

# **Protibakteriální účinky fenoxxyethanolu a 1 – oktyl – 2 – pyrrolidonu**

Bc. Jan Salač

---

Diplomová práce  
2014/2015

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jan Salač**  
Osobní číslo: **T13367**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Protibakteriální účinky fenoxylethanolu a 1-oktyl 2-pyrrolidonu**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na protimikrobní účinky fenoxylethanolu a 1-oktyl 2-pyrrolidonu.
2. Experimentálně ověřte účinek uvedených látek proti čistým kulturám vybraných druhů bakterií.
3. Experimentálně ověřte účinek uvedených látek proti směsné kultuře aktivovaného kalu.
4. Zhodnoťte použití obou metod pro posouzení protibakteriální toxicity těchto látek.
5. Výsledky přehledně zpracujte požadovanou formou a diplomovou práci odevzdejte v písemné i elektronické podobě v předepsaném termínu.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Odborné práce získané z vědeckých databází, především z Web of Science, SCOPUS, ScienceFinder, Medline, TOXNET a dalších, dle aktuálních potřeb.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce:

**15. května 2015**

Ve Zlíně dne 10. února 2015

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Salač Jan

Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí

## 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 užit 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.

Ve Zlíně .....15.5.2015.....

  
.....

<sup>21)</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 nevydělečně 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 nahlázení 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>22)</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:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>23)</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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá protibakteriálními účiny fenoxoethanolu, 1-oktyl-2-pyrrolidonu a směsí těchto látek. Byla zjišťována minimální inhibiční a minimální baktericidní koncentrace u čtyř gramnegativních a čtyř grampozitivních bakteriálních kultur. V rámci této práce byla prokázána nižší účinnost fenoxoethanolu vůči grampozitivním bakteriím a zároveň vyšší účinnost směsi těchto dvou látek oproti látkám samotným.

Dále také byla pozorována vysoká účinnost jednotlivých baktericidních látek na respiraci aerobního aktivovaného kalu. Z respiračních křivek byly sestrojeny křivky inhibice a z nich stanoveny hodnoty  $EC_{50}$  1,88 g.l<sup>-1</sup> pro fenoxoethanol a 0,185 g.l<sup>-1</sup> pro 1-oktyl-2-pyrrolidon.

### Klíčová slova:

Fenoxoethanol, 1-oktyl-2-pyrrolidon, bakterie, minimální inhibiční koncentrace, minimální baktericidní koncentrace, respirace, aerobní aktivovaný kal

## **ABSTRACT**

This Master's thesis deals with antibacterial effects of phenoxyethanol, 1-octyl-2-pyrrolidone and several mixtures of these two substances. Minimal inhibitory and minimal bactericidal concentrations have been in four Gram-negative and four Gram-positive bacterial cultures determined. Within this work less efficiency of phenoxyethanol has been proven against Grampositive bacteria as well as higher efficiency of the mixture was in comparison of the substances themselves found.

In further part of the work high efficiency of each of the bactericidal agent against aerobic respiration of activated sludge has been observed. The inhibition curves have been from respiratory curves constructed, from which we determined effective concentration  $EC_{50}$  1.88 g.l<sup>-1</sup> for phenoxyethanol and 0.185 g.l<sup>-1</sup> for 1-octyl-2-pyrrolidone.

### Keywords:

Phenoxyethanol, 1-octyl-2-pyrrolidone, bacteria, the minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration, respiration, aerobic activated sludge

Rád bych poděkoval vedoucímu mé diplomové práce panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, rady a vědomosti, které mi poskytl. Dále také velkou ochotu a čas, který mi věnoval při realizaci této práce. Dále bych rád poděkoval laborantkám laboratoří mikrobiologie paní Lence Machálkové a Bc. Veronice Kučabové za odborné rady. Závěrem bych rád poděkoval své rodině a přátelům, kteří mě podporovali během celé doby studia.

*„Věda nikdy nevyřeší jeden problém, aniž by vyprodukovala deset dalších.“*

George Bernard Shaw

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně 15. 5. 2015

.....

Podpis

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 FENOXYETHANOL</b> .....	<b>12</b>
1.1 VLASTNOSTI A POUŽITÍ.....	12
1.2 BIODEGRADACE .....	12
1.3 KOMPATIBILITA .....	13
Látky, se kterými je fenoxxyethanol kmpatibilitní.....	13
Látky, se kterými je fenoxxyethanol nekompatibililní.....	13
1.4 TOXIKOLOGIE.....	13
1.4.1 Akutní toxicita: studie na zvířatech.....	13
1.4.2 Akutní toxicita: studie na lidech .....	14
1.4.3 Genotoxicita .....	14
1.4.4 Karcinogenita .....	14
1.5 PROTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY .....	15
1.5.1 Porovnání účinnosti čistého fenoxxyethanolu a konzervantu Euxyl® PE 9010.....	15
1.5.2 Porovnání fenoxxyethanolu s různými baktericidními látkami .....	20
1.5.3 Účinnost fenoxxyethanolu v kombinaci s různými konzervanty.....	22
1.5.4 Test adaptace <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 na fenoxxyethanol .....	24
1.6 EKOTOXICITA .....	24
1.6.1 Životní prostředí.....	24
1.6.2 Akutní a chronická toxicita studována na vybraných druhích živočichů.....	25
<b>2 1 – OKTYL – 2 – PYRROLIDON</b> .....	<b>27</b>
2.1 VLASTNOSTI.....	27
2.2 POUŽITÍ .....	27
2.3 TOXICITA .....	27
2.3.1 Vliv na člověka .....	27
2.3.2 Vliv na zvířata .....	28
2.3.3 Vliv na vodní organismy.....	28
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>29</b>
<b>3 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>30</b>
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A SLOŽENÍ ŽIVNÝCH MÉDIÍ.....	30
3.2 POUŽITÉ KULTURY .....	31
3.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ.....	31
3.4 METODY A POSTUPY .....	32
3.4.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace fenoxxyethanolu v mikrotitračních destičkách .....	32
3.4.2 Stanovení minimální baktericidní koncentrace fenoxxyethanolu .....	36
3.4.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace 1O2P.....	37
3.4.4 Stanovení účinnosti směsi fenoxxyethanolu a 1O2P vůči kultuře <i>E. coli</i> CCM 3954.....	40
3.4.5 Sledování toxicity látek vůči aktivovanému kalu .....	47
3.4.6 Vedlejší testy .....	52



<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>53</b>
4.1	PRÁCE S FENOXYETHANOLEM .....	53
4.1.1	Stanovení minimální inhibiční koncentrace fenoxxyethanolu vůči čistým bakteriálními kulturám .....	53
4.1.2	Stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC) fenoxxyethanolu .....	61
4.1.3	Stanovení MIC a MBC fenoxxyethanolu pro kulturu <i>Bacillus subtilis</i> prekulivovanou 20 hodin .....	64
4.2	PRÁCE S 1–OKTYL–2 PYRROLIDONEM .....	66
4.2.1	Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) 1O2P – část I. ....	66
4.2.2	Dynamické testy s kulturami <i>E. coli</i> CCM 3954 a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 .....	68
4.2.3	Stanovení minimální inhibiční koncentrace 1O2P, část II. ....	72
4.2.4	Stanovení minimální baktericidní koncentrace 1O2P .....	79
4.3	TESTOVÁNÍ SMĚSI FENOXYETHANOLU A 1O2P .....	80
4.4	STANOVENÍ TOXICITY LÁTEK VŮČI AKTIVOVANÉMU KALU .....	86
4.4.1	Sledování respirace aerobního kalu s přidavkem fenoxxyethanolu .....	86
4.4.2	Sledování respirace aerobního kalu s přidavkem 1O2P .....	90
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>94</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>97</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>101</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>102</b>
	<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>103</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	<b>107</b>

## ÚVOD

Denně využíváme k hygieně přípravky, které jsou složeny z několika látek hlavně s baktericidními účinky, ať už se jedná o hlavní baktericidní látku nebo o přísadu s konzervačními účinky jako je fenoxylethanol. Tyto přípravky sice přispívají ke zdraví člověka, ale po jejich použití se dostávají spolu s odpadní vodou do čistíren odpadních vod, kde mohou ve větším množství způsobit nemalé technologické potíže. Účinnost biologického čištění může být velmi výrazně narušena i malým množstvím těchto baktericidních látek. Ačkoliv obsah fenoxylethanolu v kosmetických přípravcích je legislativně omezen, do čistíren odpadních vod se dostává jen v určitém množství, které může způsobit pokles účinnosti aktivovaného kalu. Samozřejmě ne vždy se odpadní voda spolu s inhibitory dostane do čistíren, ale skončí v půdách nebo řekách. Proto je dobré studovat účinky baktericidních látek nejen v technologických procesech, ale také jeho působení na půdní organismy a případně i vyšší živočichy, aby v případě havárie bylo možné lépe vyhodnotit ekologická rizika. Fenoxylethanol patří mezi látky dobře zdokumentované a existuje řada vědeckých prací zabývajících se také proti-mikrobiální problematikou fenoxylethanolu. Na druhé straně existuje celá řada látek jako např. 1-oktyl-2-pyrrolidon, díky kterým by bylo možné jej průmyslově využít, ale o jeho dopadech na životní prostředí nejsou dostupné žádné informace. Z toho důvodu je zapotřebí tyto látky důkladně prostudovat než se začnou využívat např. ke komerčním účelům. Jelikož by mohlo dojít vlivem neopatrné manipulace k negativnímu dopadu na životní prostředí s nezvratnými účinky.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

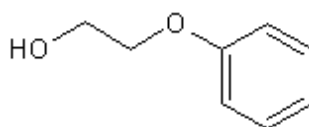
# 1 FENOXYETHANOL

## 1.1 Vlastnosti a použití

Fenoxyethanol je bezbarvá, olejovitá kapalina s charakteristickým aroma a s rozpustností ve vodě  $26,7 \text{ g.l}^{-1}$  (BEILFUSS et. al. , 2005). Je dobře rozpustný v polárních rozpouštědlech. Patří do strukturní skupiny vonných látek Aryl Alkyl Alkoholů (AAA). Obecně jsou tyto látky strukturovány jako  $\text{AR-C-(R}_1\text{)(R}_2\text{)OH}$  nebo  $\text{AR-Alkyl-C-(R}_1\text{)(R}_2\text{)OH}$  (SCOGNAMIGLIO et. al. , 2012). Kvůli antibakteriálním účinkům a nízké dráždivosti vůči lidské pokožce, se nejčastěji využívá jako konzervant vonných látek v kosmetickém průmyslu, jako např. v mýdlech či koupelových produktech. (CADBY et. al. , 2002)

Vyhláška 448/2009 Sb. o stanovení hygienických požadavků na kosmetické prostředky, udává maximální povolený obsah fenoxyethanolu v kosmetických přípravcích 1%. (ČESKO, Vyh. č. 448/2009 Sb.)

Fenoxyethanol se hojně využívá i v nekosmetickém průmyslu, zejména v domácích čistících přípravcích a detergentech (ARCTANDER , 1969). Může se také využívat jako hlavní desinfekční prostředek při léčbě spálenin (WILSON et. al. , 1990). Fenoxyethanol se vyskytuje i v přírodě, ve vyšší koncentraci byl nalezen např. v avokádu, nebo čekance (NIJSSEN et. al. , 2009).



**Obr. 1** Struktura fenoxyethanolu

## 1.2 Biodegradace

Pro fenoxyethanol byla zjištěna biologická spotřeba kyslíku (BSK) a to 21% pro  $\text{BSK}_5/\text{TSK}$ , 66% pro  $\text{BSK}_{10}/\text{TSK}$  a 75% pro  $\text{BSK}_{20}/\text{TSK}$ . Z výsledků vyplývá, že fenoxyethanol je pomalu biologicky rozložitelný (HOWARD, n.d.).

### 1.3 Kompatibilita

U chemických látek je důležité znát jejich reaktivitu s jinými látkami, zejména při jejich uskladňování a při manipulaci.

#### Látky, se kterými je fenoxylethanol kompatibilní

Nerezová ocel, mosaz, měď, hliník, polyetylen, tvrzené PVC, etylen-propylen pryž (EPDM) a polytetrafluoretylen (PTFE) (SCHÜLKE & MAYER GMBH , 2010).

#### Látky, se kterými je fenoxylethanol nekompatibilní

Polykarbonát, polymethylmethakrylát (PMMA), akrylonitrilbutadienstyren (ABS), tmely, lepidla apod. (SCHÜLKE & MAYER GMBH , 2010).

### 1.4 Toxikologie

Toxikologická data patří k důležitým informacím o dané látce. Jedná-li se zejména o látku používanou v kosmetických přípravcích, které jsou používány v každodenním životě. Toxikologické studie byly prováděny Výzkumným institutem vonných látek (RIFM) jak na zvířatech, tak na lidech. Genotoxické zkoušky byly provedeny u bakteriální kultury *Salmonella typhimurium*.

#### 1.4.1 Akutní toxicita: studie na zvířatech

##### Orální studie

Testováním čistého fenoxylethanolu na albinotickém typu potkana Wistar byla zjištěna hodnota LD<sub>50</sub> u samců 1,35 g.kg<sup>-1</sup> a 1,90 g.kg<sup>-1</sup> u samic. Klinické příznaky byly mírná až těžká slabost, rozčuchaná srst, porucha pohyblivosti (ataxie), rozšíření cév (vazodilatace), vysílení a smrt (RIFM , 1984)

##### Kožní studie

Dermální LD<sub>50</sub> byla studována v roce 1949 u novozélandských bílých králíků. Studie ukázala LD<sub>50</sub> v rozmezí hodnot 3,10 - 3,44 g.kg<sup>-1</sup>. V roce 1953 byl proveden test aplikováním formou masti na kůži králíků po dobu 24 hodin. Zvířata byla sledována po dobu 14 dní a byla u nich pozorována toxicita na části kůže, zčervenání kůže vlivem rozšíření cév (erytém), olupování kůže, mimo to i světlé játra, bledé a oteklé ledviny. Úmrtnost byla prokázána pouze mezi 1.–4. dnem testu (RIFM , 1983, RIFM , 1984).

Hodnota dermální akutní toxicity byla při studiích stanovena na  $LD_{50} > 5,0 \text{ g.kg}^{-1}$ . Test probíhal na pěti laboratorních králících. K úmrtí došlo u jednoho ze zkoumaných objektů po 11–ti dnech. Byly pozorovány klinické příznaky jako chorobná spavost (letargie), průjem, nafouklé břicho, výtok žluté tekutiny (exsudátu) z nosu, úst a očí, hlava zvrácená dozadu, respirační problémy, studené končetiny a šedé exkrementy. Pitevní nález odhalil žlutou až červenou želatinovou tkáň v oblasti střev (RIFM , 1978).

#### 1.4.2 Akutní toxicita: studie na lidech

##### Kožní studie

U roztoku o obsahu 15 % fenoxylethanolu a 85 % etanolu nebyla zjištěna žádná negativní reakce s lidskou pokožkou. Na bavlněné obinadlo Webril o rozměrech 20 x 20 mm bylo nanášeno 0,4 ml roztoku. Obinadlo bylo umístěno na oblast ramen. Aplikace trvala 3 týdny (RIFM , 1978) .

Roztok 10 % fenoxylethanolu a minerálního oleje byl dávkován o objemu 0,3 ml na  $\frac{3}{4}$ “ bavlněný obvaz (Webril) o rozměrech 20 x 20 mm, který byl aplikován pod okluzi. U 51 testovaných subjektů nebyla zjištěna žádná negativní reakce (RIFM , 1987).

10 % fenoxylethanol ve vazelině bylo aplikováno ve třech testech na počtu 18, 26 (RIFM , 1982) a 30 (RIFM , 1978) zdravých mužských jedinců na oblast zad. Ani v jednom případě nedošlo k negativní reakci s pokožkou.

##### Alergologický test

U 11–leté dívky, bez žádných dřívějších dermatologických problémů, byla zjištěna reakce s kůží po aplikaci hydratačních krémů s obsahem fenoxylethanolu. Svědění a otoky byly sledovány již 30 s po aplikaci. Byly pozorovány oteklé ruce i oči, které se postupně zvětšovaly, až nemohla vidět. Příznaky odezněly do 20 min, kdy stírací testy byly pozitivní na fenoxylethanol (BIRNIE et. al. , 2006) .

#### 1.4.3 Genotoxicita

Fenoxylethanol není mutagenní pro bakterie *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 a TA1537(MARON et. al. , 1981).

#### 1.4.4 Karcinogenita

Nejsou dostupná žádná data.

