

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Synergické interakce vybraných rostlinných látek proti
patogenním mikroorganismům**

Diplomová práce

Bc. Karolína Minaříková

Výživa a potraviny

Ing. Pavel Nový, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Synergické interakce vybraných rostlinných látek proti patogenním mikroorganismům" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19. 4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, panu Ing. Pavlu Novému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc jak v laboratoři, tak při zpracování práce. Dále moc děkuji svým rodičům za možnost studovat, za psychickou oporu a podporu po celou dobu mého studia.

Synergické interakce vybraných rostlinných látek proti patogenním mikroorganismům

Souhrn

Antibiotická rezistence je rostoucí globální problém, kdy mnoho bakteriálních kmenů nabývá odolnosti proti konvenčním antibiotikům. Jedním z běžných řešení je aplikace synergicky působících kombinací. Silice obsahující bioaktivní složky, jako jsou terpeny, aldehydy a fenoly s antimikrobiálními vlastnostmi, se nabízejí jako nadějná alternativa. Synergie mezi různými složkami silic nebo jejich kombinace s jinými antimikrobiálními látkami by se mohly stát novým účinným nástrojem v boji proti patogenním mikroorganismům. Silice mají potenciál například v potravinářství či zdravotnictví, kde je rezistence na antibiotika zvláště akutní problém.

Diplomová práce byla zaměřena na ověření antimikrobiálních synergických interakcí vybraných rostlinných látek (eugenol, karvakrol, linalool tymol, α -terpineol) proti vybraným mikroorganismům (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae*).

Pomocí bujónové mikrodiluční metody byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace (MIC) jednotlivých silic samostatně i v kombinacích proti všem vybraným bakteriím. Synergické interakce pak byly vyhodnoceny na základě těchto MIC podle hodnot součtů tzv. frakčních inhibičních koncentrací (FICI).

Synergická interakce byla zjištěna u kombinací tymol/karvakrol proti *Enterococcus faecalis* s FICI 0,5; α -terpineol/tymol proti *Escherichia coli* (FICI = 0,38); a u karvakrolu s eugenolem proti *P. aeruginosa* (FICI = 0,281). Dále byla pozorována slabší synergie u kombinace linaloolu s tymolem proti *K. pneumoniae* (FICI = 0,5) a 13 různých kombinací s aditivním účinkem.

Tato práce rozšiřuje nové možnosti využití synergických kombinací rostlinných silic, které poskytují efektivnější obranu proti široké škále patogenů. Tyto unikátní kombinace přírodních složek mohou inspirovat vývoj nových přístupů v lékařství a potravinářství.

Klíčová slova: fytotherapie, inhibiční účinek, silice, rezistence, antimikrobiální látky

Synergistic interactions of plant essential oils against pathogenic microorganisms

Summary

Antibiotic resistance is a growing global issue, with many bacterial strains developing resistance to conventional antibiotics. One common solution is the application of synergistically acting combinations. Essential oils containing bioactive components, such as terpenes, aldehydes, and phenols with antimicrobial properties, are emerging as a promising alternative. The synergy between different components of essential oils or their combinations with other antimicrobial substances could become a new effective tool in the fight against pathogenic microorganisms. Essential oils have potential in areas such as food processing and healthcare, where antibiotic resistance is particularly acute.

The thesis was focused on verifying the antimicrobial synergistic interactions of selected plant substances (eugenol, carvacrol, linalool, thymol, α -terpineol) against selected microorganisms (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*). Using the broth microdilution method, the minimum inhibitory concentrations (MICs) of individual oils alone and in combinations against all selected bacteria were determined. Synergistic interactions were then assessed based on these MICs using the fractional inhibitory concentration index (FICI) values.

Synergistic interaction was found in combinations of thymol/carvacrol against *Enterococcus faecalis* with a FICI of 0.5; α -terpineol/thymol against *Escherichia coli* (FICI = 0.38); and carvacrol with eugenol against *P. aeruginosa* (FICI = 0.281). Weaker synergy was also observed in the combination of linalool with thymol against *K. pneumoniae* (FICI = 0.5) and 13 different combinations with additive effects.

This work expands new possibilities for the use of synergistic combinations of plant essential oils, which provide a more effective defense against a wide range of pathogens. These unique combinations of natural ingredients may inspire the development of new approaches in medicine and the food industry.

Keywords: phytotherapy, inhibitory effect, essential oils, resistance, antimicrobials

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Antimikrobiální rezistence	10
3.1.1 Formy rezistence.....	11
3.1.2 Mechanismy antimikrobiální rezistence	12
3.2 Charakterizace vybraných druhů bakterií	14
3.2.1 Grampozitivní.....	16
3.2.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	16
3.2.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.2.2 Gramnegativní	18
3.2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	18
3.2.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
3.2.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
3.3 Silice	20
3.3.1 Charakterizace	20
3.3.2 Chemické vlastnosti	20
3.3.3 Způsoby získávání silic	21
3.3.4 Mechanismus účinku antimikrobiální látky	22
3.3.5 Charakterizace vybraných složek silic.....	24
3.3.5.1 Eugenol	24
3.3.5.2 Karvakrol.....	25
3.3.5.3 Linalool	26
3.3.5.4 Tymol	27
3.3.5.5 α -Terpineol	28
3.3.6 Význam.....	29
3.4 Synergické interakce	30
4 Metodika	32
4.1 Silice a antibiotika	32
4.2 Kultivační média	32
4.3 Rozpouštědla	32
4.4 Testované bakterie	32
4.5 Antimikrobiální aktivita	32

4.5.1	Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC).....	33
4.5.2	Příprava roztoků silic a antibiotik	33
4.5.3	Příprava inokula	34
4.5.4	Standardizace inokula pro testování	34
4.5.5	Zaočkování	34
4.5.6	Příprava mikrotitrační destičky	34
4.5.7	Vyhodnocení antibakteriálního účinku kombinací složek silic	37
5	Výsledky	39
6	Diskuze	46
6.1	Antibakteriální účinnost látek testovaných samostatně	46
6.1.1	Eugenol	46
6.1.2	Karvakrol	47
6.1.3	Linalool	48
6.1.4	Tymol	49
6.1.5	α -terpineol	50
6.2	Antibakteriální účinek kombinací vybraných látek	51
6.2.1	Karvakrol a tymol	51
6.2.2	Tymol a α -terpineol	52
6.2.3	Eugenol a karvakrol	52
7	Závěr	54
8	Literatura	55
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	62
10	Seznam obrázků	63
11	Seznam tabulek	63

1 Úvod

Antimikrobiální rezistence (AMR) se stala závažnou hrozbou pro veřejné zdraví, vedoucí ke komplikacím v prevenci a léčbě různých onemocnění. Přes mnohé snahy a opatření přijatá v minulých desetiletích se trendy globální AMR nesnížily. Nadměrné a nevhodné používání antibiotik jak v medicíně, tak v zemědělství je hlavní příčinou tohoto problému, což vede k růstu počtu rezistentních bakteriálních kmenů (Dadgostar 2019).

Silice jsou historicky používány jako silné antimikrobiální látky, které jsou produkovány rostlinami jako sekundární metabolity k ochraně proti stresorům. Využití silic sahá až do starověkého Egypta, kde se extrahovaly namáčením částí rostlin do tuků. Ve 14. století se ukázalo, že osoby vystavené silicím byly odolné vůči morové epidemii. Pojem "aromaterapie" zavedl v roce 1937 René Gattefossé, což vedlo k rozvoji výzkumu těchto silic. V současnosti se používají v terapiích pro různá zdravotní onemocnění (Abers et al. 2021).

Tradičně se silice využívají také v potravinářství pro zlepšení aroma a vůně. Je známo, že silice mají schopnost působit proti mikrobům, což lze přisuzovat jejich obsahu aromatických molekul s různými substituenty, např. eugenol, cinnamaldehyd nebo karvakrol. V poslední době se v potravinářském průmyslu objevuje trend omezování používání chemických konzervantů, což vede k rostoucímu zájmu o použití bioaktivních složek ze silic jako přírodních antimikrobiálních činidel (Qiu et al. 2010).

V roce 2017 publikovala Světová zdravotnická organizace (WHO) seznam bakteriálních kmenů, jenž obsahuje skupinu bakterií ESKAPE, která zahrnuje *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter*, známé pro odolnost vůči běžným antibiotikům. Tento seznam zdůrazňuje naléhavou potřebu vývoje nových léčebných přístupů proti těmto patogenům (Johansen et al. 2022).

Hodnocení biologické aktivity silic se provádí již řadu let s cílem identifikovat nové sloučeniny s antibakteriální aktivitou pro průmyslové využití. Potravinářský průmysl hledá přírodní sloučeniny, protože používání některých syntetických antimikrobiálních přísad může způsobovat řadu vedlejších nežádoucích účinků, v ojedinělých případech byly popsány i případy rakoviny několika typů tkání, například u parabenů či dusitanů (Guimarães et al. 2019).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíl práce

Cílem práce je nalézt takové kombinace rostlinných silic, které budou ve směsi vykazovat zvýšený antimikrobiální účinek.

Hypotéza

Některá z vybraných kombinací silic bude mít zesilující antimikrobiální účinek *in-vitro*.

3 Literární rešerše

3.1 Antimikrobiální rezistence

V současné době jsou nejčastěji v medicíně k boji proti bakteriálním infekcím využívána antibiotika, která přispívají ke zlepšení lidského zdraví a prodloužení délky života. Většina těchto léčiv byla objevena v první polovině 20. století (Samtiya et al. 2022; Porras et al. 2021). Dlouhodobé a nesprávné užívání antibiotik může vést k antibiotické rezistenci, a obecně podporuje růst rezistentních bakteriálních izolátů a inhibuje růst citlivých bakterií. Neustálý tlak antibiotik způsobuje rezistenci nejen vůči používanému antibiotiku, ale i vůči ostatním antibiotikům ze stejné třídy (Pulingam et al. 2022). Antimikrobiální léky jsou běžně používány jak u lidí, tak u zvířat a jsou používány i preventivně v produkčním zemědělství. Mikroorganismy odolné vůči těmto léčivům mohou vstoupit do potravinového řetězce během jakékoli fáze výroby potravin, jak v živočišné, tak v rostlinné produkci (Samtiya et al. 2022).

Antimikrobiální rezistence nastává, když mikroorganismy (bakterie, viry a houby) modifikují svou fyziologickou nebo genetickou strukturu po kontaktu s antimikrobiální látkou a jsou následně schopny přežít pod vlivem antimikrobiálních látek. Mezi antimikrobiální látky, které mohou zpomalit růst, inhibovat množení nebo dokonce vést k úmrtí bakterií se řadí zejména antibiotika, dezinfekční prostředky a konzervační látky v potravinách (Abushaheen et al. 2020). Změny ve fyziologickém a metabolickém stavu bakterií mohou u lidí způsobit změny v patologii, ohrožení imunitního systému nebo terapeutické neúčinnosti. Antibiotická rezistence může tedy vzniknout v důsledku genetických mutací u bakterií, nedostatečné informovanosti o užívání a souvisejících rizik, používání širokospektrálních antibiotik, jejichž spektrum pokrývá širokou škálu mikroorganismů, včetně těch neškodných, používání antibiotik v zemědělství a omezené dostupnosti nových antibiotik (Chiş et al. 2022).

Objev antibiotik a jejich nadměrné užívání vedl ke vzniku multirezistentních mikroorganismů známých jako superbakterie, které jsou odolné vůči více léčivům současně, mezi ně se řadí např. *Enterococcus faecium*, meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* (Chiş et al. 2022). Vznik bakterií odolných vůči antibiotikům se stal celosvětově hlavním problémem s klinickými a ekonomickými důsledky, jak nedávno zdůraznila Světová zdravotnická organizace (WHO) ve svém dokumentu z roku 2019. Tato rezistence byla zařazena mezi deset hlavních hrozeb pro celkové zdraví populace. Bakterie odolné vůči antibiotikům představují riziko nozokomiálních infekcí, které jsou obtížně léčitelné a mohou často vést k fatálním následkům (Iseppi et al. 2021; Porras et al. 2021).

Antimikrobiální rezistence vůči antibiotikům je tedy rozsáhlým a narůstajícím problémem. Podle amerického Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) se odhaduje, že antimikrobiální rezistence celosvětově každoročně způsobí více než 700 tisíc úmrtí, a do roku 2050 se očekává, že tento počet vzroste na 10 milionů. Vývoj nových antimikrobiálních léčiv je považován za naléhavou prioritu. Současný trend se zaměřuje na průzkum přírodních produktů s cílem objevit nová terapeutika pro boj s odolnými patogeny (Breijyeh et al. 2020).

Při hledání alternativ k omezeným zásobám antibiotik byly zkoumány přírodní produkty, jako jsou silice. Kultury po celém světě využívaly silice jak pro domácí péči, tak i k hojení ran. Starověcí Egypťané začali používat silice už kolem roku 4500 př. n. l., a první záznamy o využití těchto silic pocházejí již z čínské a indické medicíny mezi lety 2000 a 3000 př. n. l. s použitím stovek látek pro léčebné účely. Řecko v dokumentech z 4. až 5. století př. n. l. zaznamenalo používání některých silic, včetně tymiánu, máty peprné a šafránu. Vědci v 18. století identifikovali aktivní složky léčivých rostlin, které mají biologické účinky (Aljaafari et al. 2021).

Boj proti rozvoji antibiotické rezistence se tradičně soustřeďuje především na klinické prostředí a v poslední době se rozšířil i do zemědělství. Cílem je omezit přenos rezistentních bakterií a zabránit jejich šíření během antibiotické léčby. V posledních letech se stále mluví o životním prostředí jako o důležitém zdroji a cestě pro šíření lékové rezistence mezi bakteriemi (Urban-Chmiel et al. 2022).

3.1.1 Formy rezistence

Bakterie mohou vykazovat antibiotickou rezistenci buď vnitřní, získanou nebo adaptivní formou (Christaki et al. 2020). Primární rezistence, vznikající spontánní mutací, může být zakódována chromozomálně a není přenášena na jiné bakterie. Sekundární rezistence vzniká při kontaktu mikroorganismu s antimikrobiálním léčivem (Urban-Chmiel et al. 2022). Vertikální genový přenos nastává z rodičovské buňky, zatímco horizontální genový přenos plazmidů zahrnuje získání genů z jiných buněk (Aljaafari et al. 2021).

Vnitřní rezistence je charakterizována jako odolnost způsobená přirozenými vlastnostmi bakterie. Jedním z příkladů vnitřní rezistence je glykopeptidová rezistence, projevující se u gramnegativních bakterií v důsledku neproměnlivosti vnější membrány v buněčném obalu (Christaki et al. 2020). Nebo přítomnost enzymu β -laktamázy, která katalyzuje hydrolyzu penicilinů, cefalosporinů a dalších antibiotik založených na struktuře β -laktamu. V literatuře bylo zaznamenáno více než 200 druhů β -laktamáz, které jsou široce rozšířeny mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi. Tento enzym je schopen hydrolyzovat jak peniciliny, tak cefalosporiny (Ju et al. 2022).

Získaná rezistence vznikne, když bakterie, která byla dříve citlivá, získá mechanismus rezistence buď mutací nebo získáním nového genetického materiálu z externího zdroje (horizontální přenos genů). Extrachromozomální děj probíhá přenosem genů rezistence pomocí malých kruhových plazmidů nacházejících se v cytoplazmě, které mohou přenášet geny kódující rezistenci z jedné bakteriální buňky do druhé (Urban-Chmiel et al. 2022). K horizontálnímu přenosu genů může dojít prostřednictvím tří hlavních mechanismů: transformace, transdukce, konjugace (Christaki et al. 2020). Konjugace umožňuje šíření rezistence kontaktem mezi dvěma nebo více bakteriálními buňkami prostřednictvím vláken jimi produkovaného proteinu. Mohou se jí účastnit bakterie různého druhu a rodu, včetně fylogeneticky vzdálených druhů. U transdukce bakteriofágy přenáší plazmidy z donorové buňky do buňky příjemce. Po navázání bakteriofágu na receptor na povrchu buňky je jeho DNA zavedena do bakterie. Následně bakteriofág využívá metabolické procesy buňky k replikaci své DNA a tvorbě virových proteinů. Vytvořením nových bakteriofágů uvnitř buňky dochází

k lýzi – lytickému cyklu, při němž je buňka rozložena. Fágová DNA se také může integrovat do bakteriálního chromozomu, což se nazývá lysogenie (Urban-Chmiel et al. 2022).

Adaptivní rezistence je charakterizována odolností vůči jednomu nebo více antibiotikům, která vzniká specifickým signálem z prostředí, jako je například stres, růstové podmínky, pH, koncentrace iontů, živiny nebo subinhibiční hladiny antibiotik. Na rozdíl od vnitřní a získané rezistence je adaptivní rezistence přechodná. Adaptivní rezistence, která umožňuje bakteriím rychleji reagovat na výzvu antibiotikem, se obvykle vrací do původního stavu, jakmile je odstraněn vyvolávající signál, není tedy způsobena genetickými změnami (Christaki et al. 2020).

3.1.2 Mechanismy antimikrobiální rezistence

Vznik rezistence obecně závisí na druhu, povaze antimikrobiální látky a jejím cílovém místě. Mikroorganismus při zasahování antimikrobiální látky aktivuje sofistikovaný alternativní mechanismus, aby se zabránilo bakteristatické nebo baktericidní aktivitě činidla (Pulingam et al. 2022). Mezi 4 hlavní biologické mechanismy antimikrobiální rezistence (Obrázek 1) se řadí: enzymatická inhibice molekul antibiotik, snížená propustnost antibiotik, zvýšená extruze antibiotik prostřednictvím efluxních pump, a změny cíle (Nadeem et al. 2020). Antibiotika jsou jedním z antimikrobiálních látek, které mají několik tříd, z nichž každá má jiné cíle. V důsledku toho bakterie donekonečna používají metody k překonání účinnosti antibiotik pomocí různých typů mechanismů (Abushaheen et al. 2020).

Aby mnohé antimikrobiální látky mohly působit, musí proniknout přes bakteriální buněčný obal a dosáhnout svého cíle. To je důležité zejména u gramnegativních bakterií, které mají dvojitou membránovou strukturu, díky níž je buněčný obal relativně nepropustný, což zajišťuje vnitřní rezistenci vůči mnoha antibiotikům, která působí proti grampozitivním patogenům. Kromě toho mohou změny struktury obalu, jako je ztráta porinů nebo změny obsahu fosfolipidů a mastných kyselin v cytoplazmatické membráně, ovlivnit schopnost léčiva proniknout do buňky a mohou přispět ke vzniku AMR (Darby et al. 2023).

Poriny v membráně fungují jako vodou naplněné kanály, regulující průchod hydrofilních látek a živin dovnitř bakterie. Představují jednu z možných cílů pro antibakteriální látky a jsou hlavní cestou vstupu hydrofilních antibiotik (jako jsou β -laktamy, fluorochinolony, tetracykliny a chloramfenikol). Počet a typ porinů exprimovaných na vnější membráně ovlivní vstup hydrofilních antibiotik a tím i citlivost bakteriální buňky k nim (Christaki et al. 2020). Podle jejich aktivity lze poriny rozdělit na specifické a nespecifické. Specifické poriny jsou selektivnější pro určité sloučeniny, například Lam B, a selektivně vychytávají maltózu, maltodextrin a Fep A specifický pro komplex železa. Na druhou stranu nespecifické neboli obecné poriny, přispívají k propustnosti membrán a mohou být spojeny s rezistencí bakterií vůči antimikrobiálním látkám (Jubair et al. 2021). Grampozitivní bakterie postrádají vnější membránu, což jim přirozeně dává vyšší propustnost pro mnoho antibiotik. Avšak studie ukázaly, že změny ve složení cytoplazmatické membrány, které ovlivňují její fluiditu, jsou klíčové pro snížení propustnosti pro antibiotika (Darby et al. 2023).

Antibiotická inaktivace je proces, kdy rezistentní bakterie produkují enzymy, které modifikují nebo přímo degradují aktivní molekuly antimikrobiální látky. Mezi strategie inaktivace se řadí hydrolýza, přenos skupin a redoxní procesy (Pulingam et al. 2022). Enzymatická degradace zahrnuje hydrolýzu funkční skupiny antibiotika, čímž se stává neúčinným. Enzymy modifikující antibiotika přenášejí na antibiotikum různé chemické skupiny, které zabraňují vazbě antibiotika na jeho cíl (Darby et al. 2023). Například bakterie produkující β -laktamázu, jako je *E. coli* nebo *K. pneumoniae*, deaktivují antibiotika, jako je penicilin, cefalosporin a karbapenem, hydrolýzou β -laktamového kruhu (Pulingam et al. 2022).

