	50	25	25	50
k. 4-hydroxyfenyloctová	25	25	50	25	25	50	12,50	12,50	25
k. isoferulicová	100	–	–	100	100	–	100	100	–
k. isovanilová	25	25	–	25	25	–	25	25	–
k. kynurenová	25	25	–	25	25	–	25	25	–
k. šťavelová	12,50	–	12,50	12,50	–	12,50	6,25	–	6,25
k. protokatechuová	25	–	25	25	–	25	25	–	25
k. salicylová	12,50	12,50	25	12,50	12,50	25	6,25	6,25	12,50
k. salicylhydroxamová	3,13	3,13	50	3,13	3,13	100	≤0,78	≤0,78	25
k. sinapová	25	–	25	25	–	25	12,50	12,50	25
k. syringová	12,50	12,50	25	12,50	12,50	25	12,50	12,50	25
tropolon	0,39	0,39	0,78	0,39	0,39	6,25	≤0,78	≤0,78	3,13

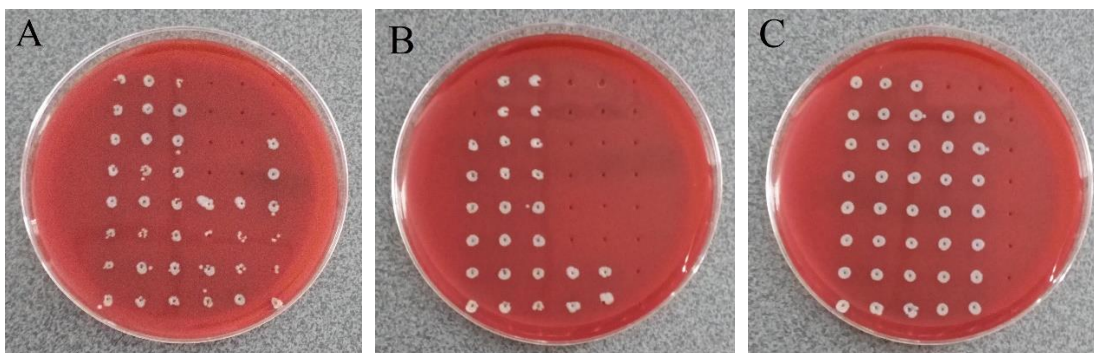
MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBS = minimální bakteriostatická koncentrace; MBC = minimální baktericidní koncentrace



Obrázek 15: Výsledek mikrodiluční metody u kmene *Staphylococcus epidermidis* (CCM 7221). PK = pozitivní kontrola (*S. epidermidis* CCM 7221); NK = negativní kontrola (BHI); testované látky: gen = gentamicin; $CuSO_4$ = síran měďnatý; 11 = kyselina gallová; 23 = kyselina salicylhydroxamová; 26 = tropolon.



Obrázek 16: Výsledek mikrodiluční metody u kmene *Staphylococcus epidermidis* (CCM 7221). PK = pozitivní kontrola (*S. epidermidis* CCM 7221); NK = negativní kontrola (BHI); testované látky: gen = gentamicin; $CuSO_4$ = síran měďnatý; 11 = kyselina gallová; 23 = kyselina salicylhydroxamová; 26 = tropolon.

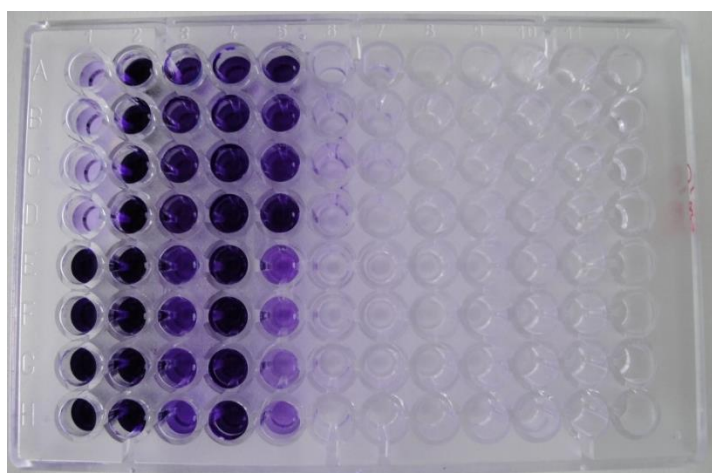


Obrázek 17: Stanovení MBS a MBC u kmene *S. epidermidis* (CCM 7221) na krevním agaru. (A) vyočkovány sloupce 1–6 z mikrotitrační destičky prezentované na obrázku 15; (B) vyočkovány sloupce 7–12 z mikrotitrační destičky prezentované na obrázku 15; (C) vyočkovány sloupce 7–12 z mikrotitrační destičky prezentované na obrázku 16

4.4 Modifikovaná Christensenova metoda

Pro průkaz tvorby biofilmu byla použita modifikovaná Christensenova metoda v mikrotitrační destičce. Schopnost biofilmu byla testována v BHI bez příměsí glukózy a s přidavkem glukózy (0,25% a 1%). Nejlepší nárůst bakterií ve formě biofilmu byl zaznamenán u destičky obsahující BHI s 0,25% přidavkem glukózy.

U bakteriálního kmene *Stenotrophomonas maltophilia* (CF5/363) nebyla stanovena schopnost tvořit biofilm. Všechny ostatní testované kmeny byly biofilm pozitivní. Schopnost tvorby biofilmu testovaných kmenů v BHI s přidavkem 0,25% glukózy je zobrazena na obrázku 18. Výsledné naměřené hodnoty optické denzity pro jednotlivé bakteriální kmeny jsou uvedeny v tabulce 15.



Obrázek 18: Výsledek testování schopnosti růst ve formě biofilmu modifikovanou Christensenovou metodou (rozmístění kmenů viz tabulka 15).

Tabulka 15: Naměřené hodnoty optické denzity

	1	2	3	4	5
A	(NK) 0.373	(CCM 3953) 3.999 +++	(LMG 16656) 2.625 +++	(CCM 3955) 2.921 +++	(CF5/362) 3.999 +++
B	(NK) 0.324	(CCM 3953) 3.999 +++	(LMG 16656) 2.280 +++	(CCM 3955) 3.432 +++	(CF5/362) 2.693 +++
C	(NK) 0.276	(CCM 3953) 3.999 +++	(LMG 16656) 2.796 +++	(CCM 3955) 3.215 +++	(CF5/362) 2.368 +++
D	(NK) 0.357	(CCM 3953) 3.999 +++	(LMG 16656) 2.273 +++	(CCM 3955) 3.999 +++	(CF5/362) 3.999 +++
E	(PK) 3.999	(CCM 4223) 3.999 +++	(CF5/358) 1.822 +++	(CNCTC 5537) 3.999 +++	(CF5/363) 0.698 ++
F	(PK) 3.999	(CCM 4223) 3.999 +++	(CF5/358) 1.824 +++	(CNCTC5537) 3.999 +++	(CF5/363) 0.606 +
G	(PK) 3.999	(CCM 4223) 3.999 +++	(CF5/358) 1.806 +++	(CNCTC5537) 3.620 +++	(CF5/363) 0.474 +
H	(PK) 3.999	(CCM 4223) 3.999 +++	(CF5/358) 1.348 +++	(CNCTC 5537) 3.999 +++	(CF5/363) 0.636 +

NK = negativní kontrola (BHI); PK = pozitivní kontrola (*Staphylococcus epidermidis* CCM 7221); *Staphylococcus aureus* (CCM 3953); *Staphylococcus aureus* (CCM 4223); *Burkholderia cenocepacia* (LMG 16656); *Burkholderia cenocepacia* (CF5/358); *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955); *Pseudomonas aeruginosa* (CNCTC 5537); *Pseudomonas aeruginosa* (CF5/362); *Stenotrophomonas maltophilia* (CF5/363); +++ biofilm pozitivní; -/+ +++ biofilm negativní

4.5 Stanovení interference s tvorbou biofilmu

Mimo antimikrobiální aktivitu byla testována schopnost interference testovaných látek s tvorbou bakteriálního biofilmu u referenčního kmene pro testování schopnosti tvořit biofilm *S. epidermidis* CCM 7221. Pro stanovení interference s tvorbou biofilmu byla použita modifikovaná Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách. Výsledky srovnání hodnot MIC a MBIC v $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ jsou uvedeny v tabulce 16. Nejsilnější interferenční účinek byl stanoven u látek: kyseliny 2,4-dihydroxyskořicové, kyseliny isoferulicové, naringenininu, resveratrolu a kyseliny sinapové. Tyto látky zamezovaly tvorbě biofilmu při nižší koncentraci, než byla hodnota MIC.

