

# **Účinnost antimikrobiálních látek používaných v kosmetických přípravcích na biofilm pozitivní bakterie**

Lucie Bartošová

---

Bakalářská práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Bartošová**  
Osobní číslo: **T16344**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Účinnost antimikrobiálních látek používaných v kosmetických přípravcích na biofilm pozitivní bakterie**

Zásady pro vypracování:

### **Teoretická část**

**Charakteristika mikroorganismů vyskytujících se při tvorbě biofilmů.**

**Charakteristika a výskyt biofilmů**

**Možnosti detekce biofilmů**

**Vliv antimikrobních látek na bakterie**

### **II. Praktická část**

**Kultivační metody pro stanovení biofilm pozitivních bakterií**

**Vliv kultivačních podmínek na tvorbu biofilmů.**

**Vyhodnocení a zpracování výsledků**

**Diskuze a formulace závěrů**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**SIVAMANI, Raja K., Jared R. JAGDEO, Peter ELSNER a Howard I. MAIBACH.** *Cosmeceuticals and active cosmetics* . Third edition. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016. ISBN 978-1-4822-1417-8.

**BERLANGA, Mercedes, Laura GÓMEZ-PÉREZ a Ricardo GUERRERO.** Biofilm formation and antibiotic susceptibility in dispersed cells versus planktonic cells from clinical, industry and environmental origins. *Antonie van Leeuwenhoek* . 2017, 110(12), 1691-1704.

DOI: 10.1007/s10482-017-0919-2. ISSN 0003-6072. Dostupné z:

<http://link.springer.com/10.1007/s10482-017-0919-2>

**ALHEDE, Morten, Özge ER, Steffen FICKHARDT, et al.** Bacterial biofilm formation and treatment in soft tissue fillers. *Pathogens and Disease* . 2014, 70(3), 339-346. DOI:

10.1111/2049-632X.12139. ISSN 2049632X. Dostupné z:

<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/2049-632X.12139>

Dle doporučení vedoucího.

Databáze Web of Science

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Pavel Pleva, PhD.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

**2. ledna 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**20. května 2019**

Ve Zlíně dne 12. března 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

*děkan*

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.

*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně .....

.....

---

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

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

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

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

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

## ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce je zhodnotit antimikrobiální účinky vybraných látek používaných v kosmetických přípravcích a zdali tvorba bakteriálního biofilmu má vliv na rezistenci k těmto látkám. Teoretická část se věnuje charakterizaci, tvorbě a detekci mikrobiálního biofilmu a také popisu biofilm pozitivních bakterií. Kromě toho se také zabývá antimikrobiálními látkami využívaných v kosmetických přípravcích a kontaminačním cestám, které tyto přípravky znehodnocují. V experimentální části jsou vyhodnoceny výsledky měření testovaných bakterií v různých koncentracích antimikrobiálních látek a detekce tvorby biofilmu u těchto bakterií. Z výsledků vyplývá, že testované gramnegativní bakterie (*Stenotrophomonas maltophilia*) jsou odolnější vůči testovaným látkám (extrakt z grepových jader, laktát sodný, nisin, kyselina jantarová, capryloyl glycin) než bakterie grampozitivní (*Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* a *Bacillus cereus*).

Klíčová slova: biofilm, bakterie, inhibice, antimikrobiální látky

## ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis is to evaluate the antimicrobial effects of selected substances in cosmetics and documents related to biological materials. The theoretical part deals with characterization, formation and microbial biofilm and description of biofilm positive bacteria. In addition, anti-microbial agents used in cosmetics and contaminating pathways that deplete these preparations are also used. The experimental results are aimed at measuring the results of test bacteria in various concentration antimicrobial agents and detecting the formation of biofilm in these bacteria. The results indicate that the Gram-negative bacteria tested (*Stenotrophomonas maltophilia*) are more resistant to test substances (grapefruit extract, sodium lactate, nisin, succinic acid, capryloyl glycine) than Gram-positive bacteria (*Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus cereus*).

Keywords: biofilm, bacteria, inhibition, antimicrobial agents

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Pavlovi Plevovi Ph.D. za rady a velkou trpělivost při tvorbě této práce. Poděkování patří i paním laborantkám Bc. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové, které mi vždy velmi ochotně poradily v laboratoři. Také bych chtěla poděkovat své rodině, která mi byla oporou a dodávala mi sílu.

*„Vím, že nic nevím“*

*Autor: Sókratés*

# OBSAH

ÚVOD.....	9
<b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>10</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA BIOFILMU A JEHO VÝSKYT.....</b>	<b>11</b>
1.1 DEFINICE BIOFILMU.....	11
1.2 STRUKTURA BIOFILMU.....	11
1.2.1 Extracelulární polymerní látky (EPS).....	12
1.2.2 Vodní kanálky.....	12
1.3 TVORBA BIOFILMU.....	12
1.3.1 Fáze I – připojení (adheze).....	13
1.3.2 Fáze II – množení (agregace).....	13
1.3.3 Fáze III – zrání 1.....	14
1.3.4 Fáze IV – zrání 2.....	14
1.3.5 Fáze V – disperze.....	14
1.4 KOMUNIKAČNÍ FORMY BIOFILMU.....	14
1.5 VÝSKYT A VÝZNAM BIOFILMU.....	15
<b>2 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANISMŮ PŘI TVORBĚ BIOFILMU.....</b>	<b>16</b>
2.1 BIOFILM POZITIVNÍ BAKTERIE.....	16
<b>3 MOŽNOSTI DETEKCE BIOFILMU.....</b>	<b>19</b>
3.1 PŘÍMÉ METODY.....	19
3.2 NEPŘÍMÉ METODY.....	19
<b>4 BAKTERIE LIDSKÉ POKOŽKY.....</b>	<b>21</b>
4.1 STAVBA KŮŽE.....	21
4.2 BAKTERIE VYSKYTUJÍCÍ SE NA KŮŽI.....	22
<b>5 VLIV ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH NA BAKTERIE.....</b>	<b>24</b>
5.1 LEGISLATIVA KOSMETICKÉHO PŘÍPRAVKU.....	24
5.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY, JEJICH CHARAKTERISTIKA A VLASTNOSTI.....	24
5.2.1 Extrakt z grepových jader.....	25
5.2.2 Laktát sodný.....	25
5.2.3 Nisin.....	26
5.2.4 Kyselina jantarová.....	26
5.2.5 Capryloyl glycin.....	26
5.3 KONTAMINAČNÍ CESTY A ZDROJE KONTAMINACE.....	27
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>28</b>
<b>6 MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ.....</b>	<b>29</b>



6.1	POUŽITÉ BAKTERIE.....	29
6.2	ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY .....	29
6.3	ŽIVNÉ MÉDIA.....	29
6.4	POMŮCKY A ZAŘÍZENÍ .....	30
<b>7</b>	<b>METODIKA PRÁCE.....</b>	<b>31</b>
7.1	IDENTIFIKACE BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ.....	31
7.2	VLIV ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK NA RŮST BAKTERIÍ.....	31
7.2.1	Příprava roztoků antimikrobiálních látek.....	31
7.2.2	Příprava mikrotitrační destičky .....	32
7.3	KULTIVAČNÍ METODY PRO STANOVENÍ BIOFILM POZITIVNÍCH BAKTERIÍ .....	33
7.3.1	Průkaz tvorby biofilmu pomocí Christensenovy zkumavkové metody .....	33
7.3.2	Průkaz tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce.....	34
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>35</b>
8.1	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ POMOCÍ MALDI – TOF A SEKVENACE BAZÍ.....	35
8.2	RŮSTOVÉ KŘIVKY PRO SLEDOVANÉ BAKTERIE V EXTRAKTU Z GREPOVÝCH JADER.....	35
8.3	RŮSTOVÉ KŘIVKY PRO SLEDOVANÉ BAKTERIE V LAKTÁTU SODNÉM .....	38
8.4	RŮSTOVÉ KŘIVKY PRO SLEDOVANÉ BAKTERIE V NISINU.....	40
8.5	RŮSTOVÉ KŘIVKY PRO SLEDOVANÉ BAKTERIE V KYSELINĚ JANTAROVÉ .....	42
8.6	RŮSTOVÉ KŘIVKY PRO SLEDOVANÉ BAKTERIE V CAPRYLOYL GLYCINU .....	44
8.7	DETEKCE BIOFILM POZITIVNÍCH BAKTERIÍ.....	45
8.7.1	Christensenova zkumavková metoda.....	46
8.7.2	Metoda mikrotitrační destičky .....	46
8.7.3	Diskuze.....	50
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>52</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>59</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>60</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>61</b>

## ÚVOD

Vztah mezi mikroorganismy a lidskou populací tu existuje již od pradávna, může mít jak pozitivní, tak negativní vliv na člověka. Mezi hlavní benefity pro člověka patří to, že se mikroorganismy podílejí na tvorbě užitečných produktů, jako je pivo, víno nebo sýry. Také mají schopnost vyrábět pohonné hmoty, čistit odpadní látky člověkem vyprodukované a mnoho dalších činností. Avšak jejich stinnou stránkou je napadat lidský organismus, na kterém parazitují, a to může vyústit až ve smrtelnou infekci. (Lear *et al.*, 2008, Melo *et al.*, 1992, Percival *et al.*, 2011)

Obdobně jako člověk, dokáží mikroorganismy tvořit společenství. Toto společenství mikrobiálních buněk se nazývá biofilm. Mikroorganismy tvořící biofilm jsou pevně přichyceny na pevném povrchu nebo sobě navzájem, jsou obaleny extracelulárními látkami, které si sami produkují. (Schindler, 2001) Tyto látky poskytují mikrobiálnímu biofilmu přežít nepříznivé podmínky. (Donlan *et al.*, 2002) Mikroorganismy tvořící biofilm také disponují schopností nepřetržité komunikaci mezi jednotlivými mikrobiálními buňkami, což jim umožňuje adaptaci na vnější prostředí. (Muhsim *et al.*, 2015)

Používání kosmetických přípravků v dnešní době stále roste a uživatelé vyžadují nejen, aby jejich přípravek plnil funkci, kterou jim slibuje na obalu, ale taktéž aby jim nějaký čas vydržel bez možné kontaminace. A právě k tomu slouží látky s antimikrobiálními účinky, které těmto nepříznivým osudům kosmetického přípravku zabraňují. (Paye, 2006)

Mezi antimikrobiální látky se řadí jak přírodní, tak chemicky syntetizované látky. Jedná se o soli kyselin, extrakty z plodů, esenciální oleje, mastné kyseliny a mnoho dalších jiných. Tyto látky mají bakteriostatický až bakteriocidní účinek na mikroorganismy, které proniknou do kosmetického přípravku. (Halla, 2018) A právě těmito účinky se zabývá tato bakalářská práce spolu s tvorbou biofilmu bakteriálních buněk v nepříznivých podmínkách vybraných antimikrobiálních látek.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 CHARAKTERISTIKA BIOFILMU A JEHO VÝSKYT

Biofilm je společenství mikroorganismů, které díky své fenotypové přizpůsobivosti tvoří jednu z nejúspěšnějších forem života na Zemi. Mohou žít volně ve vodném prostředí, jako plankton, nebo v komunitách, které tvoří na pevných površích tenkou vrstvu. (Schindler, 2001)

Tvorba biofilmu je několikastupňový proces, počínaje připojením k povrchu, pak tvorbou mikrokolonií, která vede ke vzniku 3D struktury biofilmu, a nakonec končí dozráváním a následovným oddělením. Během tvorby biofilmu je mnoho druhů bakterií schopno mezi sebou komunikovat prostřednictvím specifického mechanismu, který se nazývá *quorum sensing*. Je to systém stimulů ke koordinaci různých genových expresí. (Donlan *et al.*, 2002, Muhsim *et al.*, 2015)

### 1.1 Definice biofilmu

Biofilm je tvořen seskupením mikrobiálních buněk, které jsou pevně spojeny s povrchem nebo sobě navzájem a jsou uzavřeny v matrici extracelulárních polymerních látek (EPS). Tyto buňky mají přirozenou tendenci se v přírodě lepit a přilnout na pevný povrch. (Schindler, 2001) Biofilmy se mohou tvořit na širokém spektru povrchů, na inertním (sklo, plast) nebo organickém (kůže, sliznice) povrchu. (Donlan *et al.*, 2002, Muhsim *et al.*, 2015)

Mikroorganismy, ať už se jedná o prokaryotické nebo eukaryotické buňky, mají potenciál žít v jednom ze dvou fenotypů: přisedlém nebo planktonickém. Přisedlý fenotyp je výsledkem vazby k povrchu. Planktonický fenotyp je tvořen volně plovoucími mikroorganismy. (Aparma *et al.*, 2008)

Biofilmy nabízejí kromě negativních vlivů, kdy vykazují rezistenci vůči antimikrobiálním látkám (dezinfekční činidla a antibiotika) i řadu fyziologických a ekologických výhod. (Lear *et al.*, 2008)

### 1.2 Struktura biofilmu

Biofilmy jsou heterogenní komunity obsahující mikrokolonie bakteriálních buněk zabalené v matrici EPS, které jsou odděleny od jiných mikrokolonií intersteciálními dutinami neboli vodními kanály. (Šašek, 2009)

Tloušťka biofilmu je závislá na výskytu živin a zda je složen z jednoho či více bakteriálních kmenů. Tloušťka biofilmu je podle naměřených hodnot velmi proměnlivá, může nabývat hodnot až do 100  $\mu\text{m}$ . Také je velmi podstatná pro výskyt aerobních a anaerobních bakterií, kdy na povrchu biofilmu je koncentrace mikroorganismů nízká a směrem do nižší hloubky stoupá a poté zase klesá. Biofilm nese různý elektrický náboj v rozdílných vrstvách, což hraje významnou roli nejen v transportu živin. (Schindler, 2001)

### 1.2.1 Extracelulární polymerní látky (EPS)

Mezi primární složky tvořící biofilmy se řadí mikrobiální buňky a EPS. EPS může zastupovat 50 % až 90 % z celkového množství organických látek v biofilmu se vyskytujících, proto je lze pokládat za základní složku biofilmu. (Donlan *et al.*, 2002)

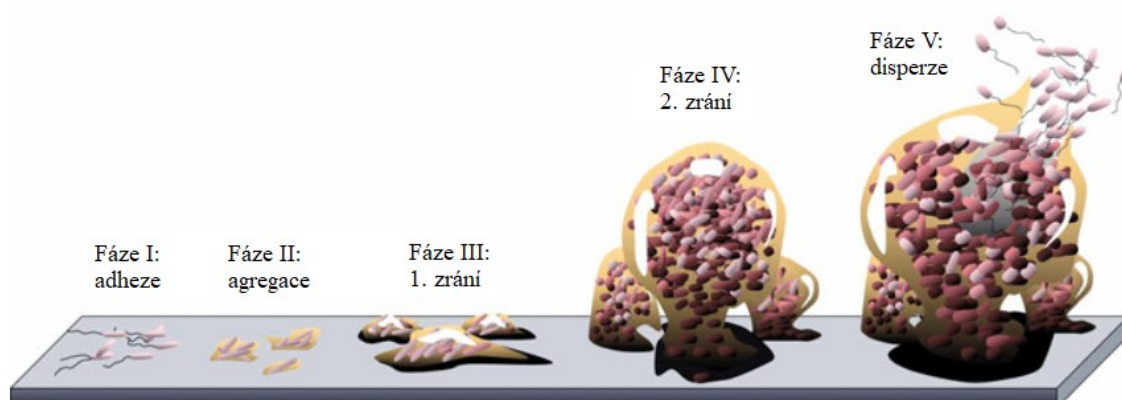
Jedná se o přírodní polymery s vysokou molekulovou hmotností, které jsou produkovány do prostředí mikroorganismy. Tyto polymery určují fyzikální a chemické vlastnosti biofilmu. Jsou složeny převážně z polysacharidů a bílkovin, ale mohou obsahovat i další makromolekuly, jako jsou DNA, RNA, lipidy a humózní látky. (Muhsin *et al.*, 2015) EPS jsou vysoce hydratované, jelikož obsahují velké množství vody, kterou váže ve své struktuře a tím zamezuje vysychání některých přírodních biofilmů. (Donlan *et al.*, 2002) Produkce EPS je ovlivněna stavem živin růstového média, kdy při nadbytku uhlíku a omezení množství dusíku, draslíku a fosfátu dochází k podpoře syntézy EPS. (Donlan *et al.*, 2002)

### 1.2.2 Vodní kanálky

Mezi mikrokoloniemi jsou vodní kanálky, které tvoří primitivní cirkulační systém dodávající živiny, kyslík a řadu dalších látek z vody do mikrokolonií a odvod metabolitů mimo ně. Tento proces je zajištěn cirkulací vody pohybující se v obou směrech. (Šašek, 2009; Muhsin *et al.*, 2015)