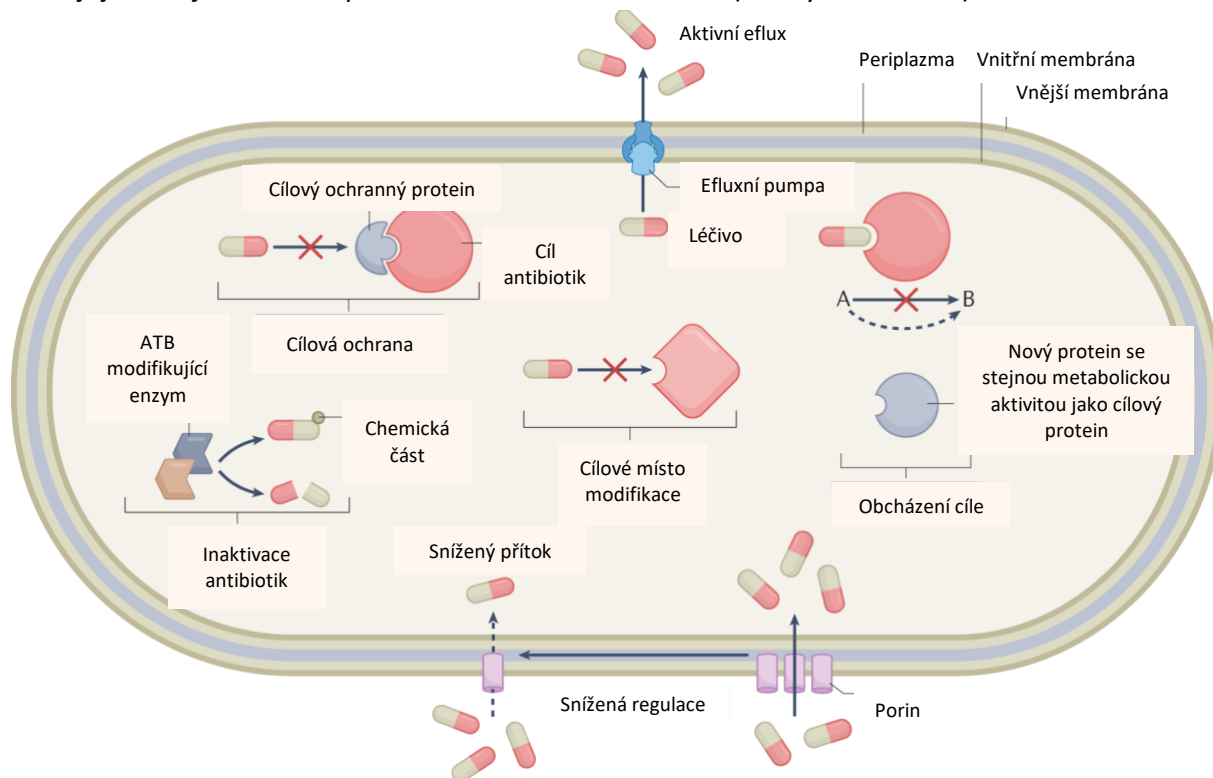
Změna cílového místa zahrnuje změnu cílového místa antibiotika za účelem snížení vazby antibiotika. To může zahrnovat mutace v genu kódujícím cílovou bílkovinu molekuly antibiotika nebo enzymatickou změnu vazebného místa. Při obcházení cíle je funkce cíle antibiotika plněna novým proteinem, který není inhibován antibiotikem, takže původní cíl je nadbytečný a antibiotikum neúčinné (Darby et al. 2023). Příkladem modifikace cílového místa PBP (penicilin vázající proteiny) jsou transpeptidázy, které se podílejí na výstavbě struktury peptidoglykanu, který je hlavním prvkem bakteriální buněčné stěny. Antibakteriální účinek β -laktamů závisí na jejich schopnosti přerušit syntézu buněčné stěny prostřednictvím inhibice PBPs. Rezistence k meticilinu u *S. aureus* je výsledkem získání cizího genu, označovaného jako *mecA*, který kóduje PBP2a, PBP, který je považován za látku s nízkou afinitou ke všem β -laktamům, včetně penicilínů, cefalosporinů a karbapenemů. Získání *mecA* proto způsobuje, že většina β -laktamů je proti MRSA nepoužitelná a u závažných infekcí je třeba použít alternativní léčbu (Nadeem et al. 2020).

Dalším příkladem jsou enzymy modifikující aminoglykosidy zprostředkovávají acetylaci, fosforylaci nebo adenylaci aminoglykosidů, přičemž výsledné modifikované antibiotikum má sníženou aviditu pro svůj cíl. Geny kódující aminoglykosidy jsou obvykle umístěny v mobilních genetických elementech, což jim umožňuje účinné šíření mezi bakteriemi. V důsledku toho mohou prakticky všechny lékařsky významné bakterie vykazovat rezistenci vůči aminoglykosidům prostřednictvím tohoto mechanismu. Enzymatická acetylace molekuly antibiotika je nejčastějším mechanismem rezistence vůči chloramfenikolu. U široké škály bakteriálních druhů bylo popsáno mnoho chloramfenikol acetyltransferáz (Christaki et al. 2020).

Kromě toho, že bakterie brání vstupu léčiv do buňky, mohou je také aktivně exportovat v procesu známém jako eflux (Darby et al. 2023). Efluxní pumpa je protein umístěný na cytoplazmatické membráně bakterií, jehož hlavní funkcí je zabránit vstupu toxických sloučenin do cytoplazmy. Efluxní pumpa bakterií chrání bakteriální buňku vypuzováním velkého množství antibiotik ven z buněk (Aljaafari et al. 2021). Ačkoli všechny bakterie obsahují více efluxních pump, u gramnegativních bakterií jsou obzvláště důležitými zprostředkovateli AMR. Spolupracují synergicky s nepropustnou dvojitou membránou, což způsobuje, že tyto patogeny jsou vnitřně rezistentní vůči mnoha antibiotikům (Darby et al. 2023). Nedávné studie naznačují, že silice jsou schopny inhibovat efluxní pumpu bakterií. Inhibice efluxních pump je klíčovým cílem pro silice a jejich metabolity. Silice mají hydrofobní povahu, což znamená, že jejich sloučeniny zvyšují permeabilitu membrán bakterií. Tato zvýšená permeabilita může

následně vést k úniku obsahu bakteriálních buněk. Únik obsahu buněk zahrnuje ionty draslíku a vodíkové ionty (H^+), stejně jako proteiny a genetický materiál, jako je DNA (Aljaafari et al. 2021).

Ochrana cíle obecně zahrnuje fyzickou asociaci proteinu ochrany cíle s cílem antibiotika, čímž jej zbavuje inhibice zprostředkované antibiotikem (Darby et al. 2023).



Obrázek 1: Přehled molekulárních mechanismů rezistence vůči antibiotikům (Darby et al. 2023).

3.2 Charakterizace vybraných druhů bakterií

Bakterie jsou mikroskopické prokaryotické živé organismy, které jsou považované za první primitivní formy života na Zemi. Jsou výrazně adaptabilní a schopné přežít v extrémních podmínkách, jako jsou vysoké/nízké teploty, různé hodnoty pH prostředí, koncentrace kyslíku, osmotický a atmosférický tlak. Díky této adaptabilitě se nacházejí téměř ve všech přírodních prostředích. Z pohledu výživy jsou bakterie především heterotrofové, ale některé bakterie vykazují i symbiotické, parazitické nebo saprofytické chování (Dhere et al. 2023).

Součástí bakteriálních buněk je bakteriální stěna, nukleoid, plazmidy, ribozomy, popř. bičíky. Bakterie se nejčastěji rozmnožují vegetativně binárním dělením, ale také konjugací, transformací nebo transdukcí. Vykazují různorodé velikosti od 0,1 μm do 10 μm . Z morfologického hlediska byly bakterie klasifikovány do tří hlavních forem, tj. kulovité (*Coccus*), tyčinkovité (*Bacillus*) a spirálovité (helikální) bakterie (Dhere et al. 2023). Bakteriální stěny mají několik funkcí, poskytují základní strukturu pro život chráněním před nepřátelským prostředím, obsahují unikátní složky nenacházející se nikde jinde v přírodě, určují tvar bakterií, inhibují připojení ligandů a proteinů pro adhezenci k hostitelským buňkám, představují

receptorová místa pro léčiva a viry, jsou cílem antibiotik, poskytují struktury pro imunitní rozpoznání a variabilitu, a mohou způsobovat nemoci u zvířat a lidí (Rohde 2019).

Základním stavebním prvkem bakteriální buněčné stěny je peptidoglykan, což je polymer složený z dlouhých glykanových řetězců, jež jsou spojeny flexibilními peptidovými můstky. Tato silná elastická stěna chrání základní protoplast před lýzou způsobenou vysokým vnitřním osmotickým tlakem. Glykanový řetězec sestává z řady střídavých podjednotek, které jsou spojeny β -1,4-vazbou mezi aminosacharidy N-acetylglukosaminem (GlcNAc) a kyselinou N-acetylmuramovou (MurNAc) (Scheffers & Pinho 2005). V porovnání s gramnegativními bakteriemi je peptidoglykanová vrstva grampozitivních bakterií výrazně tlustší, dosahuje velikosti mezi 30 a 100 nm nebo i silnější. Naopak gramnegativní bakterie mají pouze tenkou vrstvu peptidoglykanu, tlustou jen několik nanometrů, obklopující vnější cytoplazmatickou membránu (Rohde 2019).

Buněčný obal grampozitivních bakterií se skládá ze dvou hlavních částí. První částí je cytoplazmatická lipidová dvojvrstva membrány, která obklopuje cytoplazmu bakterie. Nad touto membránou se nachází druhá část, což je polymerová buněčná stěna tvořící vnější povrch bakterie. Hlavním polymerním prvkem této buněčné stěny je peptidoglykan, který vzniká kovalentním propojením glykanových řetězců přes peptidové stonky na střídavých sacharidech. Tento polymer obklopuje celou bakterii a je znám pod třemi synonymy: murein, sakulus nebo nejčastěji peptidoglykan (Fisher & Mobashery 2020). Součástí buněčné stěny grampozitivních bakterií je i kyselina teichoová, což je polymer obsahující glykolipidy. Představuje přibližně 60 % celkové hmotnosti buněčné stěny. V případě, že je kyselina teichoová zakotvena v buněčné stěně, nazývá se stěnovou teichoovou kyselinou, zatímco při své vazbě na buněčnou membránu se označuje jako lipoteichoová kyselina (Jeong et al. 2023).

Gramnegativní bakterie disponují třemi vrstvami buněčného obalu. První vrstva představuje vnější membránu, která je charakteristická pro gramnegativní bakterie. Tato membrána obsahuje fosfolipidy vázané na vnitřní cíp a lipopolysacharid vázaný na vnější cíp, který může způsobovat endotoxický šok (Breijyeh et al. 2020). Lipopolysacharidy představují klíčovou složku buněčného povrchu, která hraje roli při počátečním povrchovém připojení buněk a vytváření biofilmů u gramnegativních bakterií (Jeong et al. 2023). Proteiny vnější membrány umožňují průchod malých molekul (aminokyseliny, monosacharidy, ...). Druhou vrstvou je buněčná stěna z peptidoglykanu, která určuje tvar buňky (Breijyeh et al. 2020). Peptidoglykan je kovalentně připojen k vnější membráně prostřednictvím lipoproteinu, známého též jako Braunův lipoprotein (Scheffers & Pinho 2005). Třetí vrstva představuje vnitřní membránu, fosfolipidovou dvojvrstvu odpovědnou za různé procesy, včetně struktury, transportu a biosyntetických funkcí. Tato membrána také slouží jako místo pro ukotvení DNA a hraje klíčovou roli při separaci sesterských chromozomů (Breijyeh et al. 2020).

V roce 1884 bakteriolog Hans Christian Gram vyvinul barvicí metodu pro rozlišení bakterií pod mikroskopem, známou jako Gramovo barvení. Jeho princip spočívá v užití barviva genciánové violeti, která proniká buněčnou stěnou a cytoplazmatickou membránou a obarvuje cytoplazmu bakterií. Po přidání jódu vznikne nerozpustný komplex, který zůstane v buněčné stěně grampozitivních bakterií po odbarvení etanolem. Grampozitivní bakterie tedy

získávají fialové zbarvení, zatímco gramnegativní bakterie vyžadují kontrastní obarvení druhým barvivem – safraninem nebo fuchsinem, čímž získají růžové až červené zbarvení (Rohde 2019).

Obecně platí, že grampozitivní bakterie jsou citlivější na terpeny než gramnegativní (Zengin & Baysal 2014). Bakterie s grampozitivní strukturou mohou způsobit závažné infekce a představují klíčový problém ve zdravotní péči, zejména multirezistentní kmeny, například methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecium* a β -laktamáza-rezistentní *Streptococcus pneumonia* (Jubeh et al. 2020).

Při testování antimikrobiální aktivity silic v této práci bylo vybráno 5 mikroorganismů, které jsou popsány dále.

3.2.1 Grampozitivní

3.2.1.1 *Enterococcus faecalis*

E. faecalis jsou grampozitivní fakultativně anaerobní koky, které jsou ze své podstaty odolné a schopné přežít celou řadu nepříznivých podmínek. Enterokoky se řadí do čeledi Enterococcaceae, která zahrnuje velké množství druhů a jsou přirozenou součástí lidské mikrobioty. Kolonizují dolní gastrointestinální trakt, dutinu ústní a genitální trakt. V lidském střevě je přibližně 10^6 až 10^7 kolonií tvořících jednotek (KTJ), z nichž většina je buď *E. faecalis* nebo *E. faecium* (Krawczyk et al. 2021).

Tato druhově pestrá skupina kolonizuje různé prostředí – trávicí systém lidí, zvířat a hmyzu, ale také přírodní biotopy, jako je voda, odpadní vody, půda a orná půda. Enterokoky tedy lze využít pro podporu imunitního systému ve formě probiotika. Stejně tak hrají enterokoky roli v potravinářské technologii jako startovací kultura podílející se na fermentaci masa a sýrů a konzervaci potravin. Na druhé straně mohou působit i jako patogeny. Jsou zodpovědné za kontaminaci potravin a vzhledem k jejich občasné přítomné virulenci a multirezistenci představují epidemickou hrozbu v nemocničním prostředí (Krawczyk et al. 2021).

Enterokoky jsou environmentálními původci mastitid, přičemž infekce způsobují především *Enterococcus faecalis* (přibližně 80 %) a *Enterococcus faecium* (přibližně 10-15 %). Původci mastitid skotu jsou klasifikováni jako „environmentální“ nebo „nakažlivé,“ přičemž *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Mycoplasma* spp. jsou reprezentativními původci nakažlivých mastitid. Díky své schopnosti přizpůsobit se nepříznivým podmínkám mohou *Enterococcus* spp. přežívat v prostředí po dlouhou dobu a infikovat mléčné žlázy. Ačkoli ampicilin, gentamicin, penicilin, tetracyklin a tylosin jsou antimikrobiální látky schválené a dříve používané k léčbě mastitidy skotu v Jižní Koreji, jejich terapeutický úspěch je omezen antimikrobiální rezistencí (Kim et al. 2022).

3.2.1.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus z čeledi Staphylococcaceae je grampozitivní, nepohyblivý, nesporulující, fakultativní anaerob. Shlukuje se do koků, a jeho kolonie mají nažloutlou barvu. Tato bakterie

fermentuje glukózu na kyselinu mléčnou a roste při optimální teplotě v rozmezí 15 až 45 °C. Je tedy odolná vůči vysokým teplotám, a snáší i vysoké koncentrace sodíku (až 15 %) a sucho. *S. aureus* se vyskytuje v lidské mikroflóře, tedy na kůži, nosních průchodech a sliznicích, a navíc je pro člověka patogenní, způsobuje celou řadu hnisavých infekcí, syndrom toxického šoku a otravy potravinami (Ibrahim 2020). Této bakterii se říká také „zlatý stafylokok,“ jelikož obsahuje karotenoidní pigmenty, které přispívají k oxidativnímu stresu a rezistenci neutrofilů a virulenci (Liu et al. 2020).

Nositelům *S. aureus* je přibližně 20 až 30 % lidské populace, výskyt *S. aureus* se u jednotlivých druhů hostitelů liší, např. nositelem je až 90 % kuřat, 42 % prasat, 29 % ovcí a 14 až 35 % krav a jalovic. *S. aureus* se od většiny zástupců rodu liší hojnou produkcí vylučované enzymu koagulázy, která přeměňuje sérový fibrinogen na fibrin a podporuje srážení krve (Haag et al. 2019).

Je hlavním původcem pneumonie a dalších infekcí dýchacích cest, infekcí v místě chirurgického výkonu, protetických kloubů a kardiovaskulárních infekcí a také nemocniční bakteriémie. Bakteriémie způsobená *S. aureus* je příčinou většího počtu úmrtí, než je například počet úmrtí způsobených syndromem získaného selhání imunity (AIDS), tuberkulózou a virovou hepatitidou dohromady. Ostatní infekce vyvolané *S. aureus*, jako jsou středně závažné kožní infekce včetně furunkulů, abscesů, infekcí ran a rozvoj atopické dermatitidy, obvykle neohrožují život, ale mohou být doprovázeny značnou morbiditou a bolestí (Cheung et al. 2021).

S. aureus je také hlavní příčinou mastitid u dojnic, čímž způsobuje ekonomické ztráty v mlékárenském průmyslu. Mastitida u dojnic má za následek snížení užitkovosti, potřebu veterinárních zásahů a ztráty mléka, které musí být vyřazeno buď kvůli kontaminaci patogeny, nebo antibiotiky. Pokud je léčba vemene neúspěšná, je zvíře často utraceno. Mastitida vede k shromažďování leukocytů do vemene, kvalita mléka se stanovuje hodnotami počtu leukocytů. Vezmeme-li jako příklad kravské mléko, je mléko s více než 200 000 leukocytů na ml považováno za infikované, a v Evropské unii je při nálezů více než 400 000 buněk na ml mléko považováno za nevhodné k lidské spotřebě. *S. aureus* se může vylučovat z infikovaných mléčných žláz a většina stafylokokových izolátů z mléka má geny kódující enterotoxiny. Kontaminace syrového mléka tak může vést k otravám z potravin z fermentovaných syrových mléčných výrobků (Haag et al. 2019).

Stafylokoková gastroenteritida a otrava jídlem nejsou výsledkem požití samotného *S. aureus*, ale spíše jejich enterotoxinů, které vznikají v potravě. Ještě důležitější je, že enterotoxiny jsou tepelně stabilní a dokážou odolat vysoké teplotě, aniž by ztratily svou biologickou aktivitu (Qiu et al. 2010).

Infekce vyvolané *S. aureus* jsou obzvláště problematické vzhledem k častému výskytu rezistence vůči antibiotikům, z nichž klinicky nejvýznamnější jsou meticilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA) (Cheung et al. 2021). MRSA se objevil jako rozšířená příčina komunitních i nemocničních infekcí. V současnosti je MRSA odpovědná za 10krát více infekcí než všechny multirezistentní gramnegativní patogeny dohromady (Craft et al. 2019). Infekce způsobené MRSA jsou ve srovnání s infekcemi způsobenými *S. aureus* citlivým na meticilin provázeny

zvýšenou mortalitou, morbiditou a délkou hospitalizace. Zatímco v USA, Evropě, Číně a mnoha dalších zemích nemocniční infekce spojené s MRSA klesají pravděpodobně díky zvýšeným hygienickým opatřením a dohledu, v málo rozvinutých zemích stále narůstají (Cheung et al. 2021).

3.2.2 Gramnegativní

3.2.2.1 *Escherichia coli*

E. coli je fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinka, která patří také do čeledi Enterobacteriaceae (Gomes et al. 2016). Tyčinky mají průměr zhruba 0,4 µm a délku 2–3 µm (Sora et al. 2021). Rod *Escherichia* byl pojmenován po německém pediatrovi Theodoru Escherichovi. *Escherichia coli* je široce rozšířena, obývá komenzálně tlusté střevo člověka a teplokrevných živočichů. Ačkoli většina kmenů žije neškodně v tlustém střevě a jen zřídka způsobuje onemocnění u zdravých jedinců, řada patogenních kmenů může způsobovat střevní i mimostřevní onemocnění jak u zdravých, tak u imunokompromitovaných jedinců (Gomes et al. 2016).

Patogenní *E. coli* lze rozlišit na dvě hlavní skupiny podle schopnosti způsobovat infekce v gastrointestinálním systému nebo mimo něj. Intestinální kmeny *E. coli* se dělí na následující patotypy: enteropatogenní způsobující průjemy u dětí a zvířat; enterohemoragická, která je zodpovědná za hemoragickou kolitidu a hemolyticko-uremický syndrom; enterotoxigenní, která je hlavní příčinou cestovatelského průjmu a průjmu prasat a skotu; enteroagregativní, která může u lidí způsobit přetrvávající průjem; difúzně adherentní způsobující průjem u dětí; a enteroinvazivní, která způsobuje vodnaté průjemy a úplavici. Skupina extraintestinálních patogenů zahrnuje následující varianty: uropatogenní; *E. coli* způsobující neonatální meningitidu; izoláty způsobující septikémii; aviární patogenní; a mamární patogenní *E. coli*. Tyto patotypy jsou také izolovány z nemocí zvířat, jako je fatální pneumonie u prasat, mastitida u krav a prasat, pyometra a infekce močových cest u psů (Sora et al. 2021).

3.2.2.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella je bakteriální rod z čeledi Enterobacteriaceae, což jsou gramnegativní, nepohyblivé, nesporující bacily, které se běžně vyskytují v gastrointestinálním traktu savců a příležitostně infikují hostitele. Tyto bakterie často způsobují život ohrožující infekce, jako jsou septikémie, infekce močových cest, pneumonie a jaterní abscesy u pacientů s oslabenou imunitou. *K. pneumoniae* je nejrozšířenějším nozokomiálním a oportunním patogenem (Sivaramakrishnan et al. 2022).

Bakterie byla poprvé popsána Carlem Friedlanderem v roce 1882, byla izolována z plic pacientů, kteří podleli zápalu plic. Tato všudypřítomná bakterie kolonizuje povrch sliznic a proniká až do krevního řečiště (Dai et Hu 2022). *K. pneumoniae* může za anaerobních podmínek fermentovat glukózu za vzniku kyseliny a plynu, což vede k plynotvorným abscesům. Byly popsány případy způsobující plynotvorné abscesy hlavně v játrech a močových cestách.

Jelikož je jejich výskyt v mozku extrémně vzácný, antibiotika procházející hematoencefalickou bariérou nejsou běžně volena pro léčbu (Wu et al. 2024).

Kritickou vlastností *K. pneumoniae*, přispívající k její evoluci, je schopnost získávat nový genetický materiál. V důsledku toho v současné době existují dva patotypy označované jako klasická *K. pneumoniae* (cKp) a hypervirulentní *K. pneumoniae* (hvKp). Oba patotypy jsou globálními patogeny, ale výskyt infekcí způsobených hvKp se v posledních třech desetiletích neustále zvyšuje v zemích asijsko-pacifického regionu. Naproti tomu v západních zemích dosud převládá původce cKp, ale infekce způsobené hvKp jsou stále častěji rozpoznávány i mimo Asii (Russo & Marr 2019).

3.2.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Tato všudypřítomná gramnegativní aerobní bakterie je běžnou součástí střevní flóry, ale může se stát silným patogenem, zejména u kriticky nemocných pacientů na jednotkách intenzivní péče (Breijyeh et al. 2020). *P. aeruginosa* může způsobovat závažné akutní a chronické infekce u pacientů na ventilátorech a u pacientů s popáleninami, chirurgickými incizemi, vředy na diabetické noze a katetry. Kromě toho je také významnou příčinou morbidity u jedinců s cystickou fibrózou. Infekce způsobené *P. aeruginosa* se mohou vyskytnout i u jinak zdravých lidí, například mohou způsobit zánět vnějšího zvukovodu, zánět středního ucha, zánět vlasových folikulů a zánět rohovky. Pokud je léčba v akutním stavu neúspěšná, mohou se vytvořit chronické biofilmové infekce, kterých je obtížné se zbavit. Kromě toho je tato bakterie vnitřně rezistentní k široké škále antibiotik a v poslední době se zvyšuje výskyt multirezistentních kmenů (Crone et al. 2020).