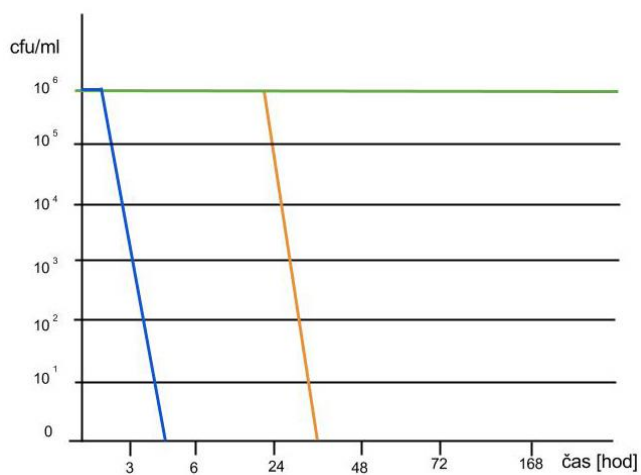
## 1.5 Protimikrobiální účinky

Fenoxyethanol je účinný vůči bakteriím, kvasinkám i plísním. Protibakteriální testy různých studií ukázaly, že fenoxyethanol patří spíše mezi méně účinné konzervanty.

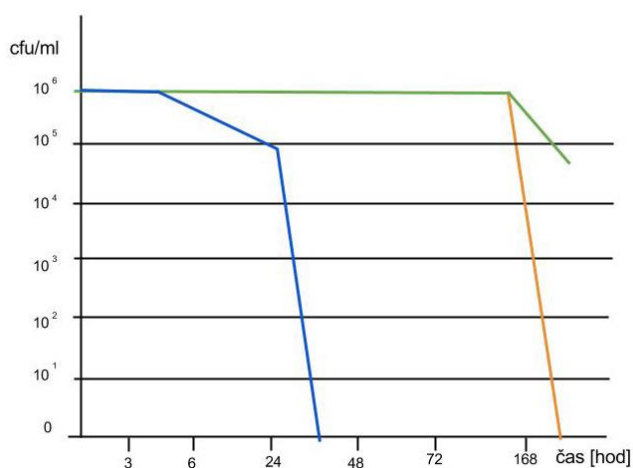
Minimální doba kontaktu fenoxyethanolu s mikroorganismy je 48 hodin. Účinnost fenoxyethanolu se snižuje při použití v silně znečištěném stavu (SCHÜLKE & MAYER GMBH, 2010).

### 1.5.1 Porovnání účinnosti čistého fenoxyethanolu a konzervantu Euxyl® PE 9010

Euxyl® PE 9010 je konzervační látka obsahující 90% fenoxyethanolu a 10 % ethylhexylglycerinu. Beilfuss a spol. porovnávali inhibiční účinky čistého fenoxyethanolu a Euxylu® PE 9010 na vybraných druzích gramnegativních a grampozitivních bakterií, hub a kvasinek, viz tabulka 1. Pro porovnání toxicity byla použita metoda sledování úbytku počtu kolonie tvořících jednotek (CFU). 50 ml připraveného roztoku inhibiční látky o určité koncentraci bylo zaočkováno 0,5 ml suspenze mikroorganismů s předpokládaným množstvím  $10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>. Tento roztok byl v daných intervalech nanesen na Trypton – sojový agar (*Pseudomonas aeruginosa*), případně Sabouraudův agar s přídavkem 4 % dextrózy (*Aspergillus niger*). Inkubace agarů probíhala při 37 °C po dobu 48 hodin nebo 72 hodin při 25–27 °C. V časových intervalech 3, 6, 24, 48, 72 a 168 hodin byly počítány CFU. Výsledky studie jsou znázorněny graficky na obrázcích 2 a 3. Jsou zde uvedeny hodnoty i pro další druhy mikroorganismů. (BEILFUSS et. al., 2005).



**Obr. 2** Grafické znázornění úbytku kolonií v závislosti na době kultivace u kultury *Pseudomonas aeruginosa* (BEILFUSS et. al. , 2005)



**Obr. 3** Grafické znázornění úbytku kolonií v závislosti na době kultivace u vláknité mikroskopické houby *Aspergillus niger* (BEILFUSS et. al. , 2005)

Legenda k použitým barvám v obrázcích 2 a 3:

- Modrá – 1,0 % Euxyl<sup>®</sup> PE 9010
- Oranžová – 0,9 % Fenoxoethanol
- Zelená – 0,1 % Ethylhexylglycerin



Z grafů vyobrazených v obrázcích 2 a 3 lze pozorovat, že samotný ethylhexylglycerin nemá žádné inhibiční účinky. Avšak v roztoku Euxyl® PE 9010 napomáhá k účinnějšímu a rychlejšímu působení fenoxxyethanolu.

**Tab. 1** Stanovení MIC fenoxxyethanolu oproti Euxylu® PE 9010 (BEILFUSS et. al. , 2005)

Mikroorganismy	Typ	Euxyl® PE 9010 [g.l <sup>-1</sup> ]	Fenoxxyethanol [g.l <sup>-1</sup> ]
<b>Gram-negativní</b>			
<i>Enterobacter gergoviae</i>	33028	5	5
<i>Escheria coli</i>	11229	5	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	2,5	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15442	5	5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	17397	2,5	5
<i>Pseudomonas putida</i>	12633	5	5
<b>Gram-pozitivní</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	5	10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	5	10
<b>Houby</b>			
<i>Aspergillus niger</i>	6275	2,5	5
<i>Penicillium funiculosum</i>	36839	2,5	2,5
<b>Kvasinky</b>			
<i>Candida albicans</i>	10231	2,5	5

Z tabulky 1 lze pozorovat, že konzervant Euxyl® PE 9010 má lepší proti mikrobiální účinky u kultur *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Aspergillus niger* a *Candida albicans*, než samotný fenoxxyethanol. Zvýšení účinnosti má za následek 10% přídavek ethylhexylglycerinu, který napadá buněčnou stěnu a tím napomáhá lépe proniknout fenoxxyethanolu do mikrobiálních buněk.

Německá firma Schülke & Mayer GmbH zabývající se hygienickými a konzervačními látkami, také studovala MIC fenoxxyethanolu na vybraných bakteriích, kvasinkách a houbách. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3.

**Tab. 2** Stanovení MIC vybraných bakteriálních kultur (SCHÜLKE & MAYER GMBH , 2010)

Bakterie	MIC [g.l <sup>-1</sup> ]
<b>Gram negativní</b>	
<i>Burholderia cepacia</i>	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	3,2
<i>Escherichia coli</i>	3,2
<i>Proteus vulgaris</i>	7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
<i>Pseudomonas putida</i>	3,2
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	3,2
<b>Gram pozitivní</b>	
<i>Bacillus subtilis</i>	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6,4

**Tab. 3** Stanovení MIC vybraných druhů kvasinek a hub (SCHÜLKE & MAYER GMBH , 2010)

Mikroorganismy	MIC [g.l <sup>-1</sup> ]
<b>Kvasinky</b>	
<i>Candida albicans</i>	3,2
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	2,5
<b>Houby</b>	
<i>Aspergillus niger</i>	2,5
<i>Penicillium funiculosum</i>	0,6
<i>Trichoderma virens</i>	2,5

Z naměřených výsledků firmy Schülke & Mayer GmbH je možné pozorovat vyšší účinnost fenoxxyethanolu na kvasinky a houby. Nejedodlnějším zkoumaným mikroorganismem byla bakterie *Pseudomonas fluorescens*.

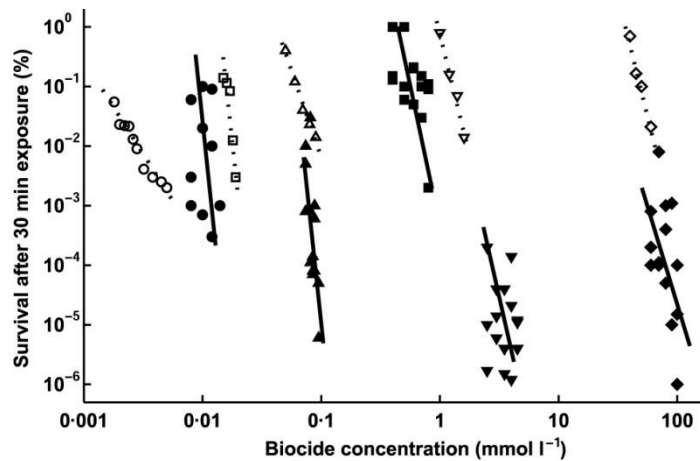
Périamé a spol. zkoumali MIC a minimální baktericidní koncentraci (MBC) u 65 kmenů bakterie druhu *Enterobacter gergoviae* izolovaných z různých zdrojů, např. z ovoce a kosmetiky. Dále zkoumali kultury *Escherichia coli* AG100 a *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Pro stanovení MIC byly použity 96 jamkové mikrotitrační destičky, které byly naplněny 100 µl ředěné konzervační látky a 100 µl živného média Mueller – Hinton se suspenzí inokula o přibližném počtu CFU 10<sup>5</sup>. Destičky byly kultivovány přes noc při 30°C (PÉRIAMÉ et. al. , 2014).

Stanovení MBC probíhalo dvěma způsoby. V prvním případě došlo k centrifugaci 1 ml vzorku, u kterého nebyl pozorován viditelný růst bakterií při 5000 g, po dobu 15 min při 20 °C. Pelety byly resuspendovány ve 100 µl v Lauria – Bertani živném médiu a 60 µl bylo naočkováno na Lauria – Bertani agaru. Ve druhém případě došlo ke kultivaci v 96 jamkových destičkách k resuspendaci buněk do dvou ředěných neutralizačních roztoků Eugen LT100 a poté k vyočkování určitého objemu na agary Lauria – Bertani. MBC fenoxxyethanolu byla u vybraných bakteriálních kultur stanovena na 9 g.l<sup>-1</sup> (PÉRIAMÉ et. al. , 2014).

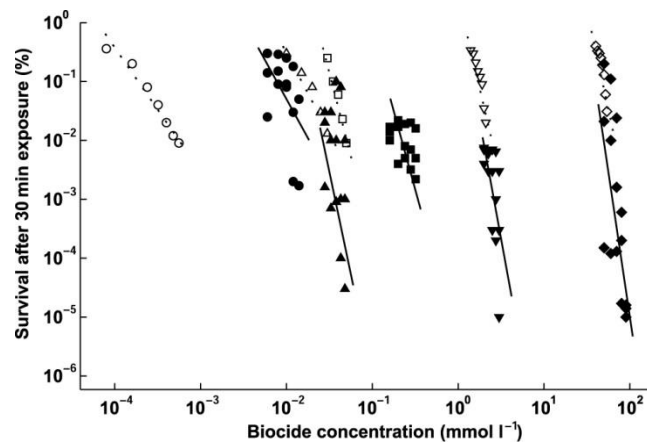
U testovaných kmenů byla naměřena stejná hodnota MIC, a to  $4,5 \text{ g.l}^{-1}$ . U několika málo bakteriálních kmenů byla zjištěna shodná hodnota MBC s hodnotou MIC (tedy  $4,5 \text{ g.l}^{-1}$ ), u většiny ostatních byly hodnoty MBC vyšší, a to 9 nebo  $18 \text{ g.l}^{-1}$ . Dále byla studována MIC fenoxylethanolu, s přidavkem látky fenylalanin arginin  $\beta$ -naftylamid (PA $\beta$ N), která má za následek blokadu vylučovací pumpy (efflux pump) u bakterií. PA $\beta$ N v kombinaci s fenoxylethanolem neměl vliv na přežívání bakterií, což ukazuje, že odolnost vůči fenoxylethanolu není dána činností efluxní pumpy, ale jinými mechanismy (PÉRIAMÉ et. al. , 2014).

### 1.5.2 Porovnání fenoxylethanolu s různými baktericidními látkami

Gilbert a spol. zkoumali odolnost biofilmových buněk *Escherichia coli* (kmen Dyson) a *Staphylococcus epidermis* NCTC 11047 vůči chlorxylenolu, kyselinu peroctové, polyhexamethylen biguanidu (PHMB), cetrimidu a fenoxylethanolu. Během tohoto studia vyvinuli metodu posouzení desinfekčních účinků látek na biofilmové buňky, s využitím měření zákalu (optické density) v mikrotitračních destičkách, která umožnila srovnání účinnosti širokého okruhu biocidních látek proti různým biofilmům. Byla prováděna 48-hodinová kultivace v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Planktonní fáze byla odstraněna a jamky byly vypláchnuty. Reziduální biofilm byl vystaven po dobu 1 hodiny výše jmenovaným látkám v různých koncentracích. V 15 minutových intervalech byly biocidy odstraněny, jamky promyty neutralizační látkou a naplněny čerstvým médiem. Následný růst byl monitorován během kultivace při  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Biofilm byl znatelně aktivnější než planktonní bakterie, neboť biofilmy jsou známé svojí odolností proti biocidům. Výsledky přežívání buněk jsou graficky uvedeny na obrázcích 4 a 5 (GILBERT et. al. , 2001)



**Obr. 4** Přežívání volných buněk (prázdné symboly) *Escherichia coli* a biofilmových buněk (plné symboly) (GILBERT et. al. , 2001)



**Obr. 5** Přežívání volných buněk (prázdné symboly) *Staphylococcus epidermidis* a biofilmových buněk (plné symboly) (GILBERT et. al. , 2001)

Legenda k obrázkům 4 a 5:

- ▼ - Chlorxylenol
- - PHMB
- - Kyselina peroctová
- ▲ - Cermid
- ◆ - Fenoxýethanol

Na obrázcích 4 a 5 lze vidět, že v obou případech bylo zapotřebí použít fenoxylethanol o koncentraci cca 8–13 g.l<sup>-1</sup> k zajištění dostatečného účinku na buňky zkoumaných bakterií. Tím se řadil k nejméně účinným antimikrobiálním látkám, které byly v této práci zkoumány.

### 1.5.3 Účinnost fenoxylethanolu v kombinaci s různými konzervanty

Lundov a spol. zkoumali účinnost fenoxylethanolu v kombinaci s alergenními konzervanty: diazolidinyl močovinou (DM), methylchloroisothiazolinon/methylisothiazolinonem (MCI/MI), methylisothiazolinonem (MI). Výsledky studie ukázaly snížení alergenních účinků vybraných konzervantů v kombinaci s fenoxylethanolem. Lundov a spol. během studie použili metodu stanovení MIC a tzv. zlomkové inhibiční koncentrace (Fraction Inhibitory Concentration (FIC)) na bakteriálních kulturách *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, kvasince *Candida albicans* a plísní *Aspergillus niger* (LUNDOV et. al. , 2011). Byla použita standardizovaná metoda stanovení MIC - CLSI M7-A6 pro bakteriální kultury *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (NCCLS document M7-A6, 2003) a standardizovaná metoda CLSI M27-A2 M38 pro *Candida albicans* a *Aspergillus niger* (NCCLS document M27-A2, 2002, NCCLS document M38-A, 2002). S normovanými metodami se neshodovala jen inkubační teplota, která při testu byla 25 ± 2 °C u všech zkoumaných mikroorganismů. Se sníženou teplotou byla proto prodloužena kultivační doba na 48 ± 2 hodiny pro bakteriální kultury a 72 ± 2 hodiny pro plíseň a kvasinky (LUNDOV et. al. , 2011).

Tzv. zlomková inhibiční koncentrace byla v této studii počítána dle vztahu /1/ (MOODY, 2004).

$$FIC = \left(\frac{MIC_S}{MIC_A}\right) + \left(\frac{MIC_S}{MIC_B}\right) \quad /1/$$

Kde:

FIC	- Zlomková inhibiční koncentrace	[1]
MIC <sub>S</sub>	- Minimální inhibiční koncentrace směsi konzervantů	[g.l <sup>-1</sup> ]
MIC <sub>A</sub>	- Minimální inhibiční koncentrace zkoumané látky A	[g.l <sup>-1</sup> ]
MIC <sub>B</sub>	- Minimální inhibiční koncentrace zkoumané látky B	[g.l <sup>-1</sup> ]

Cílem této studie FIC bylo zjistit, zda konzervanty navzájem zvyšují konzervační účinek nebo se navzájem ruší. Pokud je  $FIC \leq 0,5$ , pak konzervanty navzájem zvyšují svoji účinnost; při hodnotách mezi 0,5–4 se konzervanty nijak neovlivňují;  $FIC > 4$  se konzervanty se navzájem vylučují. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5 (LUNDOV et. al. , 2011).