## 1.3 Tvorba biofilmu

Biofilmy se postupně formují a to je spojeno s velmi složitým procesem. Tvorba biofilmu je vázaná na expresi specifických genů podílejících se na vzniku biofilmu. Jedná se o nekulturní proces, který začíná navázáním mikrokolonie na povrch, následovaným množením, zráním a později i oddělením zobrazené na Obr. 1. (Muhsin *et al.*, 2015)



Obr. 1 Jednotlivé fáze tvorby biofilmu, upraveno dle Unosson, (2015)

### 1.3.1 Fáze I – připojení (adheze)

V této fázi dochází k reverzibilní adhezi na povrch vyvolané vnějšími signály, která může trvat pouze několik málo sekund, než se aktivuje. Tyto signály doprovází změny v živinách a koncentracích živin, pH, teplotě, koncentraci kyslíku, osmolalitě a výskytu železa. (Donlan *et al.* 2002) Mikrobiální buňky se poté přichytí pomocí aktivních molekul na daný pevný povrch, který poskytuje dostatečné množství živin. Těmto aktivním molekulám se říká adheziny, mohou to být molekuly látek různé povahy – bílkoviny, glykopeptidy nebo polysacharidy. (Schindler, 2001)

Prvotní kontakt mikroorganismu s povrchem je zprostředkován různými mechanismy, mezi které se řadí difúze, pasivní transport vody nebo aktivní pohyb pomocí bičíků. Přilnutí k povrchu je ovlivněno fyzikálním a chemickým působením (elektrostatické síly a van der Waalsovy síly). Velmi důležitou roli zde hraje taktéž povrchový náboj buněk (zeta potenciál) a hydrofobicita povrchu buňky a povrchu, ke kterému adheruje. (Šašek, 2009)

Drsné povrchy jsou náchylnější k tvorbě biofilmu, což je způsobeno snížením třecích sil a zvětšením plochy povrchu. Různé studie naznačují, že biofilmy mají tendenci se tvořit více na hydrofobních materiálech, jako je teflon a jiné plasty než na sklu nebo kovech. (Muhsin *et al.*, 2015)

### 1.3.2 Fáze II – množení (agregace)

Po přilnutí mikrobiálních buněk na povrch se po pár minutách začnou mikroorganismy množit pomocí komunikace přes chemické signály (*quorum sensing*). Jakmile intenzita signálu

přesahuje určitou prahovou úroveň má to za následek produkci EPS, které jsou schopny zachycovat živiny a planktonické bakterie. Během této fáze se tvoří agregáty (mikrokolonie) a je snížena pohyblivost. (Donlan *et al.*, 2002; Muhsin *et al.*, 2015)

### 1.3.3 Fáze III – zrání 1

Po stádiu tvorby mikrokolonií biofilmu probíhá exprese určitých genů, které souvisí se zvýšenou produkcí EPS, tedy hlavním strukturním materiálem biofilmu, a dochází ke zrání biofilmu – tvorbě 3D struktury. (Muhsin *et al.*, 2015) Mikrokolonie se začínají vrstvit a dosahují tloušťky 10  $\mu\text{m}$ . (Donlan *et al.*, 2002)

### 1.3.4 Fáze IV – zrání 2

Biofilm dosáhne své konečné tloušťky, která dosahuje rozměrů okolo 100  $\mu\text{m}$ . (Donlan *et al.*, 2002) Jedná se tedy o konečnou fázi zrání, kdy v tomto společenství je dokončena tvorba důležitých komponent, příkladem jsou vodní kanálky podílející se na přísunu živin a odvedení odpadních látek. (Muhsin *et al.*, 2015)

### 1.3.5 Fáze V – disperze

V průběhu vývoje biofilmu dochází k oddělování jednotlivých buněk nebo celých mikrokolonií, které mohou osídlovat nový povrch. Speciální roli při oddělování buněk z biofilmu hraje enzymatická degradace, která je způsobena snížením koncentrace živin, tedy vyhladověním buněk. (Donlan *et al.*, 2002) Také v důsledku některých mechanických zátěží se bakterie mohou oddělovat od kolonií do vnějšího prostředí. Tyto dispergované buňky z biofilmu mají schopnost zachovat si určité vlastnosti biofilmu, příkladem je citlivost na antibiotika. (Muhsin *et al.*, 2015).

## 1.4 Komunikační formy biofilmu

Blízká vzdálenost buněk uvnitř nebo mezi mikrokoloniemi poskytuje ideální prostředí pro vytváření gradientů živin, výměnu genů a *quorum sensing*. (Donlan *et al.* 2002)

Biofilmy poskytují ideální místo pro výměnu extrachromozomální DNA pomocí plazmidů. Ke konjugaci dochází především mezi buňkami v biofilmech než mezi planktonickými buňkami. (Donlan *et al.*, 2002) Tím mohou bakterie získat například rezistenci vůči antibiotikům. (Miller *et al.*, 2001)

Mechanismus mezibuněčné komunikace, *quorum sensing*, který umožňuje bakteriím vnímat a reagovat na změny v okolí a taktéž ovlivňuje velkou škálu biologických funkcí, jako je například bioluminiscence nebo virulence. (Miller *et al.*, 2001)

Bakterie při svém růstu produkují malé signální molekuly – autoinduktory. Autoinduktory se podílejí na optimální hustotě populace, tzn. při dosažení prahové koncentrace autoinduktorů, dojde k zamezení transkripce genů množících se bakterií. Touto změnou exprese genů se vyvolá zastavení růstu a množení bakterií. (Donlan *et al.*, 2002)

## 1.5 Výskyt a význam biofilmu

Biofilmy se vyskytují v mnoha různých odvětvích průmyslu a medicíně. Mohou mít jak pozitivní, tak negativní význam pro člověka nebo prostředí. (Melo *et al.*, 1992) Mohou se tvořit na široké škále povrchů, včetně přírodních vodních systémů, živých tkání, zdravotnických prostředků a průmyslových systémů (potrubí) pro pitnou vodu. (Percival *et al.*, 2011)

Důležitou roli hraje při degradaci znečišťujících látek v čistírnách odpadních vod v bioreaktorech, kdy v posledních letech patří mezi hlavní a základní procesy úpravy vody. Biofilmy také rády ulpívají na různých površích průmyslových přístrojů (výměník tepla, chladicí věž atd.), kdy mohou záporně ovlivnit provozní náklady tohoto přístroje. V potravinářském průmyslu mohou způsobovat kontaminaci potravin. A v medicíně se tyto mikrobiální biofilmy vytvářejí na zubech, implantátech, kontaktních čočkách a různých protetických pomůckách. Při vytvoření biofilmu tak může docházet k velmi vážným až smrtelným infekcím. (Melo *et al.*, 1992; Percival *et al.*, 2011)

Tvorba biofilmu je také spojována s virulencí, kdy se toto společenství mikroorganismů stává odolnější vůči antibiotikům, imunitním reakcím hostitele a dezinfekčním prostředkům. (Rossie *et al.*, 2018)



## 2 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANISMŮ PŘI TVORBĚ BIOFILMU

Téměř všechny mikroorganismy mají schopnost vytvářet biofilm na širokém spektru povrchů. Právě tvorba biofilmu představuje závažný problém pro veřejné zdraví vzhledem k jeho rezistenci vůči antibiotikům. (Muhsin *et al.*, 2015) Biofilm tvořící bakterie vykazuje zvýšený potenciál nést a neutralizovat antimikrobiální látky, což může vést k delší léčbě. Dochází k zapínání některých genů vedoucích k aktivaci exprese stresových genů, díky kterým se mění fenotyp na rezistentní v důsledku určitých změn, např. hustota buněk, výživa nebo teplota. (Melo *et al.*, 1992) Schopnost tvorby biofilmu byla popsána u velkého počtu bakterií, například *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli* a u dalších grampozitivních a gramnegativních druhů. Bylo také zjištěno, že některé bakterie mohou tvořit biofilm i v lidském těle, příkladem je *Haemophilus influenzae*. (Muhsin *et al.*, 2015)

### 2.1 Biofilm pozitivní bakterie

*Escherichia coli* je gramnegativní bakterie tyčinkovitého tvaru způsobující velké množství nozokomiálních a komunitních infekcí, příkladem může být infekce močových cest. *Escherichia coli* umí vylučovat do vnějšího prostředí různé toxiny, polysacharidy a patří mezi biofilm pozitivní bakterie. Schopnost tvořit biofilm je závislá na vnějších podmínkách, tloušťka biofilmu *Escherichia coli* může dosahovat až stovky mikrometrů. Při léčbě představuje velké potíže, jelikož vykazuje rezistenci k antibiotikům v důsledku přítomnosti EPS. (Muhsin *et al.*, 2015; Larson *et al.*, 2003)

*Pseudomonas aeruginosa* je gramnegativní bakterie, která je součástí lidské mikroflóry kůže. Jedná se o všudypřítomný patogenní organismus, který může být izolován z různých zdrojů, např. z rostlin, zvířat a lidí. Řadí se mezi bakterie tvořící biofilm, ze studií bylo zjištěno, že tento biofilm se podílí na řadě chronických infekcí. Biofilmy *Pseudomonas aeruginosa* jsou vyvinuté komunity jednotlivých buněk, které jsou uzavřeny v extracelulární polysacharidové matici a díky tomu vykazují extrémní odolnost vůči antibiotikům. (Muhsin *et al.*, 2015)

*Staphylococcus aureus* je multirezistentní bakterie způsobující řadu nozokomiálních infekcí. Roste na katétrech a chronických ranách jako biofilm. *Staphylococcus aureus* využívá pro-

teiny pro tvorbu extracelulární matrice v cytoplazmě, tyto proteiny také fungující jako matričové proteiny a umožňují zvýšenou flexibilitu a adaptaci při tvorbě biofilmů v zátěžových stavech, a dokonce mohou podpořit tvorbu biofilmů se smíšenými druhy u chronických ran. (Muhsin *et al.*, 2015) Je to typicky vyskytující se druh kožní bakterie, která se nejčastěji nachází v oblastech nosní dutiny, tedy v dýchacích cestách. Zatímco některé kmeny jsou pro lidský organismus neškodné, některé mohou způsobit vážné zdravotní problémy. *Staphylococcus aureus* se obvykle přenáší fyzickým kontaktem s narušenou částí kůže, nejčastěji k infekční nákaze dochází pobytem v nemocnicích. Bakterie *Staphylococcus aureus* jsou schopny adherovat na povrchy kvůli přítomnosti buněčných adhezních molekul. Mohou přilnout k různým typům povrchů, včetně zdravotnického vybavení. Pokud tyto bakterie vniknou do vnitřního systému těla, způsobí infekci, kde následky této infekce mohou být fatální. (Chiller *et al.*, 2001)

*Staphylococcus epidermidis* je dobře známý jako oportunistický patogen, který má větší potenciál způsobovat infekce u pacientů s oslabeným imunitním systémem. (Muhsin *et al.*, 2015) Tyto bakterie tvoří silnou slizovitou bariéru chránící bakterie před antibiotiky, chemickými látkami a dalšími nebezpečnými látkami, které mohou přilnout k různým povrchům. Jako takový *Staphylococcus epidermidis* obvykle způsobuje infekce spojené s použitím zdravotnických nástrojů. Tato bakterie je také jednou z hlavních příčin infekce krve, která se získává ve zdravotnickém prostředí a tím se stává stále odolnější vůči antibiotikům. (Chiller *et al.*, 2001)

*Enterobacter cloacae* je grampozitivní bakterie způsobující řadu nozokomiálních infekcí u lidí, jako infekce dolních dýchacích cest, endokarditida, intraabdominální infekce, septická artritida, infekce kůže a měkkých tkání, osteomyelitida a oční infekce. *Enterobacter cloacae* je zodpovědná za infekce krevního oběhu, které způsobují bakteriální onemocnění až úmrtí v rozvojových zemích. Také způsobuje infekce spojené s biofilmem, jako jsou infekce močových cest a infekce žlučových cest. Vykazuje také schopnost vnitřní rezistence vůči určitým antibiotikům, jako jsou ampicilin a cefalosporiny s úzkým spektrem. (Chiller *et al.*, 2001)

*Klebsiella pneumoniae* je gramnegativní bakterie, často způsobující nozokomiální infekce, patří do rodu *Klebsiella*. Způsobuje značný podíl nozokomiálních infekcí, jako jsou infekce močových cest, pneumonie, septicémie a infekce měkkých tkání. V jedné studii zaměřené na různé kmeny *Klebsiella pneumoniae* izolovaných z různých lidských vzorků, jako je moč, krevní výtěry z ran, bylo hlášeno, že asi polovina kmenů má schopnost tvořit biofilmy. Také

schopnost *Klebsiella pneumoniae* vytvářet biofilm probíhá úspěšněji ve směsných kmenech než u jednotlivých kmenů. (Muhsin *et al.*, 2015)

*Bacillus subtilis* je grampozitivní bakterii, která není pro člověka zdraví škodlivá. Hojně se vyskytuje v půdě, kde žije v symbióze s kořeny rostlin, kde podporuje jejich růst a chrání ji před škodlivými patogeny. Ochranná funkce kořenů rostlin je zajištěna díky tvorbě biofilmu této bakterie, která je závislá od určitých rostlinných polysacharidů, které dají impulz bakterii pro jeho tvorbu. (Beauregard *et al.*, 2013)

*Stenotrophomonas maltophilia* patří mezi gramnegativní rezistentní oportunistické patogeny, vyskytující se ve vodě, půdě, potravinách, nemocničních prostředích, ale i v řadě lidských orgánů a tkáních. Pro člověka je velmi nebezpečná a způsobuje nozokomiální a komunitní infekce. (Brooke *et al.*, 2012) Právě produkce proteáz a elastáz je spojena se schopností tvorby biofilmu a jeho přilnutí k syntetickým materiálům, *Stenotrophomonas maltophilia* nejčastěji adhezuje k lékařským implantátům a katétrům. Vytvořený biofilm slouží jako ochrana proti imunitní obraně hostitele nebo různým antimikrobiálními látkám. (Nicodemo *et al.*, 2007)

### 3 MOŽNOSTI DETEKCE BIOFILMU

#### 3.1 Přímé metody

Dynamičnost a složitost biofilmu lze pozorovat pomocí optických přístrojů, mikroskopů. Využívá se různých druhů mikroskopie, např. světelná nebo fluorescenční mikroskopie. (Kirmusaoglu *et al.*, 2019)

Světelná mikroskopie patří mezi nejjednodušší a nejrychlejší metody pozorování morfologie přilnutých mikroorganismů k povrchu akrylových fólií, skleněných krycích sklíček a polystyrenových Petriho misek. Pro pozorování pomocí světelné mikroskopie patří mezi důležité parametry transparentní a rovinné povrchy, na které se mikroorganismy připojují. Obraz vytváří 2D projekci biofilmu, pro lepší detekci lze využít i barviv, například fluorescein. Světelná mikroskopie je vhodná na pozorování přisedlé a planktonické formy biofilmu. (Kirmusaoglu *et al.*, 2019)

#### 3.2 Nepřímé metody

Metoda Roll Plate, využívá pro stanovení přítomnosti biofilmu simulaci kontaminace vnějších povrchů válcového tvaru, různé lékařské pomůcky (katétry), vodovodní potrubí a jiné. Mikroorganismy přisedlé na tomto povrchu jsou následně přeneseny na médium. (Kirmusaoglu *et al.*, 2019)

Kvalitativní analýza pro detekci mikrobiálního biofilmu využívající kultivaci na agaru s kongo červení, a to v důsledku změny barvy kolonií inokulovaných na médium s kongo červení vyhodnocených po inkubaci v termostatu po 24 hodinách. Bakterie tvořící biofilm vykazují černé zbarvení kolonií s drsným a suchým povrchem. (Kirmusaoglu *et al.*, 2019; Hassan *et al.*, 2011)

Christensenova zkumavková metoda se taktéž řadí mezi kvalitativní analýzy pro detekci biofilmu. Izolované mikroorganismy jsou o daném zákalu McFarlandovy zákalové stupnice inokulovány do plastové nebo skleněné zkumavky s bujónem s mozkosrdcovou infuzí (BHI) a ponechány po dobu 24 hodin inkubovat při vhodné teplotě. (Kirmusaoglu *et al.*, 2019) Po inkubaci je zkumavka několikrát promyta vodou a následně je biofilm na dně zkumavky fixován etanolem nebo fosfátovým pufrům (PBS) po dobu několika minut. Po zafixování biofilmu dochází k jeho následnému barvení roztokem krystalové violeti nebo safraninu. Barvivo se po několikaminutovém působení vylíje a zkumavka je promyta vodou. Na dně

zkumavky lze pozorovat viditelný barevný film, který indikuje tvorbu biofilmu. (Panda *et al.*, 2016)