P. aeruginosa byla poprvé identifikována v roce 1882 a je považována za oportunního patogena, který může přežít na površích nemocničního prostředí. Je častou příčinou nozokomiálních infekcí, zejména ventilátorové pneumonie a infekcí krevního řečiště (Breijyeh et al. 2020). Oproti jiným bakteriím má *P. aeruginosa* unikátní vlastnost – každý z jejích vnitřních mechanismů rezistence poskytuje odolnost proti více antibiotikům současně (Kakoullis et al. 2021).

Léčbu infekcí navíc ztěžuje schopnost *P. aeruginosa* vytvářet biofilmy, které je chrání před okolními vlivy prostředí, brání fagocytóze, a tím jim propůjčují schopnost kolonizace a dlouhodobého přetrvávání. Biofilm představuje komplexní uskupení bakterií uzavřených v autonomně vytvořené matici extracelulárních polymerních látek (EPS). Jedná se o klíčovou strategii pro přežití druhů v reakci na změny životních podmínek, jako jsou kolísání teploty a dostupnosti živin (Thi et al. 2020).

3.3 Silice

3.3.1 Charakterizace

Lidé využívají rostliny k léčbě různých onemocnění, včetně bakteriálních infekcí, již tisíce let. Moderní techniky nám umožnily vědecky potvrdit mnoho tradičních léčebných využití rostlin. V poslední době byly intenzivně zkoumány různé rostlinné sloučeniny, včetně komplexních rostlinných extraktů, éterických olejů a čistých látek, jako jsou terpenoidy, polyfenoly a alkaloidy (Álvarez-Martínez et al. 2021).

Rostliny vytvářejí dva typy metabolitů: primární, které jsou zásadní pro jejich přežití, a sekundární, které reagují na interakce s prostředím. Primární metabolity zahrnují produkty glykolýzy, šikimátové dráhy a cyklu trikarboxylových kyselin, které podporují výživu a reprodukci rostlin (Jubair et al. 2021). Silice neboli esenciální oleje pocházejí z aromatických rostlin, kde působí jako sekundární metabolity (Mahizan et al. 2019). Silice se nacházejí v cytoplazmě některých rostlinných buněk, konkrétně se vylučují v trichomech nebo sekrečních chloupkách, epidermálních buňkách, vnitřních sekrečních buňkách a sekrečních kapsách (Bhavaniramya et al. 2019). Zastupují ochrannou funkci proti bakteriálním, plísňovým a virovým infekcím (Mahizan et al. 2019). Plní také klíčovou úlohu v rostlinné reprodukci tím, že přitahují opylovače, což přispívá k distribuci semen a pylu. Některé silice, např. z *Cryptomeria japonica*, mají rovněž repelentní účinek vůči hmyzu a škůdcům, což je důležitá součást obranného mechanismu rostlin (Aljaafari et al. 2021).

V mnoha výzkumech byl potvrzen terapeutický potenciál těchto látek, přičemž silice projevovaly antibakteriální, antioxidační, analgetické, sedativní, protizánětlivé, protiplísňové, protirakovinné a protizánětlivé účinky (Marinelli et al. 2018). Fytochemikálie mohou působit prostřednictvím různých mechanismů a cílových míst ve srovnání s tradičními antibiotiky, a proto bylo navrženo, aby jejich kombinace s konvenčními antibiotiky poskytovala vynikající účinnost při potlačování rozvoje rezistence (Álvarez-Martínez et al. 2021).

Nejvíce silic se vyskytuje v rostlinných čeledích *Lamiaceae* (hluchavkovité – levandule, máta peprná, šalvěj, oregano, tymián, majoránka), *Apiaceae* (miříkovité – kmín, anýz), *Rutaceae* (routovité – pomeranč, citron, grapefruit), *Asteraceae* (hvězdicovité – kopretina, slunečnice, bodláky), *Cupressaceae* (cypřišovitě – jalovec, sekvoj), *Myrtaceae* (myrtovité – eukalyptus, hřebíček), *Pinaceae* (borovicovité – cedr, modřín, borovice, smrk) (Kachur & Suntres, 2020).

3.3.2 Chemické vlastnosti

Základními složkami silic jsou terpeny, zejména upravené terpeny (terpenoidy) obsahující kyslík ve formě hydroxylových, eterových, aldehydových, ketonových nebo karboxylových skupin. Přítomny mohou být i fenylpropanoidy a deriváty alifatických uhlovodíků s krátkým řetězcem. Terpeny se skládají z izoprenových jednotek (2-methyl-1,3-butadien) s obecným strukturálním vzorcem $(C_5H_8)_n$, kde n je počet vázaných izoprenylových jednotek (Pereira et al., 2018). Okysličené sloučeniny mohou být odvozeny z terpenů, ve

kterých se nazývají „terpenoidy“ (Tongnuanchan & Benjakul 2014). Podle počtu atomů uhlíku se klasifikují na hemiterpeny s 5 C, monoterpeny (10 C), seskviterpeny (15 C), diterpeny (20 C), sesterpenteny (25 C), triterpeny (30 C), tetraterpeny (40 C) a polyterpeny (>45 C). Monoterpeny dominují v rostlinách jako nejvýznamnější složka silic, tvoří více než 80 % obsahu (Pereira et al. 2018).

Pro zlepšení rozpustnosti silic se využívá různých dispergačních činidel a povrchově aktivních látek, včetně bezvodého etylalkoholu, Tween, dimetylsulfoxidu, agarosu a lecitinu. Tímto způsobem je dosaženo maximálního kontaktu silice s mikroorganismy. Přítomnost emulgátorů může brzdit separaci silic a vody, což zvyšuje kontaktní plochu mezi silicemi a bakteriemi (Ju et al. 2022).

Mnoho složek silic obsahuje asymetrické atomy uhlíku, které vykazují optickou aktivitu. Tyto chirální sloučeniny, zejména mono- a seskviterpeny, se vyskytují v charakteristickém enantiomerním rozložení, vyvinutých prostřednictvím enzymaticky řízené biosyntézy. Chiralita vonných látek má vliv na způsob jejich účinku, což způsobuje, že analogicky s jinými léčivými mohou enantiomery působit odlišně. Mezi chirálními sloučeninami se může vyskytovat rozdíl ve vůni (Sharmeen et al. 2021). Složení silic může být ovlivněno prostředím, sklizní, zpracováním a skladováním rostlinného materiálu. Terpenoidy a další složky silic jsou obvykle těžké, termolabilní a náchylné k oxidaci, hydrolýze a snadné degradaci (de Matos et al. 2019).

3.3.3 Způsoby získávání silic

Silice jsou těkavé, většinou kapalné a dobře rozpustné látky v lipidech a organických sloučeninách. Vyskytují se v květech, poupatech, listech, kůře, větvičkách, dřevě, stonku, semenech nebo v kořenech (Mahizan et al. 2019). Tradiční přístupy k získání silic a extraktů z rostlinné matrice zahrnují parní a hydrodestilaci, extrakci kapalným rozpouštědlem a destilaci. V současné době se pozornost věnuje extrakci složek silic za vysokého tlaku pomocí superkritických kapalin. Tato metoda je obzvláště zajímavá pro potravinářský, farmaceutický a kosmetický průmysl jako alternativa k tradičním postupům, jelikož zahrnuje moderní metody jako mikrovlnný proces a extrakci superkritickými kapalinami, které snižují oxidaci sloučenin a zachovávají květinové vůně (Baptista-Silva et al. 2020).

LISOVÁNÍ

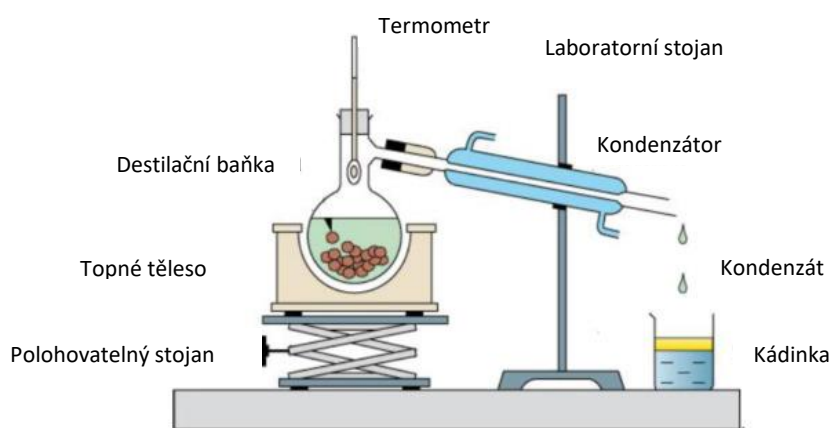
Nejstarší metodou získávání silic je lisování za studena. Touto metodou se získávají hlavně silice z citrusových slupek (Reyes-Jurado et al. 2015). Jedná se o fyzikální proces, při kterém se rostlinná matrice rozdrťí nebo rozbije, aby se uvolnila silice, čímž vznikne emulze olej/voda, která se obvykle oddělí odstředěním (Razola-Díaz et al. 2021). Na trhu je k dispozici mnoho zařízení pro tuto metodu. Silice získané touto metodou nejsou zcela těkavé sloučeniny, obsahují též kumariny, rostlinná barviva atd. Proto, je-li požadována čistá silice, je třeba použít destilaci nad zředěným NaOH (Reyes-Jurado et al. 2015).

PARNÍ DESTILACE

Parní destilace je nejčastěji používanou selektivní metodou pro extrakci silic z rostlin. Tato metoda umožňuje výtěžek z 93 % silic, dalších 7 % lze získat pomocí jiných postupů. Vzorek rostliny je vstříkovan do vroucí vody, buněčná stěna praskne a uvolní se aromatické sloučeniny nebo silice (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Masango (2005) vyvinul efektivní metodu parní destilace silic, která zvyšuje výtěžnost oleje a snižuje ztráty polárních sloučenin v odpadní vodě. Tato metoda zahrnuje umístění rostlinného materiálu nad zdrojem páry vytvořené samostatně, přičemž pouze pára prochází skrz rostlinný materiál, a vroucí voda zůstává oddělená. Tímto způsobem se minimalizuje spotřeba páry a množství vody v destilátu. Tato metoda také snižuje rozpustnost ve vodě rozpustných sloučenin v kondenzátu (Tongnuanchan & Benjakul 2014). Parní destilace se používá nejčastěji pro extrakci levandule, pomerančové kůry a eukalyptu. Naopak pro extrakci koření, například hřebíčku, kmínu, zázvoru, máty, semene kopru, citronové trávy a bazalky, je nejúčinnější hydrodestilace (Katekar et al. 2023).

HYDRODESTILACE

Metoda hydrodestilace (Obrázek 2) zahrnuje destilační baňku s léčivým rostlinným materiálem a rozpouštědlem (obvykle vodou) (Katekar et al. 2023). Tato technika se pravidelně provádí pomocí zařízení známého jako Clevengerův přístroj nebo jednoduchá destilace s vodní parou. Hydrodestilace zahrnuje tři hlavní fyzikálně-chemické procesy: hydrodifuzi, hydrolýzu a tepelný rozklad (Fagbemi et al. 2021). Směs je externě ohřívána elektrickou topnou spirálou, čímž dochází ke vzniku pár, které kondenzují v kondenzátoru, kde dochází ke shromažďování silic. Pára obsahující silice se zkondenzuje a silice se oddělí (Katekar et al. 2023). Při hydrodestilačních metodách však může dojít k chemickým změnám a sloučeniny citlivé na teplo se mohou při teplotě varu vody snadno zničit. Proto je kvalita výtažků silic velmi zhoršená (Baptista-Silva et al. 2020).



Obrázek 2: Hydrodestilace (Katekar et al., 2023)

3.3.4 Mechanismus účinku antimikrobiální látky

Mechanismus účinku silic není úplně objasněn, což je dáno rozsáhlým spektrem jejich složek. Je pravděpodobné, že jejich antimikrobiální aktivita není výsledkem jediného

specifického mechanismu, ale zahrnuje různé cíle uvnitř buňky (Andrade-Ochoa et al. 2021). Mechanismy účinku silic a jejich složek závisí na chemickém složení. Např. tymol a karvakrol, přestože mají podobné antimikrobiální účinky, působí různě na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Rozdíl v umístění funkčních skupin na těchto molekulách ovlivňuje jejich antimikrobiální účinnost. Ačkoli tymol je strukturně podobný karvakrolu s odlišným umístěním hydroxylových skupin, tento rozdíl neovlivňuje jejich antimikrobiální aktivitu (Nazzaro et al. 2013).

Hlavní mechanismy účinku silic zahrnují degradaci buněčné stěny, poškození cytoplazmatické membrány a membránových proteinů, což vede ke koagulaci cytoplazmy, zvýšenou permeabilitu a únik buněčného obsahu (Nazzaro et al. 2013). Antibakteriální účinek esenciálních olejů je také spojen se sníženým membránovým potenciálem, narušením protonové pumpy a vyčerpáním ATP (adenosintrifosfát) (Turina et al. 2006). Porucha buněčné membrány způsobená silicemi také ovlivňuje základní procesy jako je metabolismus energie, zpracování živin, syntéza makromolekul a sekrece růstových regulátorů (Oussalah et al. 2006)

Esenciální oleje mohou ovlivnit jak vnější obal buňky, tak cytoplazmu (Nazzaro et al. 2013). Jednotlivé složky esenciálních olejů mohou mít různé mechanismy účinku proti mikrobům, závislé na typech chemických složek v oleji. Celkový antibakteriální účinek esenciálních olejů je ovlivněn biochemickými reakcemi v bakteriální buňce a také se liší podle bakteriální struktury, včetně rozdílů mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi, které mají odlišné složení buněčných membrán (Swamy et al. 2016). Fenolové sloučeniny, obsažené v esenciálních olejích, vykazují antimikrobiální účinky převážně proti grampozitivním bakteriím. Účinnost těchto sloučenin závisí na jejich koncentraci: v nižších hladinách mohou ovlivňovat enzymy spojené s výrobou energie, zatímco ve vyšších koncentracích mají tendenci denaturovat proteiny (Nazzaro et al. 2013).

Další mechanismus účinku silic proti mikroorganismům spočívá v interakci jejich hydrofobních složek s lipidy buněčné membrány. Tato interakce způsobuje ztrátu integrity membrány a toto poškození vyvolává změny ve fungování elektronového transportního řetězce. Cytoplazmatická membrána působí jako selektivní bariéra, která umožňuje vstup a výstup malých rozpuštěných látek a iontů, jako je H^+ , K^+ , Na^+ a Ca^{2+} . Tato selektivita řídí hlavní buněčné funkce a poškození buněčné membrány může změnit mikrobiální homeostázu a vést k metabolickým změnám, které mohou vést k buněčné smrti (da Silva et al. 2021).

Eugenol ovlivňuje membrány tím, že zasahuje do transportu iontů a ATP a mění složení mastných kyselin u různých bakterií. Navíc inhibuje několik bakteriálních enzymů, včetně ATPázy, histidinkarboxylázy, amylázy a proteázy (Thoroski et al. 1989).

Antimikrobiální aktivita tymolu způsobuje strukturální a funkční změny v cytoplazmatické membráně, poškozuje membrány, a interaguje s membránovými proteiny a intracelulárními cíli. Tyto interakce zvyšují permeabilitu membrány, což vede k uvolňování iontů draslíku (K^+) a ATP. Tymol se také integruje do lipidové dvojvrstvy, což může ovlivnit buněčné funkce a v nízkých koncentracích umožňuje adaptaci lipidového profilu membrány pro zachování její funkce (Nazzaro et al. 2013).

Karvakrol, hydrofobní sloučenina, ovlivňuje buněčné membrány tím, že mění složení mastných kyselin, což ovlivňuje jejich fluiditu a propustnost (Rudramurthy et al. 2016). Hydroxylová skupina v karvakrolu může fungovat jako transmembránový nosič iontů, což zvyšuje tekutost a propustnost membrán. Exponované mikrobiální buňky mohou reagovat změnou složení mastných kyselin v membráně, což ovlivňuje jejich strukturu a funkci (Nazzaro et al. 2013).

Linalool primárně poškozuje buněčnou membránu, což vede k úniku intracelulárních makromolekul a narušení její funkce. Navíc inhibuje aktivity klíčových enzymů zapojených do citrátového cyklu a glykolýzy, stejně jako ATPázu a dehydrogenázu dýchacího řetězce, čímž omezuje produkci ATP a buněčné dýchání (Guo et al. 2021).

Zvláštní mechanismy účinku α -terpineolu proti bakteriím zahrnují tvorbu glykosidických a vodíkových vazeb s bakteriemi, zvýšené gelovatění membrán a sníženou fluiditu membrán, narušení elektronového transportu v cytoplazmatické membráně a narušení protonového gradientu a oxidativní fosforylace (Yang et al. 2023).

3.3.5 Charakterizace vybraných složek silic

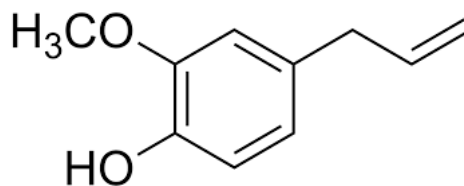
3.3.5.1 Eugenol

Tato aromatická látka, rozpustná v organických rozpouštědlech, se vyznačuje čirou až světle žlutou tekutinou olejovité konzistence s kořeněným aroma (Ulanowska & Olas, 2021). Podle chemického názvosloví se jedná o 4-allyl-2-methoxyfenol (Obrázek 3), což je fenolpropanoid s allylovým řetězcem substituovaným guajakolem (Nisar et al. 2021).

Tato přírodní organická látka se nachází v bazalce, hřebíčku, zázvoru, skořici, kurkumě, paprice a muškátovém oříšku. Nicméně nejvyšší obsah eugenolu je zaznamenán v hřebíčkovci kořeněném (*Eugenia caryophyllata*), a to v rozmezí od 45 do 90 %. Hřebíčková silice se používá k léčbě mnoha nemocí včetně akné, astmatu, revmatoidní artritidy, jizev, bradavic a různých alergií (Marchese et al. 2017). Eugenol má také farmakologické, parfumérské a potravinářské využití. Ve farmakologii se využívá pro své analgetické, antidiabetické, antimikrobiální a protizánětlivé vlastnosti, stejně jako pro neuroprotektivní účinky. Taktéž byla zaznamenána protinádorová aktivita. V zemědělství se eugenol využívá jako atraktant pro hmyz a při výrobě pesticidů (Nisar et al. 2021).

Eugenol vykazuje baktericidní nebo bakteriostatický účinek v závislosti na MIC (minimální inhibiční koncentrace) a MBC (minimální baktericidní koncentrace). Taktéž projevuje antivirové a antimykotické účinky. Eugenol prokazuje aktivitu proti různým bakteriálním kmenům, včetně gramnegativních a grampozitivních (Nisar et al. 2021). Bylo popsáno, že eugenol inhibuje růst *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* a *S. aureus* (Qiu et al. 2010). Přítomnost volné hydroxylové skupiny v molekule eugenolu představuje hlavní faktor odpovědný za vysokou antimikrobiální aktivitu. Eugenol negativně ovlivňuje buněčnou stěnu a membránu bakterií (Nisar et al. 2021). Jelikož je hydrofobní, snadno proniká lipopolysacharidovou buněčnou membránou a vstupuje do cytoplazmy. Jeho přítomnost v

buňce může způsobit strukturální změny, vedoucí ke ztrátě intracelulárních složek (Ulanowska & Olas 2021).



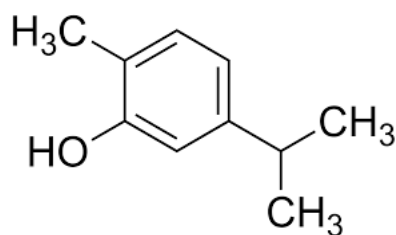
Obrázek 3: Eugenol

3.3.5.2 Karvakrol

Karvakrol C₁₀H₁₄O, chemickým názvoslovím 2-methyl-5-(1-methyl)-fenol, se skládá z monoterpenového fenolu (Obrázek 4). Přirozeně se vyskytuje v tymiánu, oreganu divokém bergamotu, černém kmínu a řeřiše. Je rozpustný v etanolu, tetrachlormetanu a dietyleru. Díky své odvozenině od cymenu vykazuje bakteriální inhibiční schopnosti. Karvakrol rovněž projevuje antioxidační a hepatoprotektivní účinky. V důsledku přítomnosti hydroxylové skupiny dochází k zachycování volných radikálů (Imran et al. 2022).

Největší obsah karvakrolu lze nalézt v oreganu (*Origanum vulgare*), která projevuje významnou antioxidační a antikarcinogenní aktivitu proti buněčné linii triple-negativnímu karcinomu prsu. Karvakrol dále projevuje antiseptické, protizánětlivé, antidiabetické, imunomodulační, antimikrobiální a hepatoprotektivní a neuroprotektivní účinky. Významná antimikrobiální aktivita byla zaznamenána především u bakterií *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, a v kombinaci s tymolem také u *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* a *Pseudomonas aeruginosa*. Antifungální účinky byly prokázány u plísní *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida spp.*, *Penicillium rubrum* a *Trichoderma viride* (Imran et al. 2022).

Karvakrol spolu s tymolem tvoří 75–80 % silic obsažených v oregánu. Bioaktivní složky oregana jsou prospěšné zejména díky svým antioxidačním a antimikrobiálním vlastnostem. Oregano se používá v řeckých, italských a mexických pokrmech; jeho sušené listy jsou přidávány do omáček, polévek, dušeného masa, nádivek, čajů a kombinují se s rajčaty na pizzu (Rodriguez-Garcia et al. 2016). Tymián obsahuje 5–75 % karvakrolu, zatímco majoránka 50–70 %. Použití karvakrolu jako přísady do potravinářských výrobků bylo schváleno Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a byl zařazen mezi chemické látky používané k aromatizaci. Díky svým aromatickým vlastnostem se také používá jako konzervační látka (Imran et al., 2022; Marinelli et al. 2018).