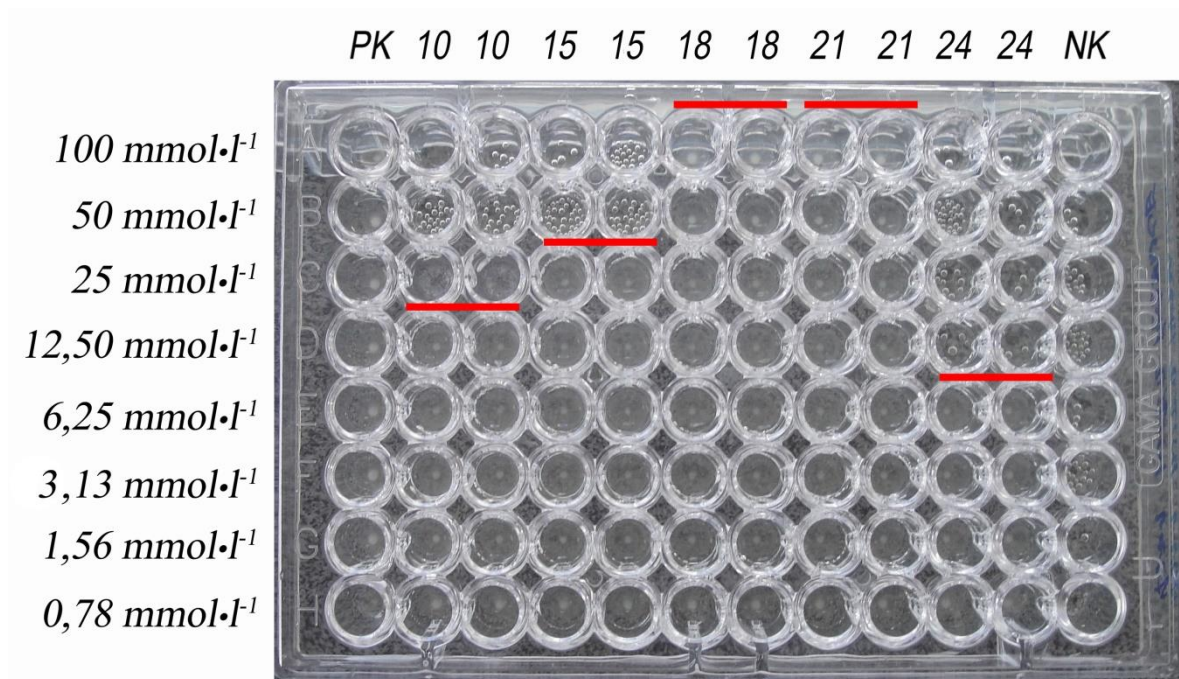
Hodnota MBIC u tropolonu byla stanovena menší nebo rovna $0,78 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci a hodnota MIC $0,39 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Protože interference s tvorbou biofilmu nebyla testována při nižší než $0,78 \text{ mmol/l}$ koncentraci, nelze hodnotu MBIC přesně stanovit a tak určit, zda tropolon zabraňuje tvorbě biofilmu při nižší koncentraci než je hodnota MIC.

Minimální inhibiční koncentrace u výše zmíněných látek je zobrazena na obrázku 19 a výsledky interference na obrázku 20.

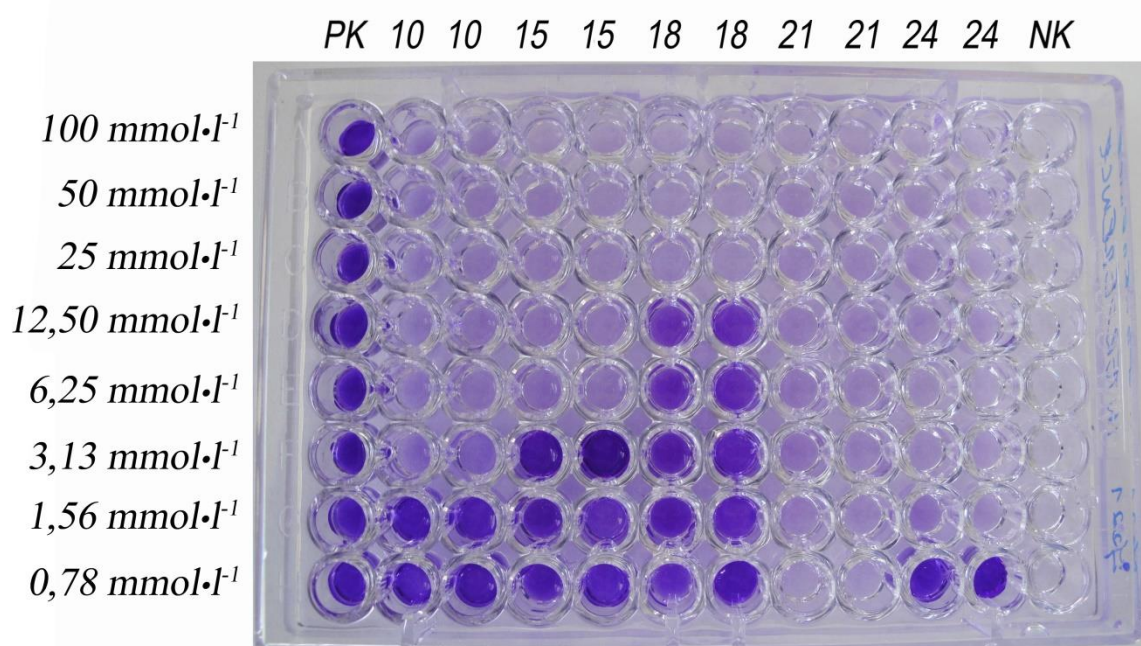
Tabulka 16: Minimální inhibiční koncentrace a koncentrace informující o interferenci biofilmu u kmene *Staphylococcus epidermidis* (CCM 7221)

Látka	MIC [mmol·l ⁻¹]	MBIC [mmol·l ⁻¹]	MBEC [mmol·l ⁻¹]	Interference
gentamicin	>134	134	>134	×
síran měďnatý	6,25	–	6,25	×
k. azelainová	6,25	–	6,25	×
k. kávová	12,5	–	12,5	×
karvakrol	3,13	1,56	3,13	I
katechin hydrát	25	12,50	25	I
p-k. kumarová	12,50	6,25	12,50	I
krocín B	>10	–	>10	×
kurkumin	>100	–	>100	×
k. 2,6-dihydroxybenzoová	25	12,50	25	I
k. 3,5-dihydroxybenzoová	25	12,50	25	I
k. 2,4-dihydroxyskořicová	25	3,13	25	I
k. gallová	25	–	25	×
hesperetin	>100	–	>100	×
k. 4-hydroxybenzoová	12,50	6,25	12,50	I
k. 4-hydroxyfenyloctová	25	12,50	25	I
k. isoferulicová	50	6,25	50	I
k. isovanilová	12,50	6,25	12,50	I
k. kynurenová	25	6,25	25	I
(±)-Naringenin	>100	25	>100	I
k. šťavelová	6,25	3,13	6,25	I
k. protokatechuová	12,50	–	12,50	×
resveratrol	>100	≤0,78	>100	I
k. salicylová	12,50	6,25	12,50	I
k. salicylhydroxamová	12,50	1,56	12,50	I
k. sinapová	12,50	1,56	12,50	I
k. syringová	12,50	1,56	12,50	I
tropolon	0,39	≤0,78	0,39	ND

MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBIC = minimální biofilm inhibující koncentrace; MBEC = minimální biofilm eradikující koncentrace; I = byla pozorována interference s tvorbou biofilmu, bylo zabráněno tvorbě biofilmu při nižší koncentraci než, byla hodnota MIC; × = nebyla pozorována interference s tvorbou biofilmu; ND = nebylo stanoveno



Obrázek 19: Stanovení MIC mikrodiluční metodou u kmene *S. epidermidis* (CCM 7221). PK = pozitivní kontrola (*S. epidermidis* CCM 7221); NK = negativní kontrola (BHI); testované látky: 10 = kyselina 2,4-dihydroxyskořicová; 15 = kyselina isoferulicová; 18 = naringenin; 21 = resveratrol; 24 = kyselina sinapová.