Mezi hojně využívanou metodu pro detekci biofilm pozitivní bakterie se využívá Christensenovy metody v jamkách mikrotitrační destičky. Tato metoda se provádí obdobně jako u zkumavkové metody. (Kirmusaoglu *et al.*, 2019) Do jamek je napipetován BHI bujón, do kterého jsou zaočkovány bakterie o daném stupni zákalu McFarlandovy stupnice. Po inokulaci je plastová mikrotitrační destička vložena na jeden den do inkubátoru, poté se jamky vyprázdní a promyjí. Po důsledném promytí jamek přichází na řadu fixace biofilmu vytvořeného na plastovém povrchu jamky etanolem nebo PBS o pH 7,2. Pro detekci biofilmu lze využít barvení, které se může provádět 2 metodami. První metoda využívání k barvení biofilm pozitivní bakterie Grammův roztok č. 1 (roztok krystalové violeti), kdy dochází u mikroorganismů tvořící biofilm k zadržení barviva v jamce. A následně je vizuálně porovnávána tvorba biofilmu s negativní kontrolou. Druhá metoda je založena na principu resolubilizace zadrženého barviva na stěnách a dně mikrotitrační jamky pomocí organického rozpouštědla, např. 96% etanol a následného měření optické denzity resolubilizovaného roztoku barviva při optimální vlnové délce. Biofilm pozitivní bakterie se následně vyhodnotí podle naměřené optické denzity proti negativní kontrole, jejíž hodnota by měla být zásadně vyšší. (Stepanović *et al.*, 2007)

## 4 BAKTERIE LIDSKÉ POKOŽKY

Prvotní styk lidského organismu s bakteriemi začíná ihned po narození a po uplynutí nějaké doby si organismus na toto osídlení zvykne. Na lidské kůži se vyskytuje okolo dvou set druhů bakterií. Zdravá a neporušená lidská kůže slouží jako ochranná bariéra před vniknutím bakterie dovnitř organismu, po vstupu je organismus bráněn buňkami imunitního systému (Langerhasovými buňkami). (Grice *et al.*, 2011)

Bakterie mají svá specifická místa na lidské kůži, které osídlují. Nejvíce se vyskytují v oblastech vlhkých vlhké zapářky, kde se vyskytují různé druhy bakterií. Nejpestřejší bakteriální zastoupení je v oblasti podpaží. Bakterie se zde také účastní rozkládání kožního potu, který provází charakteristický zápach. Na skladbu lidské mikroflóry má vliv i úroveň hygieny a používání kosmetických přípravků. (Grice *et al.*, 2011)

### 4.1 Stavba kůže

Kůže je největší orgán lidského těla s plochou dosahující až 2 m<sup>2</sup>, která představuje sedminu váhy těla. Tvoří ochrannou bariéru mezi vnějším a vnitřním prostředím, před fyzikálními a chemickými vlivy a vniknutím bakterií nebo virů.

Kůže se skládá ze 3 vrstev:

- zevní vrstva kůže – pokožka (*epidermis*),
- střední vrstva kůže – škára (*corium*),
- podkožní vrstva – podkožní vazivo (*subcutis*). (Kittnar, 2011)

Pokožka je tvořena několika vrstvami plochých buněk, které jsou uloženy ve vrstvách těsně nad sebou. Je složena z 5 základní vrstev: vrstvy bazální (*Stratum basale*), vrstvy ostnaté (*Stratum spinosum*), vrstvy zrnité (*Stratum granulosum*), vrstvy jasné (*Stratum lucidum*) a vrstvy rohové (*Stratum corneum*). (Dylevský, 2009)

Epidermis je tvořena z velké části keratinocyty, což jsou buňky neustále dělící se v bazální a ostnaté vrstvě posunující se vertikálně k povrchu, kdy se v rozmezí 21 až 28 dní oddělí v podobě šupinky. Kromě keratinocytů se v kůži vyskytují melanocyty, Langerhasovy a Merkelovy buňky. Epidermis je bezcévná, ale v hlubších vrstvách se vyskytují volná nervová zakončení, která vnímají bolest. (Rocken *et al.*, 2018))

Rozhraní mezi škárrou není ostré, mezi nimi je dermoepidermální spojení, tzn. škára vybíhá do pokožky papilami, a naopak pokožka do škárky čepý. Toto spojení má velký význam pro pevnost a výživu jednotlivých vrstev. (Rocken *et al*, 2018))

Škára je tvořena vazivovými vlákny, rovněž je proložena sítěmi kapilár, které se podílejí na výživě pokožky. Jsou zde přítomny i volná nervová zakončení, specializovaná hmatová tělíska, termoreceptory a mazové žlázy. Škára je složena ze dvou vrstev: vrstvy bradavičnaté (*Stratum papillare*) a vrstvy síťové (*Stratum reticulare*). Mezi základní buňky tvořící škárrou patří fibroblasty, které vytváří důležité látky jako kolagen nebo kyselinu hyaluronovou. (Dylevksý, 2009)

Podkožní vazivo je tvořeno kolagenními a elastickými vlákny, které se podílejí na pevnosti a pružnosti lidské kůže, a vazivovými buňkami. Je považováno za potenciální tukovou tkáň, jelikož je schopno ukládat v buňkách velké množství tukových kapének. (Dylevksý, 2009)

## 4.2 Bakterie vyskytující se na kůži

Na lidské kůži se vyskytuje velké množství bakterií, které ji osídlují. Vzhledem k tomu, že je kůže v neustálém kontaktu s vnějším prostředím, mikroby mají permanentní a snadný přístup k jeho kolonizaci. Bakterie se tedy mohou nacházet na kůži a vlasu, jedná se buď o komenzály (prospěšné pro bakterie a neutrální pro hostitele – nepomáhají ani nepoškozují) nebo mutualisty (prospěšné pro oba organismy v symbióze). Některé kožní bakterie dokonce mohou i chránit před patogenními bakteriemi tím, že vylučují látky, které zabraňují penetraci škodlivým mikrobům dovnitř hostitele. Tyto bakterie mohou vyvolat závažné onemocnění jako infekci krve, meningitidu a další jiné. Ostatní chrání před patogeny tím, že varují buňky imunitního systému a vyvolávají imunitní odpověď. (Grice *et al.*, 2011)

Kožní bakterie se vyznačují typem prostředí, ve kterém jim to nejvíce vyhovuje: mazové nebo mastné oblasti (hlava, krk), oblasti vlhké zapáčky (záhyby loktů, kolen a mezi prsty), a suché oblasti (plochy rukou a nohou). (Fredricks, 2001)

Mezi nejvíce zastoupenými bakteriemi na kůži patří: *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*.

*Propionibacterium acnes* anaerobní grampozitivní bakterie, která je spojována s výskytem akné na lidské pokožce. *Propionibacterium acnes* se převážně vyskytuje na mastných oblastech pokožky a vlasových folikulech. Tyto bakterie přispívají k rozvoji akné, jelikož se množí kvůli nadměrné tvorbě mazu a tím dochází i k ucpaní pórů. *Propionibacterium acnes*

bakterie využívají kožní mazu produkovanou mazovými žlázami jako hlavní složku výživy pro růst. Maz je lipid složený z tuků, cholesterolu a směsi dalších lipidových látek. Je nezbytný pro správné fungování pokožky, protože ji hydratuje a chrání. Abnormální hladiny tvorby kožního mazu přispívají k výskytu akné, protože dochází k ucpání pórů, čímž dojde k přemnožení této bakterie. (Chiller *et al.*, 2001)

Rod *Corynebacterium* patří mezi grampozitivní bakterie, které mají tyčinkovitý tvar buněk. Tento rod zahrnuje patogenní i nepatogenní druhy bakterií. Bakterie *Corynebacterium diphtheriae* produkují toxiny, které způsobují onemocnění záškrť, kdy se jedná o infekční onemocnění postihující především krk a sliznice nosu. Záškrť je závažné onemocnění a v horších případech může způsobit poškození ledvin, srdce a nervového systému. (Chiller *et al.*, 2001)

Grampozitivní bakterie *Streptococcus pyogenes* převážně kolonizuje kůži v oblastech hrdla a osidluje je, aniž by působil nějak škodlivě na hostitele. Nicméně *Streptococcus pyogenes* se může stát patogenní u jedinců s oslabeným imunitním systémem. Tento druh je zodpovědný za řadu onemocnění, které se pohybují od mírných infekcí až po život ohrožující nemoci. Některá z těchto onemocnění zahrnují impetigo, nekrotizující fasciitidu, syndrom toxického šoku, septikémii a akutní revmatickou horečku. (Chiller *et al.*, 2001)



## 5 VLIV ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH NA BAKTERIE

Antimikrobiální látky jsou látky používané pro své dezinfekční vlastnosti, čímž chrání neživé objekty, povrchy, průmyslové technologické procesy, vodu nebo jiné chemické látky před kontaminací mikroorganismy. V podstatě každý kosmetický přípravek obsahuje antimikrobiální látku nebo látky, které se podílejí na udržení čistoty kosmetického přípravku, a tudíž i na prodloužení jejich životnosti. Taktéž chrání uživatele kosmetického přípravku před případným mikrobiálním onemocněním. (Paye *et al*, 2006)

### 5.1 Legislativa kosmetického přípravku

Legislativa kosmetického přípravku spadá pod odpovědné orgány Evropské Unie a je vymezena v Nařízení Evropského Parlamentu a Rady č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích ze dne 30. 11. 2009. V tomto nařízení je přesně definován kosmetický přípravek a látky, jež jsou vhodné pro jeho výrobu, aniž by nějak poškodily uživatele. (Česká republika, 2009)

### 5.2 Antimikrobiální látky, jejich charakteristika a vlastnosti

Antimikrobiální látky jsou tedy chemické sloučeniny používány v kosmetických přípravcích i přípravcích spotřební chemie, které poskytují těmto produktům specifické funkce během jejich používání. (Paye *et al*, 2006)

Kosmetické přípravky, stejně jako jakýkoliv jiný výrobek obsahující vodu, organické a anorganické sloučeniny, vyžaduje ochranu proti mikrobiální kontaminaci, záruku bezpečnosti pro spotřebitele a prodloužení jejich trvanlivosti. Hlavním cílem mikrobiologické bezpečnosti je ochrana spotřebitele před potenciálně patogenními mikroorganismy, spolu s konzervační produktů vyplývající z biologického a fyzikálně chemického poškození. (Halla *et al*, 2018)

Nejběžnější funkce je založena na aplikaci antimikrobiálních činidel, buď použitím syntetických nebo přírodních sloučenin. Tyto antimikrobiální látky mají různé mechanismy působení v závislosti na jejich chemické struktuře a reaktivitě funkčních skupin. Antimikrobiální látky mohou však představovat i negativní účinky pro spotřebitele. Jejich použití při vysokých koncentracích je účinnější z hlediska ochrany, avšak pro spotřebitele je toto množství zdraví škodlivé, zatímco při nízkých koncentracích se může vyvíjet rezistence na mikrobiální látky. (Halla *et al*, 2018)

Tyto látky (antimikrobika), aby mohly být použity v kosmetických přípravcích, musí splňovat řadu vlastností. Hlavní vlastností je antimikrobiální účinek proti mikroorganismům, dále snadná rozpustnost ve vodě nebo v ingrediencích kosmetických přípravků. Antimikrobika nesmí být nebezpečné pro uživatele, tudíž by neměly dráždit povrch, na který jsou aplikovány. Antimikrobika by měly mít pH v neutrálním rozmezí, aby nezměnily pH celého přípravku. Nesmí mít negativní vlastnosti na celkový výrobek, tedy snížit jeho aktivní funkci nebo vzhled výrobku. Důležitou vlastností je i jejich stabilita v širokém rozmezí teplot a pH. (Mitsui, 1997)

### 5.2.1 Extrakt z grepových jader

Jedná se o produkt získaný ze semen a drtě z grapefruitu, který je chemicky velmi rozmanitý. V extraktu jsou přítomné flavonoidy, kyselina askorbová, tokoferoly, kyselina citronová, limonoidy, steroly a také mnoho minerálů. Právě díky těmto látkám se využívá v potravinářském a kosmetickém průmyslu pro silnou antimikrobiální aktivitu. Antibakteriální účinnost, mechanismus účinku a toxicita byla zkoumána *in vitro*. V autorské práci Cvetnić *et al.*, (2004) bylo zjištěno, že extrakt naruší membránu bakteriální buňky, což má za následek uvolnění obsahu cytoplazmy vně buňku do 15 minut jeho působení.

V kosmetických přípravcích se využívá etanolický roztok extraktu. Kromě antibakteriálního účinku je také přidáván do řady přípravků určených pro uživatele s atopickým ekzémem. U těchto produktů se látka podílí na zmírnění následků tohoto onemocnění. (Ulbricht, 2010)

### 5.2.2 Laktát sodný

Neboli sodná sůl kyseliny mléčné je ve vodě rozpustná kapalina hojně využívaná jako přírodní zvlhčovač v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Kromě toho se používá i jako antimikrobiální činidlo, kdy mechanismus účinku laktátu sodného je založen na snížení pH v bakteriální cytoplazmě po permeaci nedisociovaných forem bakteriálními membránami. Vzhledem k tomu, že se jedná o ve vodě rozpustnou sloučeninu, dochází k tomuto procesu velmi rychle v závislosti na pH. (Magrinyá *et al.*, 2015) V kosmetických přípravcích se využívá jako humektant a napomáhá stabilizaci emulzí. Podílí se také na úpravě pH výsledného přípravku v kombinaci s kyselinou mléčnou. (Jungermann a Sonntag, 1991)

### 5.2.3 Nisin

Nisin je amfifilní peptid (3510 Da), který je syntetizován některými bakteriemi mléčného kvašení (rod *Lactococcus*). Řadí se mezi účinné inhibitory grampozitivních bakterií a bylo prokázáno, že se adsorbuje na povrchy, kde následně působí na bakterie bakteriocidně, a to především na skupiny, které se adherovaly *in vitro*. Antimikrobiální účinek nisinu je více-  
stupňový. Nejdříve destabilizuje fosfolipidovou dvojvrstvu buňky a poté vytváří přechodné póry, které zajišťují snadný vstup nisinu dovnitř buňky, (Tai *et al.*, 2008)

Nisin je v této době nejvíce využíván v potravinářském průmyslu jako konzervant. Pro jeho velký potenciál přírodního antimikrobiálního činidla byla zkoumána jeho použitelnost v kosmetických přípravcích s cílem nahradit nebo snížit využívání syntetických antimikrobiálních látek. Ve studii se došlo k závěru, že nisin lze použít jako alternativu syntetických látek v kosmetických přípravcích v kombinaci s jinými přírodními konzervačními látkami. (Mauricio *et al.*, 2017)

### 5.2.4 Kyselina jantarová

Kyselina jantarová je organická dikarboxylová kyselina, která vykazuje nízkou rozpustnost ve vodě. Má mírně nahořklou chuť a v potravinářském průmyslu slouží ke zvýraznění chuti výrobku. Kyselina jantarová ovlivňuje mikrobiální aktivitu dvěma primárními mechanismy, kdy dochází k difúzi nedisociované kyseliny přes mikrobiální membránu v závislosti na pH vnějšího prostředí nebo k difúzi protonizované kyseliny přes membránu, kde dochází k disociaci kyseliny na kyselý ion a volný proton. (Mani-Lopéz *et al.*, 2012)

Použití kyseliny jantarové jako kosmetické přísady je v kosmetickém průmyslu velmi omezené. Ve stanovisku některých vědců vykazuje kyselina jantarová vlastnosti, které mohou být velmi přínosné v kosmetickém průmyslu jako je například antimikrobiální nebo anti-akné účinek. Kyselina jantarová by v budoucnosti mohla nahrazovat antimikrobiální činidla, která jsou méně šetrná k pokožce. (Theunissen a Courbes, 2018)

### 5.2.5 Capryloyl glycin

Capryloyl glycin je polyfunkční přísadou v kosmetických přípravcích pro oplachování a výrobcích spotřební chemie. Jedná se N-acyl- $\alpha$ -aminokyselinu složenou z glycinu a kyseliny kaprylové. V kosmetickém průmyslu je využívána kromě úpravy pokožky a vlasů také jako povrchově aktivní látka s antimikrobiálními vlastnostmi. Navzdory skutečnosti, že capryloyl

glycin inhibuje proliferaci bakterií kožní mikroflóry jako je *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* nebo *Propionibacterium acnes*, je přidáván do produktů pro léčbu akné nebo lupů, není považován za plnohodnotnou antimikrobiální látku. Tento derivát glycinu je však často používán společně s jinými antimikrobiálními činidly k dosažení jejich synergického účinku. (Mangodt *et al.*, 2019)

### 5.3 Kontaminační cesty a zdroje kontaminace

Kosmetické ingredience obsahují širokou škálu látek od povrchově aktivních látek po polymery, UV filtry, antioxidanty aj. Společnost, která kosmetický přípravek vyrábí, je povinna zajistit jeho bezpečnost, nicméně prodávané kosmetické výrobky vždy nejsou zcela sterilní. (Budecka *et al.*, 2014)

Kosmetické přípravky mohou být kontaminovány dvěma cestami. Primární cesta kontaminace je hned u výroby, při použití surovin napadených mikroorganismy nebo nedodržením správných hygienických postupů při jeho výrobě. Mezi sekundární kontaminaci patří také zanesení mikroorganismů do přípravku uživatelem během jeho používání. To však výrobce neovlivní (Paye *et al.*, 2006)

Mikrobiální napadení může nejen změnit fyzikální vlastnosti produktu, jako je barva, chuť, vůně a viskozita, ale také zbavit funkce aktivní složky kosmetického přípravku. (Mitsui *et al.*, 1997) Také metabolity mikroorganismů mohou mít nepříznivý účinek na uživatele v podobě podráždění nebo alergické reakce místa, kdy byl přípravek aplikován. V případě výskytu patogenních mikroorganismů to může mít za následek onemocnění ohrožující lidský život. (Budecka *et al.*, 2014)

Mikroorganismy mohou přežít v prostředí, které splňují jejich fyzikální a chemické požadavky na proliferaci a další vývoj. Mezi nejdůležitější fyzikální požadavky patří vhodná teplota a pH prostředí. Mikroorganismy často vyžadují specifickou vodní aktivitu, dostupné a snadno metabolizovatelné živiny, popřípadě kyslík. Tyto požadavky splňují téměř všechny kosmetické přípravky, jelikož jsou bohaté na vodu a mají pH téměř neutrální. (Budecka *et al.*, 2014)

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ

### 6.1 Použité bakterie

K testování byly využívány kmeny bakterií, které byly vyzolovány ve Výzkumném ústavu mlékárenském v Praze z různých mléčných výrobků. Tyto jednotlivé kmeny byly následně podrobeny testům k jejich identifikaci. K jejich identifikaci bylo využito PCR (Polymerase Chain Reaction) spolu se sekvenací bazí a MALDI – TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization s analyzátozem doby letu Time of Flight).