Obrázek 4: Karvakrol

3.3.5.3 Linalool

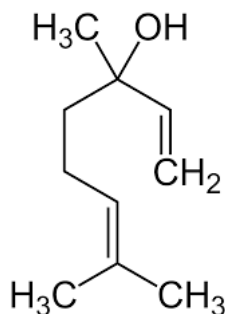
3,7-dimethyl-1,6-oktadien-3-ol, neboli linalool $C_{10}H_{18}O$ (Obrázek 5), je monoterpenový acyklický terciární alkohol. Při běžné pokojové teplotě se vyskytuje jako bezbarvá nebo jemně nažloutlá látka. Je přítomná v silicích více než 200 jednoděložných a dvouděložných rostlin, zejména u čeledí: hluchavkovité (*Lamiaceae*), vavřínovité (*Lauraceae*) a miříkovité (*Apiaceae*) (Pereira et al. 2018). V potravinách se vyskytuje přirozeně v různých koncentracích. Největší podíl má v pomeranči a bergamotu, dále v meruňkách, hroznech, nektarinkách, broskvích, jahodách a rajčatech, nejméně v citronech, melounu, a malinách (Maćzka et al. 2022). Linalool je uváděn jako hlavní složka levandulové silice (cca 40 %) a koriandru (60–80 %). Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*) patří do čeledi Lamiaceae a používá se pro různé poruchy, včetně úzkosti, stresu a bolestí hlav (Caputo et al. 2021). Linalool je klíčovou sloučeninou pro výrobu různých domácích produktů, kosmetiky a vonných chemikálií, jako je geraniol, nerol, citral a jeho deriváty, a také je to hlavní sloučenina při syntéze vitamínů A a E ve farmacii (Crone et al. 2020).

Linalool existuje ve formě dvou enantiomerů: (3S)-(+)-linalool, tzv. koriandrol, a (3R)-(–)-linalool, tzv. licareol. Je zajímavé, že oba enantiomery mají odlišné aromatické profily: koriandrol je vnímán jako sladký, květinový, bylinný s citrusovými a ovocnými tóny, zatímco licareol má dřevité a levandulové aroma. Využívá se při výrobě parfémů, pleťových vod, mýdel, šamponů, v detergentech nebo čistících prostředcích. Poslední dobou se také uplatňuje jako složka v aktivních obalech, kde je buďto rozprašován do prostoru nad potravinou v obalu, nebo se aplikuje přímo do obalu nebo folie potravin (Maćzka et al. 2022). Linalool podléhá oxidaci kvůli přítomné hydroxylové skupině a dvojným vazbám, což vede k vytvoření produktů furanoidů a pyranoidů, které jsou typické pro vůně vína, papáji a květin (Pereira et al. 2018).

Linalool vykazuje různé bioaktivní vlastnosti, včetně protizánětlivých, antiproliferativních a protirakovinných účinků, antihyperlipidemických vlastností, antimikrobiálních schopností, antinociceptivních a analgetických účinků, anxiolytických a antidepresivních účinků, a též neuroprotektivních účinků (Pereira et al. 2018).

Některé studie prokázaly jeho účinnost proti život ohrožujícím kmenům, včetně multirezistentních jako *E. coli* a *P. aeruginosa*. Kromě toho byl účinek prokázán i proti bakteriím spojených s gastrointestinálními infekcemi, onemocněním parodontu a vznik zubního kazu, a také onemocněním způsobeným bakteriemi *Streptococcus mutans*, a *Staphylococcus epidermidis*. Přidání linaloolu do potravin může mít pozitivní účinky, protože bylo prokázáno, že působí proti mikrobům kontaminujícím potraviny, jako jsou *Campylobacter* spp. a *Salmonella* spp., a také *Listeria monocytogenes* a *E. coli*. Nicméně, fyzikální vlastnosti

linaloolu, zejména jeho rozpustnost a stabilita, mohou představovat problém. Problém biologické dostupnosti lze vyřešit uzavřením linaloolu do nanoemulzí a koloidních disperzí, které jsou stabilnější (Maćzka et al. 2022).



Obrázek 5: Linalool

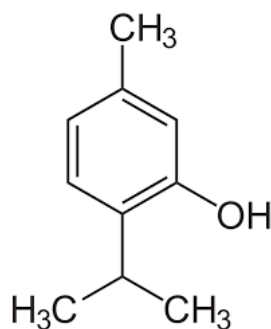
3.3.5.4 Tymol

Tymol, též označovaný jako 2-isopropyl-5-metylphenol a 5-metyl-2-isopropylphenol (Obrázek 6), představuje přírodní monoterpenoidní fenol. Je krystalický, bezbarvý a vyznačuje se charakteristickým zápachem. S karvakolem představuje hlavní aktivní složku silice získávané z tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*). Jedná se o vytrvalou aromatickou rostlinu, dřevnatou, silně rozvětvenou a malého vzrůstu, patřící do čeledi hluchavkovitých (Escobar et al. 2020).

Tymián prokázal účinnost v boji proti bakteriím (*E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida*, *S. aureus*, MRSA) a houbám (*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus laurentii*) s rezistencí vůči standardní antimykotické terapii díky schopnosti tvořit biofilm. Tymiónové silice vykazují také antivirovou aktivitu proti virům chřipky, HSV-1, HSV-2 a HIV-1 (Kowalczyk et al. 2020). Mezi hlášená léčebná použití silic z tymiánu a dalších silic obsahujících tymol patří následující: léčba poruch postihujících dýchací a trávicí systém (např. antitusika, expektorans, žaludeční, zažívací, karminativní a antispasmodika), aktivita proti onemocněním dutiny ústní (např. kaz), antioxidantní, protizánětlivé, antifungální a antimikrobiální účinky. V potravinářství se používá jako konzervant. Tymol se uplatňuje také v komerčních formulacích jako insekticid, akaricid, repelent proti hmyzu a zvířatům, fungicid a lékařský dezinfekční prostředek (Escobar et al. 2020).

Tymol působí na bakterie tím, že se integruje do lipidové vrstvy buněčné membrány, což deformuje povrch a způsobuje strukturální změny. Hydrofilní část molekuly interaguje s polární částí membrány, zatímco hydrofobní benzenový kruh a alifatické postranní řetězce pronikají do vnitřní části biologické membrány, destabilizují lipidovou vrstvu, zvyšují propustnost a snižují elasticitu. Tento proces ovlivňuje i aktivitu vnitřních membránových proteinů, včetně enzymů a receptorů, což může vést k změnám v jejich aktivitě. Po integrování do membrány tymol interaguje s vnitřními proteiny prostřednictvím různých nesespecifických

mechanismů, což vede k dalším změnám v konformaci a aktivitě vnitřních a membránových proteinů (Kowalczyk et al. 2020).



Obrázek 6: Tymol

3.3.5.5 α -Terpineol

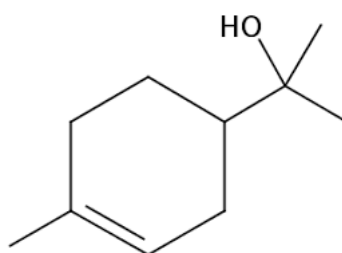
Terpineol ($C_{10}H_{18}O$) je monocyklický monoterpenový terciární alkohol (Obrázek 7), který se vyskytuje v aromatických silicích z koření. Existuje pět izomerů terpineolu, včetně α -, β -, γ -, δ -terpineolu a terpinen-4-olu. α -Terpineol a terpinen-4-ol jsou nejběžnější a vyskytují se ve velkém množství přírodních zdrojů, naopak β -, γ - a δ -terpineol jsou v přírodě méně běžné (Chen et al. 2023).

α -Terpineol, propan-2-ol substituovaný 4-metylcyklohex-3-en-1-ylou skupinou v poloze 2, je často používán ve vonných přísadách potravin, nápojů, tabáku, mýdla, parfémů, kosmetiky a čisticích prostředků. Tato látka existuje ve dvou formách: R-(+)- α -terpineol a S-(-)- α -terpineol, s odlišnými senzorickými vlastnostmi. R-(+)- α -Terpineol s vůní podobnou šeríku se nachází v mnoha rostlinných silicích, včetně sladkého pomeranče, manga, neroli bigarde, máty citronové, máty dlouholisté a oregánu. Naopak S-(-)- α -terpineol má jehličnatý zápach a získává se ze silic skořice, citronu, liči a vavřínu (Chen et al. 2023).

α -Terpineol je hlavní složkou silic z různých rostlin, majoránky (*Origanum majorana*, 73 %), borovice přímořské (*Pinus pinaster*, 67 %) nebo šalvěže (*Salvia sclarea*, 47 %). Tato látka tvoří i významný podíl narcisu bílého (*Arcissus poeticus*, 24 %) a vyskytuje se v relativně vysokých koncentracích (> 1 %) v ropné frakci dalších druhů zdrojů. Ester terpinylacetátu se vyskytuje v různých silicích, včetně těch z cypřiše, malabarského kardamonu, kajeputu, jehličí sibiřské borovice, borovice a hořkého pomeranče. I přes to, že se α -terpineol hojně přirozeně vyskytuje a lze jej získat z přírodních zdrojů (např. frakční destilací borových silic), se tato složka obvykle vyrábí chemickou syntézou (Sales et al. 1947).

β -Terpineol je bezbarvá viskózní kapalina se štiplavým dřevitým zápachem, používaná v mýdlech a detergentech. γ -Terpineol, nacházející se v silici z jalovce formosanského (*Juniperus formosana*), je známý svou lehkou borovicovou vůní. δ -Terpineol má přírodní květinovou vůni a často se přidává do mýdel jako parfém. Terpinen-4-ol, terciární alkohol s teplým pepřovým zápachem, je v kosmetickém průmyslu využíván pro své parfumérské kvality a v čisticích prostředcích pro své dezinfekční vlastnosti. Tento terpineol je také používán v potravinářském průmyslu jako aromatická přísada (Chen et al. 2023).

Vykazuje řadu příznivých vlastností, včetně antioxidačních, protizánětlivých, antimikrobiálních, analgetických, protiprůjmových, antikonvulzivních, protirakovinných účinků a snižování krevního tlaku, a dalších účinků. α -Terpineol inhibuje růst mnoha bakterií, včetně *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecalis* a *Helicobacter pylori*. Studie prokázaly, že α -terpineol má silný inhibiční účinek na bakterii *E. coli* s minimální inhibiční koncentrací (MIC) 0,78 $\mu\text{g/ml}$. Léčba α -terpineolem vedla k morfologickým změnám v *E. coli*, zahrnující zmenšení velikosti buněk, změny tvaru buňky, poškození buněčné stěny a membrány, vnějšímu úniku cytoplazmy, rozpuštění jaderné membrány a vakuolizaci buňky. Byl pozorován pokles intenzity fluorescence DNA a obsahu proteinů. Celkově studie naznačují, že antibakteriální mechanismus α -terpineolu spočívá ve zvyšování permeability buněčné stěny a membrány a inhibici syntézy nukleové kyseliny a proteinů (Chen et al. 2023).



Obrázek 7: α -Terpineol

3.3.6 Význam

V současné době je známo přibližně 3 000 silic, z nichž 300 je komerčně významných (Baptista-Silva et al. 2020). Používání silic se v současnosti stává stále oblíbenějším nejen ve farmaceutickém průmyslu, ale také v parfumérském a kosmetickém odvětví (parfémy/vůně, aromaterapie, péče o vlasy a pleť). Jejich široká aplikace by mohla v budoucnu nahradit antibiotika, ačkoli přesné mechanismy účinku silic závisí na chemickém složení silic (Aljaafari et al. 2021). Také mohou být využívány v potravinářském průmyslu jako funkční potraviny (nutraceutika, biopolymery), potravinářské přídatné látky (ochucovadla, antioxidanty, antimikrobiální látky) a také jako doplňky stravy (potravinové doplňky, kulinářství) (Zengin & Baysal 2014). Dle informací od FDA z roku 2005 je bezpečné využívat silice, a jejich složky mohou sloužit jako aditiva v antimikrobiálních přípravcích s cílem redukovat vývoj rezistence vůči antibakteriálním, antifungálním a antivirovým lékům. I přes bohatou nabídku silic získalo schválení jako potravinových konzervantů jen několik z nich. To lze přičíst tomu, že některé složky potravin výrazně snižují antimikrobiální účinnost silic. Některé studie naznačují, že surové extrakty a silice mají lepší antimikrobiální spektrum ve srovnání s čistými sloučeninami, což lze přičíst synergii mezi různými metabolity nebo kombinovanému antimikrobiálnímu účinku různých složek (Aljaafari et al. 2021).

Silice se využívají i jako přírodní přísada pro prodloužení trvanlivosti potravin, namísto používání syntetických konzervačních látek. Mohou být přidávány do tzv. chytrých nebo aktivních obalů, kde mohou modifikovat strukturu obalových materiálů a tím vylepšit jejich vlastnosti (Tongnuanchan & Benjakul 2014).

Hledání nových účinných látek proti bakteriím s multidrogovou rezistencí je prioritou světového zdraví. Některé fytochemikálie byly identifikovány jako schopné inaktivovat nebo oslabit rezistenční mechanismy vůči antibiotikům, což způsobuje, že bakterie jsou citlivější na účinky antibiotik. Tato synergická interakce mezi vybranými fytochemikáliemi a antibiotiky zvyšuje jejich účinnost, která by samostatně byla omezená. Některé fytochemikálie projevují svou antibakteriální aktivitu pouze v kombinaci s antibiotiky, zatímco samy o sobě jsou neaktivní (Álvarez-Martínez et al. 2021).

3.4 Synergické interakce

Novým přístupem, který se v současné době zkoumá, je kombinovaný účinek silic a jejich sloučenin s antibiotiky. Tato kombinovaná terapie může vykazovat čtyři typy účinků: synergický, aditivní, indiferentní a antagonistický. Využití synergické kombinace silic a antimikrobiálních látek bylo navrženo jako jedna z možných alternativních strategií v boji proti antimikrobiální rezistenci. Podle několika studií některé složky silic prokázaly schopnost zvýšit konvenční antimikrobiální účinnost a potenci, když jsou použity v kombinaci (Aljaafari et al. 2021).

Antibakteriální mechanismus silic obvykle spočívá v současném působení několika mechanismů namísto jednoho. Bariérová funkce buněčné stěny mikroorganismů snižuje jejich citlivost na antimikrobiální látky. Hlavní složky buněčné stěny a enzymy spojené s buněčnou stěnou představují klíčová místa interakcí s molekulami silic. Aktivní složky obsažené v silicích narušují strukturu peptidoglykanu nebo inhibují jeho syntézu, což má za následek poškození buněčné stěny a deformaci nebo apoptózu bakterií. Transpeptidáza, nezbytná pro soupeření s bakteriemi o syntézu buněčné stěny, brání spojení mezi D-alaninem a pentapeptidovým můstkem na postranním řetězci tetrapeptidů. To má za následek neschopnost bakterií syntetizovat kompletní buněčnou stěnu (Ju et al. 2022).

V současné době většina laboratoří v Evropě i mimo ni stále více používá pro testování antimikrobiální citlivosti hodnoty dle Evropského výboru pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST). V průběhu 90. let 20. století existovaly ještě další evropské národní komise zaměřené na problematiku antimikrobiální citlivosti. Mezi nimi byl například Stálý výbor BSAC pro testování antimikrobiální citlivosti ve Spojeném království. Každá komise si stanovila vlastní hodnoty MIC, a některé i vlastní metody diskové difúzní metody. Metoda EUCAST je korelována s MIC, která byla stanovena v souladu s mezinárodním standardem pro testování citlivosti k antimikrobiálním látkám. Disková difúzní metoda EUCAST byla vyvinuta s cílem pokrýt širší spektrum kombinace antimikrobiálních látek a mikroorganismů než disková difúzní metoda BSAC, i když některé nedostatky jsou stále přetrvávající (Brown et al. 2016). Vyhodnocení v této práci je provedeno pomocí EUCAST, avšak v Tabulce 1 je uvedeno i vyhodnocení podle BSAC.

Účinky kombinací antibiotik se vyhodnocují dle EUCAST Evropské společnosti klinické mikrobiologie a infekčních nemocí (ESCMID). Synergetické působení se vyskytuje, když účinek kombinace antibiotik nebo antibiotik a neaktivních látek překračuje aditivní účinky jednotlivých složek. Aditivní efekt kombinace antibiotik nastává, když účinek této kombinace

odpovídá součtu účinků jednotlivých složek. Indiferentní účinek kombinace antibiotik nebo antibiotik a neaktivních látek nastává, když celkový účinek odpovídá účinku neaktivnější složky. Antagonismus se projevuje, když je zaznamenán nižší účinek kombinace antibiotik ve srovnání s účinkem nejúčinnější jednotlivé látky. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2000).

Hodnocení vzájemného působení složek esenciálních olejů se provádí pomocí technik makro- nebo mikrodiluce. Nejběžněji používané metody jsou: šachovnicová metoda (checkerboard), e-test (gradientový test), metoda časového účinku (Time-kill assay), disková difuzní metoda. Šachovnicová metoda vyžaduje určení frakční inhibiční koncentrace (FIC) nebo efektu kombinačního indexu (EC index) pro každý použitý agent. Metoda časového účinku posuzuje kombinovaný antimikrobiální efekt tím, že zkoumá, jak subinhibiční koncentrace jedné látky ovlivňuje inhibiční schopnost druhé látky během určitého časového intervalu (Bassolé et Juliani 2012).

4 Metodika

4.1 Silice a antibiotika

Jako kontrolní antibiotikum byl použit Tetracyklin (Sigma-Aldrich, USA) o čistotě 99 %, a komerčně dostupné silice:

- Eugenol o čistotě 99 % (Sigma-Aldrich, USA)
- Karvakrol o čistotě 98 % (Sigma-Aldrich, USA)
- (-)-Linalool o čistotě 95 % (Sigma-Aldrich, USA)
- α -Terpineol o čistotě 98,5 % (Sigma-Aldrich, USA)
- Tymol o čistotě 98 % (Sigma-Aldrich, USA)

4.2 Kultivační média

Na přípravu 1 litru Tris-buffered saline (TBS) bylo použito dle návodu výrobce 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 6,1 g TrisBase (Sigma-Aldrich, USA). Následně bylo upraveno na pH 7,6 pomocí 35 % kyseliny chlorovodíkové, poté autoklávováno a nakonec uloženo do lednice o teplotě 4 °C.

Na přípravu 1 litru Mueller-Hinton Broth (MHB; OXOID, UK) bylo použito 21 g, autoklávováno a uchováno v lednici při teplotě 4 °C.

4.3 Rozpouštědla

Při práci byla použita rozpouštědla: deionizovaná voda; etanol 96% (VWR; Česká republika); HCl 35% (Penta; Česká republika); Hexan (VWR; Česká republika); KCl (Penta; Česká republika); MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromide; Tween 80 (VWR, Česká republika).

4.4 Testované bakterie

Testy na antimikrobiální aktivitu byly provedeny se šesti standardními sbírkovými kmeny bakterií z Americké kolekce typových kultur (American Type Culture Collection, ATCC), z toho byly 3 grampozitivní bakterie: *Enterococcus faecalis* ATCC 29222, *E. faecalis* ATCC 51299 a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, a 3 gramnegativní: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70062 a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4.5 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita silic byla testována pomocí bujónové mikrodiluční metody podle pokynů CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) (201). Byly použity 96-ti jamkové mikrotitrační destičky. Schéma uspořádání silic a antibiotik v destičce bylo provedeno dle schémat (Obrázek 8–10). Všechna testování byla provedena ve třech opakováních a ve třech na sobě nezávislých testech.

4.5.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

MIC je nejnižší koncentrace antimikrobiálního činidla vyjádřená v mg/l ($\mu\text{g/ml}$), která za přísně kontrolovaných podmínek *in vitro* zcela inhibuje viditelný růst testovaného kmene mikroorganismu. Tato metoda zahrnuje použití mikrotitrační destičky, do které se připraví ředící řada koncentrací antimikrobiální látky. Poté se destička očkuje příslušným kmenem mikroorganismu. Finální koncentrace bakteriální suspenze v jamkách po zaočkování má být 5×10^5 KTJ/ml dle CLSI (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021). Inkubuje se při teplotě 35 ± 2 °C po dobu 24 hodin. Při vyhodnocení se pozoruje sediment/zákal, značící mikrobiální růst. Výsledná hodnota MIC byla stanovena jako modus, nebo medián ze tří opakování. Inhibice byla hodnocena nejprve vizuálně, později měřením zákalu pomocí čtečky mikrotitračních destiček (Synergy microplate reader H1; BioTek) při vlnové délce 512 nm. Na základě výsledků viditelných okem byla ověřena správnost pomocí čtečky, kdy byla zaznamenána inhibice ≥ 80 % mikrobiálního nárůstu v porovnání s pozitivní kontrolou. Data ze čtečky mikrotitračních destiček byly zpracovány dle vzorců uvedených v podkapitole 4.3.7 a byla stanovena klasifikace interakcí mezi složkami silic (Tabulka 1). Jelikož vyšší koncentrace některých látek i bez přítomnosti mikroorganismu vytvářejí během inkubace přirozený zákal, nebylo někdy možné jednoznačně odečíst správný výsledek pouhým okem, ani spektrofotometricky. V takovém případě bylo použito barvivo MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid), které způsobilo fialové zabarvení v případě přítomnosti vyšší koncentrace vitálních bakteriálních buněk. Tetrazoliová sůl žlutého zabarvení se enzymatickou redukcí mění na fialový formazanový derivát tvořící nerozpustný komplex s živými buňkami. Toto barvivo se často používá na testování životaschopnosti a proliferaci buněk (Benov et al. 2021).

4.5.2 Příprava roztoků silic a antibiotik

Na přípravu zásobních roztoků silic byly použity komerčně dostupné vybrané složky silic a rozpouštědlo etanol:Tween 80 v poměru 2:1.