**Tab. 4** MIC pro diazolidinyl močovinu, MCI/MI, MI a fenoxylethanol (LUNDOV et. al. , 2011)

	Diazolidinyl močovina	MCI/MI	MI	Fenoxylethanol
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 0,3125	0,002	0,045	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,625	0,002	0,015	4
<i>Aspergillus niger</i>	1,25	0,0005	> 0,1	4
<i>Candida albicans</i>	5	0,0005	0,065	6

**Tab. 5** FIC pro kombinace konzervantů s fenoxylethanolem (LUNDOV et. al. , 2011)

	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Průměr	Průměr	Průměr	Průměr
DM+Phe	0,55	0,79	0,88	---
DM-MCI/MI+Phe	0,85	1,30	0,93	---
MCI/MI+Phe	0,98	1,79	0,75	0,88
DM-MI+Phe	1,10	1,00	---	---
MI+Phe	0,87	---	---	1,21
DM+MCI/MI	0,88	0,71	0,64	---
DM+MI	1,43	0,93	---	---

V tabulce 5 jsou uvedeny zlomkové inhibiční koncentrace konzervantů v kombinaci s fenoxylethanolem. U zkoumaných konzervantů v kombinaci s fenoxylethanolem nedochází k vzájemnému působení či snižování antibakteriálních účinků. Pod černou čarou v tabulce 5 jsou dále uvedeny další hodnoty FIC pro kombinace konzervantů bez fenoxylethanolu. (LUNDOV et. al. , 2011).

#### 1.5.4 Test adaptace *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 na fenoxxyethanol

*Pseudomonas aeruginosa* patří mezi organismy, které jsou vůči lidem podmíněně patogenní, a jsou navíc odolné vůči různým druhům antibiotik. Tato vlastnost je dána tím, že má mechanismy exkrece (vyloučení), pomocí nichž dokáže odstranit velké množství bakteriostatik z buněk. (HANCOCK , 2000, LOUGHLIN et. al. , 2002). Fenoxxyethanol narušuje bakteriální stěnu a tím má také negativní vliv na ATP syntézu (BEVERIGEDGE et. al. , 1991). Malek a Badran se zaměřili při své práci na adaptaci buněk *Pseudomonas aeruginosa* na fenoxxyethanol, a to tak, že použili pasážovací metodu s opakovaným stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC). *P. aeruginosa* PAO1 byla kultivována na R2A agaru. Buňky byly poté vystaveny úvodní koncentraci fenoxxyethanolu  $33 \mu\text{g.l}^{-1}$  a kultivovány se zvýšenou koncentrací fenoxxyethanolu v tekutém médiu. Pak byla opětovně stanovena MIC fenoxxyethanolu a postup byl opakován 10x. Po každé kultivaci bylo do bujónu s inokulem přidáno o  $\frac{1}{4}$  více přídavku fenoxxyethanolu než v předchozím případě a 250  $\mu\text{l}$  inokula bylo vždy přidáno k 25 ml čerstvého bujónu. I když výsledky ukázaly, že došlo k nárůstu MIC fenoxxyethanolu vůči *Ps. aeruginosa* PAO1 z počátečních  $33 \mu\text{g.l}^{-1}$  na konečných  $82 \mu\text{g.l}^{-1}$ , znamenají extrémní citlivost uvedené bakteriální kultury na fenoxxyethanol. I když rozdíl je  $49 \mu\text{g.l}^{-1}$ , nedají se tyto výsledky považovat za prokazatelnou schopnost adaptace *Ps. aeruginosa* PAO1 vysoké koncentrace na fenoxxyethanol (ABDEL MALEK et. al. , 2010).

### 1.6 Ekotoxicita

Chronické i akutní toxikologické testy prokázaly negativní vliv na lidský organismus. Jelikož fenoxxyethanol je hojně užíván v kosmetickém průmyslu je velice pravděpodobný výskyt i v životním prostředí. Proto je důležité znát jeho účinky na ostatní organismy. V této kapitole je zmíněna účinnost fenoxxyethanolu zejména na vodní organismy.

#### 1.6.1 Životní prostředí

Fenoxxyethanol vyráběný firmou Schülke & Mayer GmbH nemá negativní vliv na provoz čistírny odpadních vod (SCHÜLKE & MAYER GMBH , 2010).



### 1.6.2 Akutní a chronická toxicita studována na vybraných druzích živočichů

Akutní a chronickou toxicitou nejen fenoxýethanolu se zabýval Tamura a kol. na třech vybraných vodních organismech. Bylo testováno pět antibakteriálních látek: triclosan, triclocarban, resorcinol, fenoxýethanol a p-thymol.

Ke zjištění toxicity byla použita zelená řasa *Pseudokirchneriella subcapitata*, perloočka hrotnatka velká (*Daphnia magna*) a ryba medaka japonská (*Oryzias latipes*).

Pro stanovení akutní a chronické toxicity Tamura a spol. použili stanovení 50 % efektivní koncentrace ( $EC_{50}$ ) (TAMURA et. al. , 2013).

#### Inhibiční test zelené řasy *Pseudokirchneriella subcapitata*

Do 100 ml Erlenmayerovy baňky byla dána inkubovaná řasa se stanoveným počtem buněk cca  $5 \cdot 10^3 \text{ ml}^{-1}$ . Nárůst buněk byl měřen spektrofotometricky při 750 nm. Koncentrace testovaných látek byly sledovány před a po 72h inkubaci použitím HPLC s UV – VIS a fluorescenčním detektorem. Efektivní dávka byla stanovena probitovou nebo logitovou analýzou s Ecotox – Statics v. 2,6d (TAMURA et. al. , 2013).

#### Imobilizační test na *Daphnia magna*

Čtyři čerstvě vylíhlí jedinci byli umístěni v 50 ml zkoumané inhibiční látkou o určité koncentraci. Test probíhal při 20 °C při režimu 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Byl spočítán počet imobilizovaných jedinců po 48 hodinách. Koncentrace byla testována pomocí HPLC, jak je uvedeno výše. Letální koncentrace byla vyhodnocena pomocí probit nebo legit analýzy (TAMURA et. al. , 2013).

#### Test akutní toxicity na rybě Medaka japonská

Pět nedospělých jedinců bylo umístěno ve 100 ml kádince s různými koncentracemi zkoumaných látek. Byl připraven i slepý pokus. Test byl prováděn při 25 °C, s osvitem 16 hodin a 8 hodinami tmy. Roztoky byly měněny po dobu 48 hodin a vzorky byly měřeny stejně jako v předchozím případě pomocí metody HPLC. Počet uhynulých jedinců byl spočítán po 96 hodinách. Střední letální dávka ( $LC_{50}$ ) byla stanovena pomocí stejného softwaru jako v testu s řasami (TAMURA et. al. , 2013).

### Výsledky

Výsledky akutní toxicity ukázaly nízkou toxicitu fenoxxyethanolu.  $EC_{50}$  po 72 hodinách u zelené řasy byla stanovena na hodnotu  $> 130\,000\ \mu\text{g.l}^{-1}$ , na rozdíl od triclosanu, u kterého byla stanovena hodnota  $EC_{50}$  v průměru na  $5,1\ \mu\text{g.l}^{-1}$ .  $EC_{50}$  fenoxxyethanolu po 48 hodinách byla stanovena na hodnotu  $> 96\,000\ \mu\text{g.l}^{-1}$  u hrotnatky a  $LC_{50}$  po 96 hodinách  $> 123\,000\ \mu\text{g.l}^{-1}$  u ryby medaky (TAMURA et. al. , 2013).

Výsledky chronické toxicity, také prokázaly nízkou toxicitu fenoxxyethanolu. U zelené řasy byla stanovena chronická toxicita fenoxxyethanolu vyšší jak  $130\,000\ \mu\text{g.l}^{-1}$ . Chronická toxicita byla stanovena u hrotnatky po 8 dnech a byla zjištěna hodnota  $5800\ \mu\text{g.l}^{-1}$ . U ryby po 9 dnech byla chronická toxicita stanovena na více jak  $52\,000\ \mu\text{g.l}^{-1}$  (TAMURA et. al. , 2013).

## 2 1 – OKTYL – 2 – PYRROLIDON

1-oktyl-2-pyrrolidon (1O2P) též jako N-oktyl-2 pyrrolidon nebo N-oktylpyrrolidon.

### 2.1 Vlastnosti

1O2P je bezbarvá až nažloutlá kapalina se slabým zápachem o molekulové hmotnosti  $197,3 \text{ g.mol}^{-1}$ , bodem varu v rozmezí  $306 - 307 \text{ }^\circ\text{C}$  a hustotou  $0,92 \text{ g.cm}^{-3}$ . Je rozpustný organickými rozpouštědly a v nízkých koncentracích i s vodou.

1O2P patří mezi látky s povrchově aktivními vlastnostmi. Při hoření může docházet k tvorbě toxických výparů CO, NO<sub>x</sub>, HCl a HCN (BASF THE CHEMICAL COMPANY, 2013, ANSELL, et. al., 1988).

### 2.2 Použití

1O2P se využívá jako insekticid, ve speciálních inkoustech, nátěrových hmotách i při zpracování ropy. Ve farmacii je využíván při syntéze látek obsahující alkaloidy a jako stabilizátor ve vodních směsích. Díky svým vlastnostem je využíván jako v zemědělském průmyslu. 1O2P se přidává do směsí na ochranu rostlin. Kvůli povrchově aktivním vlastnostem je zkoumán jako přídavek do šampónů. V průmyslu nachází své uplatnění jako přísada do čistících přípravků (ANSELL, et. al., 1988, BASF THE CHEMICAL COMPANY, 2013).

### 2.3 Toxicita

1O2P může negativně reagovat po kontaktu nejen s lidskou pokožkou, ale i s jinými tkáněmi.

#### 2.3.1 Vliv na člověka

1O2P patří mezi žraviny a může poškodit oči, kůži a poleptat dýchací cesty. (BASF THE CHEMICAL COMPANY, 2009). Při kontaktu s očima může dojít k neprůhlednosti rohovky po dobu 7 dnů (BASF THE CHEMICAL COMPANY, 2013). Po orálním podání může docházet k akumulaci v organismu. Mutagenita ani karcinogenita nebyla prokázána (VYORALOVÁ, 2012).

### 2.3.2 Vliv na zvířata

Ansell a spol. testovali akutní toxicitu na krysách. Látka byla podávána ve stupňovaných koncentracích po dobu 18–24 hodin. Toxikologické a farmaceutické účinky byly sledovány ve 14–denní periodě. Po skončení testu byla provedena pitva. Pitevní nálezy ukázaly poškození ledvin, jater a plic (ANSELL, et. al. , 1988).

### 2.3.3 Vliv na vodní organismy

Konkrétní data nejsou ve vědecké literatuře k dispozici, obecně lze však na základě firemních údajů uvést, že 1O2P je toxický pro vodní organismy s možnými dlouhodobými nepříznivými účinky. V závislosti na koncentraci a podmínkách může působit nepříznivě na biologické procesy u aktivovaného kalu (BASF THE CHEMICAL COMPANY , 2013).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Použité chemikálie a složení živných médií

Fenoxyethanol (SIGMA – ALDRICH, Německo)

1 – oktyl – 2 pyrrolidon (SIGMA – ALDRICH, Německo)

Tryptonový agar s kvasničným extraktem (TYA) (HIMEDIA, Indie)

R2A agar (HIMEDIA, Indie)

##### Složení TSB tekutého média

Trypton (HIMEDIA, Indie)	1,7 g
Soja pepton (HIMEDIA, Indie)	0,3 g
NaCl	0,4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
Glukosa	0,5 g
Destilovaná voda	100 ml

Dále bylo použito TSB média koncentrovaného 2x (TSB2), 4x (TSB4) a 8x (TSB8).

##### Složení syntetické odpadní vody (substrát):

Trypton (HIMEDIA, Indie)	16,0 g
Soja pepton (HIMEDIA, Indie)	11,0 g
Sacharosa	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
NaCl	0,7 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,4 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
Glukosa	0,5 g
Destilovaná voda	100 ml

##### Složení ředěného minerálního média

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 9,07 g.l <sup>-1</sup>	2 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O – 23,90 g.l <sup>-1</sup>	8 ml
Destilovaná voda	990 ml
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O – 10 g.l <sup>-1</sup>	1 ml
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1 ml

### 3.2 Použité kultury

V diplomové práci byly využity běžné mikrobiální kultury. Kultury označené CCM byly získány z České sbírky mikroorganismů Brno, ostatní byly izoláty získané v mikrobiologické laboratoři ÚIOŽP FT.

<u>Grampozitivní bakterie:</u>	Kmen
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 3953
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224
<i>Bacillus subtilis</i>	CCM 2216
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	FR6
<u>Gramnegativní bakterie:</u>	
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCM 4415
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FT1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FT2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FT3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FT4
<i>Pseudomonas sp.</i>	MP 11
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MS1
<i>Pseudomonas putida</i>	FR3

### 3.3 Použité přístroje a vybavení

Pro stanovení minimálních inhibičních a baktericidních koncentrací byly použity následující přístroje a vybavení: Aseptické boxy Telstar BIO-II-A a Thermo–Scientific MSC 1.2; kultivační boxy s teplotou 30 °C a 37 °C; Spektrofotometr Tecan SUNRISE pro 96–jamkové mikrotitrační destičky; mikroskop s fázovým kontrastem Olympus CX41; PC se software Magellan3 a Quick Photo PRO;

Kromě uvedených přístrojů byly použity 96–jamkové mikrotitrační destičky (GAMEDIUM, ČR) a běžné laboratorní vybavení pro mikrobiologickou práci.

Pro sledování toxicity látek byly použity následující přístroje: Kyslíková elektroda EO-12 (TWT) Oximetr (WTW), magnetická míchačka, pH-metr; dělicí baňky (1 l a 2 l), vzduchovací motorky, uzavřená měřicí cela, pipety, odměrné válce.

### 3.4 Metody a postupy

#### 3.4.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace fenoxoethanolu v mikrotitračních destičkách

Test pro stanovení MIC fenoxoethanolu byl prováděn v pěti dílčích pokusech v závislosti na jednotlivých výsledcích. Všechny dílčí pokusy probíhaly v mikrotitračních destičkách a každá kultura byla vždy zkoumána minimálně ve dvou paralelních sloupcích.

Cílem pokusů bylo sledování růstu testovacích kultur v tekutém médiu (TSB bujonu) (růst byl sledován měřením optické density při 600 nm) v závislosti na rostoucí koncentraci fenoxoethanolu, v jamkách mikrotitračních destiček. Ty koncentrace, které již pohledem nevykazovaly růst, byly přeměřeny na spektrofotometru Tecan při 600nm, pro zpřesnění výsledku. Nejnižší koncentrace fenoxoethanolu, při které ani po instrumentálním změření zkoumaná kultura nevytvořila zákal, byla označena jako minimální inhibiční koncentrace.

#### Část I.

1. Byl připraven zásobní roztok fenoxoethanolu o koncentraci  $10 \text{ g.l}^{-1}$  a sterilizován filtrací přes sterilní filtr o průměru pórů  $0,2 \mu\text{m}$ .
2. Byl připraven TSB2 bujon, který byl sterilizován filtrací (viz výše).
3. Byly připraveny suspenze zkoumaných kultur, prekultivované 72 hodin při  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , o hustotě 2. stupně McFarlandovy stupnice.
4. Do dvou mikrotitračních destiček (jedna pro gram – pozitivní a jedna pro gram – negativní bakteriální kultury) byly napipetovány jednotlivé složky podle tabulky 6 a destičky byly dány do kultivačního boxu na 48 hodin při  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .



**Tab. 6** Dávkování jednotlivých složek do mikrotitračních destiček pro stanovení MIC fenoxýethanolu v první části pokusu

Sloupec	Výsledná konc. FE	Zásobní Ⓞ fenoxýethanolu	TSB2 bujon	Inokulum	Sterilní destilovaná voda
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]
A	<b>0,00</b>	0	100	20	80
B	<b>0,25</b>	5	100	20	75
C	<b>0,50</b>	10	100	20	70
D	<b>0,75</b>	15	100	20	95
E	<b>1,00</b>	20	100	20	90
F	<b>1,50</b>	30	100	20	50
G	<b>2,00</b>	40	100	20	40
H	<b>3,00</b>	60	100	20	20

## Část II.

1. Byl připraven zásobní roztok fenoxýethanolu o koncentraci 20 g.l<sup>-1</sup> a sterilizován filtrací přes sterilní filtr o průměru pórů 0,2 μm.
2. Následný postup byl shodný prvním dílčím pokusem

**Tab. 7** Dávkování jednotlivých složek do mikrotitračních destiček pro stanovení MIC fenoxýethanolu v druhé části pokusu

Sloupec	Výsledná konc. FE	Zásobní Ⓞ fenoxýethanolu	TSB4 bujon	Inokulum	Sterilní destilovaná voda
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]
A	<b>0,00</b>	0	50	20	130
B	---	---	---	---	---
C	---	---	---	---	---
D	---	---	---	---	---
E	<b>2,10</b>	21	50	20	109
F	<b>3,15</b>	32	50	20	98
G	<b>4,20</b>	42	50	20	88
H	<b>6,30</b>	63	50	20	67

Část III.