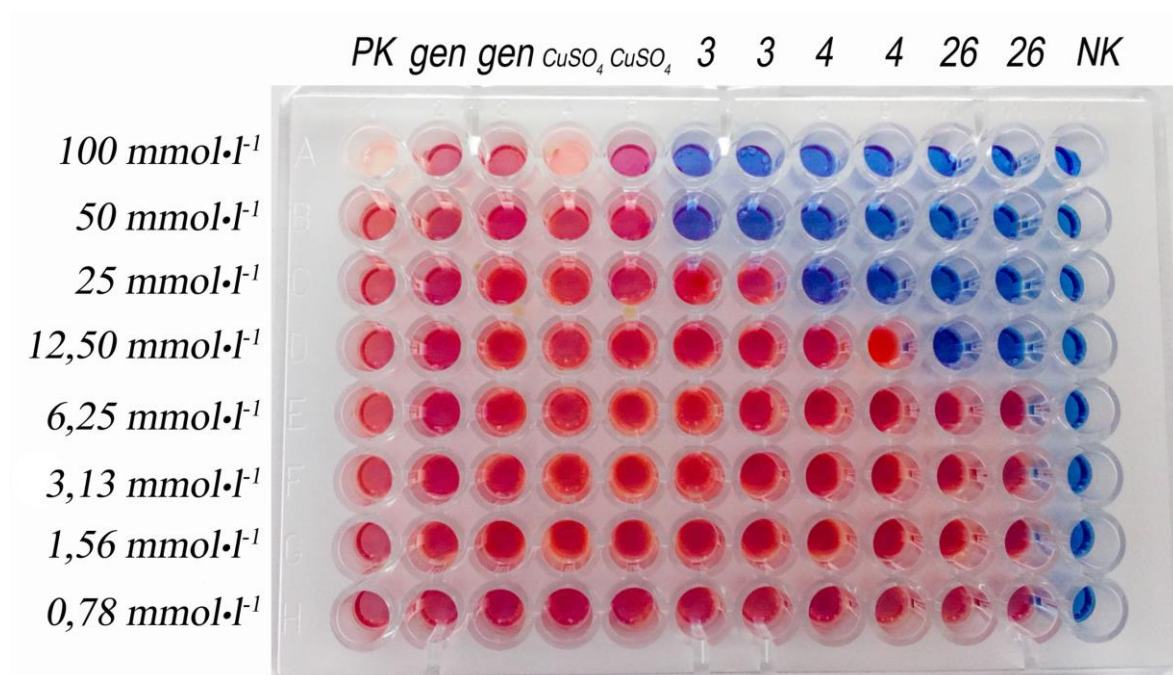


Obrázek 20: Interference s tvorbou biofilmu u kmene *Staphylococcus epidermidis* (CCM 7221). PK = pozitivní kontrola (*S. epidermidis* CCM 7221); NK = negativní kontrola (BHI); testované látky: 10 = kyselina 2,4-dihydroxyskořicová; 15 = kyselina isoferulicová; 18 = naringenin; 21 = resveratrol; 24 = kyselina sinapová.

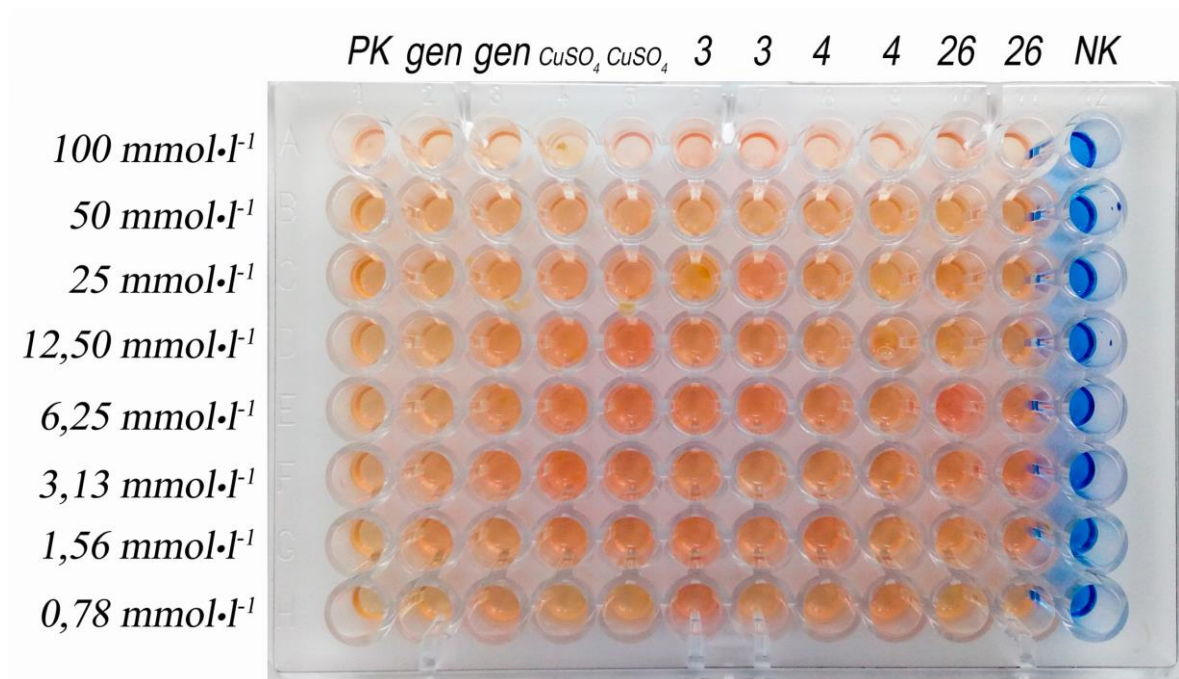
4.6 Stanovení antibiofilmové aktivity

V poslední části této práce byla testována antibiofilmová aktivita u referenčního kmene pro detekci biofilmu *S. epidermidis* CCM 7221. Zda testovaná látka působí na narostlý biofilm, bylo vizualizováno přidáním barviva resazurinu. Podle změny zbarvení z modré na růžovou po 30 minutové a 24 hodinové inkubaci při teplotě 37 °C byla stanovena viabilita buněk.

Z důvodu generační doby bakterie byla odečítána antibiofilmová aktivita po 30 minutové inkubaci, při které bylo pozorováno modré zbarvení pouze u 3 látek: karvakrolu ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), katechin hydrátu ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a tropolonu ($12,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) (obrázek 21). Tyto 3 látky pomaleji prostupovaly do vyzrálého biofilmu. Po 30 minutové inkubaci zmíněné látky neprostoupily do struktury biofilmu. Propustnost látek do biofilmu byla zaznamenána až po 24 hodinové inkubaci. Všechny ostatní testované látky na narostlý biofilm nepůsobily, což značilo růžové zbarvení jamek již po 30 minutové inkubaci. Po 24 hodinové inkubaci na biofilm nebylo pozorováno působení žádné z testovaných látek (obrázek 22).



Obrázek 21: Výsledek stanovení antibiofilmové aktivity testovaný u kmene *Staphylococcus epidermidis* (CCM 7221) odečtený po 30 minutách působení resazurinu. PK = pozitivní kontrola (*S. epidermidis* CCM 7221); NK = negativní kontrola (BHI); testované látky: gen = gentamicin; CuSO_4 = síran měďnatý; 3 = karvakrol; 4 = katechin hydrát; 26 = tropolon.



Obrázek 22: Výsledek stanovení antibiofilmové aktivity testovaný u kmene *Staphylococcus epidermidis* (CCM 7221) odečtený po 24 hodinách působení resazurinu. PK = pozitivní kontrola (*S. epidermidis* CCM 7221); NK = negativní kontrola (BHI); testované látky: gen = gentamicin; CuSO_4 = síran měďnatý; 3 = karvakrol; 4 = katechin hydrát; 26 = tropolon.

5 DISKUZE

Diplomová práce je zaměřena na studium antimikrobiální aktivity 26 přírodních látek, gentamicinu a síranu měďnatého. Mikrodiluční metodou byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje růst a množení testované bakterie. Dále bylo zjišťováno, zda se jedná o látku s bakteriostatickým nebo baktericidním účinkem. U referenčního kmene *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221 byla testována antibiofilmová aktivita a interference s tvorbou biofilmu.

Antimikrobiální aktivita byla testována na celkem 9 bakteriálních kmenech, které zahrnovaly 6 referenčních kmenů a 3 klinické izoláty. Jako referenční kmeny byly použity *S. epidermidis* CCM 7221, *S. aureus* CCM 3953, *S. aureus* CCM 4223, *B. cenocepacia* LMG 16656, *P. aeruginosa* CCM 3955, *P. aeruginosa* CNCTC 5537. Klinické bakteriální kmeny byly vykultivované ze vzorků sputa od pacientů trpících cystickou fibrózou a jednalo se o kmeny *B. cenocepacia* CF5/358, *P. aeruginosa* CF5/362, *S. maltophilia* CF5/363.

Mezi faktory, které mohly ovlivnit antimikrobiální účinnost látek, patří např. složení kultivačního média, testované mikroorganismy, extrakční metoda, pH a rozpustnost vzorku v kultivačním médiu (Rios a kol., 1988). Podle studie Aleksic a Knezevic (2014) antimikrobiální aktivitu komplikuje špatná rozpustnost přírodních látek a nestabilita. Pro zvýšení rozpustnosti se používají látky Tween 80 nebo dimethylsulfoxid, které ale mají antimikrobiální účinek. Řada testovaných látek byla v BHI špatně rozpustná, což mohlo následně negativně ovlivnit jejich antimikrobiální působení (příloha 1).

Z hlediska antimikrobiální aktivity bylo nejzajímavějších 5 látek, zahrnující gentamicin, síran měďnatý, kyselina gallová, kyselina salicylhydroxamová a tropolon.

Výsledky testování prezentované v této práci ukazují, že gentamicin působil baktericidně při hodnotách MIC $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *S. aureus* CCM 3953 a $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *S. aureus* CCM 4223, $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *P. aeruginosa* CCM 3955, $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *P. aeruginosa* CNCTC 5537 a $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *P. aeruginosa* CF5/362.

Ve studii Rodrigues a kol. (2017) byla testována antimikrobiální aktivita **gentamicinu** proti kmenům *S. aureus* a *P. aeruginosa*. U těchto kmenů byla mikrodiluční metodou zjištěna hodnota MIC a MBC. Hodnota MIC gentamicinu pro kmen *S. aureus* byla $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a MBC $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U bakteriálního kmene *P. aeruginosa* byla stanovena MIC gentamicinu $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a MBC $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ve studii byl použit Mueller-Hintonův bujón a vytvořená bakteriální suspenze měla hodnotu 1 McFarlanda.