Bylo identifikováno 6 kmenů bakterií, z toho 4 kmeny byly grampozitivní a 2 kmeny byly gramnegativní.

### 6.2 Antimikrobiální látky

Byly vybrány antimikrobní látky s možným biofilm inhibičním účinkem: extrakt z grepových jader (Ekokoza.cz, ČR); laktát sodný (Ekokoza.cz, Velká Británie); nisin (SigmaAldrich s.r.o., Dánsko); kyselina jantarová (LachNer, Neratovice, ČR) a capryloyl glycin (SigmaAldrich s.r.o., Francie).

### 6.3 Živné média

V experimentální části byl používán bujón mozkosrdcové infúze (BHI; Brain Heart Infusion Broth, HiMedia, Bombai, Indie) a BHI agar (HiMedia, Bombai, Indie).

#### Složení BHI bujónu:

- Výtažek z telecího mozku ..... 7,5 g
- Výtažek z hovězího srdce ..... 10,0 g
- Pepton ..... 10,0 g
- Glukóza ..... 2,0 g
- NaCl ..... 5,0 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 2,5 g
- Destilovaná voda ..... do 1000 ml

**Složení BHI agaru:**

- Výtažek z telecího mozku ..... 7,5 g
- Výtažek z hovězího srdce .....10,0 g
- Pepton .....10,0 g
- Glukóza ..... 2,0 g
- NaCl ..... 5,0 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 2,5 g
- Agar .....12,0 g
- Destilovaná voda..... do 1000 ml

Všechny komponenty byly smíchány s požadovaným množstvím destilované vody a řádně rozmíchány. Následně byly sterilovány v autoklávu 20 minut při 121 °C. Agar byl následně rozlit do Petriho misek a bujón byl dávkován do skleněných zkumavek. Petriho misky s BHI agarem sloužily k uchovávání mikroorganismů.

**6.4 Pomůcky a zařízení**

Na experiment byly použity tyto pomůcky a zařízení:

- automatické pipety (Biohit, Švýcarsko) a špičky;
- Petriho misky;
- mikrotitrační destičky;
- bakteriologické kličky;
- laboratorní sklo: plastové a skleněné zkumavky;
- analytické váhy (KERN, Česká republika);
- denzitometr (Erba Lachema, Česká republika) a vortex IKA MS3 basic (Německo);
- termostat, Flow Box Clean Air;
- Tecan Infinite M200 PRO (Švýcarsko).

## 7 METODIKA PRÁCE

### 7.1 Identifikace bakteriálních kmenů

Bakteriální kmeny byly identifikovány dvěma metodami. První metoda byla založena na izolaci bakteriální DNA, PCR a sekvenaci bazí. Izolace byla provedena podle protokolu k izolačnímu kitu Ultra Clean Microbial DNA (katalogové číslo 12224-50). Izolovaná bakteriální DNA jednotlivých testovaných bakterií byla podrobena PCR a následné sekvenaci bazí. Druhá metoda využívala hmotnostního spektrometru MALDI – TOF, kdy se k identifikaci využila kolonie mikroorganismů, která byla asepticky přenesena na určité místo nosiče, kde byla ošetřena maticí a následně vysušena. Naměřená hmotnostní spektra byla poté porovnána s databází obsahující referenční identifikátory pro jednotlivé kmeny mikroorganismů.

### 7.2 Vliv antimikrobiálních látek na růst bakterií

Růst bakterií byl sledován pomocí růstové křivky po dobu 24 hodin v přítomnosti různých koncentrací zkoumaných látek (extrakt z grepových jader, laktát sodný, nisin, kyselina jantarová a capryloyl glycin).

#### 7.2.1 Příprava roztoků antimikrobiálních látek

Tab. 1. Navážky a objemy pro přípravu výsledných roztoků antimikrobiálních látek

Antimikrobiální látka	Výsledná koncentrace roztoku [g/ml]	Navážka antimikrobiální látky [g]	Objem rozpouštědla
Extrakt z grepových jader	0,0510	1,0198	20 ml 10% etanolu
Laktát sodný	1,500	-	-
Nisin	0,0463	0,2314	5 ml destilované vody
Kyselina jantarová	0,0255	0,5098	20 ml destilované vody
Capryloyl glycin	0,0009	0,0088	10 ml 10% etanolu



V tabulce (Tab. 1) jsou detailně zaznamenány jednotlivé navážky používaných látek, objemy použitých rozpouštědel a výsledné koncentrace připravených roztoků. Laktát sodný byl již zakoupen v podobě roztoku.

### 7.2.2 Příprava mikrotitrační destičky

Do jednotlivých jamek kromě řady A mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  BHI bujónu. Do řady A mikrotitrační destičky byl napipetován požadovaný objem BHI bujónu a antimikrobiální látky dle Tab. 2.

Tab. 2. BHI bujónu a zkoumaná látka v řadě A mikrotitrační destičky

Antimikrobiální látka	Výsledná koncentrace roztoku [mg/ml]	Objem antimikrobiální látky [ $\mu\text{l}$ ]	Objem BHI bujónu [ $\mu\text{l}$ ]
Extrakt z grepových jader	51,0	200	-
Laktát sodný	75,0	10	190
Nisin	23,0	100	100
Kyselina jantarová	26,0	200	-
Capryloyl glycin	0,5	100	100

Na jedné mikrotitrační destičce byl pozorován růst jednoho kmene bakterie ve třech různých antimikrobiálních látkách dle schématického znázornění v tabulce (Tab. 3).

Tab. 3. Schématické znázornění ředění koncentrací pipetovaných látek v jamkách

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	L1	L1	L1	BHI	L2	L2	L2	BHI	L3	L3	L3	BHI
<b>B</b>	L1/2x	L1/2x	L1/2x	BHI	L2/2x	L2/2x	L2/2x	BHI	L3/2x	L3/2x	L3/2x	BHI
<b>C</b>	L1/4x	L1/4x	L1/4x	BHI	L2/4x	L2/4x	L2/4x	BHI	L3/4x	L3/4x	L3/4x	BHI
<b>D</b>	L1/6x	L1/6x	L1/6x	BHI	L2/6x	L2/6x	L2/6x	BHI	L3/6x	L3/6x	L3/6x	BHI
<b>E</b>	L1/8x	L1/8x	L1/8x	BHI	L2/8x	L2/8x	L2/8x	BHI	L3/8x	L3/8x	L3/8x	BHI
<b>F</b>	K	K	K	BHI	K	K	K	BHI	K	K	K	BHI

Pozn.: L1;2;3 – různé antimikrobiální látky, K – kontrola (BHI bujón s mikroorganismem), BHI – čistý bujón, L1/2, 4, 6, 8x – 2, 4, 6, 8krát zředěný roztok.

Ředění roztoků zkoumaných látek bylo prováděno přímo v mikrotitrační destičce, kdy z řady A bylo odpipetováno 100  $\mu\text{l}$  do řady B ve stejném sloupci. Pomocí automatické pipety byl výsledný roztok, který se 2krát zředil, pořádně promíchán. Obdobně se postupovalo v celém sloupci mikrotitrační destičky. Poté byla připravena suspenze jednotlivých kmenů bakterií ve fyziologickém roztoku tak, aby odpovídala hodnotě denzitometru 1,0 McFarlandovy stupnice. Takto připravené suspenze kmenů bakterií byly po 5  $\mu\text{l}$  napipetovány do určených jamek mikrotitrační destičky. Připravená mikrotitrační destička byla vložena do přístroje Tecan Infinite M200 PRO 24 hodin. V jamkách byla pomocí tohoto přístroje měřena změna optické denzity (OD) při vlnové délce 600 nm a teplotě 30 °C v intervalech po 30 minutách. Z naměřených hodnot OD byla poté sestrojena růstová křivka pro jednotlivé koncentrace testovaných látek a bakteriálních kmenů ve vzájemných kombinacích. Optická denzita vynášená do grafu růstových křivek byla vypočítána jako rozdíl hodnoty OD zředěných antimikrobiálních látek s mikroorganismy a OD zředěných látek bez zaočkování bakteriemi.

### **7.3 Kultivační metody pro stanovení biofilm pozitivních bakterií**

Jako nejvhodnější metody pro detekci biofilmu byla vybrána Christensenova zkumavková metoda a metoda v mikrotitrační destičce viz. kapitola 3.2.

#### **7.3.1 Průkaz tvorby biofilmu pomocí Christensenovy zkumavkové metody**

Byly připraveny suspenze zkoumaných kmenů bakterií ve fyziologickém roztoku, aby naměřená hodnota na denzitometru odpovídala hodnotě 1,0 zákalu McFarlandovy stupnice (obdobně jako v kapitole 7.2.2). Do 7 sterilních plastových zkumavek byly napipetovány 2 ml BHI bujónu, 6 zkumavek bylo zaočkováno 100  $\mu\text{l}$  připravených suspenzí testovaných bakteriálních kmenů. Všechny zkumavky byly inkubovány na 24 hodin v termostatu při teplotě 30 °C. Po uplynutí dané doby byl obsah všech zkumavek vylit a zkumavky se 3krát opatrně promyly vodou. Vytvořený biofilm na dně zkumavky byl následně fixován po dobu 20 minut etanolem. Po skončení fixace byl obsah znovu vylit a zkumavky se naplnily 3 ml Gramova roztoku č. 1 (roztok krystalové violeti), který byl po 20 minutách taktéž vylit. Zkumavky byly poté 3krát promyty vodou a po vypaření veškeré vody byla vizuálně pozorována tvorba biofilmu proti negativní kontrole (čistý bujón bez inokulace).

### 7.3.2 Průkaz tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce

K průkazu tvorby biofilmu se využilo práce provedené v kapitole 7.2.2. Z jednotlivých jamek byl opatrně odpipetován veškerý obsah a jamky byly několikrát promyty vodou. Poté byl vytvořený biofilm na stěnách jamek fixován po dobu 20 minut etanolem. Po skončení fixace byly jamky naplněny 150  $\mu$ l Gramova roztoku č. 1, který v jamkách byl ponechán 20 minut. Po uplynutí doby bylo barvivo z jamek odstraněno, jamky se opět několikrát promyly vodou a nechaly se vysušit. Poté byly jednotlivé jamky naplněny 150  $\mu$ l 96% etanolu, který vyluhuje barvivo ze stěn jamek. Intenzita zbarvení výluhu je měřena na přístroji Tecan Infinite M200 PRO při vlnové délce 600 nm.

Z naměřených hodnot byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka optické denzity jamek s čistým bujónem (OD<sub>k</sub>). Následně byla vypočtena hraniční hodnota pro potvrzení pozitivní tvorby biofilmu jako součet trojnásobku směrodatné odchylky jamek s čistým bujónem a OD<sub>k</sub> (OD<sub>h</sub> = OD<sub>k</sub> + směr. odchylky OD<sub>k</sub>). Výsledky měření jsou rozděleny do tří kategorií na základě porovnání naměřených hodnot (OD) proti negativní kontrole vypočtených hodnot optické denzity (OD<sub>h</sub>):

- Kmen netvoří biofilm:  $OD \leq OD_h$
- Kmen slabě tvoří biofilm:  $OD_h < OD \leq 2OD_h$
- Kmen silně tvoří biofilm:  $2OD_h < OD$

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Identifikace bakterií pomocí MALDI – TOF a sekvenace bazí

Všechny bakteriální kmeny byly testovány fenotypově a dále s použitím MALDI -TOF a sekvenace bazí. Byly identifikovány 4 grampozitivní kmeny (*Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* a *Bacillus cereus*) a 2 gramnegativní kmeny bakterií (*Stenotrophomonas maltophilia*). V tabulce (Tab. 4) jsou zaznamenány hodnoty skóre a shoda v procentech s identifikovanými bakteriální kmeny.

Tab. 4. Výsledky z identifikace bakterií pomocí MALDI a sekvenace bazí

Testované bakterie	MALDI skóre [-]	PCR, sekvenace bazí – shoda [%]	Identifikace bakterií
R23	1,432	100	<i>Bacillus tequilensis</i> APBSMLB99
R25	1,531	100	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> DSM 10T DSM
R34	1,490	100	<i>Bacillus pumilus</i> IAM 12050 PAH
R39	1,755	99	<i>Bacillus cereus</i> DSM 21T DSM
GK CIP 1/1	2,437	100	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DSM 50173T BRB
GK CIP 5/1	2,280	100	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (PX) 23086229 MLD

### 8.2 Růstové křivky pro sledované bakterie v extraktu z grepových jader

Na Obr. 3 jsou vyobrazeny jednotlivé růstové křivky pro testované bakteriální kmeny a různé koncentrace extraktu z grepových jader. Z růstových křivek pro bakterii *Bacillus tequilensis* (R23) je patrné, že nejlépe je inhibován růst této bakterie v přítomnosti nejkonzentrovějšího roztoku extraktu z grepových jader, tedy v 51 mg/ml. Inhibice je pozorována i v následující koncentraci, 26 mg/ml, kdy po 15 hodinách je již zaznamenán konec lag fáze. V ostatních koncentracích roztoků nejsou pozorovatelné žádné bakteriostatické účinky, růstové křivky pro koncentrace roztoků z extraktu z grepových jader 13, 7, 4 mg/ml mají totožnou růstovou křivku jako kontrola (bakterie inokulovaná v čistém bujónu).