1. Byl připraven zásobní roztok fenoxoethanolu o koncentraci  $20 \text{ g.l}^{-1}$  a sterilizován filtrací přes sterilní filtr o průměru pórů  $0,2 \mu\text{m}$ .
2. Byl připraven TSB4 bujon, který byl sterilizován filtrací (viz výše).
3. Následný postup se lišil v přípravě čtyř mikrotitračních destiček (dvě pro gramnegativní a dvě pro grampozitivní kultury). Dvě destičky byly spektrofotometricky změřeny při  $600 \text{ nm}$  ihned po přípravě a dvě destičky byly kultivovány po dobu 48 hodin při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  ve tmě.
4. Po kultivaci byly mikrotitrační destičky změřeny stejně jako v bodě 3.

**Tab. 8** Dávkování jednotlivých složek do mikrotitračních destiček pro stanovení MIC fenoxoethanolu ve třetí části pokusu

Sloupec	Výsledná konc. FE [g.l <sup>-1</sup> ]	Zásobní ☉ fenoxoethanolu [μl]	TSB4 bujon [μl]	Inokulum [μl]	Sterilní destilovaná voda [μl]
A	<b>3,00</b>	30	50	20	100
B	<b>4,50</b>	45	50	20	85
C	<b>6,00</b>	60	50	20	70
D	<b>7,50</b>	75	50	20	55
E	<b>9,00</b>	90	50	20	40
F	<b>10,00</b>	100	50	20	30
G	<b>11,50</b>	115	50	20	15
H	<b>13,00</b>	130	50	20	0

Část IV.

1. Byl připraven zásobní roztok fenoxoethanolu o koncentraci  $20 \text{ g.l}^{-1}$  a sterilizován filtrací přes sterilní filtr o průměru pórů  $0,2 \mu\text{m}$ .
2. Byl připraven TSB8 bujon, který byl sterilizován filtrací (viz výše).
3. Byly připraveny suspenze kultur *Enterococcus faecalis* CCM 4224 a *Bacillus subtilis* CCM 2216, prekultivované 72 hodin při  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , o hustotě 2. stupně McFarlandovy stupnice.
4. Po přípravě destiček bylo provedeno měření a kultivace stejně jako v třetím dílčím pokusu.

**Tab. 9** Dávkování jednotlivých složek do mikrotitračních destiček pro stanovení MIC fenoxýethanolu ve čtvrté části pokusu

Sloupec	Výsledná konc. FE	Zásobní Ⓞ fenoxýethanolu	TSB8 bujon	Inokulum	Sterilní destilovaná voda
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]
A	<b>13,00</b>	130	25	20	25
B	<b>13,25</b>	133	25	20	22
C	<b>13,75</b>	138	25	20	17
D	<b>14,00</b>	140	25	20	15
E	<b>14,25</b>	143	25	20	12
F	<b>14,75</b>	148	25	20	7
G	<b>15,00</b>	150	25	20	5
H	<b>15,50</b>	155	25	20	0

#### Část V.

1. Byl připraven zásobní roztok fenoxýethanolu o koncentraci 10 a 20 g.l<sup>-1</sup> a sterilizován filtrací přes sterilní filtr o průměru pórů 0,2 μm.
2. Byly připraveny TSB2 a TSB4 bujony, které byly sterilizovány filtrací (viz výše).
3. Byla připravena suspenze kultury *Bacillus subtilis* CCM 2216, prekultivované 20 hodin při 30 °C, o hustotě 2. stupně McFarlandovy stupnice.
4. Po přípravě destiček bylo provedeno měření a kultivace stejně jako v třetím dílčím pokusu.

**Tab. 10a** Dávkování jednotlivých složek do mikrotitračních destiček pro stanovení MIC fenoxýethanolu pro *Bacillus subtilis* CCM 2216 prekultivovaný 20 hodin – testované koncentrace fenoxýethanolu 0 – 3 g.l<sup>-1</sup>

Sloupec	Výsledná konc. FE	Zásobní Ⓞ fenoxýethanolu	TSB2 bujon	Inokulum	Sterilní destilovaná voda
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]
A	<b>0,00</b>	0	100	20	80
B	<b>0,25</b>	3	100	20	77
C	<b>0,50</b>	5	100	20	75
D	<b>0,75</b>	8	100	20	72
E	<b>1,00</b>	10	100	20	70
F	<b>1,50</b>	15	100	20	65
G	<b>2,00</b>	20	100	20	60
H	<b>3,00</b>	30	100	20	50

**Tab. 10b** Dávkování jednotlivých složek do mikrotitračních destiček pro stanovení MIC fenoxoethanolu pro *Bacillus subtilis* CCM 2216 prekultivovaný 20 hodin testované koncentrace fenoxoethanolu 3,5 – 13 g.l<sup>-1</sup>

Sloupec	Výsledná konc. FE [g.l <sup>-1</sup> ]	Zásobní Ⓞ fenoxoethanolu [μl]	TSB4 bujon [μl]	Inokulum [μl]	Sterilní destilovaná voda [μl]
A	<b>3,50</b>	35	50	20	95
B	<b>4,50</b>	45	50	20	85
C	<b>6,00</b>	60	50	20	70
D	<b>7,50</b>	75	50	20	55
E	<b>9,00</b>	90	50	20	40
F	<b>10,00</b>	100	50	20	30
G	<b>11,05</b>	115	50	20	15
H	<b>13,00</b>	130	50	20	0

### 3.4.2 Stanovení minimální baktericidní koncentrace fenoxoethanolu

Pro stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC) fenoxoethanolu bylo využito jamek mikrotitračních destiček, které již po kultivaci nevykazovaly tvorbu zákalu (růst bakterií). Tyto jamky byly sterilní kličkou dokonale promíchány a vyočkovány na petriho misky s TYA agarem. Misky byly kultivovány při 30 °C po dobu 48 hodin a nejnižší koncentrace účinné látky, při níž nedošlo k vyrostení kultury, byla zaznamenána jako MBC. Výsledkem tedy bylo stanovení takové koncentrace, při které naočkované bakteriální kultury nebyly schopny přežít.

### 3.4.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace 1O2P

Stanovení MIC 1O2P probíhalo celkem ve čtyřech částech.

#### Část I. – Stanovení MIC v mikrotitračních destičkách

1. Bylo připraveno 500 ml TSB bujonu.
2. Byla připravena řada koncentrací roztoku 1O2P v TSB bujonu dle tabulky 11. Po přípravě byly roztoky sterilizovány filtrací přes sterilní filtr o průměru pórů 0,2  $\mu\text{m}$ .

**Tab. 11** Dávkování složek do roztoku TSB pro stanovení MIC 1O2P v I. části testu

Sloupec	Výsledná koncentrace 1O2P v testu [mg.l <sup>-1</sup> ]	TSB bujon [ml]	Navážka 1O2P [mg]
A	<b>0</b>	40	0,0
B	<b>18</b>	200	4,0
C	<b>45</b>	100	5,0
D	<b>90</b>	50	5,0
E	<b>225</b>	50	12,5
F	<b>450</b>	20	10,0
G	<b>675</b>	50	15,0
H	<b>900</b>	20	20,0

3. Byly připraveny suspenze testovacích kultur stejně jako v předchozích pokusech.
4. Do jamek mikrotitračních destiček bylo napipetováno 180  $\mu\text{l}$  připravených roztoků TSB bujonu s 1O2P a 20  $\mu\text{l}$  zkoumané bakteriální suspenze.
5. Měření a kultivace destiček probíhalo stejně jako v předchozích testech s fenoxethanolem

#### Část II. – Stanovení MIC v mikrotitračních destičkách

1. Byl připraven TSB4 bujon, který byl sterilizován filtrací pomocí filtru s velikostí pórů 0,2  $\mu\text{m}$ .
2. Byly připraveny suspenze zkoumaných kultur stejně jako předchozích pokusech.
3. Byla připravena zásobní emulze 1O2P o koncentraci 2 g.l<sup>-1</sup>. Připravená emulze byla sterilizována v autoklávu při 120 °C po dobu 20 min.
4. Mikrotitrační destičky byly připraveny dle tabulky 12.

**Tab. 12** Dávkování složek do lahvíček pro stanovení MIC 1O2P v II. části testu

Sloupec	Výsledná konc. 1O2P [mg.l <sup>-1</sup> ]	Zásobní emulze 1O2P [μl]	Sterilní destilovaná voda [μl]	TSB4 bujon [μl]	Inokulum [μl]
A	<b>0</b>	0	130	50	20
B	<b>20</b>	2	128	50	20
C	<b>50</b>	5	125	50	20
D	<b>100</b>	10	120	50	20
E	<b>250</b>	25	105	50	20
F	<b>500</b>	50	80	50	20
G	<b>750</b>	75	55	50	20
H	<b>1000</b>	100	30	50	20

Část III. – Testování protimikrobiálního účinku 1O2P vůči kultuře *E. coli* CCM 3954 – dynamický test

**A. Příprava lahví**

1. Bylo připraveno 200 ml TSB bujonu. Živné médium bylo rozpipetováno po 20 ml do 8 inkubačních lahví o objemu 100 ml. Naplněné lahve byly sterilizovány v autoklávu při 120 °C po dobu 20 min.
2. Ve fyziologickém roztoku byla připravena suspenze kultury *E. coli* CCM 3954 o hustotě 2. st. McFarlandovy stupnice prekultivované 24 hodin. Předpokládaný počet buněk 10<sup>8</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>.
3. Po sterilizaci a zchladnutí lahví byly provedeny následující přídavky

Láhve	Výsledná konc. 1O2P
1 + 2 200 μl suspenze (kontrola růstu)	[0,0 g.l <sup>-1</sup> ]
3 + 4 22 μl OP + 200 μl suspenze	[1,0 g.l <sup>-1</sup> ]
5 + 6 110 μl OP + 200 μl suspenze	[5,0 g.l <sup>-1</sup> ]
7 + 8 případná rezerva	

Inkubace lahví probíhala na třepačce s kmitavým pohybem ve tmě při 25 °C.

**B. Odběry vzorků**

4. V časech 0, 4 a 24 hodin bylo odebráno 100  $\mu\text{l}$  vzorku ze všech lahví. V časech 0 hodin byly vzorky 100x ředěny v 9,9 ml sterilním fyziologickém roztoku. V čase 4 hodin byly 100x ředěny pouze vzorky, u kterých probíhala kontrola růstu. Takto připravené a promíchané vzorky byly asepticky pipetovány o objemu 20  $\mu\text{l}$  na povrch R2A agaru v petriho misce a rozetřeny sterilní hokejkou. Inkubace probíhala ve tmě při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin.
5. Po inkubaci byl proveden odečet počtu kolonií.

**C. Mikroskopie**

6. V časech 0, 4 a 24 hodin byly po dokonalém promíchání odebrány vzorky o objemu 10  $\mu\text{l}$ . Ty byly za použití mikroskopu Olympus CX41 mikroskopovány při zvětšení 400x s fázovým kontrastem v počítačící komůrce CYRUS II. Byly počítány počty buněk v čtvercích 50 x 50  $\mu\text{m}$ . Pro přepočet počtu buněk na 1 ml byl počet pozorovaných buněk vynásoben koeficientem 8 000 000.

**Část IV. – Testování protimikrobiálního účinku 1O2P vůči kultuře *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955****A. Příprava lahví**

1. Příprava lahví a suspenze zkoumané kultury probíhala stejně jako v předchozím dílčím pokusu. Rozdíl spočíval pouze v dávkování 1O2P.

Láhve		Výsledná konc. 1O2P
1 + 2	200 $\mu\text{l}$ suspenze (kontrola růstu)	[0,0 g.l <sup>-1</sup> ]
3 + 4	11 $\mu\text{l}$ OP + 200 $\mu\text{l}$ suspenze	[0,5 g.l <sup>-1</sup> ]
5 + 6	22 $\mu\text{l}$ OP + 200 $\mu\text{l}$ suspenze	[1,0 g.l <sup>-1</sup> ]
7 + 8	44 $\mu\text{l}$ OP + 200 $\mu\text{l}$ suspenze	[2,0 g.l <sup>-1</sup> ]
9 + 10	případná rezerva	

Inkubace lahví probíhala na třepačce s kmitavým pohybem ve tmě při 25 °C.

**B. Mikroskopie**

2. Probíhala stejně v předchozím dílčím pokusu.

### 3.4.4 Stanovení účinnosti směsi fenoxxyethanolu a 1O2P vůči kultuře *E. coli* CCM 3954

#### Část I.

1. Byl připraven zásobní roztok fenoxxyethanolu o koncentraci 20 g.l<sup>-1</sup>, který byl sterilizován filtrací filtrem o velikosti pórů 0,2 μm. Byl připraven zásobní roztok 1O2P o koncentraci 1 g.l<sup>-1</sup> a emulze 1O2P o koncentraci 2 g.l<sup>-1</sup>.
2. Byl připraven TSB4 bujon a suspenze zkoumané kultury *E. coli* CCM 3954
3. Celkem byly připraveny 4 mikrotitrační destičky, dle tabulky 13 až 17. 2 mikrotitrační destičky byly použity pro ověření MIC fenoxxyethanolu a MIC 1O2P, 2 destičky byly použity na stanovení MIC směsi obou látek. 1 mikrotitrační destička z obou sad byla proměřena ihned po přípravě spektrofotometricky na přístroji Tecan při vlnové délce 600 nm.
4. Zbylé 2 destičky byly kultivovány ve tmě při 30°C po dobu 72 hodin. Po uplynutí kultivační doby byly destičky měřeny spektrofotometricky na přístroji Tecan při 600 nm.

**Tab. 13** Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení účinnosti směsi fenoxxyethanolu s přídatkem 1O2P o konc. 200 mg.l<sup>-1</sup> pro kulturu *E. coli* CCM 3954

Sloupec	Výsledná konc.		Zásobní ⊙ fenoxxyethanolu	Zásobní ⊙ 1O2P	Inokulum	TSB4 bujon	Steril. destil. voda
	Fenoxxyethanol	1O2P					
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]
A	<b>0,0</b>	0,0	0	0	20	50	130
B	<b>0,5</b>	0,2	5	43,5	20	50	82
C	<b>1,0</b>	0,2	10	43,5	20	50	77
D	<b>2,0</b>	0,2	20	43,5	20	50	67
E	<b>3,0</b>	0,2	30	43,5	20	50	57
F	<b>4,0</b>	0,2	40	43,5	20	50	47
G	<b>4,5</b>	0,2	45	43,5	20	50	42
H	<b>5,0</b>	0,2	50	43,5	20	50	37



**Tab. 14** Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přidavkem 1O2P o konc.  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  pro kulturu *E. coli* CCM 3954

Sloupec	Výsledná konc.		Zásobní Ⓞ fenoxxyethanolu	Zásobní Ⓞ 1O2P	Inokulu m	TSB4 bujon	Steril. destil. voda
	Fenoxxyethanol	1O2P					
	$[\text{g.l}^{-1}]$	$[\text{g.l}^{-1}]$	$[\mu\text{l}]$	$[\mu\text{l}]$	$[\mu\text{l}]$	$[\mu\text{l}]$	$[\mu\text{l}]$
A	0,0	0,0	0	0	20	50	130
B	0,5	0,1	5	21,8	20	50	104
C	1,0	0,1	10	21,8	20	50	99
D	2,0	0,1	20	21,8	20	50	89
E	3,0	0,1	30	21,8	20	50	79
F	4,0	0,1	40	21,8	20	50	69
G	4,5	0,1	45	21,8	20	50	64
H	5,0	0,1	50	21,8	20	50	59

**Tab. 15** Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přidavkem 1O2P o konc.  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  pro kulturu *E. coli* CCM 3954

Sloupec	Výsledná konc.		Zásobní Ⓞ fenoxxyethanolu	Zásobní Ⓞ 1O2P	TSB4 bujon	Inokulum	Ster. voda
	Fenoxxyethanol	1O2P					
	$[\text{g.l}^{-1}]$	$[\text{g.l}^{-1}]$	$[\mu\text{l}]$	$[\mu\text{l}]$	$[\mu\text{l}]$	$[\mu\text{l}]$	$[\mu\text{l}]$
A	0,0	0,00	0	0	50	20	130
B	0,5	0,05	5	10,9	50	20	115
C	1,0	0,05	10	10,9	50	20	110
D	2,0	0,05	20	10,9	50	20	100
E	3,0	0,05	30	10,9	50	20	90
F	4,0	0,05	40	10,9	50	20	80
G	4,5	0,05	45	10,9	50	20	75
H	5,0	0,05	50	10,9	50	20	70

**Tab. 16** Příprava mikrotitračních destiček pro ověření MIC fenoxxyethanolu pro kulturu*E. coli* CCM 3954

Sloupec	Výsledná konc. fenoxxyethanolu [mg.l <sup>-1</sup> ]	Zásobní Ⓞ fenoxxyethanolu [μl]	Sterilní destilovaná voda [μl]	TSB4 bujon [μl]	Inokulum [μl]
A	<b>0,0</b>	0	130	50	20
B	<b>0,5</b>	5	128	50	20
C	<b>1,0</b>	10	125	50	20
D	<b>2,0</b>	20	120	50	20
E	<b>3,0</b>	30	105	50	20
F	<b>4,0</b>	40	80	50	20
G	<b>4,5</b>	45	55	50	20
H	<b>5,0</b>	50	30	50	20

**Tab. 17** Příprava mikrotitračních destiček pro ověření MIC 1O2P pro kulturu *E. coli*

CCM 3954

Výsledná konc. 1O2P [mg.l <sup>-1</sup> ]	Zásobní emulze 1O2P [μl]	Sterilní destilovaná voda [μl]	TSB4 bujon [μl]	Inokulum [μl]
0	0	130	50	20
20	2	128	50	20
50	5	125	50	20
100	10	120	50	20
250	25	105	50	20
500	50	80	50	20
750	75	55	50	20
1000	100	30	50	20

Část II. – Stanovení účinnosti směsi fenoxoethanolu a 1O2P na kulturu *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

1. Byl připraven zásobní roztok fenoxoethanolu o koncentraci 20 g.l<sup>-1</sup>, který byl sterilizován filtrací filtrem o velikosti pórů 0,2 μm. Byl připraven zásobní roztok 1O2P o koncentraci 1 g.l<sup>-1</sup>.
2. Byly připraveny TSB4 a TSB8 bujony, které byly sterilizovány filtrací stejně jako v předchozích testech.
3. Byla připravena suspenze zkoumané kultury.
4. Destičky byly napipetovány dle tabulek 18 – 23.
5. Měření a kultivace probíhaly stejně jako v předcházejících pokusech.