Z výsledků vyplývá, že v této práci byl pozorován větší antimikrobiální efekt gentamicinu na testované kmeny než ve studii Rodrigues a kol. (2017). Rozdílné výsledky hodnot MIC mohou být způsobeny např. použitím kmenů s nižší citlivostí na antimikrobiální látky než v této práci. Ve studii byl použit také jiný typ média s odlišnou hustotou zákalu, což také mohlo ovlivnit naměřené hodnoty MIC.

Citlivost ke gentamicinu byla také testována metodou E-test. Byly zjištěny odchylky mezi výsledky MIC stanovenými mikrodiluční metodou a E-testem u grampozitivních kmenů: *S. epidermidis* CCM 7221, *S. aureus* CCM 3953 a *S. aureus* CCM 4223. Hodnoty MIC získané z E-testu u těchto kmenů byly $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $0,75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledné hodnoty MIC zjištěné mikrodiluční metodou byly pro uvedené kmeny $>64 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledky hodnot MIC stanovených u gramnegativních bakterií se nelišily.

Srovnáním mikrodiluční metody a E-testu se zabývala studie Prakash a kol. (2008), ve které bylo testováno MIC vankomycinu proti meticilin-rezistentnímu kmenu *S. aureus* (MRSA). V uvedené studii byly prokázány odchylky hodnot MIC mezi použitými metodami, což odpovídá výsledkům prezentovaných v předložené diplomové práci. Odchylky mezi výsledky MIC získanými z jednotlivých metod mohou být způsobeny např. jinou várkou použitého bujónu, použitím suspenze pro inokulaci o jiném zákalu atd. Metoda E-test je ovlivňována nejvíce schopností difuze antibiotika do agaru na rozdíl od mikrodiluční metody, kde naopak mohou vznikat odchylky během tvorby koncentrační řady (Amsler a kol., 2010).

Mikrodiluční metodou byla zjištěna hodnota MIC **síranu měďnatého** pro testované kmeny v rozmezí $6,25\text{--}12,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Na grampozitivní kmeny působil síran měďnatý bakteriostatickým účinkem na rozdíl od gramnegativních, kde byl pozorován baktericidní účinek. Ve studii Feßler a kol. (2017) se výrazně nelišila zjištěná hodnota MIC u testovaného kmene *S. aureus* RN4220, která byla $6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výsledky hodnot MIC získané v experimentální části této práce se shodují s poznatky uvedené ve studii.

Při testování **kyseliny gallové** byl pozorován bakteriostatický účinek na grampozitivní kmeny a naopak baktericidní účinek na gramnegativní kmeny. Hodnota MIC byla u všech testovaných kmenů $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, což odpovídá koncentraci $4,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ve studii Sanhueza a kol. (2017) byla testována antimikrobiální aktivita kyseliny gallové získána z hroznových výlisků proti referenčním kmenům *S. aureus* ATCC 6538 a *E. coli* ATCC 25922 a klinickým izolátům *S. aureus* (8298–2 a 8275), meticilin-rezistentní *S. aureus* (622–4 a 97–7) a *E. coli* (33.1, 16.1 a A2UC). Hodnota MIC pro testované kmeny byla v rozmezí od 1 500 do $3000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Výsledné hodnoty MIC fenolových kyselin proti kontrolnímu kmenu *S. aureus* ATCC 6538 získané v uvedené studii byly porovnány s výsledky MIC přírodních látek proti kmenům *S. aureus* (CCM 3953) a *S. aureus* (CCM 4223) použitých v experimentální části této práce (tabulka 17). Při testování antimikrobiální aktivity kyseliny gallové a dalších fenolových kyselin v rámci prezentované diplomové práce bylo dosaženo lepší účinnosti u testovaných bakteriálních kmenů, než ve zmíněné studii. Rozdíl mezi výsledky může být dán např. citlivostí testovaných kmenů nebo použitým bujónem pro testování, jak bylo zmíněno dříve. Bakteriostatický a baktericidní účinek fenolových kyselin nelze srovnat, protože ve studii Sanhueza a kol. (2017) nebyla uvedena hodnota MBC a MBS.

Tabulka 17: Srovnání výsledků MIC u kmene *S. aureus* ATCC 6538 ze studie Sanhueza a kol. (2017) a testovaných kmenů *S. aureus* (CCM 3953) a *S. aureus* (CCM 4223)

Látka	MIC [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]			
	Samostatné fenolové sloučeniny	Fenolové sloučeniny z extraktu *	Samostatné fenolové sloučeniny	
	ATCC 6538	ATCC 6538	CCM 3953	CCM 4223
k. gallová	1500	47	4,25	4,25
k. syringová	625	39	2,48	2,48
p- k. kumarová	1500	24	8,21	8,21
k. protokatechová	750	23	3,85	1,93

* fenolové sloučeniny získané z extraktu hroznových výlisků

Kyselina salicylhydroxamová byla účinnější na gramnegativní bakterie než grampozitivní. Ve studii Algadi a kol. (2017) byla difuzní diskovou metodou prokázána antimikrobiální aktivita proti kmenům *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Kyselina salicylhydroxamová nepůsobila na grampozitivní kmen *Bacillus subtilis* NCTC 8236. Stanovená zvýšená antimikrobiální aktivita kyseliny salicylhydroxamové proti gramnegativním kmenům v uvedené studii potvrdila výsledky získané v rámci této práce. Výjimkou byl kmen *S. aureus* ATCC 25923, který byl ve studii účinně inhibován kyselinou salicylhydroxamovou.

Nejúčinnější látkou při testování antimikrobiální aktivity pro všechny použité kmeny byl **tropolon** s hodnotou MIC $0,39 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. U této látky nelze srovnat naměřené hodnoty MIC s jinými výsledky, protože dosud nebyla provedena studie antimikrobiální aktivity tropolonu na bakteriální druhy použité v této práci.

Ve studii Donlin a kol. (2017) byl testován tropolon a jeho deriváty na kvasinku *Cryptococcus neoformans*. Tropolon nepůsobil cytotoxicky a inhiboval růst kryptokoka

při hodnotě MIC 0,024 mmol·l⁻¹. Nejúčinnějším inhibitorem byl thiotropolon, derivát tropolonu, s hodnotou MIC 0,0002 mmol·l⁻¹.

Dále byla v rámci prezentované diplomové práce testována schopnost tvorby biofilmu pomocí modifikované Christensenovy metody v mikrotitračních destičkách. Bakteriální kmen *S. maltophilia* CF5/363 jako jediný z devíti testovaných kmenů netvořil biofilm. Ve studii Madi a kol. (2016) bylo na průkaz tvorby biofilmu otestováno celkem 42 kmenů *S. maltophilia* izolovaných z pacientů s cystickou fibrózou. Byly zjištěny jak biofilm pozitivní, tak biofilm negativní kmeny.

Pomocí Christensenovy metody Pinheiro a kol. (2016) sledovali tvorbu biofilmu u bakteriálních kmenů *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus haemolyticus* izolovaných z krve pacientů z brazilské nemocnice. U kmene *S. epidermidis* byl zjištěn větší počet biofilm pozitivních bakterií než u *S. haemolyticus*. V této studii bylo použito jiné médium tzv. tryptózo-sójový bujón (TSB) s přidavkem 2% glukózy na rozdíl od zde použitého BHI s 0,25% přidavkem glukózy.

Studie Stepanović a kol. (2007) se zabývala jednotlivými kroky při průkazu tvorby biofilmu u stafylokoků. Zjistili, že největší odchylky od správného výsledku mohou vzniknout během testování při promývání destiček a volbě vhodného média. Kvůli zabránění narušení integrity biofilmu doporučují minimálně 3 opakované promytí za použití mikropipety. Jako kultivační médium je nejčastěji užíván tryptózo-sójový bujón (TSB). Dalším užívaným médiem je BHI. U obou médií je doporučován 0,25% až 4% přídavek glukózy.

Přídavkem glukózy do kultivačního média se zvyšuje schopnost bakterií tvořit biofilm. To bylo prokázáno ve studii Mathur a kol. (2006), ve které bylo testováno 152 klinických izolátů *Staphylococcus spp.* Ze 152 izolátů bylo v médiu bez glukózy stanoveno pouze 7 biofilm pozitivních kmenů. Po přidání 2% glukózy do BHI se zvýšil počet biofilm pozitivních kmenů na 70. Ve studii Veh a kol. (2015) a Knobloch a kol. (2002) byla také pro zlepšení schopnosti bakterií růst ve formě biofilmu přidána glukóza do média.

U kmene *S. epidermidis* CCM 7221 byla navíc testována schopnost interference přírodních látek, gentamicinu a síranu měďnatého na tvorbu bakteriálního biofilmu a antibiofilmová aktivita. Nejsilnější interferenční účinek byl zjištěn u pěti testovaných látek: kyselina 2,4-dihydroxyokořicová, kyselina isoferulicová, naringenin, resveratrol a kyselina sinapová. Růst a množení při těchto koncentracích látky není inhibováno, ale bakterie roste v planktonní formě, což má význam např. při antibiotické terapii. Buňky v planktonické formě jsou lépe eradikovány při použití antibiotik, mechanické očištění a dezinfekci než buňky v biofilmu.