V případě bakterie *Bacillus subtilis* (R25) je taktéž pozorována nejvyšší inhibiční schopnost u nejvíce koncentrovaného roztoku antimikrobiálního činidla. U 26 mg/ml roztoku je již po 12 hodinách pozorována adaptace bakterie na prostředí a její pomalý růst, jedná se o konec

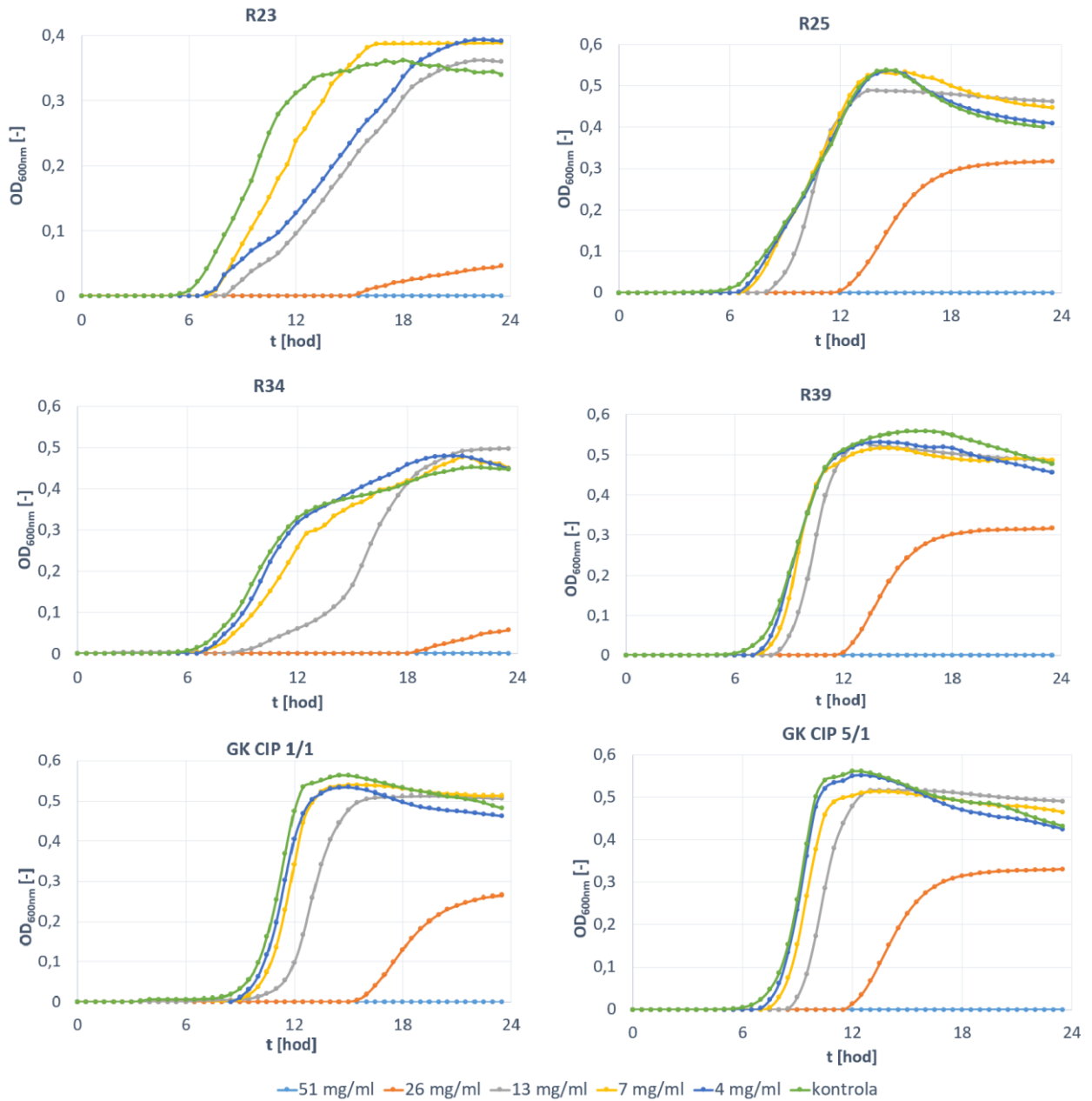
lag fáze. Ostatní koncentrace roztoku na bakterii antimikrobiálně nepůsobí a růstové křivky jsou totožné s kontrolou. Antimikrobiální účinnost extraktu z grepových jader byla také zkoumána kolektivem autorů (von Woedtke *et al.*, 1999) stejně jako obsah konzervačních činidel v šesti komerčně dostupných extraktů. Pět ze šesti testovaných extraktů vykazovalo vysokou inhibiční aktivitu vůči testovaným zárodkům *Bacillus subtilis* SBUG 14, *Micrococcus flavus* SBUG 16, *Staphylococcus aureus* SBUG 11, *Serratia marcescens* SBUG 9, *Escherichia coli* SBUG 17, *Proteus mirabilis* SBUG 47 a *Candida maltosa* SBUG 700. V této studii byla dále zkoumána i přítomnost jiných antimikrobiálních látek ve všech antimikrobiálně aktivních výtažcích z grepových jader. Byl detekován benzethoniumchlorid, triclosan a methylparaben. Pouze v jednom z testovaných extraktů z grepových jader nebylo nalezeno žádné konzervační činidlo. S tímto extraktem však nebyla detekována žádná antimikrobiální aktivita, z toho vyplývá, že univerzální antimikrobiální aktivita, která se přisuzuje extraktu z grepových jader, je způsobena pouze syntetickými konzervačními činidly. V naší studii byla pozorována inhibice u všech testovaných bakteriálních kmenů v přítomnosti koncentrací extraktu z grepových jader 51 mg/ml a 26 mg/ml.

*Bacillus pumilus* (R34) v roztoku o koncentraci 51 mg/ml je inhibován zcela, v 26 mg/ml došlo k pomalému množení bakterií zaznamenané po 18 hodinách, kdy byla ukončena lag fáze bakterie a u roztoku s koncentrací 13 mg/ml je pozorován pomalejší adaptace bakterie na prostředí. Ostatní koncentrace opět nemají žádný bakteriostatický účinek na tuto bakterii.

*Bacillus cereus* (R39) je taktéž inhibován v roztoku extraktu z grepových jader o koncentraci 51 mg/ml, u koncentrace 26 mg/ml bakterie vykazuje vyšší odolnost vůči roztoku, kdy dochází k výraznému množení a růstu bakterií než u bakterií *Bacillus pumilus* nebo *Bacillus tequilensis*. Ostatní koncentrace bakterií neinhibují, jejich růstové křivky jsou totožné s kontrolou. Testováním antimikrobiálních účinků extraktu z grepových jader se taktéž zabýval kolektiv autorů Cvetnić a Vladimir-Knežević (2004), jejichž výsledek byl obdobný tomu našemu. U koncentrace etanolického roztoku extraktu 16,50 % (w/V) byla pozorována byla bakteriostatická účinnost extraktu na testované bakterie *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina flava* a *Escherichia coli*.

Bakterie GK CIP 1/1 a 5/1 jsou rozdílné kmeny stejné bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*, pro oba kmeny je z růstové křivky zřejmý inhibiční účinek u roztoku extraktu z grepových jader o koncentraci 51 mg/ml. Lag fáze je pro GK CIP 1/1 ukončena až po 15 hodinách,

kdy u GK CIP 5/1 je tato fáze ukončena již po 12 hodinách. Inhibice je pozorována i u roztoku o koncentraci 26 mg/ml, ale není již tak vysoká jako u nejkonzentrovanejšího roztoku. Zředěnější roztoky nemají žádný bakteriostatický účinek na tyto kmeny bakterie.



Obr. 2. Růstové křivky kmenů *Bacillus teguilensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia* v přítomnosti extraktu z grepových jader (o koncentracích 51; 26; 13; 7 a 4 mg/ml)

### 8.3 Růstové křivky pro sledované bakterie v laktátu sodném

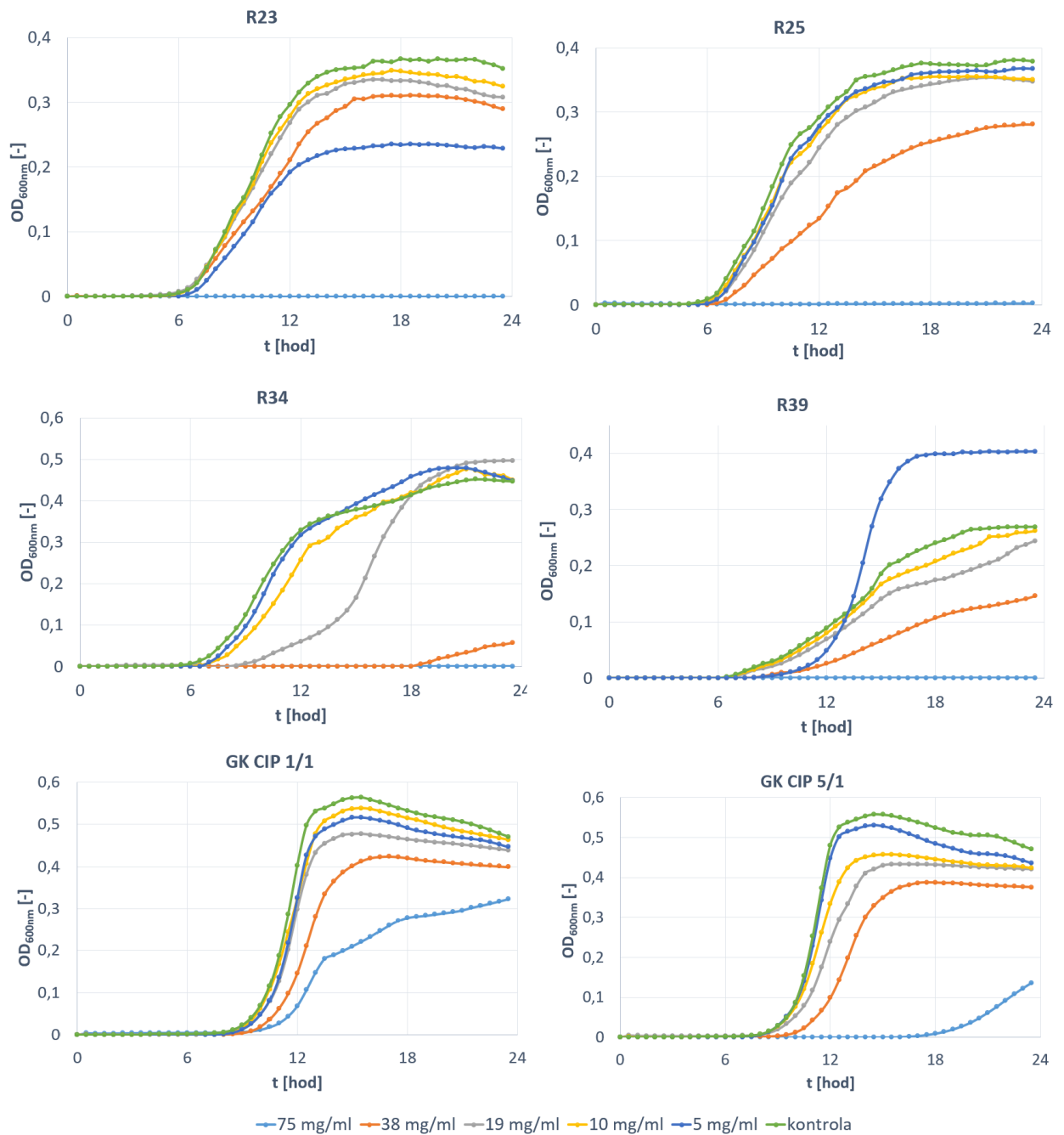
Růstové křivky testovaných bakterií v přítomnosti různě koncentrovaných roztoků laktátu sodného jsou zobrazeny na Obr. 3. Bakterie *Bacillus tequilensis* (R23) je inhibována v roztoku laktátu sodného o koncentraci 75 mg/ml zcela, v ostatních koncentracích je inhibiční schopnost velmi nízká.

U bakterie *Bacillus subtilis* (R25) má nejvyšší bakteriostatickou schopnost nejkonzentrovanejší roztok laktátu sodného, který také inhibuje růst této bakterie zcela. U koncentrace 38 mg/ml je pozorována nižší inhibiční schopnost než u více koncentrovaného roztoku. V ostatních zředěnějších roztocích laktátu sodného již nejsou pozorovány žádné inhibice růstu, růstové křivky jsou totožné s růstovou křivkou kontroly.

Nízká inhibice je zaznamenána u bakterie *Bacillus pumilus* (R34) v koncentraci 75 mg/ml roztoku antimikrobiálního činidla, kdy po 12 hodinách je pozorován pomalý růst bakterií a je ukončena lag fáze. To samé platí i v prostředí 38 mg/ml laktátu sodného. Ostatní zředěnější roztoky nevykazují u bakterie bakteriostatické účinky.

U *Bacillus cereus* (R39) je pozorována inhibice ve všech roztocích laktátu sodného. K úplné inhibici došlo v přítomnosti roztoku o koncentracích 75, 36 a 19 mg/ml, v ostatních roztocích je pozorován inhibiční účinek, ale nízký. U koncentrace 10 mg/ml byla lag fáze prodloužena oproti kontrole o 4 hodiny a o několik málo minut u nejnižší testované koncentrace laktátu sodného.

Nejkonzentrovanejší roztok laktátu vykazuje inhibici u obou kmenů bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*, ale tato inhibiční schopnost není velmi vysoká jako v případech bakterií rodu *Bacillus*. Z obou grafů lze říci, že vyšší odolnost vůči laktátu má bakterie GK CIP 5/1, jejíž lag fáze u koncentrace 75 mg/ml trvala okolo 17 hodin oproti GK CIP 1/1, kde lag fáze byla ukončena po 7 hodinách. Kolektiv autorů (de Witt a Romboust, 1999) zkoumal inhibici laktátu sodného v běžném médiu a v médiu s chloridem sodným. Tento experiment prováděli na různých kmenech bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Escherichia coli* a dalších druzích mikroorganismů). Z jejich studie plyne, že přítomnost chloridu sodného má zásadní vliv na inhibici růstu testovaných bakterií. Laktát sodný spolu s chloridem sodným vykazuje vyšší inhibiční účinky než samotný laktát sodný. Dochází k prodloužení lag fáze u bakterií a ke zpomalení log fáze.



Obr. 3. Růstové křivky kmenů *Bacillus teguilensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia* v přítomnosti laktátu sodného (o koncentracích 75; 38; 19; 10 a 5 mg/ml)

Dle studie Ilhak a kolektivu autorů (2014) má vyšší inhibiční schopnost samotný laktát sodný nežli laktát sodný spolu s thymolem. Testování bylo prováděno na rybích konzervách v koncentracích laktátu sodného (1 a 2% (v/w) roztok) a thymolu (0,1% (w/w) roztoku). Inhibice růstu byla prováděna na bakteriálních kmenech *Listeria monocytogenes* a *Salmonella typhimurium*.



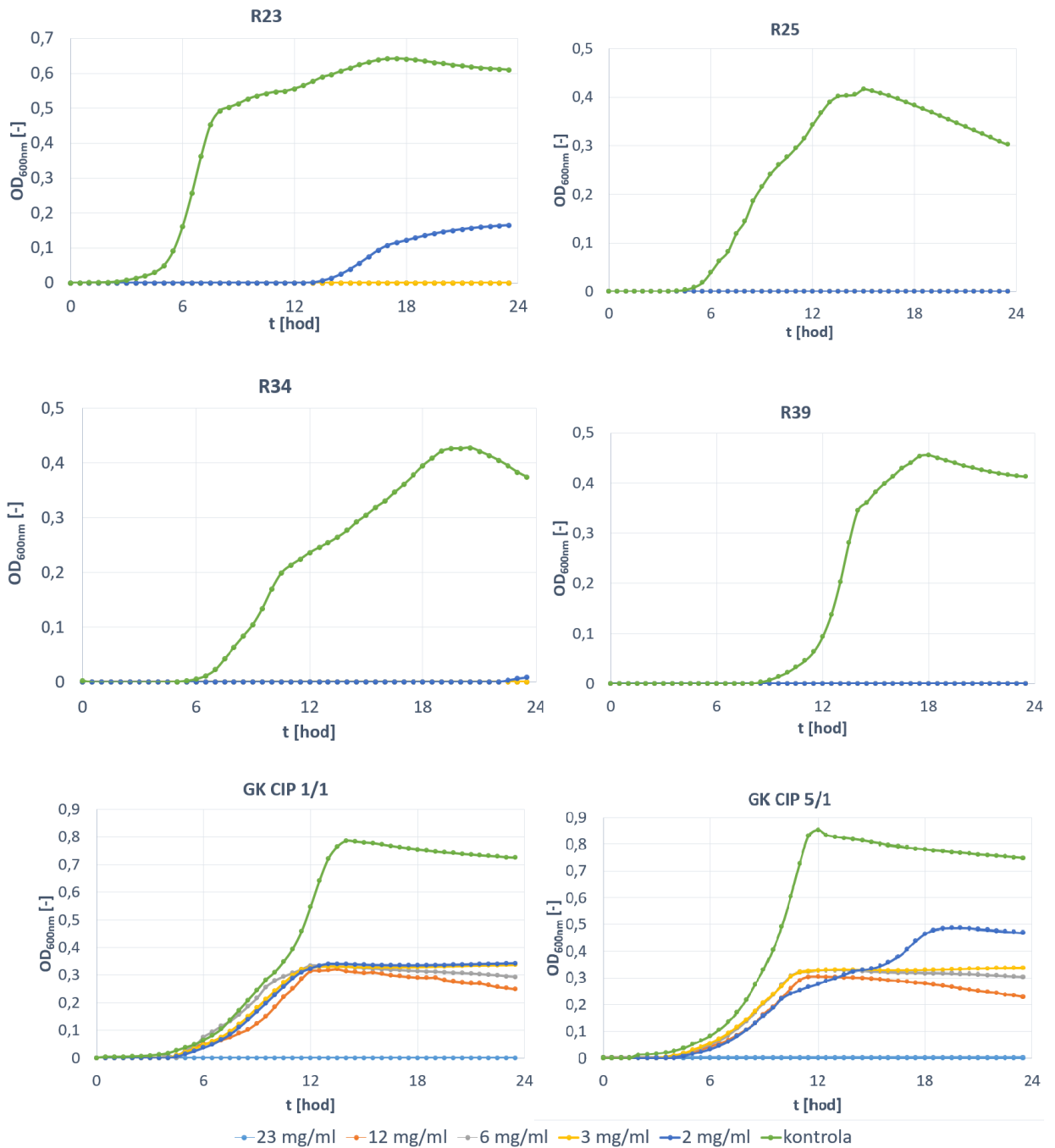
## 8.4 Růstové křivky pro sledované bakterie v nisinu

Na Obr. 4 jsou vyobrazeny růstové křivky zkoumaných bakterií v přítomnosti různých koncentrací nisinu. Zcela je inhibován růst bakterie *Bacillus tequilensis* (R23) v přítomnosti roztoku nisinu o koncentracích 23, 12, 6 a 3 mg/ml. V nejméně koncentrovaném roztoku je taktéž pozorována inhibice růstu, ale je nižší než v ostatních případech, lag fáze trvá 13 hodin, kdy přechází v log fázi růstu.