Pro každý test byl připraven roztok příslušné silice. Objem pipetované zásobní antimikrobiální látky byl určen dle potřebné počáteční koncentrace látky dle vzorce:

$$V = \frac{a}{b \cdot (100/c)} [\text{ml}],$$

kde a... hmotnost antimikrobiální látky v mg

b... potřebná počáteční koncentrace antimikrobiální látky 100x vynásobená a uvedená v mg/ml

c... čistota antimikrobiální látky vyjádřená v %.

Pro každé testování bylo připraveno kontrolní antibiotikum, a to specificky Tetracyklin o čistotě 99 %. Kvůli použití rozpouštědla bylo použito 100x vyšší množství antibiotika, které bylo následně smícháno s odpovídajícím množstvím rozpouštědla – 96% etanolem. Počáteční koncentrace antibiotik v 1. jamce destičky byla stanovena různě dle potřeby. Podle toho byly

zásobní roztoky ředěny v kultivačním médiu tak, aby maximální koncentrace rozpouštědla nepřesáhla 1%.

4.5.3 Příprava inokula

Zásobní inokula testovaných mikroorganismů byla založena a uchována pro budoucí použití. Každé z těchto zásobních inokul bylo připraveno s použitím MHB média, následně bylo inkubováno po dobu 24 hodin při teplotě 35 ± 2 °C, a poté uloženo v lednici o teplotě 4°C.

Před každým novým testováním byla nakultivována čerstvá bakteriální kultura, která byla před zaočkováním standardizována na hustotu 0,5 McFarland, měřenou denzitometrem.

4.5.4 Standardizace inokula pro testování

Před každým plánovaným zahájením testování antimikrobiální aktivity se provedla standardizace inokula. Do 15 ml plastové zkumavky bylo pipetováno cca 10 ml MHB média. Médium bylo změřeno na denzitometru, následně do něj bylo postupně přidáváno sterilní stříkačkou čerstvé inokulum tak, aby se naměřená hodnota zvýšila právě o $0,5 \pm 0,05$. Tím vznikl roztok o hodnotě 0,5 McFarlanda, což vypovídá o výsledné koncentraci kultury bakterií cca 2×10^8 KTJ/ml.

4.5.5 Zaočkování

Zaočkování destičky bylo provedeno 30 minut od standardizace inokula. Inokulátor s jehlami („ježek“) byl ponořen do 96% etanolu, sterilizován v plamenu kahanu, následně po lehkém vychladnutí byl ponořen do připravené bakteriální suspenze a přenesen do jamek do sloupců 1 až 11 mikrodiluční destičky. Sloupec 12 sloužil jako kontrola čistoty, tedy obsahoval pouze čisté médium. Každá jamka byla tímto způsobem zaočkována 2x. Tím bylo dosaženo přibližně 4×10^5 KTJ/ml, resp. 5×10^5 CFU/ml podle CLSI v každé jamce destičky při objemu 100 μ l. Zaočkové destičky byly přikryty označenými víčky a uloženy do termostatu při teplotě 35 ± 2 °C po dobu 24 hodin.

4.5.6 Příprava mikrotitrační destičky

Kontrolní testy s tetracyklinem, používaným jako standardní referenční látka, byly součástí každého měření pro srovnání citlivosti testovaných mikroorganismů s již známými daty. Testování antibiotik je klíčové pro ověření validity výsledků.

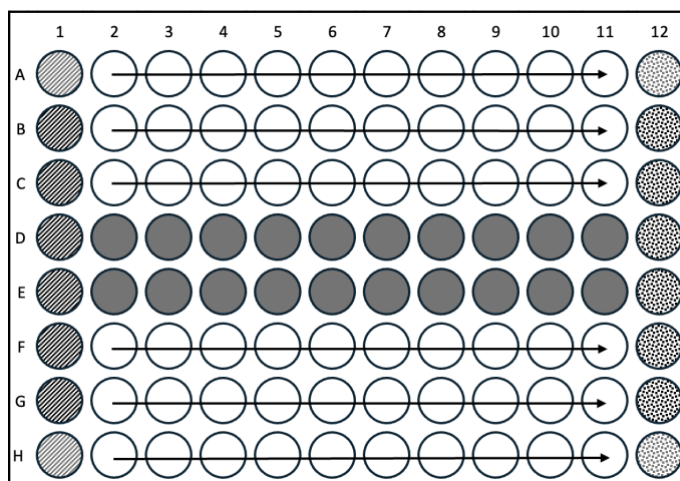
V každém testování byly současně testovány vždy i samostatně silice, aby byla zjištěna hodnota MIC jednotlivých silic, která byla důležitá pro hodnocení v kombinaci.

TESTOVÁNÍ JEDNOTLIVÝCH SILIC

Nejprve byly testovány samostatné složky silic a mikroorganismus, jak je ukázáno na obrázku 8. Na jedné mikrotitrační destičce se současně testovaly dvě složky silic v deseti koncentracích proti bakteriím, a to ve třech opakováních. Do prvního sloupce destičky bylo pipetováno 100 μ l média jako kontrola růstu mikroorganismu, která byla později zaočkována.

Dvanáctý sloupec obsahoval 100 μ l média pro kontrolu čistoty, bez přítomnosti bakterií. Do sloupců 3 až 11 bylo vloženo 100 μ l média.

Do druhého sloupce mikrotitrační destičky byly nejprve vloženy dva odlišné roztoky silic v objemu 200 μ l, přičemž každá ze silic byla aplikována do určených řádků (A-C pro první, F-H pro druhou). Pomocí multikanálové pipety bylo následně ze sloupců prvního řádku přeneseno 100 μ l roztoku do druhého řádku. Po promíchání (3x) byl opět přenesen stejný objem do dalších řádků až po jedenáctý řádek, kde bylo přebytečné medium odebráno do odpadu. Výsledkem byl rovnoměrný objem 100 μ l roztoku v každé jamce na destičce.



Obrázek 8: Testování mikrobiální aktivity pro samostatné silice a příslušný mikroorganismus (zdroj: vlastní zpracování)

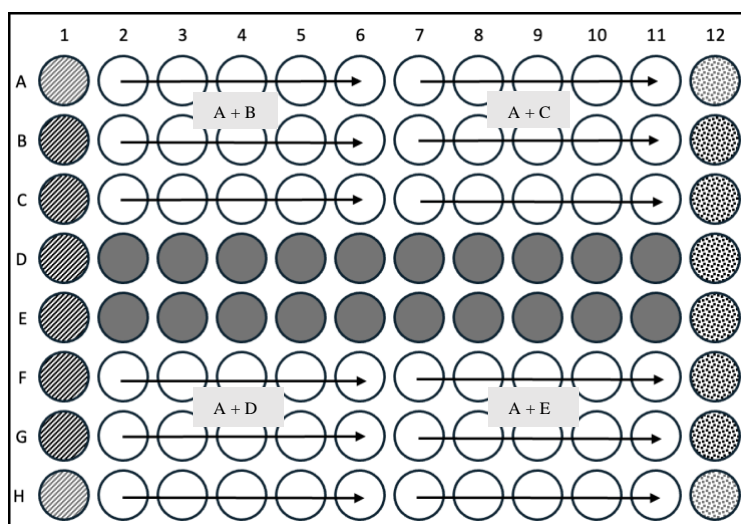


TESTOVÁNÍ KOMBINACÍ SILIC

Testování kombinací silic bylo realizováno po zjištění jejich individuálních MIC hodnot. Na základě těchto hodnot byly připraveny ředící řady pro testované kombinace. Pro každý testovaný bakteriální kmen byla potřeba pět destiček, z nichž jedna sloužila jako kontrola s antibiotikem, a jedna jako referenční nezaočkovaná destička. Na jedné destičce se testovaly čtyři různé kombinace silic, dle specifikace uvedené na obrázku 9.

Do prvního, třetího až pátého, a sedmého až dvanáctého sloupce mikrotitrační destičky bylo přidáno 100 μ l TBS média, přičemž první sloupec sloužil pro kontrolu nárůstu a poslední sloupec pro kontrolu čistoty. Kvůli zředění výsledné koncentrace silic (1:1) v kombinaci na polovinu, bylo potřeba připravit ředění čtyřnásobné počáteční MIC. V řádcích A-C byly do druhého a sedmého sloupce pipetovány 2 různé kombinace silic (100 μ l od každého). Postupovalo se tak, že do druhého sloupce řádku A, B, C bylo pipetováno 100 μ l látky A + 100 μ l látky B. Do sedmého sloupce u řádku A, B, C bylo pipetováno 100 μ l látky A + 100 μ l látky C. Do druhého sloupce u řádku F, G, H bylo pipetováno 100 μ l látky A a 100 μ l látky D, u šestého sloupce stejných řádků 100 μ l látky A + 100 μ l látky E. Stejně se postupovalo i u ostatních

destiček s dalšími kombinacemi. Následně byla provedena horizontálně ředící řada, a to tak, že byl multikanálovou pipetou promíchán roztok ve druhém sloupci, poté bylo převedeno 100 µl roztoku do třetího sloupce, promícháno 3x, převedeno 100 µl roztoku do čtvrtého sloupce, promícháno 3x, převedeno 100 µl roztoku do pátého sloupce, promícháno 3x, nakonec se 100 µl odebralo do odpadu. Stejně se postupovalo u ostatních kombinací u látek A+C, A+D, A+E, ...



Obrázek 9: Schéma testování kombinací silic
(zdroj: vlastní zpracování)

- Kontrola čistoty 
- Kontrola nárůstu 
- Prázdná jamka/jen médium 

ŠACHOVNICOVÝ TEST

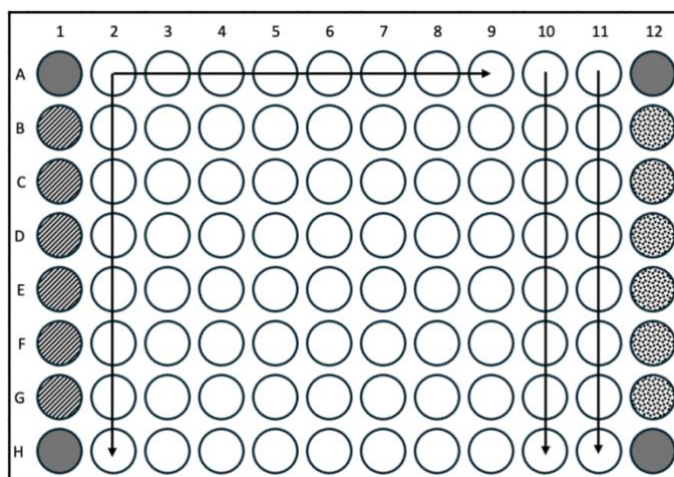
Šachovnicová titrace je metoda používaná k testování interakce dvou antimikrobiálních látek. Název nese na základě vytvoření obrazce šachovnice, která vznikne vícenásobným ředěním dvou testovaných antimikrobiálních látek. Každé políčko šachovnice představuje jedinečnou kombinaci dvou léčiv v různých poměrech. Testuje se široká škála měření, od hodnot pod minimální inhibiční koncentrací až po hodnoty nad ní. Původně se prováděla v laboratorních zkumavkách pomocí bujónového makroředění, ale dnes se častěji používají mikrotitrační destičky pro snadnější a efektivnější testování (Schwalbe Richard et al. 2007).

Šachovnicový test byl proveden s cílem posoudit možné synergické, aditivní, indiferentní nebo antagonistické účinky u kombinací jednotlivých silic pomocí indexu frakční inhibiční koncentrace. Testování kombinací silic bylo provedeno u kombinací, kde byla nalezena synergie při testování kombinací silic předchozí metodou. Testovalo se 8 koncentrací od každé silice. Pro každý testovaný bakteriální kmen byla potřeba pět destiček, z nichž jedna sloužila jako kontrola s antibiotikem, a jedna jako referenční nezaočkovaná destička. Na jedné destičce se testovaly čtyři různé kombinace silic, dle specifikace uvedené na obrázku 10.

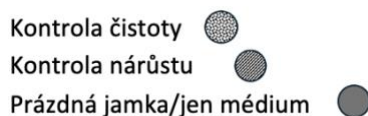
První a dvanáctý sloupec mikrotitrační destičky sloužily jako kontrolní: první pro růst mikroorganismů a dvanáctý pro kontrolu čistoty média, do kterých bylo přidáno 100 µl TBS média. Toto médium bylo také aplikováno do sloupců 2 až 9 v řadě B až H, a do celých sloupců

10 a 11. Počáteční koncentrace silic byly čtyřnásobné oproti samostatným MIC hodnotám. V řádku A byla aplikována první roztok silice v objemu 200 µl do sloupců 2 až 9, provedlo se vertikální dvojité ředění od shora dolů od sloupce 2 až po sloupec 11, čímž se dosáhlo objemu 100 µl ve všech jamkách. Do druhého sloupce bylo přidáno 100 µl druhé silice a bylo provedeno dvojité ředění horizontálně od sloupce 2 do sloupce 9.

Destičky byly takto připraveny na otestování celkem ve třech opakováních.



Obrázek 10: Schéma pro šachovnicovou metodu (zdroj: vlastní zpracování)



4.5.7 Vyhodnocení antibakteriálního účinku kombinací složek silic

Vyhodnocení bylo provedeno na základě hodnot součtu FICI kombinovaných látek, vypočtených podle následujícího vzorce:

$$FICI = FIC_A + FIC_B$$

$$FIC_A = \frac{MIC_{A_{komb}}}{MIC_{A_{samo}}}$$

$$FIC_B = \frac{MIC_{B_{komb}}}{MIC_{B_{samo}}}$$

Klasifikace interakce mezi jakýmkoli dvěma antimikrobiálními látkami se opírají o frakční inhibiční koncentraci (FIC), které jsou matematickým vyjádřením účinku kombinace antibakteriálních látek. FIC dané látky se vypočítá jako podíl minimální inhibiční koncentrace látky v kombinaci ($MIC_{A_{komb}}$) a minimální inhibiční koncentrace látky samostatně ($MIC_{A_{samo}}$). Hodnota FICI se vypočítá jako součet $FIC_A + FIC_B$, obě ze stejné jamky.

Pro vyhodnocení interakcí byla použita kritéria EUCAST (Tabulka 1).

Tabulka 1: Vyhodnocení kombinací dle EUCAST a BSAC.

	EUCAST		BSAC	
účinek (hodnota FICI)	$\leq 0,5$	synergický	$\leq 0,5$	synergický
	$0,5 < x \leq 1$	aditivní		
	$1 < x \leq 2$	indiferentní	$0,5 < x \leq 4$	bez interakce
	> 2	antagonistický	> 4	antagonistický

5 Výsledky

Účinnost samostatně testovaných látek proti vybraným bakteriím byla zjištěna v rozmezí koncentrací od 256 do 8 192 $\mu\text{g/ml}$ (Tabulky 2, 4, 5, 7, 8). Při testování antibakteriálního účinku deseti kombinací těchto látek proti pěti bakteriím bylo zjištěno 17 pozitivních interakcí, kde bylo pozorováno zvýšení účinnosti. Celkem bylo zjištěných 13 aditivních a 4 synergické interakce. Nejvýraznější interakce byla zaznamenána u kombinací eugenol/karvakrol a tymol/ α -terpineol proti *P. aeruginosa*, respektive *E. coli*.

V první etapě byly testovány kombinace všech pěti látek, konkrétně eugenolu (EUG), karvakrolu (CAR), linaloolu (LIN), tymolu (THY) a α -terpineolu (α -TER) proti jednotlivým vybraným mikroorganismům (*E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*).

Ve druhé etapě testování byly zkoumány minimální inhibiční koncentrace pouze pro ty kombinace silic a bakterií, u kterých byla zjištěna synergická interakce v první části. Konkrétně se jednalo o *E. faecalis* v kombinaci s karvakrolem a tymolem (Tabulka 3), *E. coli* v kombinaci s tymolem a α -terpineolem (Tabulka 6), a *P. aeruginosa* v kombinaci s eugenolem a karvakrolem (Tabulka 9).

Enterococcus faecalis

V tabulce 2 jsou prezentovány výsledky testování *E. faecalis* všech testovaných složek silic v kombinaci i samostatně. Samostatné MIC pro jednotlivé složky silic byly: eugenol (1 024 µg/ml), karvakrol (256 µg/ml), linalool (8 192 µg/ml), tymol (512 µg/ml) a α-terpineol (2 048 µg/ml). Byly nalezeny 2 pozitivní interakce. Synergická interakce (S) byla nalezena u tymolu (MIC = 128 µg/ml) s karvakrolem (MIC = 64 µg/ml) s výslednou hraniční hodnotou FICI = 0,5. Minimální inhibiční koncentrace tymolu a karvakrolu v kombinaci byla snížena 3x, resp. 4x. Aditivní účinek (AD) vykazoval karvakrol (MIC = 128 µg/ml) v kombinaci s α-terpineolem (MIC = 1 024 µg/ml) s hraniční hodnotou FICI = 1. Tady byla snížena MIC karvakrolu a α-terpineolu 2x pro obě složky. Celkem sedm kombinací bylo indiferentních.

Tabulka 2: Minimální inhibiční koncentrace kombinací (µg/ml) jednotlivých složek silic proti *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

	EUG ^a	CAR	LIN	THY	α-TER	Samostatná MIC
EUG	x	1024/256 2 (IN)	1024/2048 1,25 (IN)	1024/512 2 (IN)	1024/2048 2 (IN)	1024
CAR	256/1024 ^b 2 ^c (IN) ^d	x	256/2048 1,25 (IN)	64/128 0,5 (S)	128/1024 1 (AD)	256
LIN	2048/1024 1,25 (IN)	2048/256 1,25 (IN)	x	4096/1024 2,5 (AN)	2048/2048 1,25 (IN)	8192
THY	512/1024 2 (IN)	128/64 0,5 (S)	1024/4096 2,5 (AN)	x	512/2048 2 (IN)	512
α-TER	2048/1024 2 (IN)	1024/128 1 (AD)	2048/2048 1,25 (IN)	2048/512 2 (IN)	x	2048

^a EUG: eugenol; CAR: karvakrol; LIN: linalool; THY tymol; α-TER: α-terpineol; ^b x/y, kde x je MIC kombinace silice v řádku, y je MIC kombinace silice ve sloupci; ^c hodnota FICI; ^d vyhodnocení interakcí podle FICI: (S) = synergický účinek; (AD) = aditivní účinek; (IN) = indiferentní účinek; (AN) = antagonistický účinek.

Nalezená synergie tymolu a karvakrolu byla dále ověřena pomocí šachovnicového testu (Tabulka 3). Zde vyšla MIC v kombinaci pro tymol 128 µg/ml a karvakrol 256 µg/ml, u tymolu se snížila MIC 3x, u karvakrolu 4x, stejně při použití předchozí metody. Samostatná inhibiční koncentrace karvakrolu byla 1 024 µg/ml a tymolu 512 µg/ml. Aditivně působila kombinace koncentrace 256 µg/ml tymolu s 32 µg/ml karvakrolem, a koncentrace tymolu 32 µg/ml s 512 µg/ml karvakrolem.

Tabulka 3: Minimální inhibiční koncentrace karvakrolu v kombinaci s tymolem proti *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

	Samostatná		Koncentrace thymolu (µg/ml)									
	MIC		512		256		128		64		32	
	CAR ^a	THY	MIC CAR	FICI	MIC CAR	FICI	MIC CAR	FICI	MIC CAR	FICI	MIC CAR	FICI
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1024	512	32	1,031 ^b (IN) ^c	32	0,531 (AD)	256	0,5 (S)	512	0,625 (AD)	512	0,563 (AD)

^a CAR: karvakrol; THY tymol; ^b hodnota FICI; ^c vyhodnocení interakcí podle FICI: (S) = synergický účinek; (AD) = aditivní účinek; (IN) = indiferentní účinek.

Klebsiella pneumoniae

Všechny složky silic v kombinaci i samostatně byly testovány také proti *K. pneumoniae* (Tabulka 4). Samostatná MIC vůči bakterii vyšla pro eugenol 1 024 µg/ml, karvakrol 1 024 µg/ml, linalool 4 096 µg/ml, tymol 4 096 µg/ml a α-terpineol 2 048 µg/ml. Synergická interakce byla nalezena mezi kombinacemi linaloolu o koncentraci 1 024 µg/ml s tymolem o koncentraci 1 024 µg/ml, kde byla hraniční hodnota FICI = 0,5. MIC složek silic v kombinaci byla snížena u α-terpineolu 4x a u tymolu 2x. Aditivní účinek byl pozorován u kombinace eugenolu (512 µg/ml) s tymolem (2 048 µg/ml), karvakrolu (512 µg/ml) s linalolem (512 µg/ml), a linaloolu (1 024) s α-terpineolem (1 024 µg/ml). V těchto kombinacích byly sníženy MIC eugenol/tymol 2x; karvakrol/linalool 2x, resp. 8x; a linalool/α-terpineol 4x, resp. 2x.

Tabulka 4: Minimální inhibiční koncentrace kombinací (µg/ml) jednotlivých složek silic proti *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70062.

	EUG ^a	CAR	LIN	THY	α-TER	Samostatná MIC
EUG	x	256/1024 1,25 (IN)	1024/4096 2 (IN)	512/2048 1 (AD)	512/2048 1,5 (IN)	1024
CAR	1024/256 ^b 1,25 ^c (IN) ^d	x	512/512 0,625 (AD)	1024/1024 1,25 (IN)	1024/1024 1,5 (IN)	1024
LIN	4096/1024 2 (IN)	512/512 0,625 (AD)	x	1024/1024 0,5 (S)	1024/1024 0,75 (AD)	4096
THY	2048/512 1 (AD)	1024/1024 1,25 (IN)	1024/1024 0,5 (S)	x	1024/1024 0,75 (AD)	4096
α-TER	2048/512 1,5 (IN)	1024/1024 1,5 (IN)	1024/1024 0,75 (AD)	1024/1024 0,75 (AD)	x	2048

^a EUG: eugenol; CAR: karvakrol; LIN: linalool; THY tymol; α-TER: α-terpineol; ^b x/y, kde x je MIC kombinace silice v řádku, y je MIC kombinace silice ve sloupci; ^c hodnota FICI; ^d vyhodnocení interakcí podle FICI: (S) = synergický účinek; (AD) = aditivní účinek; (IN) = indiferentní účinek; (AN) = antagonistický účinek.