Interferencí přírodní látky geraniolu na tvorbu bakteriálního biofilmu u kmene *S. epidermidis* se zabývala studie Kannappan a kol. (2017). Hodnota MBIC geraniolu byla $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a MIC byla $512 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato přírodní látka působila interferenčně při nižších koncentracích než MIC, jako výše zmíněné látky, které byly testovány v rámci prezentované práce.

Antibiofilmová aktivita byla testována u kmene *S. epidermidis* CCM 7221. Žádná z testovaných látek nebyla účinná natolik, aby prostoupila do struktury vyzrálého biofilmu.

Bakterie se schopností růst ve formě biofilmu jsou odolnější vůči působení antimikrobiálních látek. Problémem je, že hodnota MIC a MBC antibiotik proti bakteriím rostoucím ve formě biofilmu je 100–1000 krát vyšší než u bakterií rostoucích v planktonické formě. Také jsou tyto bakterie 150–3000 krát odolnější vůči působení dezinfekčních prostředků (Paraje, 2011).

Stejnou problematikou se zabývala studie Holá a kol. (2004), ve které bylo použito 45 kmenů *S. epidermidis* izolovaných z hemokultur pacientů s příznaky sepse. Ve studii byl použit stejný referenční biofilm pozitivní kmen *S. epidermidis* CCM 7221. Práce se zabývala antimikrobiální aktivitou antibiotik a porovnáním hodnot MIC s minimální biofilm inhibující koncentrací (MBIC) a minimální biofilm eradikující koncentrace (MBEC). Hodnoty MBIC i MBEC mnohonásobně přesahovaly hodnoty MIC. Výsledkem této studie je zjištění, že pouhé stanovení MIC nestačí ke zjištění koncentrace antibiotika, která je schopna účinně zlikvidovat mikrobiální buňky v biofilmu.

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla mikrodiluční metodou testována antimikrobiální aktivita 26 přírodních látek, gentamicinu a síranu měďnatého. Celkově nejúčinnější látkou byl tropolon, který inhiboval růst všech 9 testovaných bakteriálních kmenů již při velmi nízkých koncentracích. Zcela neúčinné byly látky krocín, kurkumin, hesperetin, naringenin a resveratrol.

Při průkazu tvorby biofilmu byla použita Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách. Bylo zjištěno, že jen jeden bakteriální kmen *Stenotrophomonas maltophilia* (CF5/363) z testovaných netvořil biofilm.

Otestováním antibiofilmové aktivity na bakteriálním kmeni *S. epidermidis* CCM 7221 bylo prokázáno, že žádná z testovaných látek nepůsobila na narostlý bakteriální biofilm. Některé látky (kyselina 2,4-dihydroxyskořicová, kyselina isoferulicová, naringenin, resveratrol a kyselina sinapová) ovšem působily interferenčně na schopnost tvorby biofilmu v nižších koncentracích než je MIC.

Většina přírodních látek byla účinná při vysokých koncentracích. Přírodní látky by se mohly užívat v kombinaci s antibiotiky, kdy by mohlo dojít ke snížení potřebné dávky nebo ke zvýšení účinnosti antibiotika. Působením přírodních látek může dojít k zabránění schopnosti bakterie vytvářet biofilm, kdy bakterie v planktonní formě mohou být účinněji léčeny s použitím nižší dávky antibiotika, než při eradikaci bakterií rostoucích ve formě biofilmu.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Afrouzan** H., Tahghighi A., Zakeri S. a Es-haghi A. (2018) Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. *Iranian Biomedical Journal* **22**(1), 50–65
- Al azzam** K. M. a El kassed W. (2017) New, simple, sensitive and validated spectrophotometric method for the determination of salicylhydroxamic acid in capsules and raw material according to the ICH guidelines. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* **4**(4), 345–349
- Aleksic** V. a Knezevic P. (2014) Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research* **169**(4), 240–254
- Algadi** D. M., Seif A. a Algielani A. (2017) Synthesis, Characterization and Biocidal Studies of Salicylhydroxamic acid and phthalic Salicylhydroxamic acid. *European Journal of Academic Essays* **4**(4), 138–140
- Al-zahrani** S. H.M. (2012) Antibacterial activities of gallic acid and gallic acid methyl ester on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of American Science* **8**(2), 7–12
- Amsler** K., Santoro C., Foleno B., Bush K. a Flamm R. (2010) Comparison of Broth Microdilution, Agar Dilution, and Etest for Susceptibility Testing of Doripenem against Gram-Negative and Gram-Positive Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* **48**(9), 3353–3357
- Anandha babu** G., Mohanapriya S.K., Ramasamy P. a Chandramohan A. (2011) Studies on the synthesis, growth, crystal structure, and physical properties of a novel nonlinear optical crystal: Glycine 3,5-dihydroxybenzoic acid. *Journal of Crystal Growth* **318**(1), 1021–1025
- Archer** N. K., Mazaitis M. J., Costerton J. W., Leid J. G., Powers M. E. a Shirliff M. E. (2014) *Staphylococcus aureus* biofilms. *Virulence* **2**(5), 445–459
- Bae** E-A, Han M. a Kim D-H. (1999) In vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Some Flavonoids and Their Metabolites. *Planta Medica* **65**(5), 442–443
- Brooke** J. S. (2012) *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* **25**(1), 2–41
- Burchacka** E., Potaczek P., Padaszyński P., Karłowicz-Bodalska K., Han T. a Han S. (2016) New effective azelaic acid liposomal gel formulation of enhanced pharmaceutical bioavailability. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **83**, 771–775

- Bursová Š.**, Dušková M., Necedová L., Karpíšková R. a Myšková P. (2014) *Mikrobiologické laboratorní metody* Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. **1**, 56–59
- Büttner H.**, Mack D. a Rohde H. (2015) Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **5**(14), 1–15
- Cowan M. M.** (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**(4), 564–582
- Cueva C.**, Moreno-Arribas M. V., Martín-Álvarez P. J., Bills G., Vicente M. F., Basilio A., Rivas C. L., Requena T., Rodríguez J. M. a Bartolomé B. (2010) Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology* **161**(5), 372–382
- Cushnie T. P. T.** a Lamb A. J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**(5), 343–356
- Dağdelen A.** (2016) Identifying Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Phenolic Extracts and Mineral Contents of Virgin Olive Oils (*Olea europaea* L. cv. Edincik Su) from Different Regions in Turkey. *Journal of Chemistry* **2016**, 1–12
- Daglia M.** (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* **23**(2), 174–181
- Del olmo A.**, Calzada J. a Nuñez M. (2015) Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure, and controversy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**(14), 3084–3103
- Denny C.**, Mělo P. S., Franchin M., Massarioli A. P., Bergamaschi K. B., De alencar S. M. a Rosalen P. L. (2013) Guava pomace: a new source of anti-inflammatory and analgesic bioactives. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **13**(235), 1–8.
- De R.**, Kundu P., Swarnakar S., Ramamurthy T., Chowdhury A., Nair G. B. a Mukhopadhyay A. K. (2009) Antimicrobial Activity of Curcumin against *Helicobacter pylori* Isolates from India and during Infections in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**(4), 1592–1597
- Dimkić I.**, Ristivojević P., Janakiev T., Berić T., Trifković J., Milojković-Opsenica D. a Stanković S. (2016) Phenolic profiles and antimicrobial activity of various plant resins as potential botanical sources of Serbian propolis. *Industrial Crops and Products* **94**(1), 856–871

- Dolejšká M.** (2008) *Escherichia coli* a koliformní bakterie rezistentní k antimikrobiálním látkám na mléčných farmách v České republice. Brno, Rigorózní práce. Masarykova univerzita.
- Donlan R.** (2002) M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* **8**(9), 881–890
- Donlin M. J., Zunica A., Lipnicky A., a kol.** (2017) Troponoids Can Inhibit Growth of the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **61**(4), 02574–16
- Dufour D., Leung V. a Lévesque C. M.** (2010) Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics* **22**(1), 2–16
- Fazli M., Rybtke M., Steiner E., Weidel E., Berthelsen J., Groizeleau J., Bin W., Zhi B. Z., Yaming Z., Kaefer V., Givskov M., Hartmann R. W., Eberl L. a Tolker-Nielsen T.** (2017) Regulation of *Burkholderia cenocepacia* biofilm formation by RpoN and the c-di-GMP effector BerB. *MicrobiologyOpen* **6**(4), 1–13
- Febler A. T., Zhao Q., Schoenfelder S., Kadlec K., Brenner Michael G., Wang Y., Ziebuhr W., Shen J. a Schwarz S.** (2017) Complete sequence of a plasmid from a bovine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring a novel ica-like gene cluster in addition to antimicrobial and heavy metal resistance genes. *Veterinary Microbiology* **200**, 95–100
- Fey P. D. a Olson M. E.** (2010) Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiology* **5**(6), 917–933
- Fila L.** (2014) Cystická fibróza u dospělých. *Interní medicína* **16**(2), 54–60
- Flores N., Sirés I., Rodríguez R. M., Centellas F., Cabot P. L., Garrido J, A. a Brillas E.** (2017) Removal of 4-hydroxyphenylacetic acid from aqueous medium by electrochemical oxidation with a BDD anode: Mineralization, kinetics and oxidation products. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **793**, 58–65
- Freeman D. J., Falkiner F. R. a Keane C. T.** (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* **42**(8), 872–4
- Ghasemzadeh A., Jaafar H. a Karimi E.** (2012) Involvement of Salicylic Acid on Antioxidant and Anticancer Properties, Anthocyanin Production and Chalcone Synthase Activity in Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Varieties. *International Journal of Molecular Sciences* **13**(11), 14828–14844