**Tab. 18** Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxoethanolu s přidavkem 1O2P o konc. 50 mg.l<sup>-1</sup> pro kulturu *Ps. aeruginosa* CCM 3955

Sloupec	Výsledná konc.		Zásobní ☉ fenoxoethanolu	Zásobní ☉ 1O2P	TSB4 bujon	Inokulum	Ster. dest. voda
	Fenoxoethanol	1O2P					
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]
A	<b>0,00</b>	0,00	0	0,0	50	20	130
B	<b>0,50</b>	0,05	5	10,8	50	20	115
C	<b>1,00</b>	0,05	10	10,8	50	20	110
D	<b>2,00</b>	0,05	20	10,8	50	20	100
E	<b>3,00</b>	0,05	30	10,8	50	20	90
F	<b>4,00</b>	0,05	40	10,8	50	20	80
G	<b>4,25</b>	0,05	43	10,8	50	20	77
H	<b>4,50</b>	0,05	45	10,8	50	20	75

**Tab. 19** Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxoethanolu s přidavkem 1O2P o konc. 100 mg.l<sup>-1</sup> pro kulturu *Ps. aeruginosa* CCM 3955

Sloupec	Výsledná konc.		Zásobní ☉ fenoxoethanolu	Zásobní ☉ 1O2P	TSB4 bujon	Inokulum	Ster. dest. voda
	Fenoxoethanol	1O2P					
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]
A	<b>0,00</b>	0,0	0	0,0	50	20	130
B	<b>0,50</b>	0,1	5	21,7	50	20	104
C	<b>1,00</b>	0,1	10	21,7	50	20	99
D	<b>2,00</b>	0,1	20	21,7	50	20	89
E	<b>3,00</b>	0,1	30	21,7	50	20	79
F	<b>4,00</b>	0,1	40	21,7	50	20	69
G	<b>4,25</b>	0,1	43	21,7	50	20	66
H	<b>4,50</b>	0,1	45	21,7	50	20	64



**Tab. 23** Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přídatkem 1O2P o konc. 600 mg.l<sup>-1</sup> pro kulturu *Ps. aeruginosa* CCM 3955

Sloupec	Výsledná konc.		Zásobní ⊙ fenoxxyethanolu	Zásobní ⊙ 1O2P	TSB8 bujon	Inokulum	Ster. dest. voda
	Fenoxxyethanol [g.l <sup>-1</sup> ]	1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]					
A	<b>0,00</b>	0,0	0	0	25	20	155
B	<b>0,50</b>	0,6	5	130	25	20	20
C	<b>1,00</b>	0,6	10	130	25	20	15
D	<b>2,00</b>	0,6	20	130	25	20	5
E	<b>2,25</b>	0,6	23	130	25	20	2
F	---	---	---	---	---	---	---
G	---	---	---	---	---	---	---
H	---	---	---	---	---	---	---

Část II. – Stanovení účinnosti směsi fenoxxyethanolu a 1O2P oproti kulturám

*Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Bacillus subtilis* CCM 4224 prekultivovaný 20 hodin

1. Byl připraven zásobní roztok fenoxxyethanolu o koncentraci 20 g.l<sup>-1</sup>, který byl sterilizován filtračním filtrem o velikosti pórů 0,2 μm. Byl připraven zásobní roztok 1O2P o koncentraci 1 g.l<sup>-1</sup>.
2. Byly připraveny TSB2 a TSB4 bujony, které byly sterilizovány filtračním filtrem stejně jako v předchozích testech.
3. Byly připraveny suspenze zkoumaných kultur.
4. Destičky byly napipetovány dle tabulek 24 – 26.
5. Měření a kultivace probíhaly stejně jako v předcházejících pokusech.

**Tab. 24** Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přidavkem 1O2P o konc. 50 mg.l<sup>-1</sup> pro kultury *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Bacillus subtilis* CCM 4224

Sloupec	Výsledná konc.		Zásobní ☉ fenoxxyethanolu	Zásobní ☉ 1O2P	TSB2 bujon	Inokulum	Ster. dest. voda
	Fenoxxyethanol	1O2P					
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]
A	0,0	0,00	0	0,0	100	20	80
B	0,5	0,05	5	10,8	100	20	65
C	1,0	0,05	10	10,8	100	20	60
D	2,0	0,05	20	10,8	100	20	50
E	3,0	0,05	30	10,8	100	20	40
F	4,0	0,05	40	10,8	100	20	30
G	5,0	0,05	50	10,8	100	20	20
H	6,0	0,05	60	10,8	100	20	10

**Tab. 25** Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přidavkem 1O2P o konc. 100 mg.l<sup>-1</sup> pro kultury *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Bacillus subtilis* CCM 4224

Sloupec	Výsledná konc.		Zásobní ☉ fenoxxyethanolu	Zásobní ☉ 1O2P	TSB4 bujon	Inokulum	Ster. dest. voda
	Fenoxxyethanol	1O2P					
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]
A	0,0	0,0	0	0,0	50	20	130
B	0,5	0,1	5	21,7	50	20	104
C	1,0	0,1	10	21,7	50	20	99
D	2,0	0,1	20	21,7	50	20	89
E	3,0	0,1	30	21,7	50	20	79
F	4,0	0,1	40	21,7	50	20	69
G	5,0	0,1	50	21,7	50	20	59
H	6,0	0,1	60	21,7	50	20	49

**Tab. 26** Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxoethanolu s přidavkem 1O2P o konc. 200 mg.l<sup>-1</sup> pro kultury *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Bacillus subtilis* CCM 4224

Sloupec	Výsledná konc.		Zásobní ⊙ fenoxoethanolu	Zásobní ⊙ 1O2P	TSB4 bujon	Inokulum	Ster. dest. voda
	Fenoxoethanol [g.l <sup>-1</sup> ]	1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]					
A	0,0	0,0	0	0,0	50	20	130
B	0,5	0,2	5	43,5	50	20	82
C	1,0	0,2	10	43,5	50	20	77
D	2,0	0,2	20	43,5	50	20	67
E	3,0	0,2	30	43,5	50	20	57
F	4,0	0,2	40	43,5	50	20	47
G	5,0	0,2	50	43,5	50	20	37
H	6,0	0,2	60	43,5	50	20	27

### 3.4.5 Sledování toxicity látek vůči aktivovanému kalu

Metoda je založená na sledování účinku testované látky na spotřebě kyslíku mikroorganismy aktivovanému kalu. V tomto pokusu byl návod k laboratorní úloze – respirace z předmětu Technologická cvičení I na Ústavu životního prostředí Fakulty technologické, který je dostupný na internetových stránkách ústavu. Dále byla použita norma ČSN EN ISO 8192 – Jakost vod – zkouška inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem při oxidaci uhlíkatých látek a amoniakálního dusíku (ČSN EN ISO 8192, 2007).

Pokus je založen na sledování úbytku kyslíku v kalu v přítomnosti různých koncentracích zkoušených toxických látek. Kyslík je měřen v uzavřené měřící cele pomocí kyslíkové elektrody za stálého míchání. Zapisování naměřených dat a jejich vyhodnocování je prováděno v počítači.

V tomto pokusu byl použit aerobní kal s čistírny odpadních vod Malenovice.

Sledování toxicity fenoxýethanolu**A. Příprava aerobního kalu**

1. Byla stanovena sušina kalu.
  - a. Byly zváženy předem vysušené filtrační papíry „červená páska“.
  - b. Bylo filtrováno pod tlakem 10 ml zásobního roztoku aerobního kalu. Filtrační papír s kalem byl sušen v sušárně při 105 °C po dobu 2 hodin. Poté byly papírky s vysušeným kalem uloženy ke schládnutí v exikátoru se silikagelem po dobu pul hodiny. Následně byly vzorky opět zváženy. Sušina kalu byla vypočítána dle vztahu /2/

$$S = \frac{m_{\text{pap.}+\text{vz.}} - m_{\text{pap.}}}{V} * 1000 \quad /2/$$

Kde:

S	- sušina kalu	[g.l <sup>-1</sup> ]
m <sub>pap</sub>	- hmotnost filtračního papírku	[g]
m <sub>pap.+vz.</sub>	- hmotnost filtračního papírku se vzorkem kalu	[g]
V	- pipetovaný objem kalu	[ml]

2. 2 l kalu o koncentraci sušiny cca 5 g.l<sup>-1</sup> bylo rozlito do 4 lahví, které byly centrifugovány na centrifuze Rotanta při 3600 ot./min a 25 °C.
3. Supernatant byl slit a sediment byl rozmíchán ve stejném objemu v ředěném minerálním médiu (ŘMM). To vše bylo opakováno ještě 2x. Finální resuspendace byla provedena na celkový objem 1,5 l.
4. Kal byl udržován ve 2 l dělicí nálevce za stálého provzdušňování po dobu 48 hodin.

**B. Měření respirace**

5. Do testovacích dělicích nálevek byly dávkovány jednotlivé složky dle tabulky 27.



**Tab. 27** Dávkování jednotlivých složek pro stanovení respirace aktivovaného kalu s přidavkem fenoxylethanolu

	Koncentrace fenoxylethanolu	Fenoxylethanol koncentrovaný	Zásobní suspenze kalu	Zásobní $\odot$ substrátu	ŘMM	Celkový objem směsi
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g]	[ml]	[ml]	[ml]	[ml]
<b>Kontrola</b>	0,0	0,0	100	20	380	500
<b>Vz. 1</b>	0,2	0,1	100	20	380	500
<b>Vz. 2</b>	1,0	0,5	100	20	380	500
<b>Vz. 3</b>	2,0	1,0	100	20	380	500
<b>Vz. 4</b>	5,0	2,5	100	20	378	500
<b>Vz. 5</b>	10,0	5,0	100	20	377	500
<b>Vz. 6</b>	20,0	10,0	100	20	375	500

6. Po přípravě testovací děličky byl připravený vzorek probubláván vzduchem po dobu 30 min a tím byl i dokonale promícháván.

7. Po uplynutí této doby byla vzorkem naplněna měřící cela bez bublin. Zaznamenávání kyslíku probíhalo v PC pomocí software LabView po dobu 10 min.

8. Během měření respirace bylo měřeno pH zkoumaných vzorků.

### C. Vyhodnocení výsledků

9. Z naměřených dat byly sestrojeny grafy v závislosti koncentrace kyslíku na čase.

10. Byla vypočítána specifická respirační rychlost „ $r_s$ “ dle vztahu /3/.

$$r_s = \frac{dS}{dt} * \frac{1}{s} \quad /3/$$

Kde:

$r_s$  - specifická respirační rychlost [mgO<sub>2</sub>.hod<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>]

dS - změna koncentrace O<sub>2</sub> za daný časový interval dt [1]

s - sušina kalu [g.l<sup>-1</sup>]

Pro výpočet hodnoty  $\frac{dS}{dt}$  byla použita rovnice přímky z rovnice regrese po převedení na správné časové jednotky.

11. Z vypočtených specifických rychlostí byla vypočítána inhibice pro jednotlivé testované koncentrace látky dle vztahu /4/.

$$I = \frac{(r_{sK} - r_{sT})}{r_{sK}} * 100 \quad /4/$$

Kde:

I	- Inhibice	[%]
$r_{sK}$	- specifická rychlost spotřeby O <sub>2</sub> u kontroly	[mgO <sub>2</sub> .hod <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> ]
$r_{sT}$	- specifická rychlost spotřeby O <sub>2</sub> u suspenze s testovanou toxickou látkou	[mgO <sub>2</sub> .hod <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> ]

12. Z vypočtených hodnot inhibice byla sestrojena inhibiční křivka v závislosti inhibice na logaritmu koncentrace testované toxické látky. Extrapolací z grafu nebo výpočtem byla zjištěna hodnota inhibice spotřeby kyslíku o 50 % (EC<sub>50</sub>).

#### Sledování toxicity 1O2P

##### **A. Příprava kalu**

1. Byla stanovena a upravena sušina kalu na koncentraci cca 5 g.l<sup>-1</sup>.
2. Další postup byl shodný s předcházejícím pokusem s fenoxethanolem.

##### **B. Měření respirace**

3. Do testovacích dělicích nálevek byly dávkovány jednotlivé složky dle tabulky 28

**Tab. 28** Dávkování jednotlivých složek pro stanovení respirace aktivovaného kalu s přísávkem 1O2P

	Koncentrace 1O2P	1O2P koncentrovaný	Zásobní suspenze kalu	Zásobní ⊙ substrátu	ŘMM	Celkový objem směsi
	[mg.l <sup>-1</sup> ]	[g]	[ml]	[ml]	[ml]	[ml]
<b>Kontrola</b>	0,0	0,000	100	20	380	500
<b>Vz. 1</b>	10	0,005	100	20	380	500
<b>Vz. 2</b>	50	0,025	100	20	380	500
<b>Vz. 3</b>	100	0,050	100	20	380	500
<b>Vz. 4</b>	200	0,100	100	20	380	500
<b>Vz. 5</b>	400	0,200	100	20	380	500
<b>Vz. 6</b>	600	0,300	100	20	380	500
<b>Vz. 7</b>	800	0,400	100	20	380	500
<b>Vz. 8</b>	1000	0,500	100	20	380	500
<b>Vz. 9</b>	2000	1,000	100	20	379	500

4. Následující postup byl shodný s testem s fenoxýethanolem.

### C. Vyhodnocení výsledků

5. Následující postup byl shodný s testem s fenoxýethanolem.

### 3.4.6 Vedlejší testy

#### Test přítomnosti spor *Bacillus subtilis* CCM 4224

Zkoumaná kultura byla kultivována na TYA agaru po dobu 20 a 72 hodin při 30 °C. Následně byla připravena suspenze ve sterilním fyziologickém roztoku. Suspenze byly umístěny na 11min do vodní lázně o teplotě 80 °C. Po uplynulé době byla suspenze vyočkována sterilní kličkou na petriho misky s TYA agarem. Misky byly kultivovány při 30 °C po dobu 48 hodin. Po uplynutí kultivační doby byl pozorován růst buněk.

#### Test na identifikaci bakterie, která kontaminovala jamky v mikrotitračních destičkách

Během druhého dílčího pokusu s 1O2P došlo ke kontaminaci jamek s kulturami *Klebsiella pneumoniae*, *Rhodococcus erythropolis* a *Enterococcus faecalis*. Kontaminaci doprovázela zelené zbarvení typické pro kulturu *Pseudomonas aeruginosa*.

Kontaminované jamky byly vyočkovány sterilní kličkou na selektivní cetrimidový agar. Vzorky byly kultivovány při 30 °C po dobu 48 hodin.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Práce s fenoxylethanolem

V rámci pokusů s fenoxylethanolem vůči čistým bakteriálním kulturám byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). Stanovení MIC probíhalo v 96–jamkových mikrotitračních destičkách. Bylo sledováno celkem 8 bakteriálních kultur (4 grampozitivní: *Staphylococcus aureus* CCM 3953; *Enterococcus faecalis* CCM 4224; *Bacillus subtilis* CCM 2216; *Rhodococcus erythropolis* FR6 a 4 gramnegativní: *Escherichia coli* CCM 3954; *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415; *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955; *Pseudomonas* sp. MP 11).