Escherichia coli

Dále byla testována odolnost *E. coli* proti všem složkám silic v kombinaci i samostatně (Tabulka 5). Samostatné MIC pro jednotlivé složky silic jsou následující: eugenol 1 024 µg/ml, karvakrol (512 µg/ml), linalool (1 024 µg/ml), tymol (512 µg/ml) a α-terpineol (1 024 µg/ml). Silně pozitivní výsledek byl zaznamenán u tymolu o koncentraci 128 µg/ml s α-terpineolem o koncentraci 128 µg/ml, kde hodnota FICI = 0,38, tedy středně silná synergie. MIC tymolu s α-terpineolem v kombinaci byla snížena 4x, resp. 8x. Pozitivní účinky byly nalezeny také u kombinací: eugenolu (512 µg/ml) s α-terpineolem (512 µg/ml), linaloolu (512 µg/ml) s tymolem (256 µg/ml), a linaloolu (512 µg/ml) s α-terpineolem (256 µg/ml). MIC v kombinaci byla snížena pro eugenol/α-terpineol 2x; u linalool/tymol 2x; u linalool/α-terpineol 2x, resp. 4x.

Tabulka 5: Minimální inhibiční koncentrace kombinací (µg/ml) jednotlivých složek silic proti *Escherichia coli* ATCC 25922.

	EUG ^a	CAR	LIN	THY	α-TER	Samostatná MIC
EUG	x	512/1024 2,5 (AN)	512/1024 1,5 (IN)	512/512 1,5 (IN)	512/512 1 (AD)	1024
CAR	1024/512 ^b 2,5 ^c (AN) ^d	x	1024/1024 3 (AN)	512/256 1,5 (IN)	1,25 (IN)	512
LIN	1024/512 1,5 (IN)	1024/1024 3 (AN)	x	512/256 1 (AD)	512/256 0,75 (AD)	1024
THY	512/512 1,5 (IN)	256/512 1,5 (IN)	256/512 1 (AD)	x	128/128 0,38 (S)	512
α-TER	512/512 1 (AD)	256/512 1,25 (IN)	256/512 0,75 (AD)	128/128 0,38 (S)	x	1024

^a EUG: eugenol; CAR: karvakrol; LIN: linalool; THY tymol; α-TER: α-terpineol; ^b x/y, kde x je MIC kombinace silice v řádku, y je MIC kombinace silice ve sloupci; ^c hodnota FICI; ^d vyhodnocení interakcí podle FICI: (S) = synergický účinek; (AD) = aditivní účinek; (IN) = indiferentní účinek; (AN) = antagonistický účinek.

Synergie α-terpineolu s tymolem byla ověřena šachovnicovou metodou (Tabulka 6). Minimální inhibiční účinek jednotlivých silic samostatně vyšla pro tymol i α-terpineol 512 µg/ml. Synergická interakce byla zaznamenána u MIC 128 µg/ml α-terpineolu s 64 µg/ml tymolem, kde došlo ke snížení MIC 8x. V kombinaci byly zaznamenány 3 aditivní účinky (AD), a to konkrétně pro koncentrace: tymolu 16, 256 a 256 µg/ml a α-terpineolu 256, 64 a 32 µg/ml v tomto pořadí. Kombinace koncentrací 16 µg/ml tymolu s 512 µg/ml α-terpineolem působila indiferentně.

Tabulka 6: Minimální inhibiční koncentrace tymolu v kombinaci s α -terpineolem proti *Escherichia coli* ATCC 25922.

	Samostatná		Koncentrace α -terpineolu ($\mu\text{g/ml}$)									
	MIC		512		256		128		64		32	
	THY ^a	α -TER	MIC THY	FICI	MIC THY	FICI	MIC THY	FICI	MIC THY	FICI	MIC THY	FICI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	512	512	16	1,031 ^b (IN) ^c	16	0,531 (AD)	64	0,375 (S)	256	0,625 (AD)	256	0,563 (AD)

^a THY: tymol; α -TER: α -terpineol; ^b hodnota FICI; ^c vyhodnocení interakcí podle FIC: (S) = synergický účinek; (AD) = aditivní účinek; (IN) = indiferentní účinek.

Staphylococcus aureus

U kombinací složek silic proti *S. aureus* byly zaznamenány čtyři pozitivní účinky (Tabulka 7). Nebyl zaznamenán žádný synergický účinek. Aditivní účinky vykazovaly kombinace linaloolu (256 $\mu\text{g/ml}$) s tymolem (512 $\mu\text{g/ml}$) s hodnotou FICI = 0,625; kde byla snížena MIC 8x, resp. 2x. Kombinace tymolu (512 $\mu\text{g/ml}$) s α -terpineolem (256 $\mu\text{g/ml}$) se stejnou hodnotou FICI jako předchozí kombinace, MIC byla snížena 4x pro obě složky silic. Dále u kombinace eugenolu (128 $\mu\text{g/ml}$) s karvakrolem (128 $\mu\text{g/ml}$) byla MIC snížena 3x, resp. 2x. A nakonec kombinace eugenolu (128 $\mu\text{g/ml}$) s tymolem (152 $\mu\text{g/ml}$) snížila 8x MIC tymolu. Samostatné hodnoty MIC proti bakterii byly následující: eugenol 512 $\mu\text{g/ml}$, karvakrol 256 $\mu\text{g/ml}$, linalool 2 048 $\mu\text{g/ml}$, tymol 1 024 $\mu\text{g/ml}$ a α -terpineol 2 048 $\mu\text{g/ml}$.

Tabulka 7: Minimální inhibiční koncentrace kombinací ($\mu\text{g/ml}$) jednotlivých složek silic proti *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

	EUG ^a	CAR	LIN	THY	α -TER	Samostatná MIC
EUG	x	128/128 0,75 (AD)	512/1024 1,5 (IN)	128/512 0,75 (AD)	512/1024 1,5 (IN)	512
CAR	128/128 ^b 0,75 ^c (AD) ^d	x	512/1024 2,5 (AN)	2048/2048 10 (AN)	512/1024 2,5 (AN)	256
LIN	1024/512 1,5 (IN)	1024/512 2,5 (AN)	x	256/512 0,625 (AD)	2048/2048 2 (IN)	2048
THY	512/128 0,75 (AD)	2048/2048 10 (AN)	512/256 0,625 (AD)	x	512/256 0,625 (AD)	1024
α -TER	1024/512 1,5 (IN)	1024/512 2,5 (AN)	2048/2048 2 (IN)	256/512 0,625 (AD)	x	2048

^a EUG: eugenol; CAR: karvakrol; LIN: linalool; THY: tymol; α -TER: α -terpineol; ^b x/y, kde x je MIC kombinace silice v řádce, y je MIC kombinace silice ve sloupci; ^c hodnota FICI; ^d vyhodnocení interakcí podle FICI: (S) = synergický účinek; (AD) = aditivní účinek; (IN) = indiferentní účinek; (AN) = antagonistický účinek.

Pseudomonas aeruginosa

Výsledky z testování *P. aeruginosa* vůči složkám silic v kombinaci i samostatně jsou uvedeny v tabulce 8. Minimální inhibiční koncentrace silic samostatně byly následující: eugenol 2 048 µg/ml, karvakrol 4 096 µg/ml, linalool 8 192 µg/ml, α-terpineol 4 096 µg/ml. Synergický účinek byl nalezen u eugenolu o koncentraci 512 µg/ml v kombinaci s karvakrolem o koncentraci 1 024 µg/ml, výsledná hodnota FICI = 0,5. MIC v kombinaci byla tedy snížena 4x. Pozitivní účinek vykazovala kombinace eugenolu (1 024 µg/ml) s tymolem (1 024 µg/ml) s hodnotou FICI = 0,75, kde byla MIC snížena 2x, resp. 4x.

Tabulka 8: Minimální inhibiční koncentrace kombinací (µg/ml) jednotlivých složek silic proti *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

	EUG ^a	CAR	LIN	THY	α-TER	Samostatná MIC
EUG	x	512/1024 0,5 (S)	2048/4096 1,5 (IN)	1024/1024 0,75 (AD)	x	2048
CAR	1024/512 ^b 0,5 ^c (S) ^d	x	8192/8192 3 (AN)	4096/2048 1,5 (IN)	x	4096
LIN	4096/2048 1,5 (IN)	8192/8192 3 (AN)	x	8192/4096 2 (IN)	x	8192
THY	1024/1024 0,75 (AD)	2048/4096 1,5 (IN)	4096/8192 2 (IN)	x	x	4096
α-TER	x	x	x	x	x	4096

^a EUG: eugenol; CAR: karvakrol; LIN: linalool; THY tymol; α-TER: α-terpineol; ^b x/y, kde x je MIC kombinace silice v řádku, y je MIC kombinace silice ve sloupci; ^c hodnota FICI; ^d vyhodnocení interakcí podle FICI: (S) = synergický účinek; (AD) = aditivní účinek; (IN) = indiferentní účinek; (AN) = antagonistický účinek.

Synergie karvakrolu s eugenolem byla dále ověřena pomocí šachovnicového testu (Tabulka 9), kde vyšla hodnota FICI = 0,231; tedy silnější synergie než pomocí předchozí metody. MIC v synergii byly zaznamenány: 32 µg/ml pro eugenol a 256 µg/ml pro karvakrol, došlo tedy ke snížení MIC 32x, resp. 4x. Samostatná inhibiční koncentrace eugenolu byla 1 024 µg/ml, stejně jako pro karvakrol. Aditivní účinek byla zaznamenán u dvou kombinací, 32 µg/ml eugenolu s 512 µg/ml karvakrolem, kde došlo ke snížení MIC 32x, resp. 2x; dále 512 µg/ml eugenolu se 128 µg/ml karvakrolem, kde došlo ke snížení MIC 2x, resp. 8x. Indiferentně působila koncentrace MIC = 64 µg/ml s tymolem (MIC = 1 024 µg/ml).

Tabulka 9: Minimální inhibiční koncentrace eugenolu v kombinaci s karvakrolem proti *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

	Samostatná		Koncentrace karvakrolu (ug/mL)							
	MIC		512		256		128		64	
	EUG ^a	CAR	MIC EUG	FICI	MIC EUG	FICI	MIC EUG	FICI	MIC EUG	FICI
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1024	1024	32	0,531 ^b (AD) ^c	32	0,281 (S)	512	0,625 (AD)	1024	1,063 (IN)

^a EUG: eugenol; CAR: karvakrol; ^b hodnota FICI; ^c vyhodnocení interakcí podle: (S) = synergický účinek; (AD) = aditivní účinek; (IN) = indiferentní účinek.

6 Diskuze

Jednou z hlavních příčin antibiotické rezistence je nadužívání antibiotik pro terapeutické účely jak u lidí, tak ve veterinární oblasti. Kromě toho si bakterie vyvinuly rezistenci vůči všem třídám antibiotik a existuje neustálá potřeba vyrábět nové účinné látky. Jak bylo uvedeno v jiných výzkumech, silice představují důležitý zdroj látek aktivních proti mikrobiálním úpatogenům, zejména kmenům rezistentním vůči konvenčním antibiotikům (Iseppi et al. 2021).

Některé studie ukázaly, že antimikrobiální účinnost éterických olejů může být obvykle vyšší než účinnost jejich hlavních složek, což naznačuje možné interakce mezi některými složkami olejů, které mohou účinnost zvyšovat nebo snižovat (Herman et al. 2016; Gutiérrez-Fernández et al. 2013).

6.1 Antibakteriální účinnost látek testovaných samostatně

Rozdíl v hodnotách MIC v naší práci ve srovnání s jinými studiemi může být ovlivněn různými faktory, jako jsou specifické podmínky laboratoře, metodika, která byla použita, a možná i odlišné charakteristiky bakteriálních kmenů. Každé experimentální prostředí může přinést jemné variace, což se odrazí ve výsledcích, jako je MIC. Klasifikace antimikrobiálních účinků čistých sloučenin není v literatuře dostatečně konsolidovaná, což ztěžuje srovnání s předchozími výsledky.

6.1.1 Eugenol

Samostatná MIC eugenolu proti *E. faecalis* byla stanovena na 1 024 µg/ml, což odpovídá účinnosti, kterou zjistil Dragland et al. (2019) s použitím stejného standardního kmene. Naproti tomu Gowda et al. (2021) naměřil MIC 3 200 µg/ml, ovšem proti jiným kmenům *E. faecalis*. Tyto rozdíly v hodnotách MIC mezi různými studiemi a kmeny naznačují variabilitu s citlivosti mezi různými kmeny *E. faecalis*.

Guimarães et al. (2019) zaznamenali MIC eugenolu na úrovni 30 µg/ml pro *E. coli* ATCC 8739, což je výrazně nižší hodnota ve srovnání s 1 600 µg/ml, jak uvádí Pei et al. (2009) pro kmen *E. coli* CGMCC 1.487. García-Salinas et al. (2018) uvádějí pro kmen *E. coli* S17 hodnotu MIC na úrovni 400 µg/ml, což také přispívá k rozporuplným výsledkům mezi různými kmeny. Silva et al. (2022) identifikovali MIC eugenolu na 1 024 µg/ml pro *E. coli* ATCC 25922, což je v souladu s hodnotami, které jsme stanovili v naší práci pro tentýž kmen. Tato shoda výsledků mezi dvěma nezávislými studiemi poukazuje na spolehlivost zjištěných MIC hodnot pro tento konkrétní bakteriální kmen. Výsledky získané v rámci různých studií demonstrují významnou variabilitu MIC eugenolu pro různé kmeny *E. coli*, což naznačuje, že citlivost k eugenolu může být ovlivněna genetickými nebo fyziologickými charakteristikami specifických kmenů.

Ve studii Silva et al. (2022) byla MIC pro *S. aureus* ATCC 25923 určena na 203,19 µg/ml s použitím mikrodiluční metody. Naproti tomu García-Salinas et al. (2018) zaznamenali pomocí téže metody MIC ve výši 1 300 µg/ml pro stejný kmen. Další výzkum provedený Qiu et al. (2010) zkoumal MIC eugenolu u 26 různých kmenů *Staphylococcus aureus*, přičemž zjištěné

hodnoty MIC se pohybovaly od 128 do 512 µg/ml. Tyto výsledky naznačují možnost využití eugenolu vývoje nových a účinnějších léčiv proti infekcím způsobených bakterií *S. aureus*. V naší vlastní studii jsme určili MIC pro *S. aureus* ATCC 29213 na 512 µg/ml, což koresponduje s výsledky Qiu et al. (2010).

Ve výzkumu Silva et al. (2022) byla MIC eugenolu pro kmen *P. aeruginosa* ATCC 9027 stanovena na 406,37 µg/ml, zatímco pro kmen *P. aeruginosa* 24 byla MIC nižší, a to 322 µg/ml. V naší studii byly hodnoty MIC pro *P. aeruginosa* ATCC 27853 určeny na 2 048 µg/ml a 1 024 µg/ml v závislosti na použité metodě.

Ve studii Silva et al. (2022) byla pro kmen *K. pneumoniae* ATCC 4352 stanovena MIC hodnota 512 µg/ml. Oproti tomu Kwiatkowski et al. (2022) zjistili MIC 4140 µg/ml. V naší práci prokázal jiný kmen stejné bakterie MIC na úrovni 1 024 µg/ml. Rozdíly v MIC mezi kmeny *K. pneumoniae* mohou být způsobeny genetickými variacemi, které ovlivňují strukturu buněčné stěny nebo mechanismy rezistence, jako jsou efluxové pumpy a enzymatické degradace.

Eugenol je americkým Federálním úřadem pro potraviny, léčiva a kosmetiku (FDA) klasifikován jako bezpečná látka a bezpečný aditiv do potravin. Avšak byl zaznamenán případ, kdy dvouletý chlapec, který konzumoval 5 až 10 ml oleje bohatého na eugenol, zažil selhání jaterních funkcí, jak bylo uvedeno v publikaci od Álvarez-Martínez et al. (2021). Tento případ ukazuje na potřebu opatrnosti při konzumaci vyšších dávek látek, které jsou běžně považovány za bezpečné.

6.1.2 Karvakrol

Studie Mechmechani et al. (2023) poukazuje na citlivost kmenu *E. faecalis* z francouzského sýra na karvakrol s MIC 625 µg/ml a zdůrazňuje efektivitu enzymů pepsin a trypsin v rozkladu biofilmů *P. aeruginosa* a *E. faecalis* bez ovlivnění růstu samotných bakterií. Tento selektivní účinek na biofilmy je důležitý pro vývoj strategií pro léčbu infekcí spojených s biofilmy, které jsou často rezistentní vůči konvenčním antibiotikům (Mechmechani et al., 2023). S tímto výsledkem se shoduje i Gutiérrez-Fernández et al. (2013), který určil MIC 600–850 v závislosti na použitém kmenu. V naší práci byly zjištěny hodnoty MIC 1 024 µg/ml a 256 µg/ml, přičemž specifická hodnota závisela na použité metodě, což podtrhuje nutnost standardizace testovacích metod pro přesnější a konzistentní výsledky.

Různé publikace dokumentují variabilitu MIC také pro různé kmeny *E. coli*, což reflektuje jak genetickou rozmanitost mezi kmeny, tak rozdíly v metodách testování. Ve studii Guimarães et al. (2019) byla MIC pro *E. coli* ATCC 8739 zjištěna na 30 µg/ml, zatímco Sokovicx et al. (2010) naměřili pro *E. coli* ATCC 0157:H7 velmi nízkou MIC karvakrolu 0,5 µg/ml. Další výsledky od Wang et al. (2016) a García-Salinas et al. (2018) uvádějí MIC pro *E. coli* ATCC 10798 na 400 µg/ml a pro *E. coli* S17 na 200 µg/ml. Pei et al. (2009) zaznamenali MIC 400 µg/ml pro *E. coli* CGMCC 1.487, a García-Salinas et al. (2018) uvádějí 200 µg/ml pro *E. coli* S17. V naší práci byla MIC pro *E. coli* ATCC 25922 stanovena na 1 024 µg/ml.

Ve studii Guimarães et al. (2019) byla zjištěna MIC karvakrolu pro *S. aureus* ATCC 25923 na úrovni 15 µg/ml. V kontrastu s tím Sokovicx et al. (2010) uvádějí pro tentýž kmen MIC pouhých 0,25 µg/ml, přičemž byla použita metoda mikroředění s detekcí při vlnové délce 655

nm. García-Salinas et al. (2018) našli MIC pro *S. aureus* ATCC 25923 na úrovni 200 µg/ml. V naší výzkumné práci byla MIC pro *S. aureus* ATCC 29213 stanovena na 256 µg/ml.

Hodnota 0,5 µg/ml karvakrolu určená výzkumem Sokovicx et al. (2010) proti *P. aeruginosa* poukazuje na vysokou citlivost daného kmenu *P. aeruginosa* na karvakrol. Na druhé straně, mnohem vyšší hodnoty MIC zjištěné v studii Mechmechani et al. (2023) a v naší práci, 5 000 µg/ml a 4 096 µg/ml, mohou indikovat přítomnost rezistence nebo snížené citlivosti na karvakrol v těchto kmenech.

Ve studii Köse (2022) byla u 25 kmenů *K. pneumoniae* zjištěna MIC karvakrolu v rozmezí od 32 do 128 µg/ml. Kwiatkowski et al. (2022) naopak zjistili mnohem vyšší MIC, a to 1 910 µg/ml. V naší práci jsme naměřili MIC 1024 µg/ml.

Studie Sokovicx et al. (2010) přináší přesvědčivé důkazy o antibakteriální aktivitě karvakrolu. Zaznamenaná inhibiční zóna o průměru 22,0 až 32,0 mm při testech na bakterie *P. aeruginosa*, *E. coli* a *S. aureus* zdůrazňuje, že karvakrol může být efektivní v inhibici růstu těchto běžných patogenů, které jsou často zodpovědné za infekce u lidí.

6.1.3 Linalool

Zatímco Guimarães et al. (2019) našli MIC pro *E. coli* ATCC 8739 na úrovni 250 µg/ml, naše práce uvádí MIC pro *E. coli* ATCC 25922 jako 1 024 µg/ml, což zdůrazňuje tuto variabilitu. Zjištění různých MIC pro *E. coli* ukazují, že jednotlivé kmeny mohou mít odlišnou citlivost na stejné antimikrobiální sloučeniny.

Guimarães et al. (2019) uvádí, že v jeho studii působil eugenol inhibičně proti *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 250 µg/ml. Což v naší práci potvrzeno nebylo, jelikož MIC byla na úrovni 1 024 µg/ml, ale jednalo se o jiný kmen.

Kwiatkowski et al. (2022) ve své studii zjistili MIC 6 480 µg/ml proti *K. pneumoniae*. Ve srovnání s tím naše výsledky ukazují nižší MIC, konkrétně 4 096 µg/ml.

Zároveň studie Liu et al. (2020) ukázala, že linalool má silnou antimikrobiální účinnost proti *P. aeruginosa* ATCC 9027 s MIC 431 µg/ml, což je v rozporu s naší prací, kde MIC dosahovala hodnoty 8 192 µg/ml. Rozdíly v MIC mohou odrážet variabilitu v metodách testování, stejně jako v použitých kmenů, které mohou mít různé genetické a fyziologické charakteristiky ovlivňující jejich reakci na antimikrobiální látky.

Také v práci He et al. (2022) se zabývali antimikrobiální aktivitou emulze linaloolu proti *P. aeruginosa*. MIC emulze linaloolu proti *P. aeruginosa* ATCC 9027 byla zjištěna jako 1,5 ml/l, což odpovídá 1 293 µg/ml, a proti *E. coli* ATCC 8739 2 586 µg/ml. Získané výsledky ukázaly, že *P. aeruginosa* je na emulzi linaloolu citlivější ve srovnání s *E. coli*. Stejně jako v naší práci bylo potvrzeno, že je linalool citlivější na *E. coli* (MIC = 1 024 µg/ml) než na *P. aeruginosa* (MIC = 8 192 µg/ml). Enkapsulační technologie je uznávána jako hlavní alternativa pro ochranu biologicky aktivních látek před degradací způsobenou jejich přímým kontaktem s různými faktory okolního prostředí. Tato technologie je také využívána pro vývoj pokročilých materiálů, které přináší zlepšení vlastností daných materiálů (He et al. 2022). Tuto technologii použili ve svém výzkumu i Parasuraman et al. (2022) kdy zjistili, že čím větší je

množství zapouzdřených biokapslí linaloolem, tím linalool vykazuje lepší účinnost inhibice proti *E. coli*, a také potvrdili, že zapouzdřené kapsle linaloolu měly vyšší antioxidační účinnost.