- Goering** R. V., Dockrell H. M., Zuckerman M. A. a Chiodini P. L. a Julák, J. (2016) *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, str. 463. ISBN 978-807-3879-280.
- Goleniowski** M., Bonfill M, Cusido R. a Palazón J. (2013) Phenolic Acids. *Natural Products* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1951–1973
- Guillén-Román** C. J., Guevara-González R. G., Rocha-Guzmán N. E., Mercado-Luna A. a I. Pérez-Pérez M. C. (2018) Effect of nitrogen privation on the phenolics contents, antioxidant and antibacterial activities in *Moringa oleifera* leaves. *Industrial Crops and Products*; **114**(1), 45–51
- Heim** K. E., Tagliaferro A. R. a Bobilya D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **13**(10), 572
- Høiby** N., Bjarnsholt T., Moser C., et al. (2017) Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. *Journal of pathology microbiology and immunology* **125**(4), 339–343
- Holá** V., Růžička F., Tejkalová R. a Votava M. (2004) Stanovení citlivosti k antibiotikům u biofilmopozitivních forem mikroorganismů. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství 2004* **10**(5), 218–222
- Hoshyar** R., Khayati G. R., Poorgholami M. a Kaykhani M. (2016) A novel green one-step synthesis of gold nanoparticles using crocin and their anti-cancer activities. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **159**, 237–242
- Hwang** D. a Lim Y-H. (2015) Resveratrol antibacterial activity against *Escherichia coli* is mediated by Z-ring formation inhibition via suppression of FtsZ expression. *Scientific Reports* **5**(1), 1–10
- Chanakul** A., Traiphol R. a Traiphol N. (2016) Colorimetric sensing of various organic acids by using polydiacetylene/zinc oxide nanocomposites: Effects of polydiacetylene and acid structures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **489**(1), 9–18
- Charnock** C., Brudeli B. a Klaveness J. (2004) Evaluation of the antibacterial efficacy of diesters of azelaic acid. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **21**(5), 589–596.
- Chen** Y., Liu T., Wang K., Hou Ch, Cai S., Huang Y., Du Z., Huang H., Kong J. a Chen Y. (2016) Baicalein Inhibits *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and the Quorum Sensing System In Vitro. *PLOS One* **11**(4), 1–18
- Ikigai** H., Nakae T., Hara Y. a Shimamura T. (1993) Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1147**(1), 132–136

- Iranshahi M.**, Rezaee R., Parhiz H., Roohbakhsh A. a Soltani F. (2015) Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life Sciences* **137**, 125–132
- Jairajpuri D. S.** a Jairajpuri Z. S. (2016) Isoferulic acid action against glycation-induced changes in structural and functional attributes of human high-density lipoprotein. *Biochemistry* **81**(3), 289–295
- Jamal M.**, Tasneem U., Hussain T. a Andleeb S. (2015) Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology* **4**(3), 1–14
- Kannappan A.**, Sivaranjani M., Srinivasan R., Rathna J., Pandian S.K. a Ravi A.V. (2017) Inhibitory efficacy of geraniol on biofilm formation and development of adaptive resistance in *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Journal of medical microbiology* **66**, 1506–1515
- Kiedrowski M. R.**, Kavanaugh J. S., Malone C. L., Mootz J. M., Voyich J. M., Smeltzer M. S., Bayles K.W. a Horswill A. R. (2011) Nuclease Modulates Biofilm Formation in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLOS One* **6**(11), 1–16
- Knobloch J.**, Horstkotte M., Rohde H. a Mack D. (2002) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol.* **191**(2), 101–106
- Knowles J. R.**, Roller S., Murray D. B. a Naidu A.S. (2005) Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(2), 797–803
- Kolář M.** (2000) *Antibiotická léčba v praxi*. Konice: Solen, str. 7–12. ISBN 80-238-58351.
- Kolář M.**, Látal T. a Čermák P. (2002) *Klinicko-mikrobiologické podklady racionální antibiotické léčby*. Praha: TRIOS, str. 10,11,51-52. ISBN 80-238-9301-7.
- Koukalová D.** a kol. (2009) *Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie I.* 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, str. 55–62. ISBN 978-802-4422-664.
- Kumar N.** a Pruthi V. (2014) Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports* **4**, 86–93
- Lai L-J.**, Chiu J-M. a Chiou R. Y-Y. (2017) Fresh preservation of alfalfa sprouts and mushroom slices by soaking with thymol and resveratrol solutions. *Food Science and Nutrition* **5**(3), 776–783

- Lasienė K.**, Straukas D., Vitkus A. a Juodžiukynienė N. (2016) The influence of copper sulphate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) on the embryo development in the guppies (*Poecilia reticulata*). *Italian Journal of Animal Science* **15**(3), 529–535
- Lebeaux D.**, Leflon-Guibout V., Ghigo J.-M. a Beloin C. (2015) In vitro activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**(6), 1704–1712
- Lee J-S.**, Bae Y-M., Han A. a Lee S-Y. (2016) Development of Congo red broth method for the detection of biofilm-forming or slime-producing *Staphylococcus sp.* *LWT - Food Science and Technology* **73**(1), 707–714
- Lembre P.**, Lorentz C. a Di P. (2012) Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World. *The Complex World of Polysaccharides* (13) ISBN 978-953-51-0819-1
- Limpisophon K.** a Schleining G. (2017) Use of Gallic Acid to Enhance the Antioxidant and Mechanical Properties of Active Fish Gelatin Film. *Journal of Food Science* **82**(1), 80–89
- Lister J. L.** a Horswill A. R. (2014) *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**, 1–9
- Liu J.**, Meng Ch-G., Liu S., Kan J. a Jin Ch-H. (2017a) Preparation and characterization of protocatechuic acid grafted chitosan films with antioxidant activity. *Food Hydrocolloids* **63**, 457–466
- Liu M.**, Amini A. a Ahmad Z. (2017b) Safranal and its analogs inhibit *Escherichia coli* ATP synthase and cell growth. *International Journal of Biological Macromolecules* **95**, 145–152
- Lopez D.**, Vlamakis H. a Kolter R. (2010) Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**(7), 398–398
- Loutet S. A.** a Valvano M. A. (2010) A Decade of *Burkholderia cenocepacia* Virulence Determinant Research. *Infection and Immunity* **78**(10), 4088–4100
- Lou Z.**, Wang H., Rao S, Sun J., Ma Ch. a Li. J. (2012) P-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control* **25**(2), 550–554
- Madi H.**, Lukić J., Vasiljević Z., Biočanin M., Kojić M., Jovčić B. a Lozo J. (2016) Genotypic and Phenotypic Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains from a Pediatric Tertiary Care Hospital in Serbia. *Plos One* **11**(10), 165660
- Mangan D. F.**, Moy P., Agodoa L. a Lundberg M. S. (2002) Research on microbial biofilms. *National Institute of Dental and Craniofacial Research*

- Marcániková K.** a **Beňová B.** (2010) Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek. *Chemické listy* **104**(1.), 27–30
- Mathur T.**, **Singhal S.**, **Khan S.**, **Upadhyay DJ.**, **Fatma T.** a **Rattan A.** (2006) Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* **24**(1), 25–29
- Mičuda S.**, **Grim J.**, **Cermanová J.** a **Martínková J.** (2002) Solutio - příruční kniha pro lékárny. *Antibiotika* 6. Praha: MEDON
- Mokhtar S. I.** a **Aziz N. A. A.** (2015) Organic Acid Content and Antimicrobial Properties of *Eleiodoxa conferta* Extracts at Different Maturity Stages. *Journal of Tropical Resources and Sustainable Sciences*. **3**, 72–76.
- Muthulakshmi S.** a **Saravanan R.** (2013) Efficacy of azelaic acid on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet induced type 2 diabetic mice. *Biochimie* **95**(6), 1239–1244
- Nakhaei M. M.** (2010) In vitro antibacterial activity of saffron (*Crocus sativus L.*) extract and its two major constituents against *Helicobacter pylori*. *Planta Medica* 76 - P496
- Nićiforović N.** a **Abramovič H.** (2014) Sinapic Acid and Its Derivatives: Natural Sources and Bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**(1), 34–51
- Nicodemo A. C.** a **Paez J. I. G.** (2007) Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **26**(4), 229–237
- Paraje M.** (2011) Antimicrobial resistance in biofilms: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. *A. Méndez-Vilas (Ed.)* 736–744
- Pinheiro L.**, **Brito C. I.**, **de Oliveira A.** a **Pereira V. C.** (2016) *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: detection of biofilm genes and biofilm formation in blood culture isolates from patients in a Brazilian teaching hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **86**(1), 1–14
- Popova M.**, **Szegedi A.**, **Mavrodinova V.**, **Novak Tušar N.**, **Mihály J.**, **Klébert S.**, **Benbassat N.** a **Yoncheva K.** (2014) Preparation of resveratrol-loaded nanoporous silica materials with different structures. *Journal of Solid State Chemistry*. **219**, 37–42.
- Prakash V.**, **Lewis J. S.** a **Jorgensen J. H.** (2008) Vancomycin MICs for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Differ Based upon the Susceptibility Test Method Used. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**(12), 4528