Hodnocení zákalu coby indikátoru růstu probíhalo dvojím způsobem. Prvním způsobem bylo hodnocení vizuálně. Druhý způsob měření zákalu probíhal spektrofotometricky při 600 nm.

#### 4.1.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace fenoxylethanolu vůči čistým bakteriálním kulturám

Podle postupu v kap. 3.4.1 byly připraveny 96–jamkové mikrotitrační destičky. Vyhodnocení růstu prvního a druhého dílčího pokusu je uvedeno v tabulkách 29 až 32.

**Tab. 29** Sledování růstu grampozitivních kultur s přidavkem fenoxylethanolu o výsledné koncentraci 0 – 3 g.l<sup>-1</sup>

Konc. fenoxylethanolu [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216	<i>Rhodococcus erythropolis</i> FR6
0,00	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+
0,50	+	+	+	+
0,75	+	+	+	+
1,00	+	+	+	+
1,50	+	+	+	+
2,00	+	+	+	+
3,00	+	+	+	+

+ zákal

**Tab. 30** Sledování růstu gramnegativních s přidavkem fenoxxyethanolu o výsledné koncentraci 0 – 3 g.l<sup>-1</sup>

Konc. fenoxxyethanolu [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954		<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4415		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955		<i>Pseudomonas sp.</i> MP 11	
0,00	+	+	+	+	++	++	++	++
0,25	+	+	+	+	++	++	++	++
0,50	+	+	+	+	++	++	++	++
0,75	+	+	+	+	++	++	++	++
1,00	+	+	+	+	++	++	++	++
1,50	+	+	+	+	++	++	++	++
2,00	+	+	+	+	++	++	++	++
3,00	+	+	+	+	+	+	+	++

++ → silný zákal      + → zákal

Jelikož z výsledků uvedených v tabulkách 29 a 30 bylo zřejmé, že nedošlo k inhibici růstu bakterií, bylo zapotřebí zvýšit výslednou koncentraci fenoxxyethanolu.

**Tab. 31** Sledování růstu grampozitivních kultur s přidavkem fenoxxyethanolu o koncentraci 0,0 – 6,3 g.l<sup>-1</sup>

Konc. fenoxxyethanolu [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953		<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224		<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216		<i>Rhodococcus erythropolis</i> FR6	
0,00	+	+	+	+	+	+	++	++
2,10	+	+	+	+	+	+	+	+
3,15	+	+	+	+	+	+	+	+
4,20	+	+	+	+	+	+	+	+
6,30	+	+	+	+	+	+	+	+

++ silný zákal      + zákal

**Tab. 32** Sledování růstu gramnegativních s přidavkem zásobního roztoku fenoxoethanolu o výsledné koncentraci 0,0 – 6,3 g.l<sup>-1</sup>

Konc. fenoxoethanolu [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954		<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4415		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955		<i>Pseudomonas sp.</i> MP 11	
0,00	+	+	+	+	+	+	++	++
2,10	+	+	+	++	+	+	++	++
3,15	+	+	+	+	+	+	++	++
4,20	+	+	+	+	+	+	+	+
6,30	+	+	+	+	+	+	+	+

++ silný zákal      + zákal

Výsledky z prvního i druhého dílčího pokusu pro stanovení MIC fenoxoethanolu, jež jsou uvedeny v tabulkách 29 – 32, neprokázaly bakteriostatické vlastnosti zkoumané látky. Stále docházelo k viditelnému růstu kultur, který byl pozorován ve formě silného zákalu, hlavně u kultur rodu *Pseudomonas*, a to i ve vyšších koncentracích fenoxoethanolu. Proto byl růst bakterií (zákal) vyhodnocen pouze pohledem a nebylo zapotřebí spektrofotometrického měření.

V následujícím dílčím pokusu byly připraveny roztoky o koncentraci fenoxoethanolu 3 až 13 g.l<sup>-1</sup>. Jelikož během tohoto pokusu již došlo v některých případech k zastavení růstu kultur, byl ten tento pokus opakován s rozdílem přípravy dvou paralelních destiček. Jedna byla spektrofotometricky měřena před kultivací (Před) a druhá po kultivaci (Po), aby bylo možné určit, při jaké koncentraci již nedochází k vytvoření zákalu. Výsledky z měření zákalu v jamkách vizuálně (Vis) i přístrojově jsou uvedeny v následujících tabulkách 33 až 34.

Tab. 33 Porovnávací tabulka z vyhodnocení MIC fenoxoethanolu o konc. 3 – 13 g.l<sup>-1</sup> vizuálně i přístrojově pro gramnegativní bakterie

Konc. PHE [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954			<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4415			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955			<i>Pseudomonas</i> sp. MP 11		
	Vis	A [I]		Vis	A [I]		Vis	A [I]		Vis	A [I]	
	Před	Po	Před	Po	Před	Po	Před	Po	Před	Po	Před	Po
3,0	+	0,083	0,404	+	0,090	0,404	±	0,065	0,128	+	0,088	0,631
	+	0,086	0,409	+	0,086	0,416	±	0,072	0,114	+	0,082	0,538
4,5	-	<b>0,097</b>	<b>0,084</b>	±	0,085	0,193	-	<b>0,074</b>	<b>0,076</b>	-	<b>0,094</b>	<b>0,073</b>
	-	<b>0,086</b>	<b>0,080</b>	±	0,092	0,209	-	<b>0,084</b>	<b>0,075</b>	-	<b>0,082</b>	<b>0,064</b>
6,0	-	0,083	0,071	-	<b>0,087</b>	<b>0,061</b>	-	0,082	0,068	-	0,089	0,073
	-	0,082	0,078	-	<b>0,087</b>	<b>0,062</b>	-	0,089	0,067	-	0,093	0,060
7,5	-	0,112	0,061	-	0,086	0,068	-	0,076	0,060	-	0,126	0,081
	-	0,079	0,083	-	0,081	0,058	-	0,083	0,061	-	0,088	0,074
9,0	-	0,076	0,072	-	0,082	0,069	-	0,079	0,065	-	0,095	0,084
	-	0,079	0,077	-	0,075	0,064	-	0,158	0,066	-	0,089	0,087
10,0	-	0,075	0,064	-	0,082	0,070	-	0,103	0,066	-	0,093	0,081
	-	0,074	0,071	-	0,073	0,066	-	0,081	0,066	-	0,089	0,085
11,5	-	0,101	0,073	-	0,084	0,065	-	0,082	0,072	-	0,078	0,087
	-	0,080	0,075	-	0,065	0,065	-	0,080	0,073	-	0,091	0,080
13,0	-	0,075	0,075	-	0,071	0,070	-	0,074	0,064	-	0,079	0,088
	-	0,074	0,074	-	0,080	0,066	-	0,070	0,075	-	0,082	0,081

+ zákal

± mírný zákal

- bez zákalu



Tab. 34 Porovnávací tabulka z vyhodnocení MIC fenoxoethanolu o konc. 3 – 13 g.l<sup>-1</sup> vizuálně i přístrojově pro grampozitivní bakterie

Konc. PHE [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953			<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224			<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216			<i>Rhodococcus erythropolis</i> FR6		
	Vis	A [I]		Vis	A [I]		Vis	A [I]		Vis	A [I]	
		Před	Po		Před	Po		Před	Po		Před	Po
3,0	+	0,084	0,424	+	0,059	0,674	+	0,105	0,478	+	0,096	0,134
	+	0,085	0,402	+	0,067	0,703	+	0,072	0,438	+	0,103	0,745
4,5	* +	0,083	0,229	+	0,059	0,635	±	0,077	0,401	** +	0,097	0,579
	* +	0,082	0,206	+	0,064	0,677	±	0,078	0,401	+	0,101	0,766
6,0	-	<b>0,078</b>	<b>0,084</b>	+	0,060	0,564	-	<b>0,080</b>	<b>0,082</b>	** +	0,097	0,111
	-	<b>0,084</b>	<b>0,074</b>	+	0,064	0,685	-	<b>0,073</b>	<b>0,067</b>	-	0,091	0,282
7,5	-	0,075	0,074	-	<b>0,060</b>	<b>0,062</b>	-	0,080	0,067	-	<b>0,093</b>	<b>0,105</b>
	-	0,080	0,098	-	<b>0,063</b>	<b>0,070</b>	-	0,082	0,072	-	<b>0,096</b>	<b>0,096</b>
9,0	-	0,074	0,070	-	0,060	0,087	-	0,076	0,059	-	0,093	0,091
	-	0,077	0,071	-	0,064	0,228	-	0,079	0,067	-	0,094	0,116
10,0	-	0,072	0,072	-	0,062	0,075	-	0,073	0,067	-	0,089	0,074
	-	0,078	0,075	-	0,066	0,070	-	0,085	0,061	-	0,092	0,074
11,5	-	0,073	0,071	-	0,059	0,057	-	0,085	0,059	-	0,095	0,100
	-	0,073	0,080	-	0,059	0,062	-	0,070	0,068	-	0,090	0,083
13,0	-	0,079	0,076	-	0,061	0,060	-	0,068	0,066	-	0,099	0,068
	-	0,078	0,066	-	0,068	0,066	-	0,076	0,058	-	0,097	0,086

+ zákal

± mírný zákal

- bez zákalu

Tučně znázorněné hodnoty v tabulkách 33 a 34 byly označeny jako MIC fenoxýethanolu. Z naměřených hodnot absorbance byly zaznamenány stejné hodnoty MIC jako z pozorování zákalu vizuálně. Jelikož v předchozím testu probíhalo zvyšování koncentrace fenoxýethanolu o  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ , došlo v následném dílčím pokusu ke zpřesnění použitím menších rozdílů mezi jednotlivými odstupňovanými koncentracemi fenoxýethanolu.

Legenda k tabulce 34 pro kultury *Staphylococcus aureus* a *Rhodococcus erythropolis*.

\* U kultury *St. aureus* CCM 3953 byla pozorována tvorba prstence u koncentrace fenoxýethanolu  $4,5 \text{ g.l}^{-1}$ , jenž byla poslední koncentrací, při které docházelo k množení bakteriální kultury.

\*\* U kultury *Rhodococcus erythropolis* FR6 byla zaznamenána tvorba sedimentu u koncentrací fenoxýethanolu  $4,0$  a  $6,5 \text{ g.l}^{-1}$ , pouze v jednom z paralelních sloupců.

Jelikož pro následující test nedošlo k oživení kultury *Pseudomonas* sp. MP11, která byla vyočkována z mrazicího boxu, byla pro pokus použita kultura *Pseudomonas fluorescens* MS1, která byla oživena ve stejný den a jako *Pseudomonas* sp. MP11 a prekultivovaná stejnou dobu jako ostatní testovací kultury.

Také v následujícím dílčím testu probíhalo hodnocení zákalu vizuálně (Vis) a přístrojově před kultivací (Před) a po kultivaci (Po).

Tab. 35 Porovnávací tabulka pro zpřesnění MIC fenoxýethanolu o konc. 3 – 7 g.l<sup>-1</sup> pro gramnegativní bakterie

Konc. PHE [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954 A [1]			<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4415 A [1]			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 A [1]			<i>Pseudomonas fluorescens</i> MS1 A [1]					
	Vis	Před	Po	Vis	Před	Po	Vis	Před	Po	Vis	Před	Po			
3,0	+	0,069	0,405	0,459	0,081	0,390	0,399	+	0,075	0,634	0,485	+	0,067	0,589	0,543
	+	0,072	0,367	0,386	0,082	0,396	0,357	+	0,077	0,655	0,689	+	0,068	0,530	0,507
3,5	+	0,064	0,375	0,443	0,077	0,345	0,397	+	0,077	0,654	0,524	+	0,070	0,339	0,357
	+	0,069	0,456	0,506	0,086	0,345	0,374	+	0,079	0,830	0,853	+	0,070	0,342	0,392
4,0	+	0,072	0,351	0,423	0,077	0,201	0,302	+	0,081	0,328	0,408	+	0,071	0,279	0,300
	+	0,069	0,326	0,477	0,083	0,291	0,347	+	0,082	0,605	0,334	+	0,055	0,287	0,340
4,5	+	0,068	0,265	0,336	0,086	0,352	0,470	±	0,086	0,243	0,245	±*	0,067	0,332	0,382
	+	0,075	0,273	0,343	0,092	0,235	0,337	±	0,081	0,299	0,552	±*	0,069	0,242	0,232
5,0	±	0,069	0,062	---	0,081	0,192	---	-	0,075	0,076	---	-	0,066	0,069	---
	-	0,067	0,066	---	0,083	0,151	---	-	0,080	0,088	---	±	0,066	0,177	---
5,5	-	0,070	0,087	0,091	0,076	0,077	0,117	-	0,085	0,077	0,082	-	0,068	0,071	0,113
	-	0,066	0,105	0,090	0,077	0,103	0,106	-	0,082	0,068	0,077	-	0,066	0,068	0,105
6,0	-	0,065	0,071	0,074	0,073	0,068	0,076	-	0,074	0,070	0,083	-	0,067	0,063	0,080
	-	0,070	0,064	0,070	0,072	0,075	0,082	-	0,083	0,070	0,072	-	0,066	0,065	0,079
7,0	-	0,065	0,066	0,068	0,074	0,069	0,070	-	0,077	0,075	0,074	-	0,063	0,067	0,067
	-	0,063	0,066	0,092	0,078	0,076	0,093	-	0,077	0,074	0,074	-	0,068	0,033	0,091

+ zákal

± mírný zákal

- bez zákalu

\* tvorba mikrokolonií

Tab. 36 Porovnávací tabulka pro zpřesnění MIC fenoxylethanolu o konc. 3 – 7 g.l<sup>-1</sup> pro gramnegativní bakterie

Konc. PHE [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953			<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224			<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216			<i>Rhodococcus erythropolis</i> FR6		
	Vis	Před	Po	Vis	Před	Po	Vis	Před	Po	Vis	Před	Po
3,5	+	0,068	0,544	+	0,056	0,682	+	0,067	0,303	+	0,095	0,699
	+	0,070	0,518	+	0,058	0,673	+	0,072	0,308	+	0,092	0,729
4,0	+	0,069	0,586	+	0,060	0,633	+	0,075	0,326	+	0,113	0,715
	+	0,073	0,649	+	0,059	0,642	+	0,067	0,317	+	0,107	0,672
4,5	+	0,073	0,614	+	0,058	0,649	+	0,072	0,621	+	0,100	0,647
	+	0,074	0,530	+	0,058	0,627	+	0,093	0,321	+	0,108	0,642
5,0	+	0,069	0,503	+	0,057	0,644	+	0,095	0,367	+	0,108	0,678
	+	0,070	0,393	+	0,060	0,642	+	0,078	0,572	+	0,117	0,631
5,5	+	0,074	0,438	+	0,059	0,587	±	0,068	0,271	+	0,111	0,850
	±	0,076	0,217	+	0,061	0,585	±	0,072	0,218	+	0,110	0,607
6,0	+	0,076	0,203	+	0,058	0,534	-	0,076	0,073	+	0,105	0,560
	±	0,073	0,143	+	0,061	0,552	+	0,07	0,455	+	0,109	0,552
6,5	-	0,077	0,102	+	0,059	0,539	+	0,069	0,501	+	0,108	0,582
	-	0,073	0,127	+	0,064	0,567	+	0,076	0,420	+	0,110	0,572
7,0	-	0,077	0,096	+	0,056	0,494	-	0,072	0,069	+	0,106	0,471
	-	0,080	0,093	+	0,062	0,488	-	0,072	0,131	+	0,106	0,443

+ zákal

± mírný zákal

- bez zákalu

Tučně zvýrazněné hodnoty v tabulkách 35 a 36, ukazují výsledné minimální inhibiční koncentrace pro gramnegativní a grampozitivní kultury.

Důvodem dvojího spektrofotometrického měření po kultivaci u gramnegativních kultur byla tvorba mikrokolonií ve větším počtu jamek. První měření probíhalo ihned po ukončení kultivační doby, druhé měření proběhlo po dokonalém mechanickém rozmíchání sterilní kličkou a byl sledován rozdíl absorbancí před mícháním a po zamíchání. I když po zamíchání došlo k nárůstu absorbancí u všech vzorků MIC, na konečnou hodnotu MIC míchání vliv nemělo, kromě kultury *Pseudomonas fluorescens*. Po rozmíchání došlo k mírnému zvýšení hodnoty absorbance, i když zákal pozorován nebyl. Druhé hodnoty absorbance u gramnegativních kultur pro výslednou koncentraci fenoxoethanolu 5,0 g.l<sup>-1</sup> nebyly stanoveny, neboť tato koncentrace fenoxoethanolu byla připravována v separátních jamkách. Jelikož po kultivaci nedošlo k tvorbě sedimentu ani k tvorbě mikrokolonií ani u jedné ze sledovaných kultur, nebylo zapotřebí provádět dvojí měření.