V práci Herman et al. (2016) bylo pomocí difuzní metody s agarovými disky zjištěno, že linalool vykazuje vyšší antimikrobiální účinnost proti *E. coli* NCTC 12923, *S. aureus* NCTC 10788 a *C. albicans* NCPF 3179 ve srovnání s čistými esenciálními oleji z levandule a grapefruitu, což naznačuje, že linalool může být efektivnější v potlačení růstu některých typů mikroorganismů.

Linalool má dle studie Liu et al. (2020) významný antimikrobiální potenciál, což dokládá jeho schopnost narušovat buněčné membrány a ovlivňovat buněčný metabolismus. Změny ve struktuře buněčných membrán, zvýšení jejich propustnosti a únik molekul citlivých na UV světlo jsou klíčové indikátory poškození buněčného metabolismu (W. Liu et al., 2020). Tyto mechanismy působení poskytují cenný vhled do toho, jak linalool může být účinný v boji proti různým patogenům. Podle studie Parasuraman et al. (2022) navíc linalool mění iontovou rovnováhu v buňce, což vede k depolarizaci buněčné membrány a snížení membránového potenciálu. Tyto zjištěné účinky jsou důležité pro pochopení, jak linalool ovlivňuje bakteriální buňky, což je relevantní pro jeho potenciální aplikaci jako antimikrobiálního agens (Parasuraman et al. 2022).

6.1.4 Tymol

Výsledky Guimarães et al. (2019) s MIC 7 µg/ml proti *E. coli* a Sokovicx et al. (2010), kde byla zjištěna MIC tymolu pouze 1 µg/ml, poukazují na vysokou účinnost těchto sloučenin v některých situacích. Naproti tomu, Wang et al. (2016) a Pei et al. (2009) uvádějí podstatně vyšší MIC hodnoty 200 µg/ml a 400 µg/ml u různých kmenů *E. coli*, což dokládá široký rozsah účinnosti proti této bakterii. Dále Gan et al. (2023) hlásí MIC 500 µg/ml. Naše výsledky, kde jsme zjistili MIC 512 µg/ml pro tymol proti *E. coli* ATCC 25922, spadají do středu tohoto rozmezí. Tyto různorodé nálezy zdůrazňují, že antimikrobiální aktivita může být výrazně ovlivněna genetickými a fyziologickými charakteristikami konkrétních kmenů bakterií.

Gutiérrez-Fernández et al. (2013) uvádějí, že MIC u různých kmenů *E. faecalis* se pohybuje mezi 600 a 1500 µg/ml. V naší studii jsme zaznamenali MIC hodnotu 512 µg/ml.

Studie zaměřené na antimikrobiální účinnost tymolu proti *S. aureus* prezentují zajímavé poznatky o rozdílné citlivosti kmenů na tuto sloučeninu. Nízká MIC v hodnotě 7 µg/ml, jak je uváděno Guimarães et al. (2019), a dokonce nižší MIC 0,25 µg/ml od Sokovicx et al. (2010), zdůrazňují potentní účinek tymolu proti některým kmenům *S. aureus*. Dále např. ve studii Marei et al. (2019) zaznamenali MIC 135 µg/ml. Tyto výsledky jsou v ostrém kontrastu s hodnotou MIC 1 024 µg/ml v naší práci, což značí, že rozsah citlivosti na tymol mezi kmeny *S. aureus* může být velmi široký.

Gan et al. (2023) ve své studii uvádějí minimální inhibiční koncentraci (MIC) proti *K. pneumoniae* ve výši 250 µg/ml. Kwiatkowski et al. (2022) pak stanovili MIC na 780 µg/ml. Tyto hodnoty jsou výrazně nižší ve srovnání s výsledky naší studie, kde jsme naměřili MIC 4 096 µg/ml.

Sokovicx et al. (2010) zjistili extrémně nízkou MIC 1 µg/ml, zatímco Liu et al. (2021) zaznamenali vyšší MIC ve výši 125 µg/ml. Toto stojí v ostrém kontrastu s mnohem vyšší MIC

4 096 µg/ml, kterou jsme zjistili v naší práci. Podobně, Gan et al. (2023), zjistili MIC nad 1 000 µg/ml. Tyto výsledky naznačují značnou variabilitu v odpovědích *P. aeruginosa* na karvakrol, což může být dáno různými kmenovými charakteristikami, experimentálními podmínkami nebo metodologickými rozdíly mezi jednotlivými studiemi. Tato variabilita zdůrazňuje potřebu dalšího zkoumání mechanismů rezistence a citlivosti v rámci této bakterie.

Studie Sokovicx et al. (2010) poskytuje zajímavé informace o účinnosti tymolu, který je známý svými antimikrobiálními vlastnostmi a je široce využíván v léčivých přípravcích a jako konzervační látka. Zjištění, že tymol má výrazný inhibiční efekt proti tak rozmanitým bakteriím, jako jsou *P. aeruginosa*, *E. coli* a *S. aureus*, je významné, protože tyto kmeny jsou obvyklými patogeny zodpovědnými za řadu nemocí a infekcí. Velikost inhibičních zón kolem 18,0 až 22,0 mm znamená, že tymol je schopný zabránit růstu těchto bakterií na vzdálenosti, která přesahuje bezprostřední blízkost aplikovaného antimikrobiálního činidla. Tento údaj poskytuje předběžný náhled na potenciální koncentraci, která by mohla být účinná v klinickém prostředí (Sokovicx et al. 2010).

Tymol má antimikrobiální účinky, které se pravděpodobně uplatňují prostřednictvím poškození bakteriálních membrán, což umožňuje pronikání do buněčného interiéru a následný únik nukleových kyselin. Tato sloučenina se také váže na menší žlábkové bakterie DNA, což může mírně destabilizovat její sekundární strukturu. Vzhledem k tomu, že DNA je zásadní pro základní životní procesy, jako jsou genová exprese, transkripce a mutagenese, má tymol potenciál významně ovlivnit tyto kritické funkce v bakteriálních buňkách (Liu et al. 2021). Tato interakce s bakteriálními membránami a DNA představuje důležitý mechanismus, kterým tymol působí proti bakteriím a naznačuje jeho potenciál jako účinné antimikrobiální činidlo.

6.1.5 α -terpineol

MIC pro tuto silici proti *P. aeruginosa* ani *K. pneumoniae* nebyla nalezeny ve studiích, proto se možná jedná o první práci, která se tímto problémem zabývá.

V našem výzkumu byla zaznamenána MIC 1 024 µg/ml pro *E. coli*, což je podstatně vyšší ve srovnání s MIC 60 µg/ml pro *E. coli*, jak uvádí Guimarães et al. (2019), s nímž se shoduje ve své práci i Marei et al. (2019), jenž uvádí MIC 55 µg/ml. Tento rozdíl může být důsledkem genetických variací mezi kmeny.

Ve studii Iseppi et al. (2021) byla prozkoumána MIC bakterie *E. faecalis* v reakci na silici z blahovičnicku kulatoplodého (*Eucalyptus globulus*), kde α -terpineol představuje jednu z vedlejších složek. Výsledky ukázaly, že MIC se pohybovala od 32 do 128 µg/ml, avšak u některých kmenů dosahovala hodnot vyšších než 512 µg/ml. V naší vlastní studii jsme zaznamenali MIC ve výši 1 024 µg/ml, což naznačuje možnou vyšší rezistenci našich testovaných kmenů *E. faecalis* v porovnání s kmeny zkoumanými ve studii Iseppi et al. (2021).

Chadha et al. (2023) zjistil MIC 2 400 µg/ml proti *P. aeruginosa*. V naší práci jsme naměřili MIC vyšší, a to 4096 µg/ml.

Výsledky naší práce indikují MIC 2 048 µg/ml pro α -terpineol vůči *S. aureus* ATCC 29213, což je podstatně vyšší než hodnota MIC 30 µg/ml, kterou uvádí Guimarães et al. (2019) pro

S. aureus ATCC 25923. Výzkum Marei et al. (2019) dále identifikoval MIC 225 µg/ml pro *S. aureus*, což je v rozporu s hodnotou MIC 2 048 µg/ml zjištěnou v naší práci.

6.2 Antibakteriální účinek kombinací vybraných látek

Synergické interakce mezi silicemi a aktivními sloučeninami mohou zvýšit jejich účinnost jako antibakteriálních činidel. Nebylo nalezeno mnoho studií, které by se zabývaly stejnými kombinacemi silic proti stejným bakteriálním kmenům použitých v této práci. Vyšší antimikrobiální aktivita rostlinných silic může souviset s přítomností hydroxylových skupin (Guimarães et al., 2019).

6.2.1 Karvakrol a tymol

Naše práce, která ukazuje FICI hodnotu 0,5 s MIC 256 µg/ml pro karvakrol a 128 µg/ml pro tymol, jasně naznačuje synergismus mezi těmito dvěma terpeny proti *E. faecalis*. Ve srovnání s údaji ze studie Gutiérrez-Fernández et al. (2013) je zajímavé poznamenat, že i když MIC hodnoty v této studii byly vyšší (200 µg/ml pro karvakrol a 400 µg/ml pro tymol), i zde byl pozorován zesilující antibakteriální účinek s FICI hodnotami mezi 0,5 a 0,75.

Dále byly v práci Gutiérrez-Fernández et al. (2013) pozorovány pozitivní aditivní účinky mezi kombinacemi kyselina gallová/tymol, kde MIC byly 800–1200 µg/ml, resp. 600–800 µg/ml; a kyselina gallová/karvakrol, kde MIC byly 400–800 µg/ml, resp. 400 µg/ml.

Karvakrol a jeho izomer tymol jsou terpenoidy, které se nacházejí jako hlavní složky silic v oreganu a tymiánu. Ve studii Engel et al. (2017) byla prozkoumána antimikrobiální účinnost tymolu a karvakrolu jak ve volné formě, tak v zapouzdřené formě v liposomech. Bylo zjištěno, že MIC pro tyto terpeny, ať už samostatně nebo kombinovaně v liposomech, činila proti *S. aureus* 662 µg/ml. Kromě toho byla testována jejich účinnost proti čtyřem kmenům *Salmonella*, kde MIC pro karvakrol a tymol ve volné formě byla 331 µg/ml a pro jejich kombinaci v liposomech 662 µg/ml. Bylo zjištěno, že *Salmonella* je na karvakrol a tymol ve volné formě citlivější než *S. aureus*. Výzkum García-Salinas et al. (2018) zkoumal kombinaci těchto látek u *S. aureus* ATCC 25923 a zjistil, že tyto látky vykazují pouze aditivní účinek. Hlavními cíli karvakrolu a tymolu jsou cytoplazmatická membrána mikroorganismů a vnější membrána gramnegativních bakterií; dále se dá předpokládat, že by tyto sloučeniny mohly interagovat s membránovými proteiny a enzymy, stejně jako s dalšími intracelulárními cíli (Engel et al. 2017).

V naší výzkumné práci byl nalezen indiferentní účinek, kdy MIC pro karvakrol proti *E. coli* stanovena na 512 µg/ml a pro tymol na 256 µg/ml. Ve studii Pei et al. (2009) byla testována také kombinace karvakrolu (100 µg/ml) s tymolem (200 µg/ml), v tomto případě byl nalezen aditivní účinek s FICI = 0,75. Ve studii byla nalezena i synergická interakce tymol/eugenol a aditivní interakce karvakrol/eugenol. Dále se zabývali i interakcí mezi tymolem se cinnamaldehydem, a karvakrolem se cinnamaldehydem proti *E. coli* CGMCC 1.487.

Bouhtit et al. (2021) studoval cytotoxické účinky silic z rostliny anýzovec obecný (*Ptychotis verticillata*), která obsahuje 44,6 % karvakrolu a 3,4 % tymolu, s cílem prozkoumat

jeho potenciální přínos v léčbě akutní myeloidní leukémie. Bylo zjištěno, že kombinace 200 µg/ml karvakrolu a 50 µg/ml tymolu, stejně jako kombinace 300 µg/ml karvakrolu s 50 µg/ml tymolu, vykazují synergický účinek proti buněčné linii HL-60. Studie rovněž hodnotila toxicitu těchto kombinací na buněčných liniích zdravých jedinců a určila toxickou koncentraci na 400 µg/ml pro karvakrol a 100 µg/ml pro tymolu. Tato zjištění naznačují, že karvakrol a tymol mohou společně indukovat apoptózu buněk akutní leukémie (Bouhtit et al. 2021).

6.2.2 Tymol a α -terpineol

Do současnosti nebyly publikovány žádné studie zkoumající účinky kombinace tymolu a α -terpineolu proti *E. coli* ani jiným mikroorganismům. Naše práce tedy pravděpodobně představuje první výzkum zaměřený na tento aspekt. Zjistili jsme, že kombinace 64 µg/ml tymolu a 256 µg/ml α -terpineolu má synergický účinek, což otevírá nové perspektivy pro antimikrobiální terapii. Tato zjištění naznačují možnost vývoje nových strategií pro boj proti mikrobiálním infekcím.

Studie Zengin & Baysal (2014) uvedla, že byla zaznamenána synergie, když byly složky α -terpineolu a linaloolu kombinovány v určitých dávkách proti *E. coli*. Studie uvádí, že kombinace α -terpineolu a linaloolu při 1/4 MIC + 1/4 MIC, 1/4 MIC + 1/8 MIC, 1/8 MIC + 1/4 MIC a 1/8 MIC + 1/8 MIC prokázala synergické účinky.

Ve farmaceutickém průmyslu je často uplatňována strategie využití synergických účinků různých přírodních složek, což je dobře ilustrováno využitím α -terpineolu ve spojení s dalšími terpeny, jako jsou kafr, chlorothymol, eukalyptol a mentol. Tyto kombinace se běžně nacházejí ve farmaceutických výrobcích jako jsou kapsle, které jsou cíleny na řadu běžných zdravotních obtíží – od ucpaní nosních cest a běžných nachlazení po astma a bolesti spojené s muskuloskeletálními problémy (Sales et al. 1947).

Ve výzkumu Shafaie et al. (2023) bylo zjištěno, že α -terpineol a E-nerolidol tvoří hlavní složky silic *S. leptoclada*. Nejcitlivějšími mikroorganismy na tuto silici byly *S. aureus* a *K. pneumoniae*, u nichž byly zaznamenány MIC ve výši 12,5 µg/ml. Naopak, *P. aeruginosa* a *E. coli* byly touto silicí inhibovány nedostatečně, což se projevilo hodnotami MIC přesahujícími 2 500 mg/ml.

6.2.3 Eugenol a karvakrol

V naší práci byla zjištěna synergická interakce mezi karvakrolem a eugenolem proti *P. aeruginosa* ATCC 27853. Kombinace těchto dvou látek v koncentracích 256 µg/ml karvakrolu a 32 µg/ml eugenolu prokázala zvýšenou antimikrobiální účinnost. Tento náález představuje zajímavý příspěvek k možnostem léčby infekcí způsobených tímto patogenem. Nebyla nalezena žádná studie, která by testovala tuto bakterii proti stejným složkám silic, a tak se možná jedná o první záznamy tohoto testování vůbec.

Ve studii Pei et al. (2009) byly zkoumány účinky kombinace eugenolu a karvakrolu na *E. coli* CGMCC 1.487. MIC pro eugenol byla stanovena na 100 µg/ml a pro karvakrol na 800 µg/ml, přičemž hodnota FICI 0,75 naznačuje aditivní účinek. V kontrastu k tomu naše práce ukázala antagonistický účinek téže kombinace na *E. coli*, s FICI hodnotou 2,5, kde MIC

pro eugenol dosáhla 512 µg/ml a pro karvakrol 1024 µg/ml. Tento rozdíl ve výsledcích může být důsledkem použití různých kmenů *E. coli* v jednotlivých studiích, což může významně ovlivnit výsledky antimikrobiálních testů. Dále ve studii měřili účinnost kombinací tymolu (MIC = 100 µg/ml) se cinnamaldehydem (MIC = 200 µg/ml) a karvakrolu (MIC = 200 µg/ml) se cinnamaldehydem (MIC = 200 µg/ml), které vykazovaly aditivní účinky. Naopak, kombinace eugenolu (MIC = 400 µg/ml) s cinnamaldehydem (MIC = 100 µg/ml) prokázala synergický účinek (Pei et al. 2009). Tato zjištění naznačují, že eugenol ve spojení s cinnamaldehydem nebo karvakrolem posiluje jejich antimikrobiální účinnost oproti samostatnému použití těchto složek. Synergismus eugenolu s cinnamaldehydem by mohl být způsoben interakcí těchto složek s různými proteiny nebo enzymy.

Ve studii Pei et al. (2009) byl nalezen synergický účinek mezi eugenolem (MIC = 400 µg/ml) a tymolem (MIC = 100 µg/ml) s FICI = 0,5 proti *E. coli*. Předpokládá se, že synergické účinky kombinací eugenol/karvakrol a eugenol/thymol mohou být způsobeny tím, že karvakrol a thymol narušují vnější membránu *E. coli*, což umožňuje eugenolu proniknout do cytoplazmy a interagovat s proteiny. V naší práci však nebyla synergická interakce mezi eugenolem a tymolem potvrzena, jelikož *E. coli* ATCC 25922 prokázal indiferentní účinek s FICI hodnotou 1,5. Rozdíly ve výsledcích mezi těmito studii mohou být způsobeny použitím odlišných kmenů *E. coli*, což může ovlivnit interakci antimikrobiálních sloučenin.

Studie Asadi et al. (2023) potvrdila pozitivní účinky kombinace karvakrolu s cefixem na *E. coli* ATCC 35218, přičemž byla použita šachovnicová metoda k prokázání synergické interakce. Výzkum zkoumal antibakteriální a antibiofilmové vlastnosti jak samotného karvakrolu, tak jeho kombinace s cefixem, čímž bylo potvrzeno zvýšení účinnosti při kombinovaném použití těchto látek.

Studie Gowda et al. (2021) zahrnovala také testování *E. faecalis* proti triklosanu s MIC = 3,43 µg/ml. Kombinace eugenolu a triklosanu s MIC v rozmezí 0,39–0,78 µg/ml prokázala synergický účinek při koncentracích 200–400 µg/ml eugenolu, což bylo ověřeno šachovnicovou metodou. Ve studii bylo dále zjištěno, že tato synergická interakce zvýšila účinnost eugenolu tří- až čtyřnásobně ve srovnání s jeho samostatným použitím, přičemž MIC eugenolu byla ve studii trojnásobně vyšší než v našem případě.

Ve studii Köse (2022) kombinovali karvakrol s meropenemem a zjistili synergii proti 8 kmenům *K. pneumoniae*, kdy došlo k osminásobnému poklesu MIC u meropenemu. Konkrétní MIC byly 8–16 µg/ml karvakrolu s 8–16 µg/ml meropenemu.

7 Závěr

Výsledky této práce prokázaly synergický účinek karvakrolu s tymolem proti *E. faecalis*, dále tymolu s α -terpineolem proti *E. coli*, eugenolu s karvakrolem proti *P. aeruginosa*, a linaloolu s tymolem u *K. pneumoniae*. Podařilo se tedy potvrdit hypotézu, že některá kombinace vybraných látek bude mít zesilující účinek *in-vitro*. Dalších pozitivních (aditivních) účinků bylo zjištěno celkem 13. Čtyři u *S. aureus*, stejně jako *K. pneumoniae*, dále tři u *E. coli* a po jedné u *E. faecalis* a *P. aeruginosa*.

Dle dostupných zdrojů nebyla dosud potvrzena informace o synergii tymolu s α -terpineolem proti *E. coli*, ani synergie eugenolu s karvakrolem proti *P. aeruginosa*. Rovněž nebyly nalezeny údaje o samostatném testování MIC α -terpineolu proti *P. aeruginosa* nebo *K. pneumoniae*, ani linaloolu proti *E. faecalis*. Tato studie je tedy možná první, která se zabývala těmito konkrétními kombinacemi.

Rostlinné silice mohou pomáhat v boji proti antibiotické rezistenci. Kombinací různých silic může být sníženo riziko vzniku rezistence, jelikož se bakterie musejí přizpůsobit více antimikrobiálním mechanismům současně. Terpeny jako karvakrol a tymol mohou narušovat buněčné membrány mikroorganismů, čímž zvyšují jejich propustnost. V kombinaci mohou tyto látky více destabilizovat membrány a tím účinněji omezit funkce buněk. Některé terpeny mohou zlepšit vstřebávání a distribuci jiných aktivních látek v mikroorganismech, čímž zvyšují jejich účinnost.

Tento výzkum přináší nové poznatky využitelné připotenciální uplatnění synergických kombinací rostlinných silic v boji proti patogenním mikroorganismům.