- Prasad** N. R., Karthikeyan A., Karthikeyan S. a Reddy B. V. (2011) Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry* **349**(1-2), 11–19
- Promsan** S., Jaikumkao K., Pongchaidecha A., Chattipakorn N., Chatsudthipong V., Arjinajarn P., Pompimon W. a Lungkaphin A. (2016) Pinocembrin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Canadian Journal of Physiology* **94**(8), 808–818
- Rasamiravaka** T., Labtani Q., Duez P. a El jaziri M. (2015) The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International* **2015**, 1–17
- Rios** J.L., Recio M.C. a Villar A. (1988) Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* **23**(2–3), 127–149
- Rodrigues** A., Gomes A., Marçal P. H. F. a Dias-Souza M. V. (2017) Dexamethasone abrogates the antimicrobial and antibiofilm activities of different drugs against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Advanced Research* **8**(1), 55–61
- Römling** U. a Balsalobre C. (2012) Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine* **272**(6), 541–561
- Sahoo** J. a Paidasetty S.K. (2015) Antimicrobial, analgesic, antioxidant and in silico study of synthesized salicylic acid congeners and their structural interpretation. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* **2**(4), 268–280
- Sanhueza** L., Mělo R., Montero R., Maisey K., Mendoza L., Wilkens M. a Agbor G. (2017) Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLOS One* **24**(1), 1–16
- Santoso** S. P., Ismadji S., Angkawijaya A. E., Soetaredjo F.E., Go A. W. a Ju Y. H. (2016) Complexes of 2,6-dihydroxybenzoic acid with divalent metal ions: Synthesis, crystal structure, spectral studies, and biological activity enhancement. *Journal of Molecular Liquids* **221**, 617–623
- Sedghi** M. a Gholi-Toluie S. (2013) Influence of Salicylic Acid on the Antimicrobial Potential of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni, Asteraceae) Leaf Extracts against Soybean Seed-Borne Pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. **12**(6), 1035–1038.
- Scharfen** J. (2013) *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Praha: Nucleus HK, str. 50-53. Mikrobiologie. ISBN 978-808-7009-321.

- Schindler J.** (2001) Mikrobiální biofilm: Jak žijí bakterie v přirozeném prostředí? *Vesmír* **80**, 203–209
- Schommer N. N., Christner M., Hentschke M., Ruckdeschel K., Aepfelbacher M. a Rohde H.** (2011) *Staphylococcus epidermidis* Uses Distinct Mechanisms of Biofilm Formation To Interfere with Phagocytosis and Activation of Mouse Macrophage-Like Cells 774A.1. *Infection and Immunity* **79**(6), 2267–2276
- Smith J. R., Jamie J. F. a Guillemin G. J.** (2016) Review: Kynurenine-3-monooxygenase. *Drug Discovery Today* **21**(2), 315–324
- Solati S. M., Tajbakhsh E., Khamesipour F. a Gugnani H. C.** (2015) Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran. *AMB Express* **5**(47), 1–5
- Sova M.** (2012) Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **12**(8), 749–767
- Sroka Z. a Cisowski W.** (2003) Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology* **41**(6), 753–758
- Stepanović S., Vuković D., Hola V., Bonaventura G.D., Djukić S., Ćirković I. a Ruzicka F.** (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Journal of pathology microbiology and immunology* **115**(8), 891–899
- Tiveron A. P., Rosalen P. L., Franchin M., et al.** (2016) Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Activities of South Brazilian Organic Propolis. *PLOS One* **11**(10), 1–19
- Toda M., Okubo S., Ikigai H., Suzuki T., Suzuki Y., Hara Y. a Shimamura T.** (1992) The Protective Activity of Tea Catechins against Experimental Infection by *Vibrio cholerae* O1. *Microbiology and Immunology* **36**(9), 999–1001
- Turski M. P., Chwil S., Turska M., Chwil M., Kocki T., Rajtar G. a Parada-Turska J.** (2016) An exceptionally high content of kynurenic acid in chestnut honey and flowers of chestnut tree. *Journal of Food Composition and Analysis* **48**, 67–72
- Tyagi P., Singh M., Kumari H., Kumari A., Mukhopadhyay K. a Zhou D.** (2015) Bactericidal Activity of Curcumin I Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane. *PLOS ONE* **10**(3), 0121313
- Valentová E.** (2012) Co jsou to antioxidanty? *CHEMPOINT: Vědci pro průmysl a praxi* [online]. Mendelova univerzita v Brně, [cit. 2018-03-02]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/co-jsou-to-antioxidanty>

- Veh** K.A., Klein R.C., Ster C., (2015) et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *Journal of Dairy Science* **98**(1), 155–168
- Votava** M. (2005) *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, str. 235–253 a 300. ISBN 80-868-5000-5.
- Votava** M. (2003) *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, str. 34–35. ISBN 80-902-8966-5.
- Votava** M., Broukal Z. a Vaněk J. (2007) *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře*. Brno: Neptun, str. 567 ISBN 978-80-86850-03-0.
- Vu** B., Chen M., Crawford R. J. a Ivanova E. P. (2009) Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules* **14**(7), 2535–2554
- Vuong** C., Kidder J. B., Jacobson E. R., Otto M., Proctor R. A. a Somerville G. A. (2005) *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin Production Significantly Increases during Tricarboxylic Acid Cycle Stress. *Journal of Bacteriology* **187**(9), 2967–2973
- Wang** M., Tachibana S., Murai Y. Li L., Lau S. Y. L, Cao M., Zhu G., Hashimoto M. a Hashidoko Y. (2016) Indole-3-Acetic Acid Produced by *Burkholderia helea* Acts as a Phenylacetic Acid Antagonist to Disrupt Tropolone Biosynthesis in *Burkholderia plantarii*. *Scientific Reports* **6**(22596)
- Yarwood** J. M., Bartels D. J., Volper E. M. a Greenberg E. P. (2004) Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Bacteriology* **186**(6), 1838–1850

Další použité zdroje:

Clinical breakpoints dle EUCAST - bacteria (verze 8.0) [cit. 2018-03-26] Dostupné také z: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Informace o testovaných látkách

Název látky	Mw [g·mol ⁻¹]	navážka [mg]	koncentrace [μg·ml ⁻¹]*	rozpuštnost v BHI [mmol·l ⁻¹]
gentamicin	477,60	191,04	47,76	R
síran měďnatý	249,69	99,88	24,97	R
k. azelaová	188,22	75,29	18,82	R
k. kávová	180,16	72,06	18,02	R
karvakrol	150,22	60,09	15,02	R
katechin hydrát	290,27	116,11	29,03	12,50
p-kyselina kumarová	164,16	65,66	16,42	12,50
krocín B	976,96	390,78	97,70	R
kurkumin	368,38	147,35	36,84	1,56
k. 2,6-dihydroxybenzoová	154,12	61,65	15,41	R
k. 3,5-dihydroxybenzoová	154,12	61,65	15,41	R
k. 2,4-dihydroxyskořicová	180,16	72,06	18,02	12,50
k. gallová	170,12	68,05	17,01	R
hesperetin	302,28	120,91	30,23	3,13
k. 4-hydroxybenzoová	138,12	55,25	13,81	R
k. 4-hydroxyfenyloctová	152,15	60,86	15,22	R
k. isoferulicová	194,18	77,67	19,42	25
k. isovanilová	168,15	67,26	16,82	12,50
k. kynurenová	189,17	75,67	18,92	12,50
naringenin	272,25	108,90	27,23	N
k. šťavelová	90,02	36,01	9,00	R
k. protokatechová	154,12	61,05	15,41	12,50
resveratrol	228,28	91,31	22,83	N
k. salicylová	138,12	55,25	13,81	50
k. salicylhydroxamová	153,14	61,26	15,31	12,50
k. sinapová	224,21	89,68	22,42	12,50
k. syringová	198,17	79,27	19,82	25
tropolon	122,12	48,85	12,21	R

* pro roztok o koncentraci 100 mmol·l⁻¹; R = rozpuštná od nejvyšší testované koncentrace; N = nerozpuštná

Příloha 2: Výsledek testování antimikrobiální aktivity v koncentracích $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u kmene *S. epidermidis* (CCM 7221), *S. aureus* (CCM 3953) a *S. aureus* (CCM 4223)