#### 4.1.2 Stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC) fenoxoethanolu

Předcházející pokusy stanovení MIC byly využity i pro stanovení MBC, dle postupu uvedeného v metodické části, a výsledky jsou uvedeny v tabulkách 37 – 40.

**Tab. 37** Stanovení MBC fenoxoethanolu pro grampozitivní bakterie

Konc. fenoxoethanolu [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953		<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224		<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216		<i>Rhodococcus erythropolis</i> FR6	
	<b>5,5</b>	---	---	---	---	+	+	---
<b>6,0</b>	+	+	---	---	+	+	---	---
<b>6,5</b>	+	+	---	---	+	+	---	---
<b>7,0</b>	+	+	---	---	+	+	---	---
<b>7,5</b>	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>9,0</b>	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>10,0</b>	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>11,5</b>	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>13,0</b>	-	-	+	+	+	+	+	-

+ růst

- bez nárůstu

--- nebylo stanovováno

Jako minimální baktericidní koncentrace byla označena koncentrace, při které již nedocházelo k růstu buněk na TYA agaru.

Z tabulky 37 byla stanovena MBC fenoxoethanolu *Staphylococcus aureus* CCM 3953 na 7,5 g.l<sup>-1</sup>. Koncentrace fenoxoethanolu 13,0 g.l<sup>-1</sup> byla označena jako hraniční pro kulturu *Rhodococcus erythropolis* FR6, neboť došlo k růstu v jednom ze dvou paralelních vzorků. Z tohoto testu nebylo možné stanovit MBC kultur *Bacillus subtilis* CCM 2216 a *Enterococcus faecalis* CCM 4224. Proto byla ještě připravena sada koncentrací fenoxoethanolu v rozmezí 13,0 – 15,5 g.l<sup>-1</sup>.

**Tab. 38** Stanovení MBC fenoxoethanolu v koncentracích 13,0 – 15,5 g.l<sup>-1</sup> pro kultury *Enterococcus faecalis* CCM 4224 a *Bacillus subtilis* CCM 2216

Konc. fenoxoethanolu [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224				<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216			
	Visuální hodnocení zákalu		MBC		Visuální hodnocení zákalu		MBC	
	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>13,00</b>	-	-	+	+	-	-	+	+
<b>13,25</b>	-	-	+	+	-	-	+	+
<b>13,75</b>	-	-	+	+	-	-	+	+
<b>14,00</b>	-	-	+	+	-	-	+	+
<b>14,25</b>	-	-	+	+	-	-	+	+
<b>14,75</b>	-	-	+	+	-	-	+	+
<b>15,00</b>	-	-	+	-	-	-	+	+
<b>15,50</b>	-	-	-	-	-	-	+	+

+ růst                      - bez zákalu (MIC)/ bez růstu (MBC)

Stanovení minimální baktericidní koncentrace u bakteriálních kultur *Bacillus subtilis* a *Enterococcus faecalis* prokázalo vysokou odolnost obou bakteriálních kultur. U *Enterococcus faecalis* byla stanovena jako MBC koncentrace 15,50 g.l<sup>-1</sup>. U koncentrace 15,00 g.l<sup>-1</sup> došlo k růstu pouze v jednom ze dvou paralelních vzorků, proto by se tato koncentrace dala označit jako hraniční baktericidní koncentrací. Pro kulturu *Bacillus subtilis* byla stanovena hodnota MBC fenoxoethanolu > 15,50 g.l<sup>-1</sup>. Vyšší koncentrace fenoxoethanolu nebyly připravovány.

Tab. 39 Stanovení MBC fenoxoethanolu pro gramnegativní bakterie

Konc. fenoxoethanolu [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954		<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4415		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955		<i>Pseudomonas</i> sp. MP 11	
	4,5	+	+	---	---	+	+	+
6,0	-	-	-	-	+	+	-	-
7,5	-	-	-	-	-	-	-	-
9,0	-	-	-	-	-	-	-	-
10,0	-	-	-	-	-	-	-	-
11,5	-	-	-	-	-	-	-	-
13,0	-	-	-	-	-	-	-	-

+ růst

- bez nárůstu

--- nebylo stanovováno

Z tabulky 39 byla stanovena hodnota MBC pro gramnegativní kultury, která byla 6,0 g.l<sup>-1</sup>, kromě kultury *Pseudomonas aeruginosa*, u které byla zaznamenána hodnota 7,5 g.l<sup>-1</sup>. *Pseudomonas aeruginosa* se tak ukázala být nejodolnější gramnegativní kulturou.

Z Tabulek 37 – 39 je jasně patrné, že grampozitivní bakterie jsou odolnější než kultury gramnegativní. Nižší odolnost gramnegativních bakterií může být dána stavbou jejich buněčné stěny, která je na rozdíl od grampozitivních kultur tenčí, strukturovanější a vůči fenoxoethanolu zřejmě méně odolná.

Tab. 40 Zpřesnění výsledků MBC fenoxoethanolu pro gramnegativní kultury

Konc. fenoxoethanolu [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954		<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4415		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955		<i>Pseudomonas fluorescens</i> MS1	
3,0	+	+	+	+	*	-	+	+
3,5	+	+	+	+	+	*	+	+
4,0	+	+	+	+	+	+	+	+
4,5	+	+	+	+	+	+	+	+
5,0	+	+	+	+	+	+	+	+
5,5	-	-	+	+	+	+	+	+
6,0	-	-	±	-	+	+	+	+
7,0	-	-	-	-	-	+	+	+

+ růst

± mírný růst

- bez nárůstu

\* kontaminace

Z tabulky 40 byly zpřesněny hodnoty minimální inhibiční koncentrace fenoxoethanolu pro gramnegativní kultury *E. coli* z hodnoty 6,0 na 5,5 g.l<sup>-1</sup>. Pro kulturu *Klebsiella pneumoniae* byla stanovena hodnota 6,0 g.l<sup>-1</sup> jako hraniční a jako MBC koncentrace 7,0 g.l<sup>-1</sup> a hraniční byla i koncentrace 7,0 g.l<sup>-1</sup> pro kulturu *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas fluorescens* prokázala vyšší odolnost vůči fenoxoethanolu, neboť pro ni byla hodnota MBC je vyšší než 7,0 g.l<sup>-1</sup> (7,5 g.l<sup>-1</sup>, zjištěných v předcházejícím pokusu). Protože pro stanovení MBC koncentrace v tabulce 40 byly vyočkovány jamky z pokusu, popsaném v tabulce 35, nebyla v tomto pokusu použita kultura *Pseudomonas* sp. MP11, ale *Pseudomonas fluorescens* MS1.

#### 4.1.3 Stanovení MIC a MBC fenoxoethanolu pro kulturu *Bacillus subtilis* prekultivovanou 20 hodin

*Bacillus subtilis* patří mezi sporující bakterie. Spory jsou morfologicky odlišným bakteriálním útvarem než buňky, a jsou odolnější vůči nepříznivým vnějším podmínkám (HIGGINS et. al. , 2011).

Výsledky testu na přítomnost spor prokázaly, že *Bacillus subtilis* CCM 2216 po 20 hodinové kultivaci spory nevytváří. Proto byl *Bacillus subtilis* prekultivován 20 hodin a takto mladá kultura byla podrobena testu na stanovení MIC a MBC. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 41.



**Tab. 41** Stanovení MIC a MBC fenoxylethanolu pro kulturu *Bacillus subtilis* prekultivovanou 20 hodin

Konc. PHE [g.l <sup>-1</sup> ]	Měření zákalu			
	Vis	A [1] Před	A [1] Po	MBC
<b>0</b>	++	0,074	0,565	+
	++	0,076	0,604	+
<b>0,25</b>	++	0,087	0,545	+
	++	0,078	0,565	+
<b>0,50</b>	++	0,073	0,591	+
	++	0,084	0,576	+
<b>0,75</b>	++	0,070	0,562	+
	++	0,081	0,576	+
<b>1,00</b>	++	0,078	0,532	+
	++	0,073	0,573	+
<b>1,50</b>	++	0,073	0,519	+
	++	0,073	0,558	+
<b>2,00</b>	++	0,076	0,446	+
	++	0,071	0,486	+
<b>3,00</b>	++	0,071	0,556	+
	++	0,079	0,458	+
Konc. PHE [g.l <sup>-1</sup> ]	Měření zákalu			
	Vis	A [1] Před	A [1] Po	MBC
<b>3,50</b>	+	0,069	0,350	+
	+	0,074	0,338	+
<b>4,50</b>	+	0,065	0,243	+
	+	0,075	0,251	+
<b>6,00</b>	+	0,068	0,283	+
	+	0,07	0,288	+
<b>7,50</b>	-	<b>0,063</b>	<b>0,066</b>	-
	-	<b>0,062</b>	<b>0,06</b>	-
<b>9,00</b>	-	0,072	0,062	-
	-	0,070	0,066	-
<b>10,00</b>	-	0,058	0,063	-
	-	0,076	0,063	-
<b>11,50</b>	-	0,062	0,057	-
	-	0,071	0,055	-
<b>13,00</b>	-	0,066	0,081	-
	-	0,069	0,120	-

++ silný zákal                      + zákal (MIC)/ růst (MBC)

- bez zákalu (MIC)/ bez nárůstu (MBC)

Z výsledků v tabulce 41 lze stanovit hodnotu MIC i MBC 7,50 g.l<sup>-1</sup>. Zároveň z výsledků vyplývá, že spory, které kultura *Bacillus subtilis* vytváří po delší kultivaci, mají významný vliv na přežívání a samotná buňka není tak odolná jako spory.

## 4.2 Práce s 1-oktyl-2-pyrrolidonem

Cílem pokusů bylo sledování protibakteriální účinnosti vůči čistým bakteriálním kulturám.

### 4.2.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) 1O2P – část I.

V prvním dílčím pokuse byly mikrotitrační destičky připraveny podle tabulky 11. Pro tento test byl 1O2P navážen, aby se předešlo jeho zachytávání ve špičce dávkovače. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 42 a 43.

**Tab. 42** Vizualní hodnocení zákalu pro stanovení MIC 1O2P pro gramnegativní bakterie

Konc. 1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>coli</i> CCM 3954	<i>pneumoniae</i> CCM 4415	<i>aeruginosa</i> CCM 3955	sp. MP 11
	Vizuálně	Vizuálně	Vizuálně	Vizuálně
<b>0</b>	++	+	+	+
	++	+	+	+
<b>20</b>	++	+	+	+
	++	+	+	+
<b>50</b>	++	+	+	+
	++	+	+	+
<b>100</b>	++	+	+	+
	++	+	+	+
<b>250</b>	+	+	+	+
	+	+	+	+
<b>500</b>	+	+	+	+
	+	+	+	+
<b>750</b>	+	+	+	+
	+	+	+	+
<b>1000</b>	+	+	+	+
	+	+	+	+

++ silný zákal

+ zákal

Tab. 43 Vizuální hodnocení zákalu pro stanovení MIC 1O2P pro grampozitivní bakterie

Konc. 1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Staphylococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Rhodococcus</i>
	<i>aureus</i>	<i>faecalis</i>	<i>subtilis</i>	<i>erythropolis</i>
	CCM 3953	CCM 4224	CCM 2216	FR6
<b>0</b>	+	+	+	+
	+	+	+	+
<b>20</b>	+	+	+	+
	+	+	+	+
<b>50</b>	+	+	+	+
	+	+	+	+
<b>100</b>	+	+	+	+
	+	+	+	+
<b>250</b>	+	+	+	+
	+	+	+	+
<b>500</b>	+	+	+	+
	+	+	+	+
<b>750</b>	+	+	+	+
	+	+	+	+
<b>1000</b>	+	+	+	+
	+	+	+	+

+ zákal

V prvním testu pro stanovení MIC 1O2P došlo k růstu bakterií při všech zkoumaných koncentracích. Z výsledků tedy zdánlivě vyplynulo, že 1O2P nevykazuje vysokou toxicitu. Ale díky fyzikálním vlastnostem 1O2P bylo možné, že došlo k jeho adsorpci na materiál sterilizačního filtru během filtrace. Z tohoto důvodu byly připraveny dynamické testy, viz kapitola 4.2.2.

#### 4.2.2 Dynamické testy s kulturami *E. coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

První část dílčího testu byla provedena s kulturou *E. coli* CCM 3954 a s koncentracemi 1O2P v TSB 0,5 g.l<sup>-1</sup>, 1,0 g.l<sup>-1</sup>, emulze 2,0 g.l<sup>-1</sup> a za použití kontrolních vzorků bez 1O2P.

##### Výsledky mikroskopického pozorování účinku 1O2P na kulturu *E. coli* CCM 3954

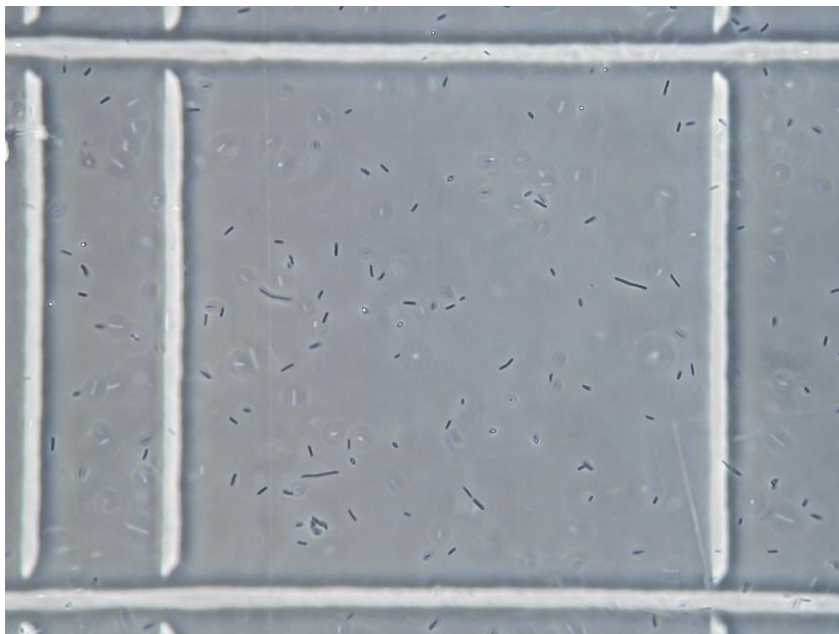
Po uplynutí kultivační doby bylo asepticky napipetováno 10 µl vzorku na počítací komůrku CYRUS II. Počítání jednotlivých buněk bylo provedeno při zvětšení 400x v čtvercích o rozměrech 50 x 50 µm a výsledky byly přepočítány na objem 1 ml.

**Tab. 44** Mikroskopické pozorování účinku 1-oktyl-2-pyrrolidonu na *E. coli* CCM 3954

Koncentrace 1O2P	Doba kultivace	CFU buňky ve čtverci	Buněk/ml
[g.l <sup>-1</sup> ]	[hod]	[1]	[1]
0,0	4	2 – 10	16*10 <sup>6</sup> – 80*10 <sup>6</sup>
	24	cca 100	800*10 <sup>6</sup>
	48	Neprováděno	
1,0	4	0	0
	24	40 - 50	320*10 <sup>6</sup> – 400*10 <sup>6</sup>
	48	Neprováděno	
2,0	4	0	0
	24	0	0
	48	Neprováděno	
5,0	4	0	0
	24	0	0
	48	Neprováděno	

Výsledky mikroskopie prokázaly vyšší toxicitu, než tomu bylo v případě prvního dílčího testu. I když byly pozorovány buňky i při koncentraci 1 g.l<sup>-1</sup>, byly tyto buňky nepohyblivé a nepravidelného tvaru, oproti buňkám v kontrolních vzorcích (viz obrázek 6). Počítání buněk bylo ztíženo hlavně u kontrolních vzorků, z důvodu zvýšeného počtu buněk a jejich velké pohyblivosti.

**Obr. 6** Tvar buněk *E. coli* CCM 3954 bez přídavku 1O2P pod mikroskopem při zvětšení 400x



V obrázku je 6 je lze pozorovat typický tyčinkovitý tvar buněk kultury *E. coli*. Při působení 1O2P o koncentraci  $1\text{g.l}^{-1}$  došlo k tvorbě nepohyblivých buněk oproti kontrole.

Při působení 1O2P o koncentraci  $5\text{g.l}^{-1}$  nebyly pod mikroskopem pozorovány žádné buňky kultury *E. coli*.

#### Výsledky kultivačního počítání bakterií *E. coli* CCM 3954

Po uplynutí kultivační doby bylo 100  $\mu\text{l}$  vzorku 100x ředěno ve fyziologickém roztoku. Ředění bylo prováděno u všech zkoumaných koncentrací 1O2P pouze v čase nula. Na základě mikroskopického pozorování byly po čtyřech hodinách kultivace ředěny pouze kontrolní vzorky. Výsledné suspenze byly sterilní hokejkou rozetřeny na povrch R2A agarů v petriho miskách. Misky byly kultivovány při  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 48 hodin. Po uplynutí kultivační bylo provedeno počítání narostlých kolonií.