*Bacillus subtilis* (R25), *Bacillus pumilus* (R39) a *Bacillus cereus* (R39) nevykazují žádnou odolnost vůči žádnému z roztoků nisinu, všechny koncentrace zcela inhibovaly růst těchto bakterií.

U kmenů *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1 a 5/1) je pozorována nejvyšší inhibice růstu pouze v případě roztoku nisinu o koncentraci 23 mg/ml. V ostatních zředěných roztocích je pozorována inhibice taktéž, ale je nižší než v případě nejkonzentrovějšího roztoku nisinu. Ve studii (Rojo-Bezares *et al.*, 2007) popsali synergický vliv nisinu a metasulfidu draselného na růst souboru 64 bakterií mléčného kvašení (23 *Oenococcus*, 29 *Lactobacillus*, 3 *Leuconostoc* a 9 *Pediococcus*), 23 bakterií octového kvašení a 20 izolátů kvasinek. Tento účinek byl pozorován pouze u všech druhů bakterií mléčného kvašení. Významné rozdíly v citlivosti na nisin byly pozorovány mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi a mezi *Oenococcus oeni* a jinými druhy bakterií mléčného kvašení. Z toho vyplývá, že vhodné kombinace nisinu a metasulfidu by mohly kontrolovat růst bakterií znehodnocujících víno a umožnit tak snížení obsahu oxidu siřičitého, který v současné době používá vinařský průmysl.

Synergický účinek více antimikrobiálních látek byl také zkoumán kolektivem autorů (Bhatia a Bharti, 2014), kdy byly tyto látky (nisin, lysozym, EDTA) testovány v různých koncentracích na mikroorganismy. Z výzkumu vyplynulo, že populace buněk ošetřených antimikrobiálními činidly zůstala významně nižší než kontrola během 72 hodin v kapalně inkubační metodě. Tato antimikrobiální činidla měla přechodný baktericidní účinek pro krátké inkubační doby, avšak inhibice růstu nebyla pozorována během delší inkubační doby.



Obr. 4. Růstové křivky kmenů *Bacillus teguilensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia* v přítomnosti nisinu (o koncentracích 23; 12; 6; 3 a 2 mg/ml)

## 8.5 Růstové křivky pro sledované bakterie v kyselině jantarové

Na Obr. 5. jsou zobrazeny růstové křivky testovaných bakterií přítomných v různě koncentrovaných roztocích kyseliny jantarové. *Bacillus tequilensis* (R23) v prostředí roztoku kyseliny jantarové o koncentracích 26, 13 a 7 mg/ml vykazoval zcela inhibici růstu. Ve zředěnějším roztoku (4 mg/ml) byl prokázán velmi nízký inhibiční účinek a lag fáze byla prodloužena oproti kontrole o 2 hodiny. V nejzředěnějším roztoku nebyla zaznamenána žádná inhibice. Růstová křivka byla téměř totožná s kontrolou růstu sledovaných bakterií.

Bakterie *Bacillus subtilis* (R25) byla úplně inhibována v roztoku kyseliny jantarové o koncentracích 26 a 13 mg/ml. V koncentraci 7 mg/ml byl po 15 hodinách pozorován pomalý růst bakterií, došlo k ukončení lag fáze. Nízká inhibice byla prokázána i u koncentrace roztoku kyseliny jantarové 4 mg/ml. Bakterie v přítomnosti nejvíce zředěného roztoku kyseliny jantarové nevykazovala již žádnou inhibici růstu.

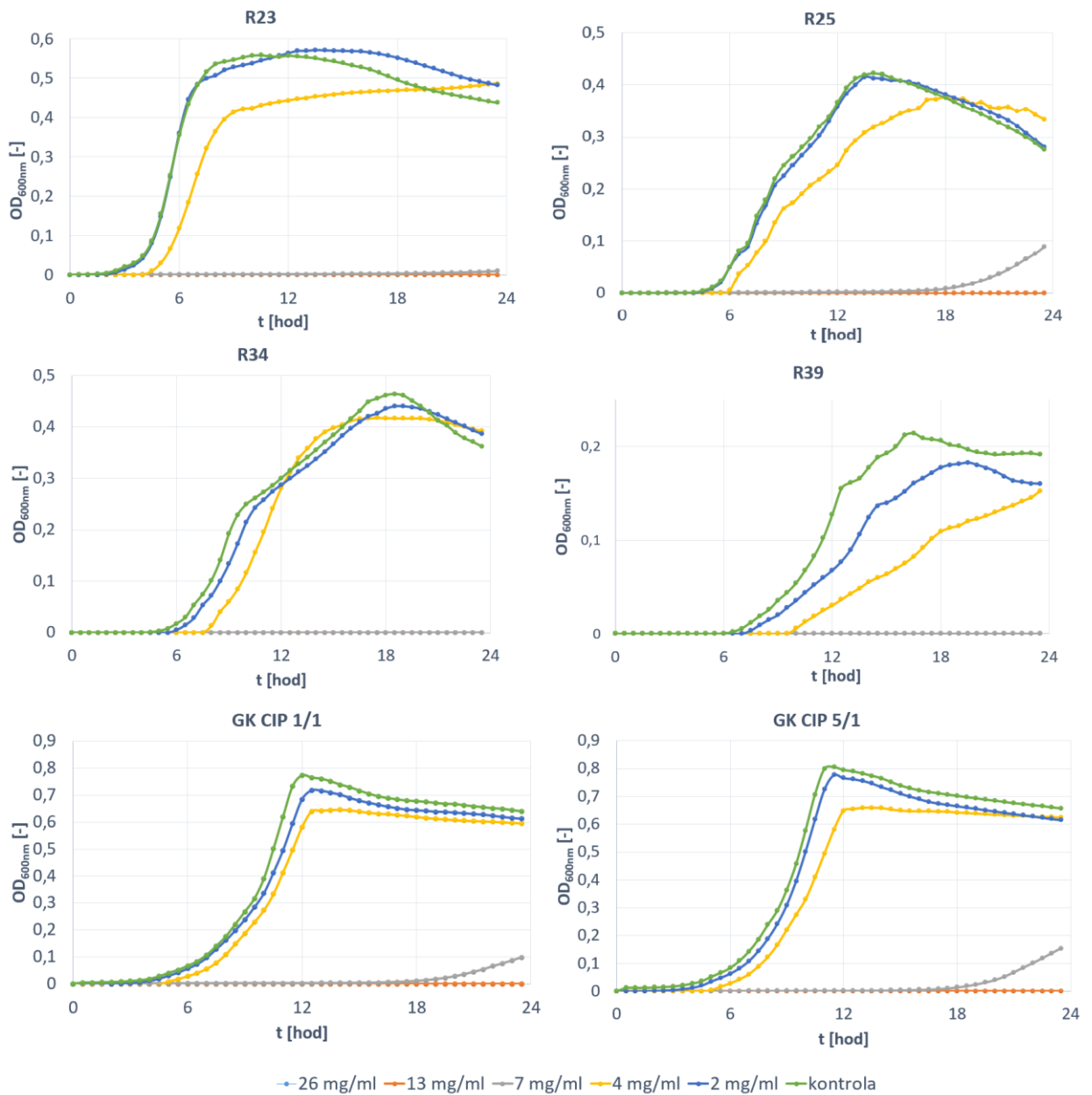
Bakterie *Bacillus pumilus* (R34) byla taktéž zcela inhibována při koncentracích kyseliny jantarové 26, 13 a 7 mg/ml. Ostatní zředěnější roztoky nepůsobily na tuto bakterii bakteriostaticky, jak je zřejmé z Obr. 6.

U *Bacillus cereus* (R39) byla prokázána úplná inhibice v roztocích kyseliny jantarové o koncentracích 26, 13 a 7 mg/ml jako u *Bacillus tequilensis* a *Bacillus pumilus*. Ostatní koncentrace taktéž vykazovaly bakteriostatické účinky, ale nižší než u koncentrovanějších roztoků. Čím více byl roztok zředěn, tím nižší inhibiční účinek měl na bakterii.

Kmeny *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1, 5/1) měly úplnou inhibici růstu v prostředí 26 a 13 mg/ml kyseliny jantarové. V přítomnosti roztoku 7 mg/ml byl po 15 hodinách zaznamenán pomalé množení bakterií a ukončení lag fáze, kdy se bakterie adaptují na nové prostředí. Roztoky o koncentraci 4 a 2 mg/ml nepůsobily na tyto kmeny bakteriostaticky.

Kyselina jantarová byla testována ve studii kolektivu autorů (Rotstein *et al.*, 1985) zaměřené na virulenci zejména *Bacteroides* spp., tyto bakterie jsou přítomné ve smíšených intraabdominálních infekcích, avšak jejich kritický význam v patogenitě těchto infekcí není jasně definován. Kyselina jantarová, hlavní vedlejší produkt metabolismu mastných kyselin, byla testována na baktericidní a bakteriostatický účinek na funkci neutrofilů, aby určila, zda by mohla hrát roli při zvyšování virulence infekcí obsahujících bakterie. Z výsledků plyne, že při pH 5,5 kyselina jantarová v koncentracích běžně vyskytujících se, hluboce inhibuje *in vitro* funkci neutrofilů a zabraňuje zabíjení *Escherichia coli* ve střevní mikroflóře. Kyselina

jantarová tedy může hrát významnou roli při parazitování bakterie *Bacterioides* ve střevní mikroflóře, ve které jsou koncentrace přítomných látek vysoké a pH nízké.



Obr. 5. Růstové křivky kmenů *Bacillus teguilensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia* v přítomnosti kyseliny jantarové (o koncentracích 26; 13; 7; 4 a 2 mg/ml)

## 8.6 Růstové křivky pro sledované bakterie v capryloyl glycinu

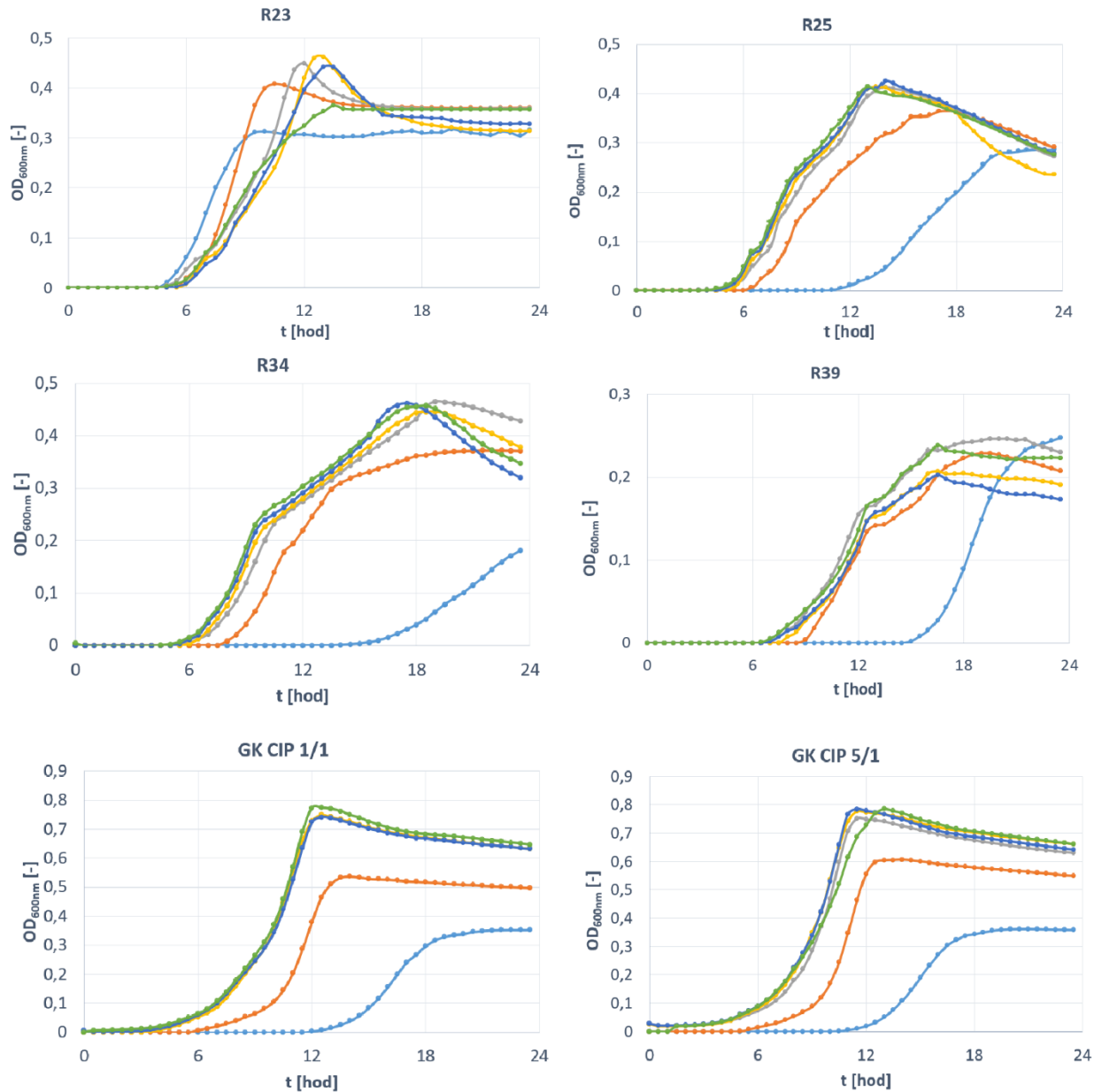
Na Obr. 6 jsou zobrazeny opět růstové křivky testovaných bakterií v prostředí různých koncentrací roztoku capryloyl glycinu. U bakterie *Bacillus tequilensis* (R23) nebyla zaznamenána žádná inhibice růstu v přítomnosti zředěných roztoků capryloyl glycinu. *Bacillus tequilensis* vykazoval vysokou odolnost vůči této antimikrobiální látce.

*Bacillus subtilis* (R25) byl velmi nízkou inhibován v přítomnosti nejvíce koncentrovaného roztoku, v roztoku capryloyl glycinu o koncentraci 0,50 mg/ml, kdy lag fáze byla prodloužena oproti kontrole o 5 hodin. Bakteriostatické účinky byly také pozorovány u koncentraci 0,25 mg/ml, kdy lag fáze byla opět prodloužena, asi o 1 hodinu. V ostatních případech tyto roztoky na bakterii nepůsobily antimikrobiálně.

Nejkonzentrovanejší roztok vykazoval u *Bacillus pumilus* (R34) nejvyšší inhibiční účinek ze všech testovaných gram pozitivních bakterií. Nízkou inhibici vykazoval i roztok o koncentraci 0,25 mg/ml, kdy lag fáze bakterie trvala 15 hodin. Následující zředěnější roztoky neměly žádný vliv na růst a množení bakterií.

*Bacillus cereus* (R39) byl inhibován pouze v prostředí koncentrace 0,50 mg/ml roztoku capryloyl glycinu, lag fáze byla oproti kontrole prodloužena o 7 hodin. V nižších koncentracích docházelo k růstu bakteriálních buněk obdobně jako v přítomnosti čistého bujónu.