8 Literatura

- Abers M, Schroeder S, Goelz L, Sulser A, St. Rose, T, Puchalski K, Langland J. 2021. Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. **21**. DOI: 10.1186/s12906-021-03285-3.
- Abushaheen MA, Muzahed Fatani AJ, Alosaimi M, Mansy W, George M, Acharya S, Rathod S, Divakar DD, Jhugroo C, Vellappally S, Khan AA, Shaik J, Jhugroo P. 2020. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*. **66**. DOI: 10.1016/j.disamonth.2020.100971.
- Aljaafari MN, Alali AO, Baqais L, Alqubaisy M, Alali M, Molouki A, Ong-Abdullah, J., Abushelaibi, A., Lai, K. S., Lim, S. H. E. 2021. An overview of the potential therapeutic applications of essential oils. *Molecules*. MDPI AG.
- Álvarez-Martínez FJ, Barraón-Catalán E, Herranz-López M, Micol V. 2021. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*. Elsevier GmbH.
- Andrade-Ochoa S, Chacón-Vargas KF, Sánchez-Torres LE, Rivera-Chavira BE, Noguera-Torres B, Nevárez-Moorillón GV. 2021. Differential antimicrobial effect of essential oils and their main components: Insights based on the cell membrane and external structure. *Membranes*. **11**. DOI: 10.3390/membranes11060405.
- Asadi S, Nayeri-Fasaei B, Zahraei-Salehi T, Yahya-Rayat R, Shams N, Sharifi A. 2023. Antibacterial and anti-biofilm properties of carvacrol alone and in combination with cefixime against *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*. **23**. DOI: 10.1186/s12866-023-02797-x.
- Baptista-Silva S, Borges S, Ramos OL, Pintado M, Sarmento B. 2020. The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. *Journal of Essential Oil Research*. Taylor and Francis Inc.
- Bassolé IHN, Juliani HR. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*.
- Benov L, Gralnick JA, Hoc A, Oh J, Olsen S. 2021. Improved Formazan Dissolution for Bacterial MTT Assay. Retrieved from <https://journals.asm.org/journal/spectrum>
- Bhavaniramy S, Vishnupriya S, Al-Aboody MS, Vijayakumar R, Baskaran D. 2019. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*. **2**. 49–55. DOI: 10.1016/j.gaost.2019.03.001.
- Bouhtit F, Najar M, Moussa Agha D, Melki R, Najimi M, Sadki K, Boukhatem N, Bron D, Meuleman N, Hamal A, Lagneaux L, Lewalle P, Merimi M. 2021. New anti-leukemic effect of carvacrol and thymol combination through synergistic induction of different cell death pathways. *Molecules*. **26**. DOI: 10.3390/molecules26020410.
- Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. 2020. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*. MDPI AG.
- Brown DFJ, Wootton M, Howe RA. 2016. Antimicrobial susceptibility testing breakpoints and methods from BSAC to EUCAST. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **71** (3–5). DOI: 10.1093/jac/dkv287.
- Caputo L, Piccialli I, Ciccone R, de Caprariis P, Massa A, De Feo V, Pannaccione A. 2021. Lavender and coriander essential oils and their main component linalool exert a protective effect against amyloid- β neurotoxicity. *Phytotherapy Research*. **35** (486–493). DOI: 10.1002/ptr.6827.

- Chadha J, Ravi Singh J, Harjai K. 2023. α -Terpineol synergizes with gentamicin to rescue *Caenorhabditis elegans* from *Pseudomonas aeruginosa* infection by attenuating quorum sensing-regulated virulence. *Life Sciences*. 313. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.121267.
- Chen Y, Zhang LL, Wang W, Wang G. 2023. Recent updates on bioactive properties of α -terpineol. *Journal of Essential Oil Research*. Taylor and Francis Ltd.
- Cheung GYC, Bae JS, Otto M. 2021. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. Bellwether Publishing, Ltd. 12 (547-569)
- Chiş AA, Rus LL, Morgovan C, Arseniu AM, Frum A, Vonica-ţincu AL, Gligor FG, Mureşan ML, Dobrea CM. 2022. Microbial Resistance to Antibiotics and Effective Antibiotherapy. *Biomedicines*. 10. DOI: 10.3390/biomedicines10051121.
- Christaki E, Marcou M, Tofarides A. 2020. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*. Springer. 88 (26–40)
- Clinical and Laboratory Standards Institute 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection*. 6 (503–508). DOI: 10.1046/j.1469-0691.2000.00149.x.
- Clinical and Laboratory Standards Institute 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. Pennsylvania, USA. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Craft KM, Nguyen JM, Berg LJ, Townsend SD. 2019. Methicillin-resistant: *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *MedChemComm*. Royal Society of Chemistry. 10 (1231–1241)
- Crone S, Vives-Flórez M, Kvich L, Saunders AM, Malone M, Nicolaisen MH, Martínez-García E, Rojas-Acosta C, Catalina Gomez-Puerto M, Calum H, Whiteley M, Kolter R, Bjarnsholt T. 2020. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*. 128 (220–231). DOI: 10.1111/apm.13010.
- da Silva BD, Bernardes PC, Pinheiro PF, Fantuzzi E, Roberto CD. 2021. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science*. Elsevier Ltd.
- Dadgostar P. 2019. Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infection and Drug Resistance*. Dove Medical Press Ltd. 12 (3903–3910)
- Dai P, Hu D. 2022. The making of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. John Wiley and Sons Inc.
- Darby EM, Trampari E, Siasat P, Gaya MS, Alav I, Webber MA, Blair JMA. 2023. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research. 21 (280–295)
- de Matos SP, Lucca LG, Koester LS. 2019. Essential oils in nanostructured systems: Challenges in preparation and analytical methods. *Talanta*. Elsevier B.V. 195 (204-214).
- Dhere D, Ghavri K, Karuppasamy MM, Shrikant Verma M. 2023. *Research Trends in Microbiology*. Retrieved from www.bhumipublishing.com
- Dragland IS, Wellendorf H, Kopperud H, Stenhagen I, Valen H. 2019. Investigation on the antimicrobial activity of chitosan-modified zinc oxide-eugenol cement. *Biomaterial Investigations in Dentistry*. 6 (99–106). DOI: 10.1080/26415275.2019.1697621.
- Engel JB, Heckler C, Tondo EC, Daroit DJ, da Silva Malheiros P. 2017. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*. 252 (18–23). DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.003.

- Escobar A, Pérez M, Romanelli G, Blustein G. 2020. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*. Elsevier B.V. **12** (9243-9269).
- Fagbemi KO, Aina DA, Olajuyigbe OO. 2021. Soxhlet Extraction versus Hydrodistillation Using the Clevenger Apparatus: A Comparative Study on the Extraction of a Volatile Compound from *Tamarindus indica* Seeds. *Scientific World Journal*. 2021. DOI: 10.1155/2021/5961586.
- Fisher JF, Mobashery S. 2020. Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein Science*. Blackwell Publishing Ltd. **29** (629–646).
- Gan C, Langa E, Valenzuela A, Ballesteros D, Pino-Otín MR. 2023. Synergistic Activity of Thymol with Commercial Antibiotics against Critical and High WHO Priority Pathogenic Bacteria. *Plants*. **12**. DOI: 10.3390/plants12091868.
- García-Salinas S, Elizondo-Castillo H, Arruebo M, Mendoza G, Irusta S. 2018. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. *Molecules*. **23**. DOI: 10.3390/molecules23061399.
- Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez MB. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*. Elsevier Editora Ltda.
- Gowda J, Tavarageri A, Kulkarni R, Anegundi RT, Janardhan A, Bhat MA. 2021. Comparative assessment of the antimicrobial efficacy of triclosan, amoxicillin and eugenol against *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. **14** (59–62). DOI: 10.5005/jp-journals-10005-1869.
- Guimarães AC, Meireles LM, Lemos MF, Guimarães MCC, Endringer DC, Fronza M, Scherer R. 2019. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*. **24**. DOI: 10.3390/molecules24132471.
- Guo F, Chen Q, Liang Q, Zhang M, Chen W, Chen H, Yun Y, Zhong Q, Chen W. 2021. Antimicrobial Activity and Proposed Action Mechanism of Linalool Against *Pseudomonas fluorescens*. *Frontiers in Microbiology*. **12**. DOI: 10.3389/fmicb.2021.562094.
- Gutiérrez-Fernández J, García-Armesto MR, Álvarez-Alonso R, del Valle P, de Arriaga D, Rúa J. 2013. Antimicrobial activity of binary combinations of natural and synthetic phenolic antioxidants against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Dairy Science*. **96** (4912–4920). DOI: 10.3168/jds.2013-6643.
- Haag AF, Fitzgerald JR, Penadés JR. 2019. *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiology Spectrum*. **7**. DOI: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0060-2019.
- He R, Zhang Z, Xu L, Chen W, Zhang M, Zhong Q, Chen H, Chen W. 2022. Antibacterial mechanism of linalool emulsion against *Pseudomonas aeruginosa* and its application to cold fresh beef. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **38**. DOI: 10.1007/s11274-022-03233-4.
- Herma A, Tambor K, Herman A. 2016. Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. *Current Microbiology*. **72** (165–172). DOI: 10.1007/s00284-015-0933-4.
- Ibrahim OO. 2020. *Staphylococcus aureus* a Gram-positive Cocci Bacterium Causing Microbial Infections, and Toxins Symptoms Including Food Poisoning Cronicon EC MICROBIOLOGY Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/345087705>
- Imran M, Aslam M, Alsagaby SA, Saeed F, Ahmad I, Afzaal M, Arshad MU, Abdelgawad MA, El-Ghorab AH, Khames A, Shariati MA, Ahmad A, Hussain M, Imran A, Islam S. 2022. Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food Science and Nutrition*. John Wiley and Sons Inc. **10** (3544–3561)
- Iseppi R, Mariani M, Condò C, Sabia C, Messi P. 2021. Essential oils: A natural weapon against antibiotic-resistant bacteria responsible for nosocomial infections. *Antibiotics*. **10**. DOI: 10.3390/antibiotics10040417.

- Jeong GJ, Khan F, Tabassum N, Cho KJ, Kim YM. 2023. Controlling biofilm and virulence properties of Gram-positive bacteria by targeting wall teichoic acid and lipoteichoic acid. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V.
- Johansen B, Duval RE, Sergere JC. 2022. First Evidence of a Combination of Terpinen-4-ol and α -Terpineol as a Promising Tool against ESKAPE Pathogens. *Molecules*. 27. DOI: 10.3390/molecules27217472.
- Ju J, Xie Y, Yu H, Guo Y, Cheng Y, Qian H, Yao W. 2022. Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: a new antimicrobial therapy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Ltd. **62** (1740-1751)
- Jubair N, Rajagopal M, Chinnappan S, Abdullah NB, Fatima A. 2021. Review on the Antibacterial Mechanism of Plant-Derived Compounds against Multidrug-Resistant Bacteria (MDR). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Hindawi Limited.
- Jubeh B, Breijyeh Z, Karaman R. 2020. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*. MDPI AG.
- Kachur K, Suntres Z. 2020. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Bellwether Publishing, Ltd. **60** (3042-3053)
- Kakoullis L, Papachristodoulou E, Chra P, Panos G. 2021. Mechanisms of antibiotic resistance in important gram-positive and gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. *Antibiotics*. MDPI.
- Katekar VP, Rao AB, Sardeshpande VR. 2023. A hydrodistillation-based essential oils extraction: A quest for the most effective and cleaner technology. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. Elsevier B.V.
- Kh Marei GI, Rabea EI, I Badawy ME. 2019. In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of Monoterpenes against some Food-Borne Pathogens. *J. Plant Prot. and Path., Mansoura Univ*. 10.
- Kim HJ, Youn HY, Kang HJ, Moon JS, Jang YS, Song KY, Seo KH. 2022. Prevalence and Virulence Characteristics of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Bovine Mastitis Milk Compared to Bovine Normal Raw Milk in South Korea. *Animals*. 12 . DOI: 10.3390/ani12111407.
- Köse EO. 2022. In vitro activity of carvacrol in combination with meropenem against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Folia Microbiologica*. **67** (143–156). DOI: 10.1007/s12223-021-00908-7.
- Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I. 2020. Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. *Molecules*. MDPI AG.
- Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. 2021. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*. MDPI AG.
- Krawczyk B, Wityk P, Gałęcka M, Michalik M. 2021. The many faces of *Enterococcus* spp.—commensal, probiotic and opportunistic pathogen. *Microorganisms*. MDPI.
- Kwiatkowski P, Sienkiewicz M, Pruss A, Łopusiewicz Ł, Arszyńska N, Wojciechowska-Koszko I, Kilanowicz A, Kot B, Dołęgowska B. 2022. Antibacterial and Anti-Biofilm Activities of Essential Oil Compounds against New DelhiMetallo- β -Lactamase-1-Producing Uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Antibiotics*. 11. DOI: 10.3390/antibiotics11020147.
- Liu T, Kang J, Liu L. 2021. Thymol as a critical component of *Thymus vulgaris* L. essential oil combats *Pseudomonas aeruginosa* by intercalating DNA and inactivating biofilm. *LWT*. 136 . DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110354.
- Liu W, Boudry P, Bohn C, Bouloc P. 2020. *Staphylococcus aureus* pigmentation is not controlled by Hfq. *BMC Research Notes*. 13. DOI: 10.1186/s13104-020-4934-4.

- Mączka W, Duda-Madej A, Grabarczyk M, Wińska K. 2022. Natural Compounds in the Battle against Microorganisms—Linalool. *Molecules*. MDPI.
- Mahizan NA, Yang SK, Moo CL, Song AAL, Chong CM, Chong CW, Abushelaibi A, Erin Lim SH, Lai KS. 2019. Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. *Molecules*. MDPI AG.
- Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, Izadi M, Abdollahi M, Nabavi SM, Ajami M. 2017. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. Taylor and Francis Ltd. **43** (668-689).
- Marinelli L, Di Stefano A, Cacciatore I. 2018. Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. *Phytochemistry Reviews*. 17 (903–921). DOI: 10.1007/s11101-018-9569-x.
- Masango P. 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*. **13** (833–839). DOI: 10.1016/j.jclepro.2004.02.039.
- Mechmechani S, Gharsallaoui A, Karam L, EL Omari K, Fadel A, Hamze M, Chihib NE. 2023. Pepsin and Trypsin Treatment Combined with Carvacrol: An Efficient Strategy to Fight *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* Biofilms. *Microorganisms*. **11**. DOI: 10.3390/microorganisms11010143.
- Nadeem SF, Gohar UF, Tahir SF, Mukhtar H, Pornpukdeewattana S, Nukthamna P, Moula Ali AM, Bavisetty SCB, Massa S. 2020. Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. Taylor and Francis Ltd. **46** (578-599).
- Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. MDPI AG. **6** (1451–1474)
- Nisar MF, Khadim M, Rafiq M, Chen J, Yang Y, Wan CC. 2021. Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited.
- Oussalah M, Phane S, Lacroix M. 2006. Mechanism of Action of Spanish Oregano, Chinese Cinnamon, and Savory Essential Oils against Cell Membranes and Walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 69 (1046–1055).
- Parasuraman V, Sharmin AM, Vijaya Anand MA, Sivakumar AS, Surendhiran D, Sharesh G, Kim S. 2022. Fabrication and bacterial inhibitory activity of essential oil linalool loaded biocapsules against *Escherichia coli*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 74. DOI: 10.1016/j.jddst.2022.103495.
- Pei RS, Zhou F, Ji BP, Xu J. 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science*. **74**. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01287.x.
- Pereira I, Severino P, Santos AC, Silva AM, Souto EB. 2018. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. Elsevier B.V.
- Porrás G, Chassagne F, Lyles JT, Marquez L, Dettweiler M, Salam AM, Samarakoon T, Shabih S, Farrokhi DR, Farrokhi DR, Quave CL. 2021. Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. *Chemical Reviews*. 121 (2495–3560)
- Pulingam T, Parumasivam T, Gazzali AM, Sulaiman AM, Chee JY, Lakshmanan M, Chin CF, Sudesh K. 2022. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Qiu J, Feng H, Lu J, Xiang H, Wang D, Dong J, Wang J, Wang X, Liu J, Deng X. 2010. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **76** (5846–5851). DOI: 10.1128/AEM.00704-10.

- Razola-Díaz M del C, Guerra-Hernández EJ, García-Villanova B, Verardo V. 2021. Recent developments in extraction and encapsulation techniques of orange essential oil. *Food Chemistry*. 354. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129575.
- Reyes-Jurado F, Franco-Vega A, Ramírez-Corona N, Palou E, López-Malo A. 2015. *Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling*. Food Engineering Reviews. Springer New York LLC.
- Rodriguez-Garcia I, Silva-Espinoza BA, Ortega-Ramirez LA, Leyva JM, Siddiqui MW, Cruz-Valenzuela MR, Gonzalez-Aguilar GA, Ayala-Zavala JF. 2016. Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **56** (1717–1727). DOI: 10.1080/10408398.2013.800832.
- Rohde M. 2019. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiology Spectrum*. 7. DOI: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0044-2018.
- Rudramurthy GR, Swamy MK, Sinniah UR, Ghasemzadeh A. 2016. Nanoparticles: Alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. *Molecules*. MDPI AG.
- Russo TA, Marr CM. 2019. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. 32 (e00001-19)
- Sales A, De L, Felipe O, Lemos Bicas J. 1947. Production, Properties, and Applications of α -Terpineol. **13** (1261–1279). DOI: 10.1007/s11947-020-02461-6
- Samtiya M, Matthews KR, Dhewa T, Puniya AK. 2022. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: Trends, Mechanisms, Pathways, and Possible Regulation Strategies. *Foods*. **11**. DOI: 10.3390/foods11192966.
- Scheffers D-J, Pinho MG. 2005. Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **69** (585–607). DOI: 10.1128/mnbr.69.4.585-607.2005.
- Schwalbe Richard, Avery Goodwin, Lynn Steele-Moore 2007. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*.
- Shafaie E, Taleghani A, Sahebkar A, Eghbali S. 2023. The Essential Oil of *Sclerorhachis leptoclada* Rech.f.: Chemical Composition and Biological Activity. *Natural Product Communications*. 18. DOI: 10.1177/1934578X231212344.
- Sharmeen JB, Mahomoodally FM, Zengin G, Maggi F. 2021. Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. *Molecules*. MDPI AG.
- Silva JC, Silva Pereira RL, Sampaio de Freitas T, Rocha JE, Macedo NS, de Fatima Alves Nonato C, Linhares ML, Arruda Tavares DS, Bezerra da Cunha FA, Melo Coutinho HD, Gonçalo de Lima S, Pereira-Junior FN, Araújo Maia FP, Pita Neto IC, Galvão Rodrigues FF, Garcia Santos GJ. 2022. Evaluation of antibacterial and toxicological activities of essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and its major constituent eugenol. *Food Bioscience*. **50**. DOI: 10.1016/j.fbio.2022.102128.
- Sivaramakrishnan R, Leela KV, Sujith R, Naik S, Priya S. 2022. Antibiotic Resistance of Clinical *Klebsiella* Isolates from tertiary Care Hospital. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. **16** (2669–2678). DOI: 10.22207/JPAM.16.4.36.
- Soković M, Glamočlija J, Marin PD, Brkić D, Van Griensven LJLD. 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*. **15** (7532–7546). DOI: 10.3390/molecules15117532.
- Sora VM, Meroni G, Martino PA, Soggiu A, Bonizzi L, Zecconi A. 2021. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: Virulence factors and antibiotic resistance. *Pathogens*. 10. DOI: 10.3390/pathogens10111355.

- Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi Publishing Corporation.
- Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG.
- Thoroski J, Blank G, Biliaderis C. 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by bacillus subtilis. Journal of food protection. 52 (399-403).
- Tongnuanchan P, Benjakul S. 2014. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. Journal of Food Science. **79**. DOI: 10.1111/1750-3841.12492.
- Turina A del V, Nolan MV, Zygadlo JA, Perillo MA. 2006. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. Biophysical Chemistry. **122** (101–113). DOI: 10.1016/j.bpc.2006.02.007.
- Ulanowska M, Olas B 2021. Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. International Journal of Molecular Sciences. MDPI.
- Urban-Chmiel R, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Wieczorek K, Dec M, Nowaczek A, Osek J. 2022. August 1 Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. Antibiotics. MDPI.
- Wang TH, Hsia SM, Wu CH, Ko SY, Chen MY, Shih YH, Shieh TM, Chuang LC, Wu CY. 2016. Evaluation of the antibacterial potential of liquid and vapor phase phenolic essential oil compounds against oral microorganisms. PLoS ONE (e0163147) DOI: 10.1371/journal.pone.0163147.
- Wu L, Mo C, Xiong Y, Chen Y, Jin M, Han K, Fu X. 2024. *Klebsiella pneumoniae* invasive syndrome with pneumocephalus and extensive cerebral infarction: Case report. Heliyon (e25745). DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e25745.
- Yang X, Zhao S, Deng Y, Xu W, Wang Z, Wang W, Lv R, Liu D. 2023. Antibacterial activity and mechanisms of α -terpineol against foodborne pathogenic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. **107** (6641–6653). DOI: 10.1007/s00253-023-12737-4.
- Zengin H, Baysal AH. 2014. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. Molecules. **19** (17773–17798). DOI: 10.3390/molecules191117773.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

AMR – antimikrobiální rezistence

ATP – adenosintrifosfát

BSAC – Britská společnost pro antimikrobiální chemoterapii

CDC – Centra pro kontrolu a prevenci nemocí

cKp – klasická *K. pneumoniae*

EPS – extracelulárních polymerních látek

ESCMID – Evropské společnosti klinické mikrobiologie a infekčních nemocí

EUCAST – Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

FICI – Frakční inhibiční koncentrační index

GlcNAc – N-acetylglukosamin

hvKp – hypervirulentní *K. pneumoniae*

KTJ – kolonie tvořících jednotek

MBC – minimální baktericidní koncentrace

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MRSA – methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

MurNAc – kyselina N-acetylmuramová

PBP – penicilin vázající proteiny

QS – quorum sensing

SF – Superkritická tekutina

WHO – Světová zdravotní organizace

10 Seznam obrázků

Obrázek 1: Přehled molekulárních mechanismů rezistence vůči antibiotikům

Obrázek 2: Hydrodestilace

Obrázek 3: Eugenol

Obrázek 4: Karvakrol

Obrázek 5: Linalool

Obrázek 6: Tymol

Obrázek 7: α -Terpineol

Obrázek 8: Testování mikrobiální aktivity pro samostatné silice a příslušný mikroorganismus

Obrázek 9: Schéma testování kombinací silic

Obrázek 10: Schéma pro šachovnicovou metodu

11 Seznam tabulek

Tabulka 1: Vyhodnocení kombinací dle EUCAST a BSAC.

Tabulka 2: Minimální inhibiční koncentrace kombinací ($\mu\text{g/ml}$) jednotlivých složek silic proti *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Tabulka 3: Minimální inhibiční koncentrace karvakrolu v kombinaci s tymolem proti *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Tabulka 4: Minimální inhibiční koncentrace kombinací ($\mu\text{g/ml}$) jednotlivých složek silic proti *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70062.

Tabulka 5: Minimální inhibiční koncentrace kombinací ($\mu\text{g/ml}$) jednotlivých složek silic proti *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabulka 6: Minimální inhibiční koncentrace tymolu v kombinaci s α -terpineolem proti *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabulka 7: Minimální inhibiční koncentrace kombinací ($\mu\text{g/ml}$) jednotlivých složek silic proti *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Tabulka 8: Minimální inhibiční koncentrace kombinací ($\mu\text{g/ml}$) jednotlivých složek silic proti *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Tabulka 9: Minimální inhibiční koncentrace eugenolu v kombinaci s karvakrolem proti *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.