Látka	CCM 7221			CCM 3953			CCM 4223		
	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC
gentamicin	>64	–	–	2	–	2	4	–	4
síran měďnatý	1,56	1,56	3,12	1,56	1,56	3,12	1,56	1,56	3,12
k. azelaová	1,18	1,18	2,35	2,35	–	2,35	2,35	–	2,35
k. kávová	2,25	2,25	9,01	1,13	1,13	2,25	2,25	2,25	4,51
karvakrol	0,47	–	0,47	$\leq 0,12$	–	–	$\leq 0,12$	–	–
katechin hydrát	7,26	7,26	–	14,52	–	14,52	14,52	14,52	29,03
p-k. kumarová	2,05	–	2,05	8,21	–	8,21	8,21	8,21	16,42
krocín B	>9,77	–	–	>9,77	–	–	>9,77	–	–
kurkumin	>36,84	–	–	>36,84	–	–	>36,84	–	–
k. 2,6-dihydroxybenzoová	3,85	–	3,85	3,85	–	3,85	3,85	–	3,85
k. 3,5-dihydroxybenzoová	3,85	–	3,85	1,93	1,93	7,71	3,85	3,85	7,71
k. 2,4-dihydroxyskořicová	4,51	–	4,51	4,51	4,51	9,01	9,01	9,01	18,02
k. gallová	4,25	4,25	8,51	4,25	4,25	8,51	4,25	4,25	8,51
hesperetin	>30,23	–	–	>30,23	–	–	>30,23	–	–
k. 4-hydroxybenzoová	1,73	–	1,73	3,45	–	3,45	3,45	3,45	6,91
k.4hydroxyfenyloctová	3,81	–	3,81	3,81	–	3,81	3,81	3,81	7,61
k. isoferulicová	9,71	9,71	–	9,71	9,71	–	9,71	9,71	–
k. isovanilová	2,10	2,10	–	2,10	2,10	–	2,10	2,10	–
k. kynurenová	4,73	–	4,73	4,73	4,73	–	4,73	4,73	–
(±)-naringenin	>27,23	–	–	>27,23	–	–	>27,23	–	–
k. šťavelová	0,56	0,56	1,13	1,13	1,13	2,25	1,13	1,13	2,25
k. protokatechuová	1,93	1,93	3,85	3,85	3,85	7,71	1,93	1,93	3,85
resveratrol	>22,83	–	–	>22,83	–	–	>22,83	–	–
k. salicylová	1,73	1,73	3,45	1,73	1,73	3,45	1,73	1,73	3,45
k.salicylhydroxamová	1,91	1,91	–	3,83	3,83	–	3,83	3,83	–
k. sinapová	2,80	2,80	5,61	2,80	–	2,80	1,40	1,40	2,80
k. syringová	2,48	–	2,48	2,48	2,48	4,96	2,48	2,48	9,91
tropolon	0,05	0,05	0,38	$\leq 0,10$	$\leq 0,10$	0,76	$\leq 0,10$	$\leq 0,10$	1,53

Příloha 3: Výsledky testování antimikrobiální aktivity v koncentracích $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u kmenů *B. cenocepacia* (LMG 16656), *B. cenocepacia* (CF5/358) a *S. maltophilia* (CF5/363)

Látka	LMG 16656			CF5 358			CF5 363		
	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC
gentamicin	>64	–	–	>64	–	–	>64	–	–
síran měďnatý	3,12	–	3,12	3,12	–	3,12	1,56	1,56	3,12
k. azelaová	2,35	2,35	4,71	4,71	–	4,71	1,18	1,18	2,35
k. kávová	4,51	4,51	18,02	18,02	–	18,02	1,13	1,13	2,25
karvakrol	$\leq 0,12$	–	–	0,12	0,12	0,47	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$	0,23
katechin hydrát	7,26	–	7,26	14,52	14,52	29,03	14,52	–	14,52
p-k. kumarová	8,21	–	8,21	8,21	8,21	16,42	1,03	1,03	2,05
krocín B	>9,77	–	–	>9,77	–	–	>9,77	–	–
kurkumin	>36,84	–	–	>36,84	–	–	>36,84	–	–
k.2,6-dihydroxybenzoová	3,85	–	3,85	3,85	–	3,85	1,93	1,93	3,85
k.3,5-dihydroxybenzoová	1,93	1,93	3,85	3,85	–	3,85	1,93	1,93	3,85
k.2,4-dihydroxyiskořicová	4,51	4,51	9,01	9,01	9,01	–	4,51	–	4,51
k. gallová	4,25	–	4,25	4,25	–	4,25	4,25	–	4,25
hesperetin	>30,23	–	–	>30,23	–	–	>30,23	–	–
k. 4-hydroxybenzoová	3,45	–	3,45	3,45	–	3,45	1,73	1,73	3,45
k. 4-hydroxyfenyloctová	1,90	1,90	3,81	3,81	–	3,81	3,81	–	3,81
k. isoferulicová	4,86	4,86	9,71	9,71	9,71	–	4,86	4,86	9,71
k. isovanilová	2,10	–	2,10	2,10	2,10	4,21	2,10	–	2,10
k. kynurenová	2,37	2,37	4,73	4,73	4,73	–	4,73	–	4,73
(±)-naringenin	>27,23	–	–	>27,23	–	–	>27,23	–	–
k. šťavelová	1,13	–	1,13	1,13	–	1,13	0,56	–	0,56
k. protokatechuová	3,85	–	3,85	3,85	–	3,85	3,85	–	3,85
resveratrol	>22,83	–	–	>22,83	–	–	22,83	–	22,83
k. salicylová	1,73	–	1,73	1,73	1,73	3,45	0,86	0,86	1,73
k. salicylhydroxamová	$\leq 0,12$	–	–	0,48	0,48	0,96	0,48	0,48	3,83
k. sinapová	5,61	5,61	11,21	5,61	–	5,61	2,80	–	2,80
k. syringová	1,24	1,24	2,48	2,48	2,48	4,96	1,24	1,24	2,48
tropolon	$\leq 0,10$	–	–	$\leq 0,10$	–	–	$\leq 0,10$	–	–

Příloha 4: Výsledky testování antimikrobiální aktivity v koncentracích $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u kmenů *P. aeruginosa* (CCM 3955), *P. aeruginosa* (CNCTC 5537) a *P. aeruginosa* (CF5/362)

Látka	CCM 3955			CNCTC 5537			CF5 362		
	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC	MIC	MBS	MBC
gentamicin	1	–	1	2	–	2	4	–	4
síran měďnatý	3,12	–	3,12	3,12	–	3,12	3,12	–	3,12
k. azelaová	4,71	–	4,71	4,71	–	4,71	2,35	–	2,35
k. kávová	18,02	–	18,02	18,02	–	18,02	9,01	9,01	18,02
karvakrol	1,88	–	1,88	0,47	–	0,47	1,88	–	1,88
catechin hydrát	29,03	29,03	–	14,52	14,52	29,03	14,52	–	14,52
p-k. kumarová	8,21	8,21	16,42	8,21	8,21	16,42	8,21	8,21	16,42
krocin B	>9,77	–	–	>9,77	–	–	>9,77	–	–
kurkumin	>36,84	–	–	>36,84	–	–	>36,84	–	–
k. 2,6-dihydroxybenzoová	3,85	–	3,85	3,85	–	3,85	3,85	–	3,85
k. 3,5-dihydroxybenzoová	3,85	–	3,85	3,85	–	3,85	3,85	–	3,85
k. 2,4 dihydroxyskořicová	9,01	9,01	18,02	9,01	9,01	–	9,01	9,01	–
k. gallová	4,25	–	4,25	4,25	–	4,25	4,25	–	4,25
hesperetin	>30,23	–	–	>30,23	–	–	>30,23	–	–
k. 4-hydroxybenzoová	3,45	3,45	6,91	3,45	3,45	6,91	3,45	3,45	6,91
k. 4-hydroxyfenyloctová	3,81	3,81	7,61	3,81	3,81	7,61	1,90	1,90	3,81
k. isoferulicová	19,42	–	–	19,42	19,42	–	19,42	19,42	–
k. isovanilová	4,21	4,21	–	4,21	4,21	–	4,21	4,21	–
k. kynurenová	4,73	4,73	–	4,73	4,73	–	4,73	4,73	–
(±)-naringenin	>27,23	–	–	>27,23	–	–	>27,23	–	–
k. šťavelová	1,13	–	1,13	1,13	–	1,13	0,56	–	0,56
k. protocatechuová	3,85	–	3,85	3,85	–	3,85	3,85	–	3,85
resveratrol	>22,83	–	–	>22,83	–	–	>22,83	–	–
k. salicylová	1,73	1,73	3,45	1,73	1,73	3,45	0,86	0,86	1,73
k. salicylhydroxamová	0,48	0,48	7,66	0,48	0,48	15,31	≤ 0,12	≤ 0,12	3,83
k. sinapová	5,61	–	5,61	5,61	–	5,61	2,80	2,80	5,61
k. syringová	2,48	2,48	4,96	2,48	2,48	4,96	2,48	2,48	4,96
tropolon	0,05	0,05	0,10	0,05	0,05	0,76	≤ 0,10	≤ 0,10	0,38