Růst buněk u kmenů *Stenotrophomonas maltophilila* (GK CIP 1/1, 5/1) byl inhibován v prostředí roztoku capryloyl glycinu o koncentracích 0,50 a 0,25 mg/ml. Zředěnější roztoky capryloyl glycinu neměly žádný bakteriostatický účinek. Ve studii Mangodt a kolektivu autorů (2019) je capryloyl glycin popsán jako nejúčinnější v minimální koncentraci 5 % (w/v) z celkového obsahu kosmetického přípravku bakteriostaticky vůči bakteriálním kmenům *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* a *Pityrosporum ovale*. Tyto bakterie se řadí mezi bakterie osídlující lidskou pokožku a způsobují řadu nemocí jako je akné. I přes své inhibiční účinky není capryloyl glycin považován za plnohodnotné antimikrobiální činidlo. (Mangodt *et al.*, 2019) V naší práci byly použity nižší koncentrace capryloyl glycinu, i přesto byla zaznamenána inhibiční schopnost této antimikrobiální látky.

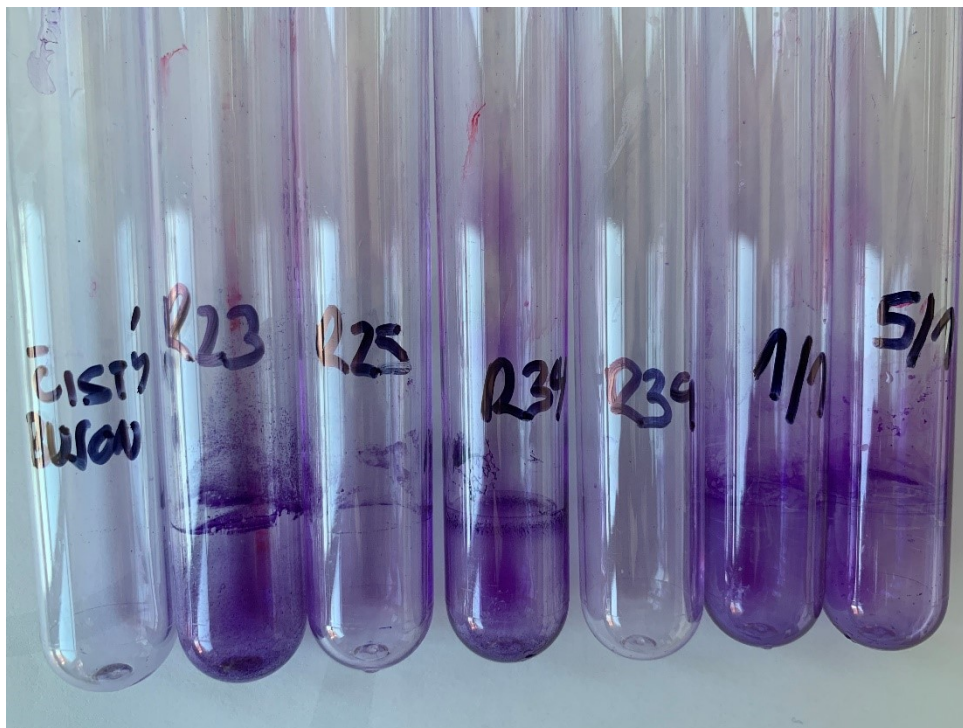


Obr. 6. Růstové křivky kmenů *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia* v přítomnosti capryloyl glycinu (o koncentracích 0,50; 0,25; 0,12; 0,06 a 0,03 mg/ml)

## 8.7 Detekce biofilm pozitivních bakterií

Pomocí dvou metod byla stanovována detekce biofilm tvořících bakterií. První metoda detekovala bakterie tvořící biofilm v čistém bujónu pomocí vizuálního stanovení. Druhá metoda využívala spektrofotometrického stanovení bakterií přítomných v různých roztocích antimikrobiálních látek.

### 8.7.1 Christensenova zkumavková metoda



Obr. 8. Vizuální vyhodnocení zkumavkové metody

Pomocí Christensenovy zkumavkové metody byly určeny vizuálně bakterie tvořící biofilm v prostředí BHI bujónu. Z Obr. 8. lze přesně určit, které bakterie biofilm tvoří a které nikoliv. Při srovnání zkumavek s bakteriemi a s negativní kontrolou (čistý bujón) byly bakterie *Bacillus tequilensis* (R25), *Bacillus pumilus* (R34) a oba kmeny *Stenotrophomonas maltophilila* (1/1, 5/1) vyhodnoceny jako bakterie silně tvořící biofilm. Bakterie *Bacillus subtilis* (R25) patří taktéž mezi biofilm pozitivní bakterie, ale jen slabě tvořící biofilm. A bakterie *Bacillus cereus* (R39) byla vyhodnocena jako biofilm negativní bakterie.

### 8.7.2 Metoda mikrotitrační destičky

V níže položených tabulkách jsou zaznamenány průměrné hodnoty optické denzity testovaných bakterií inokulovaných v různém prostředí antimikrobiálních látek.

Tab. 5. Tvorba biofilmu testovaných bakterií kultivovaných v čistém bujónu

OD <sub>600nm</sub>	R23	R25	R34	R39	GK CIP 1/1	GK CIP 5/1
Bakterie	0,31	0,29	0,61	0,25	0,66	0,52
ODh	0,26					
2ODh	0,51					

Pozn.:     – netvoří biofilm,     – tvoří slabě biofilm,     – tvoří silně biofilm.

V Tab. 4 jsou zaznamenány průměrné hodnoty OD testovaných bakterií v čistém bujónu a hodnoty kritérií určující biofilm pozitivní a biofilm negativní bakterie. Z naměřených hodnot byla přítomnost tvorby silného biofilmu zjištěna u bakterií *Bacillus pumilus* (R39) a obou kmenů *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1, 5/1). Bakterie *Bacillus tequilensis* (R23) a *Bacillus subtilis* (R25) tvoří biofilm slabě a bakterie *Bacillus cereus* (R39) byla vyhodnocena jako bakterie netvořící biofilm.

Tab. 6. Tvorba biofilmu testovaných bakterií v extraktu z grepových jader

OD <sub>600nm</sub>	R23	R25	R34	R39	GK CIP 1/1	GK CIP 5/1
51 mg/ml	0,16	0,21	0,15	0,23	0,24	0,26
26 mg/ml	0,24	0,21	0,28	0,22	0,81	0,55
13 mg/ml	0,31	0,23	0,67	0,28	1,45	0,57
7 mg/ml	0,64	0,21	0,93	0,30	1,66	0,64
4 mg/ml	0,72	0,21	0,99	0,31	1,52	0,66
ODh	0,18	0,27	0,17	0,27	0,30	0,27
2ODh	0,36	0,54	0,35	0,54	0,60	0,54

Pozn.:     – netvoří biofilm,     – tvoří slabě biofilm,     – tvoří silně biofilm.

Dále byla experimentálně analyzována tvorba biofilmu v přítomnosti různě zředěných roztoků extraktu z grepových jader, která je podrobně zaznamenána v Tab. 5. V nejkonzentrovějším roztoku extraktu nebyla zaznamenána tvorba biofilmu u žádné z testovaných bakterií. U obou kmenů *Stenotrophomonas maltophilia* byla zaznamenána silná tvorba biofilmu u roztoku z grepových jader o koncentracích 26, 13, 7 a 4 mg/ml. Silná tvorba biofilmu byla experimentálně změřena i u bakterií *Bacillus tequilensis* (R23) a *Bacillus pumilus* (R34) v prostředí nejvíce zředěných roztoků. Bakterie *Bacillus subtilis* (R23) nevykazovala žádnou tvorbu biofilmu ani v jednom z koncentrovaných roztoků, u *Bacillus cereus* (R39) byla zaznamenána slabá tvorba biofilmu ve zředěnějších roztocích.



Tab. 7. Tvorba biofilmu testovaných bakterií v laktátu sodném

OD <sub>600nm</sub>	R23	R25	R34	R39	GK CIP 1/1	GK CIP 5/1
75 mg/ml	0,17	0,17	0,15	0,12	0,25	0,28
38 mg/ml	0,34	0,22	0,34	0,15	0,18	0,56
19 mg/ml	0,34	0,19	0,95	0,19	0,33	1,02
10 mg/ml	0,57	0,41	1,19	0,24	1,68	1,35
5 mg/ml	0,51	0,67	1,14	0,29	0,87	1,33
OD <sub>h</sub>	0,18	0,18	0,17	0,17	0,30	0,30
2OD <sub>h</sub>	0,36	0,36	0,35	0,34	0,60	0,60

Pozn.:     – netvoří biofilm,     – tvoří slabě biofilm,     – tvoří silně biofilm.

V Tab. 6 jsou podrobně zaznamenána data z experimentálního měření OD testovaných bakterií přítomných v prostředí různých roztoků laktátu sodného. Z tabulky lze vyčíst, že skoro všechny bakterie tvoří v koncentracích 10 a 5 mg/ml roztoku laktátu sodného silný biofilm. V nejvíce koncentrovanějším roztoku nebyla detekována žádná tvorba biofilmu. Slabá tvorba biofilmu byla také potvrzena u bakterií *Bacillus tequilensis* (R23), *Bacillus subtilis* (R25), *Bacillus pumilus* (R34) a *Stenotrophomonas maltophilina* (GK CIP 5/1) inokulovaných v roztoku laktátu 38 mg/ml. Bakterie *Bacillus cereus* (R39) jako jediná netvořila silný biofilm v přítomnosti testovaných koncentrací laktátu sodného.

Tab. 8. Tvorba biofilmu testovaných bakterií v nisinu

OD <sub>600nm</sub>	R23	R25	R34	R39	GK CIP 1/1	GK CIP 5/1
23 mg/ml	0,22	0,12	0,18	0,64	0,39	0,64
12 mg/ml	0,30	0,20	0,21	0,59	0,69	1,25
6 mg/ml	0,29	0,19	0,18	0,49	0,71	1,58
3 mg/ml	0,28	0,18	0,19	0,57	0,77	1,83
2 mg/ml	0,62	0,27	0,19	0,56	0,83	1,83
OD <sub>h</sub>	0,31	0,18	0,15	0,86	0,46	0,67
2OD <sub>h</sub>	0,63	0,37	0,31	1,71	0,82	1,35

Pozn.:     – netvoří biofilm,     – tvoří slabě biofilm,     – tvoří silně biofilm.

V Tab. 8 jsou zaznamenány výsledky měření OD a určení tvorby biofilmu testovaných bakterií v prostředí nisinu. Z tabulky lze vyčíst, že tvorba biofilmu nebyla prokázána u bakterie *Bacillus cereus* (R39) ani v jedné z 5 koncentrací. Tvorba silného biofilmu byla experimentálně zjištěna u 2 kmenů bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*, v případě GK CIP 5/1 byla silná tvorba biofilmu potvrzena již u koncentrace 6 mg/ml, u GK CIP 1/1 až u koncentrace

2 mg/ml roztoku nisinu. Bakterie *Bacillus pumilus* (R34) ve všech testovaných koncentracích tvořila slabě biofilm. Slabá tvorba biofilmu byla taktéž experimentálně změřena u bakterií *Bacillus tequilensis* (R23) a *Bacillus subtilis* (R25) v přítomnosti nižších koncentrací.

Tab. 9. Tvorba biofilmu testovaných bakterií v kyselině jantarové

OD <sub>600nm</sub>	R23	R25	R34	R39	GK CIP 1/1	GK CIP 5/1
26 mg/ml	0,26	0,16	0,15	0,73	0,45	1,12
13 mg/ml	0,29	0,19	0,15	0,62	0,32	1,19
7 mg/ml	0,21	0,21	0,18	0,50	0,36	1,23
4 mg/ml	0,37	0,31	0,18	0,57	0,53	1,23
2 mg/ml	0,34	0,34	0,16	0,53	0,50	1,20
OD <sub>h</sub>	0,31	0,18	0,15	0,86	0,46	0,67
2OD <sub>h</sub>	0,63	0,37	0,31	1,71	0,82	1,35

Pozn.: aaa – netvoří biofilm, aaa – tvoří slabě biofilm, aaa – tvoří silně biofilm.

V Tab. 9 jsou zaznamenány průměrné hodnoty OD při vlnové délce 600 nm kvůli potvrzení přítomnosti tvorby biofilmu testovaných bakterií zaočkovaných do různých koncentrací roztoku kyseliny jantarové. Ani u jedné z bakterií nebyla potvrzena silná tvorba biofilmu. U bakterie *Bacillus cereus* (R39) nebyla detekována žádná tvorba biofilmu. U všech testovaných koncentrací kyseliny jantarové byla u bakterie *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) potvrzena slabá tvorba biofilmu. Další testované bakterie byly taktéž slabě biofilm pozitivní, ale v přítomnosti zředěnějších roztoků kyseliny jantarové.

Tab. 10. Tvorba biofilmu testovaných bakterií capryloyl glycinu

OD <sub>600nm</sub>	R23	R25	R34	R39	GK CIP 1/1	GK CIP 5/1
0,50 mg/ml	0,42	0,32	0,14	0,723	0,78	0,99
0,25 mg/ml	0,34	0,34	0,15	0,77	0,77	1,16
0,12 mg/ml	0,36	0,32	0,18	0,61	0,84	1,16
0,06 mg/ml	0,37	0,30	0,20	0,62	0,83	1,03
0,03 mg/ml	0,32	0,36	0,17	0,59	0,97	1,30
OD <sub>h</sub>	0,31	0,18	0,15	0,86	0,46	0,67
2OD <sub>h</sub>	0,63	0,37	0,31	1,71	0,82	1,34

Pozn.: aaa – netvoří biofilm, aaa – tvoří slabě biofilm, aaa – tvoří silně biofilm.

Biofilm pozitivní a biofilm negativní bakterie v prostředí koncentrovaných roztoků capryloyl glycinu jsou přehledně zaznamenány v Tab. 10. U *Bacillus cereus* (R39) nebyla detekována žádná tvorba biofilmu. U *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) byla naopak ve všech

případech potvrzena silná tvorba biofilmu. Taktéž u druhého kmene *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) byla potvrzena silná tvorba biofilmu u koncentrací 0,12; 0,06 a 0,03 mg/ml capryloyl glycinu. Slabá tvorba byla zaznamenána u bakterií *Bacillus tequilensis* (R23), *Bacillus subtilis* (R25) a *Bacillus pumilus* (R34).

### 8.7.3 Diskuze

Z dostupné literatury vyplývá, že testované antimikrobiální látky nebyly na produkci biofilmu doposud zkoumány. Ve studiích zabývajících se biofilmem byly testovány jednotlivé metody na detekci biofilmu bakteriálních kmenů v čistém médiu. Testování biofilmu bylo prováděno Hassan *et al.*, (2011) pomocí metod mikrotitrační destičky, kultivaci na agaru s kongo červení na celkem 110 klinických izolátů. Izoláty byly vybrány podle následujících kritéria: izoláty z hnisu, intravenózních a močových hrotů katétrů, vzorků moči a bakterie vykazující zvýšenou odolnost vůči běžně dostupným antibiotikům metodou Kirby-Bauerovy diskové difúze. Vzorky byly izolovány ze zdravotnických přístrojů nebo přímo od pacientů. Izolováno bylo několik kmenů *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*. Kdy výše zmíněné bakterie kromě bakterie *Staphylococcus* byly detekovány jako bakterie silně tvořící biofilm, na rozdíl od *Staphylococcus aureus*, který středně tvoří biofilm. Ke stejnému závěru došli ve studii autoři Devaraj a G. Sajjan (2015), kdy kromě bakterií ze studie Hassan *et al.*, (2011) taktéž sledovaly tvorbu biofilmu u bakteriálních kmenů *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Citrobacter spp.*, kromě posouzení, zdali se jedná o biofilm pozitivní nebo negativní bakterie, taktéž srovnávaly jednotlivé metody používané pro detekci biofilmu.

## ZÁVĚR

Antimikrobiální látky jsou nedílnou součástí kosmetických přípravků, slouží k jeho prevenci před možnou kontaminací, která může nastat již při výrobě nebo samotném používání spotřebitele a podílejí se i na prodloužení životnosti tohoto přípravku.

V naší studii byla zkoumána antimikrobiální účinnost vybraných látek používaných v kosmetických přípravcích. Testované byly látky: extrakt z grepových jader, laktát sodný, nisin, kyselina jantarová a capryloyl glycin. Bakterie, na kterých se provádělo testování, byly vyizolovány z různých sýrů ve Výzkumném ústavu mlékárenském v Praze. Tyto bakterie byly nejdříve identifikovány pomocí sekvenace bazí a MALDI – TOF a dále byly podrobeny detekci na tvorbu biofilmu. Identifikovány byly tyto bakteriální kmeny: *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus* a *Stenotrophomonas maltophilia*.

Na základě experimentálně zjištěných výsledků se došlo k těmto závěrům:

- nejvyšší inhibiční schopnost vykazoval nisin, který zcela inhiboval růst u vybraných gramozitivních bakterií i v nízkých koncentracích (23, 12, 6, 3 a 2 mg/ml);
- laktát sodný vykazoval nejnižší bakteristickou schopnost ve vysokých koncentracích (75 mg/ml);
- i při nízké koncentraci (0,5 mg/ml) vykazovala látka capryloyl glycin inhibiční účinky vůči testovaným látkám;
- u obou testovaných kmenů *Stenotrophomonas maltophilia* byla detekována silná tvorba biofilmu v čistém bujónu i nízkých koncentracích testovaných látek;
- tvorba biofilmu u bakterií zvýšila jejich rezistenci vůči silným koncentracím antimikrobiálních látek, příkladem jsou bakterie *Bacillus pumilus* a *Stenotrophomonas maltophilia*;
- gramnegativní bakterie (*Stenotrophomonas maltophilia*) vykazovaly vyšší odolnost vůči testovaným látkám než gramnegativní bakterie (bakterie rodu *Bacillus*), jelikož patří mezi bakterie silně tvořící biofilm.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

APARNA, Madhu Sharma a Sarita YADAV. Biofilms: microbes and disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* [online]. 2008, **12**(6), 526-530 [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1590/S1413-86702008000600016. ISSN 1413-8670. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_art-text&pid=S141386702008000600016&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_art-text&pid=S141386702008000600016&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

BEAUREGARD, P. B., Y. CHAI, H. VLAMAKIS, R. LOSICK a R. KOLTER. Bacillus subtilis biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2013, **110**(17), E1621-E1630 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1073/pnas.1218984110. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1218984110>

BERLANGA, Mercedes a Ricardo GUERRERO. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbial Cell Factories* [online]. 2016, **15**(1) [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1186/s12934-016-0569-5. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0569-5>

BHATIA, Sugandha a Anoop BHARTI. Evaluating the antimicrobial activity of Nisin, Lysozyme and Ethylenediaminetetraacetate incorporated in starch based active food packaging film. *Journal of Food Science and Technology* [online]. [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.1007/s13197-014-1414-7. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-014-1414-7>

BROOKE, J. S. Stenotrophomonas maltophilia: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2012, **25**(1), 2-41 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1128/CMR.00019-11. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00019-11>

BUDECKA, A., & Kunicka-Styczynska, A. Biotechnology and Food sciences. *Microbiological contaminants in cosmetics – isolation and characterization*. 2014, **78**(1) 15-23 str.[cit. 2019-04-20] Dostupné z: <http://repozytorium.p.lodz.pl/handle/11652/606>

CVETNIĆ, Zdenka a Sandra VLADIMIR-KNEZENIC. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharmaceutica* [online]. 2004, **54**(3), 243-250 [cit. 2019-05-16] Dostupné z: <https://hrcak.srce.hr/file/26006>

Česká republika. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. [online] [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/cs/TXT/?uri=CELEX:32009R1223>

DEVARAJ, Chandana a Annapurna G. SAJJAN. Comparison of Three Different Methods for the Detection of Biofilm in Gram Positive Cocci and Gram Negative Bacilli Isolated from Clinical Specimens. *Journal od Pharmaceutical Sciences and Research* [online]. 2015, 7(11), 952-955 [cit. 2019-05-16]. ISSN 0975-1459. Dostupné z: <https://www.jpsr.pharma-info.in/Documents/.../jpsr07111509.pdf>

DE WIT, J.C. a F.M. ROMBOOTS. Antimicrobial activity of sodium lactate. *Food Microbiology* [online]. 1990, 7(2), 113-120 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1016/0740-0020(90)90017-C. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/074000209090017C>

DONLAN, Rodney M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2002, 8(9), 881-890 [cit. 2019-12-03]. DOI: 10.3201/eid0809.020063. ISSN 1080-6040. Dostupné z: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063_article.htm)

DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.

FREDRICKS, David N. Microbial Ecology of Human Skin in Health and Disease. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* [online]. 2001, 6(3), 167-169 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.00039.x. ISSN 10870024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1552900X>

GRICE, Elizabeth A. a Julia A. SEGRE. The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2011, 9(4), 244-253 [cit. 2018-12-05]. DOI: 10.1038/nrmicro2537. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2537>

HALLA, Nouredine, Isabel FERNANDES, Sandrina HELENO, et al. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Molecules* [online]. 2018, 23(7) [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.3390/molecules23071571. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/7/1571>

HASSAN, Afreenish, Javaid USMAN, Fatima KALEEM, Maria OMAIR, Ali KHALID a Muhammad IQBAL. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* [online]. 2011, 15(4), 305-311

[cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1016/S1413-8670(11)70197-0. ISSN 14138670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413867011701970>

HO, Steffan N., Henry D. HUNT, Robert M. HORTON, Jeffrey K. PULLEN a Larry R. PEASE. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* [online]. 1989, **77**(1), 51-59 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/0378-1119(89)90358-2. ISSN 03781119. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378111989903582>

CHILLER, Katarina, Bryan A. SELKIN a George J. MURAKAWA. Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* [online]. 2001, **6**(3), 170-174 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x. ISSN 10870024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15529011>

ILHAK, Osman Irfan a Husnu Sahan GURAN. Combined Antimicrobial Effect of Thymol and Sodium Lactate against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in Fish Patty. *Journal of Food Safety* [online]. 2014, **34**(3), 211-217 [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.1111/jfs.12115. ISSN 01496085. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jfs.12115>

JUNGERMANN, Eric a Norman O. V. SONNTAG. *Glycerine: a key cosmetic ingredient*. New York: Marcel Dekker, c1991. ISBN 0-8247-8465-0. (423 p.)

KIRMUSAOĞLU, Sahra. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. KIRMUSAOĞLU, Sahra, ed. *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods* [online]. IntechOpen, 2019, 2019-4-3 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.5772/intechopen.84411. ISBN 978-1-78985-789-4. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/antimicrobials-antibiotic-resistance-antibiofilm-strategies-and-activity-methods/the-methods-for-detection-of-biofilm-and-screening-antibiofilm-activity-of-agents>

KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.

LARSON, Elaine L., Cabilia GOMEZ-DUARTE, Lillian V. LEE, Phyllis DELLA-LATTA, D.James KAIN a Bruce H. KESWICK. Microbial flora of hands of homemakers. *American Journal of Infection Control* [online]. 2003, **31**(2), 72-79 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1067/mic.2003.33. ISSN 01966553. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196655302482338>

LEAR Gavin, LEWIS Gillian, *Microbial biofilms: current research and applications*. Norfolk, UK.: Caister Academic, 2012. ISBN 978-1-904455-96-7.

MAGRINYÀ, Núria, Nino TERJUNG, Myriam LOEFFLER, Monika GIBIS, Ricard BOU a Jochen WEISS. Influence of fat addition on the antimicrobial activity of sodium lactate, lauric arginate and methylparaben in minced meat. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2015, **215**, 86-94 [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.017. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515301057>

MANGODT, Evelyne A., Ella DENDOOVEN, Charlotte DE FRÉ, Julien LAMBERT a Olivier AERTS. Capryloyl glycine: A polyfunctional cosmetic ingredient and potential skin sensitizer. *Contact Dermatitis* [online]. 2019, **80**(6), 400-402 [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.1111/cod.13215. ISSN 0105-1873. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cod.13215>

MANI-LÓPEZ, E., H.S. GARCÍA a A. LÓPEZ-MALO. Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research International* [online]. 2012, **45**(2), 713-721 [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.04.043. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691100278X>

MAURÍCIO, Elisabete, Catarina ROSADO, Maria DUARTE, Joana VERISSIMO, Sara BOM a Laura VASCONCELOS. Efficiency of Nisin as Preservative in Cosmetics and Topical Products. *Cosmetics* [online]. 2017, **4**(4) [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.3390/cosmetics4040041. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-9284/4/4/41>

MELO, L. F., T. R. BOTT, M. FLETCHER a B. CAPDEVILLE, ed. *Biofilms - Science and Technology* [online]. Alvor, Portugal: Kluwer Academic Publisher, 1992 [cit. 2019-03]. ISBN 978-87-011-1824-8.

MILLER, Melissa B. a Bonnie L. BASSLER. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* [online]. 2001, **55**(1), 165-199 [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.165. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.55.1.165>

MITSUI, T. *New Cosmetic Science*. first edition. The Netherlands: Elsevier Science B. V, 1997. ISBN 0 444 82654 8. (199 – 202 str.)



MUHSIN, Jamal, Tasneem UFAQ, Tahir TAHIR a Saadia ANDLEEB. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, 4(3) [cit. 2019-03-24]. ISSN 2320 - 3528.

NICODEMO, A. C. a J. I. Garcia PAEZ. Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. 2007, 26(4), 229-237 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1007/s10096-007-0279-3. ISSN 0934-9723. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-007-0279-3>

PANDA, Pragyanswagatika, Uma CHAUDHARY a SuryaK DUBE. Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* [online]. 2016, 59(2) [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.4103/0377-4929.182013. ISSN 0377-4929. Dostupné z: <http://www.ijpmonline.org/text.asp?2016/59/2/177/182013>

PAYE, Marc, A. O. BAREL a Howard I. MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. 2nd ed. New York: Taylor & Francis, 2006. ISBN 1574448242. (223 p.)

PERCIVAL, Steven L., Sladjana MALIC, Helena CRUZ a David W. WILLIAMS. Introduction to Biofilms. PERCIVAL, Steven, Derek KNOTTENBELT a Christine COCHRANE, ed. *Biofilms and Veterinary Medicine* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, 2011-7-14, s. 41-68 [cit. 2019-03-24]. Springer Series on Biofilms. DOI: 10.1007/978-3-642-21289-5\_2. ISBN 978-3-642-21288-8. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-21289-5\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-21289-5_2)

ROJO-BEZARES, Beatriz, Yolanda SÁENZ, Myriam ZARAZAGA, Carmen TORRES a Fernanda RUIZ-LARREA. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2007, 116(1), 32-36 [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.020. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507000414>

RÖCKEN, Martin, Martin SCHALLER, Elke SATTLER a Walter H. C. BURGDORF. *Kapesní atlas dermatologie*. Přeložil Marta CETKOVSKÁ, přeložil Pavel CHALOUPKA. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0106-1.

ROSSI, E., M. PARONI a P. LANDINI. Biofilm and motility in response to environmental and host-related signals in Gram negative opportunistic pathogens. *Journal of Applied*

*Microbiology* [online]. 2018, **125**(6), 1587-1602 [cit. 2018-12-05]. DOI: 10.1111/jam.14089. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.14089>

ROTSTEIN, O. D., T. L. PRUETT, V. D. FIEGEL, R. D. NELSON a R. L. SIMMONS. Succinic acid, a metabolic by-product of *Bacteroides* species, inhibits polymorphonuclear leukocyte function. *Infect Immun* [online]. 1985, **48**(2), 402-408 [cit. 2019-05-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC261327/>

SCHINDLER Jiří, Vesmír: *Mikrobiální biofilm* [online]. 2001, **80**(4) [cit. 2018-12-03]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2001/cislo-4/mikrobialni-biofilm.html>

STEPANOVIĆ, SRDJAN, DRAGANA VUKOVIĆ, VERONIKA HOLA, GIOVANNI DI BONAVENTURA, SLOBODANKA DJUKIĆ, IVANA ČIRKOVIĆ a FILIP RUZICKA. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* [online]. 2007, **115**(8), 891-899 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x. ISSN 0903-4641. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)

ŠAŠEK Jaroslav, Statní zdravotní ústav, Praha *Biofilmy a distribuční systémy vody* [online]. 2009, **2009**(2) [cit. 2018-12-03]. Dostupné z: [www.stpcr.cz/?download=articles/vvi-2009-02\\_s87.pdf](http://www.stpcr.cz/?download=articles/vvi-2009-02_s87.pdf)

TAI, Yuan-Ching, Joseph MCGUIRE a Jennifer A. NEFF. Nisin antimicrobial activity and structural characteristics at hydrophobic surfaces coated with the PEO–PPO–PEO triblock surfactant Pluronic® F108. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2008, **322**(1), 104-111 [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.02.062. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979708002397>

THEUNISSEN, Lawrence a Francois COURBES. Succinic acid: a promising multi-functional ingredient for cosmetic and personal-care applications. *Household and Personal Care Today* [online]. 2018, **13**(2), 42-44 [cit. 2019-05-16]. Dostupné z: [https://www.teknoscienze.com/tks\\_article/succinic-acid-a-promising-multi-functional-ingredient-for-cosmetic-and-personal-care-applications/](https://www.teknoscienze.com/tks_article/succinic-acid-a-promising-multi-functional-ingredient-for-cosmetic-and-personal-care-applications/)

ULBRICHT, Catherine E. *Natural Standard herb & supplement guide: an evidence-based reference*. Maryland Heights, Mo.: Elsevier/Mosby, c2010. ISBN 978-0-323-07295-3. (325 p.)

UNOSSON, E. 2015. Antibacterial Strategies for Titanium Biomaterials. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology [online]. 72 str. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis. [cit. 2018-4-20]. ISBN 978-91-554-9241-0

VON WOEDTKE, Thomas, B. SCHLUETER, P. PFEGEL, Ulrike LINDEQUIST a Wolf-Dieter JULICH. Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. *Pharmazie* [online]. 199n. 1., **54**(6), 452-456 [cit. 2019-05-16]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/12900500\\_Aspects\\_of\\_the\\_antimicrobial\\_efficacy\\_of\\_grapefruit\\_seed\\_extract\\_and\\_its\\_relation\\_to\\_preservative\\_substances\\_contained](https://www.researchgate.net/publication/12900500_Aspects_of_the_antimicrobial_efficacy_of_grapefruit_seed_extract_and_its_relation_to_preservative_substances_contained)

ZÁHEJSKÝ, Jiří. *Zevní dermatologická terapie a kosmetika: pohledy klinické, fyziologické a biologické*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1551-1.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

2ODh	Dvojnásobek hraniční optické denzity
BHI	Breast-Heart-Infusion – mozkosrdcová infúze
EDTA	Chelaton II
EPS	Extracelulární polymerní látky
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization s analyzátozem doby letu
NaCl	Chlorid sodný
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hydrogenuhličitan sodný
OD	Optická denzita
ODh	Hraniční optická denzita
ODk	Optická denzita kontroly
PBS	Fosfátový pufr
PCR	Polymerase Chain Reaction

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Jednotlivé fáze tvorby biofilmu, upraveno dle Unosson, (2015) .....	13
Obr. 2. Růstové křivky kmenů <i>Bacillus teguilensis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> v přítomnosti extraktu z grepových jader (o koncentracích 51; 26; 13; 7 a 4 mg/ml).....	37
Obr. 3. Růstové křivky kmenů <i>Bacillus teguilensis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> v přítomnosti laktátu sodného (o koncentracích 75; 38; 19; 10 a 5 mg/ml).....	39
Obr. 4. Růstové křivky kmenů <i>Bacillus teguilensis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> v přítomnosti nisinu (o koncentracích 23; 12; 6; 3 a 2 mg/ml).....	41
Obr. 5. Růstové křivky kmenů <i>Bacillus teguilensis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> v přítomnosti kyseliny jantarové (o koncentracích 26; 13; 7; 4 a 2 mg/ml) .....	43
Obr. 6. Růstové křivky kmenů <i>Bacillus teguilensis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> v přítomnosti capryloyl glycinu (o koncentracích 0,50; 0,25; 0,12; 0,06 a 0,03 mg/ml) .....	45
Obr. 8. Vizuální vyhodnocení zkumavkové metody .....	46

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1. Navážky a objemy pro přípravu výsledných roztoků antimikrobiálních látek .....	31
Tab. 2. BHI bujónu a zkoumaná látka v řadě A mikrotitrační destičky .....	32
Tab. 3. Schématické znázornění ředění koncentrací pipetovaných látek v jamkách ..	32
Tab. 4. Výsledky z identifikace bakterií pomocí MALDI a sekvenace bazí .....	35
Tab. 5. Tvorba biofilmu testovaných bakterií kultivovaných v čistém bujónu .....	47
Tab. 6. Tvorba biofilmu testovaných bakterií v extraktu z grepových jader .....	47
Tab. 7. Tvorba biofilmu testovaných bakterií v laktátu sodném .....	48
Tab. 8. Tvorba biofilmu testovaných bakterií v nisinu .....	48
Tab. 9. Tvorba biofilmu testovaných bakterií v kyselině jantarové .....	49
Tab. 10. Tvorba biofilmu testovaných bakterií capryloyl glycinu .....	49