Tab. 45 Kultivační hodnocení účinku 1O2P na *E. coli* CCM 3954

Koncentrace 1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]	Doba kultivace [hod]	Ředění	CFU [1]	CFU/ml [1]
0,0	0	100x	cca 1 000	cca 5,0.10 <sup>6</sup>
	4	100x	cca 1500	cca 7,5.10 <sup>6</sup>
1,0	0	100x	0	0
	4	Neředěno	0	0
2,0	0	100x	0	0
	4	Neředěno	0	0
5,0	0	100x	0	0
	4	Neředěno	0	0

Na základě výsledků z mikroskopie bylo prováděno vyočkování na R2A agar pouze v kultivačním čase nula a po čtyřech hodinách. I když pod mikroskopem byly pozorovány buňky i při koncentraci 1g.l<sup>-1</sup>, po vyočkování nebyl zaznamenán žádný nárůst kolonií na R2A agaru, bylo tedy zřejmé, že 1O2P působí od koncentrace 1,0 g.l<sup>-1</sup> baktericidně.

#### Výsledky mikroskopického pozorování účinku 1O2P na kulturu *Pseudomonas auruginosa* CCM 3955

První mikroskopické pozorování probíhalo po 6 hodinové kultivaci, na rozdíl od prvního odběru vzorku, který proběhl po 4 hodinách kultivace. Důvodem 2 hodinového rozdílu mezi jednotlivými metodami byla nedostupnost mikroskopu s fázovým kontrastem.

Tab. 46 Mikroskopické pozorování účinku 1O2P na *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

Koncentrace 1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]	Doba kultivace [hod]	CFU ve čtverci [1]	CFU/ml [1]
0,0	6	3 – 4	2,4 – 3,2.10 <sup>7</sup>
		3 – 7	2,4 – 5,6.10 <sup>7</sup>
	24	Nepočítatelné	
	48	Nepočítatelné	
0,5	6	0 – 4	0,0 – 3,2.10 <sup>7</sup>
		1 – 3	8,0.10 <sup>6</sup> – 2,4.10 <sup>7</sup>
	24	20 – 25	1,6 – 2,0.10 <sup>8</sup>
		15 – 20	1,2 – 1,6.10 <sup>8</sup>
48	30 – 50	2,4 – 4,0.10 <sup>8</sup>	
	20 – 30	1,6 – 2,4.10 <sup>8</sup>	
1,0	6	1 – 2	8,0.10 <sup>6</sup> – 1,6.10 <sup>7</sup>
		1 – 2	8,0.10 <sup>6</sup> – 1,6.10 <sup>7</sup>
	24	10 – 12	8,0 – 9,6.10 <sup>7</sup>
		12 – 15	9,6.10 <sup>7</sup> – 1,2.10 <sup>8</sup>
48	25 – 30	2,0 – 2,4.10 <sup>8</sup>	
	30 – 40	2,4 – 3,2.10 <sup>8</sup>	
2,0	6	1 – 2	8,0.10 <sup>6</sup> – 1,8.10 <sup>7</sup>
		0	0
	24	15 – 20	1,2 – 1,6.10 <sup>8</sup>
		20 – 25	1,6 – 2,0.10 <sup>8</sup>
48	15 – 20	1,2 – 1,6.10 <sup>8</sup>	
	20 – 30	1,6 – 2,4.10 <sup>8</sup>	

Počítání jednotlivých vzorků bylo provedeno spíše orientačně, i když buňky po aplikaci 1O2P nevykazovaly aktivní pohyb oproti kontrole. Avšak docházelo k pohybu buněk na okrajích počítací komůrky, nejspíše vlivem zahříváním vzorku lampou od mikroskopu nebo vlivem povrchového napětí.

Z mikroskopického pozorování vyplývá, že kultura *Pseudomonas aeruginosa* je odolná bakterie vůči 1O2P. I když viditelně došlo k nárůstu buněk ve všech sledovaných koncentracích, byly všechny vzorky vyočkovány na povrch TYA agaru k ověření výsledků. Výsledky vyočkování jednotlivých vzorků bylo pozitivní na růst *Pseudomonas aeruginosa* ve všech koncentracích.

Buňky vystavené působení 1O2P ve všech sledovaných koncentracích, však byly oproti kontrole nepohyblivé.

#### **4.2.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace 1O2P, část II.**

Na základě výsledků dynamického testu vůči kultuře *E. coli* byly připraveny mikrotitrační destičky dle tabulky 12. Při postupu již nebyla použita filtrace roztoků 1O2P, aby bylo zabráněno úbytku látky ze zásobních roztoků. Výsledky stanovení MIC 1O2P jsou uvedeny v tabulkách 47 a 48 na následujících stranách. Hodnocení zákalu probíhalo stejně jako u stanovení MIC fenoxxyethanolu vizuálně (Vis) a spektrofotometricky před kultivací (Před) a po kultivaci (Po).



Tab. 47 Stanovení MIC 1O2P vůči gramnegativním bakteriím

Konc. 1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954			<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4415			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955			<i>Pseudomonas sp. MP 11</i>		
	Vis	A [I] Před	Po	Vis	A [I] Před	Po	Vis	A [I] Před	Po	Vis	A [I] Před	Po
0,00	+	0,097	0,954	+	---	---	+	0,058	0,295	---	---	---
0,02	+	0,095	0,909	+	---	---	+	0,063	0,535	---	---	---
0,05	+	0,083	0,848	*	---	---	+	0,055	0,451	---	---	---
0,10	+	0,089	0,973	*	---	---	+	0,063	0,615	---	---	---
0,25	+	0,087	0,853	*	---	---	+	0,061	0,546	---	---	---
0,50	-	0,124	0,548	*	---	---	+	0,064	0,743	---	---	---
0,75	-	0,117	0,242	*	---	---	+	0,064	0,646	---	---	---
1,00	-	0,093	1,200	*	---	---	+	0,064	0,637	---	---	---
	-	0,088	0,136	*	---	---	+	0,065	0,548	---	---	---
	*	<b>0,084</b>	<b>0,068</b>	*	---	---	+	0,062	0,647	---	---	---
	-	0,080	---	*	---	---	+	0,098	0,548	---	---	---
	-	0,095	0,078	*	---	---	+	0,059	0,647	---	---	---
	-	0,116	0,076	*	---	---	+	0,067	0,676	---	---	---
	-	0,093	0,076	*	---	---	+	0,059	0,561	---	---	---
	-			*	---	---	+	0,065	0,568	---	---	---

+ zákal

- bez zákalu

\* kontaminace

--- nebylo stanovováno

Absorbance po kultivaci u kultury *E. coli* pro koncentraci 0,75 g.l<sup>-1</sup> nebyla brána do hodnocení výsledků neboť v příslušné jamce došlo ke kontaminaci.

Kultura *Pseudomonas sp. MP11* nebyla v této části testu zkoumána, neboť se jí nepodařilo oživit z mrazicího boxu.

Tab. 48 Stanovení MIC 1O2P vůči grampozitivním bakteriím

Konc. 1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953 A [1]			<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> CCM 4224 A [1]			<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216 (72 hodin) A [1]			<i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> FR6 A [1]		
	Vis	Před	Po	Vis	Před	Po	Vis	Před	Po	Vis	Před	Po
<b>0,00</b>	+	0,066	0,953	+	0,052	0,825	+	0,057	0,561	+	0,070	0,532
	+	0,071	0,908	+	0,055	0,829	+	0,058	0,778	+	0,071	1,297
<b>0,02</b>	+	0,064	0,844	+	0,051	0,771	+	0,053	0,538	+	0,073	0,982
	+	0,058	0,894	+	0,056	0,771	+	0,054	0,794	+	0,072	0,687
<b>0,05</b>	+	0,059	0,971	+	0,053	0,793	+	0,055	0,571	+	0,070	1,385
	+	0,071	0,853	+	0,056	0,825	+	0,059	0,761	+	0,081	0,944
<b>0,10</b>	-	0,061	0,541	+	0,053	0,700	-	<b>0,057</b>	<b>0,055</b>	+	0,065	0,798
	-	0,071	0,240	+	0,057	0,608	-	<b>0,058</b>	<b>0,056</b>	+	0,074	0,930
<b>0,25</b>	*	0,068	1,215	*	0,053	1,077	-	0,061	0,060	*	0,066	0,910
	-	0,080	0,133	*	0,058	1,292	-	0,060	0,045	*	0,066	1,251
<b>0,50</b>	-	0,072	0,069	-	0,060	0,057	*	0,068	1,029	-	0,077	0,063
	-	0,077	0,077	*	0,067	1,034	-	0,068	0,045	*	0,075	1,057
<b>0,75</b>	*	0,080	0,955	-	0,066	0,056	-	0,071	0,058	-	0,101	0,067
	-	0,077	0,078	-	0,063	0,057	-	0,064	0,045	*	0,081	0,730
<b>1,00</b>	-	0,069	0,076	-	0,064	0,059	-	0,065	0,066	-	0,107	0,115
	-	0,077	0,076	-	0,065	0,061	-	0,065	0,051	*	0,084	0,110

+ zákal

- bez zákalu

\* kontaminace

Během tohoto dílčího pokusu došlo ke kontaminaci několika vzorků, proto byl pokus s kontaminovanými kulturami opakován. V opakovaném testu byla dále použita kultura *Pseudomonas* sp. MP11 a také *Bacillus subtilis* prekultivovaný 20 hodin.

Jelikož kontaminaci doprovázelo charakteristické žluto-zelené zbarvení pro kulturu *Pseudomonas aeruginosa*, byly kontaminované jamky vyočkovány na selektivní cetrimidový agar. Výsledky byly pozitivní na bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Na základě těchto výsledků byla zvýšena opatrnost během dávkování jednotlivých složek do jamek, neboť bylo prokázáno, že *Pseudomonas aeruginosa* dokáže snadno kontaminovat sousední vzorky.

Tab. 49 Opakování stanovení MIC pro 102P vůči gram pozitivním kulturám

Konc. 102P [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953 A [1]			<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> CCM 4224 A [1]			<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216 (20 hodin) A [1]			<i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> FR6 A [1]		
	Vis	Před	Po	Vis	Před	Po	Vis	Před	Po	Vis	Před	Po
<b>0,00</b>	+	0,069	1,153	+	0,051	0,790	+	0,056	0,760	+	0,064	1,017
	+	0,061	1,158	+	0,053	0,886	+	0,058	0,588	+	0,062	0,906
<b>0,02</b>	+	0,064	1,054	+	0,055	0,794	+	0,059	0,674	+	0,085	0,788
	+	0,066	0,108	+	0,055	0,836	+	0,056	0,716	+	0,055	0,668
<b>0,05</b>	+	0,063	0,983	+	0,056	0,728	+	0,061	0,739	+	0,058	0,600
	-	0,071	0,085	+	0,060	0,731	+	0,060	0,670	+	0,065	0,712
<b>0,10</b>	-	0,072	0,256	±	0,061	0,500	-	<b>0,062</b>	<b>0,049</b>	-	<b>0,061</b>	<b>0,054</b>
	-	0,071	0,247	+	0,060	0,731	-	<b>0,063</b>	<b>0,049</b>	-	<b>0,064</b>	<b>0,060</b>
<b>0,25</b>	-	<b>0,065</b>	<b>0,052</b>	-	<b>0,061</b>	<b>0,059</b>	-	0,059	0,051	-	0,062	0,054
	-	<b>0,078</b>	<b>0,090</b>	-	<b>0,061</b>	<b>0,077</b>	-	0,060	0,057	-	0,061	0,060
<b>0,50</b>	-	0,079	0,094	-	0,060	0,065	-	0,061	0,072	-	0,066	0,074
	-	0,085	0,082	-	0,060	0,075	-	0,064	0,073	-	0,065	0,313
<b>0,75</b>	-	0,079	0,107	-	0,085	0,079	-	0,062	0,080	-	0,064	0,087
	-	0,085	0,101	-	0,075	0,079	-	0,080	0,085	---	0,070	0,084
<b>1,00</b>	-	0,138	0,103	-	0,158	0,076	-	0,230	0,083	-	0,130	0,091
	-	0,186	0,106	-	0,148	0,090	-	0,331	0,096	-	0,171	0,086

+zákal

- bez zákalu

--- nebylo stanovováno

Tab. 50 Opakování stanovení MIC pro 1O2P vůči gramnegativním kulturám

Konc. 1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4415			<i>Pseudomonas sp.</i> MP 11		
	Visuálně	A [1]		Visuálně	A [1]	
		Před	Po		Před	Po
0,00	+	0,068	0,975	++	0,069	1,405
	+	0,076	0,969	++	0,067	1,412
0,02	+	0,098	0,980	++	0,048	1,416
	+	0,080	0,858	++	0,048	1,427
0,05	+	0,097	0,056	++	0,047	0,044
	+	0,090	0,363	++	0,066	1,483
0,10	+	0,088	0,063	++	0,068	1,559
	±	0,092	0,059	++	0,078	1,591
0,25	-	<b>0,096</b>	<b>0,067</b>	+	0,079	1,440
	-	<b>0,089</b>	<b>0,071</b>	+	0,074	1,392
0,50	-	0,099	0,100	+	0,086	0,672
	-	0,097	0,101	+	0,075	0,778
0,75	-	0,136	0,119	+	0,084	0,723
	-	0,140	0,103	+	0,131	0,653
1,00	-	0,113	0,131	+	0,110	0,435
	-	0,133	0,111	+	0,136	0,596

++ silný zákal      + zákal      - bez zákalu

Z naměřených hodnot, uvedených v tabulkách 47 – 50, byly stanoveny hodnoty MIC v rozmezí od 0,1 – 0,5 g.l<sup>-1</sup> 1O2P v roztoku. Ze zjištěných hodnot MIC lze říci, že na odolnost vůči 1O2P nemá vliv, zda daná kultura patří do skupiny grampozitivních či gramnegativních bakterií.

Vysokou odolnost prokázaly obě kultury rodu *Pseudomonas*. Na základě těchto výsledků byly dále testovány kultury *Pseudomonas aeruginosa* FT1, FT2 a FT4, *Pseudomonas fluorescens* MS1 a *Pseudomonas putida* FR3. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 51.

Tab. 51 Visuální sledování účinku 1O2P vůči vybraným kulturám rodu *Pseudomonas*

Konc. 1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
	FT 1	FT 2	FT4	MS 1	FR 3
0	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
500	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
750	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
1000	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+

+ zákal

Jelikož došlo k jasně viditelnému zákalu ve všech zkoumaných koncentracích u všech kultur rodu *Pseudomonas*, nebylo zapotřebí měřit zákal přístrojově. Z výsledků vyplývá vysoká odolnost bakterií rodu *Pseudomonas* vůči vyšším koncentracím 1O2P. To nejspíše potvrzuje dobrou schopnost bakterií rodu *Pseudomonas* vylučovat ze svých těl toxické látky.

## 4.2.4 Stanovení minimální baktericidní koncentrace 1O2P

Tab. 52 Stanovení MBC 1O2P vůči gramnegativním bakteriím

Konc. 1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Escherichia coli</i> CCM 3954		<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4415	
	0,10	---	---	+
0,25	-	+	+	+
0,50	-	-	-	-
0,75	-	-	-	-
1,00	-	-	-	-

+ růst                      - bez růstu                      --- nebylo stanovováno

Tab. 53 Stanovení MBC 1O2P vůči grampozitivním bakteriím

Konc. 1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953		<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224		<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216		<i>Rhodococcus erythropolis</i> FR6			
					72 hodin	20 hodin				
0,05	+	+	---	---	+	+	---	---	---	---
0,10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
0,25	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
0,50	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
0,75	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
1,00	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

+ růst                      - bez růstu                      --- nebylo stanovováno

Výsledky MBC jasně ukazují na to, že 1O2P je mnohem toxičtější než fenoxylethanol, neboť kromě kultury *E. coli* se hodnoty MIC a MBC shodují. MBC nebyla stanovována pro kultury rodu *Pseudomonas*. Výsledky MBC také opět prokázaly, jak velký význam má tvorba spor pro bakterii *Bacillus subtilis*. MBC pro *Bacillus subtilis* prekultivovaný 72 hodiny bylo stanovena na více jak 1 g.l<sup>-1</sup> a pro kulturu prekultivovanou 20 hodin byla hodnota MBC stanovena na 0,1 g.l<sup>-1</sup>.

### 4.3 Testování směsi fenoxxyethanolu a 1O2P

Pro sledování účinku směsi fenoxxyethanolu a 1O2P byly vybrány 2 grampozitivní kultury (*Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Bacillus subtilis* CCM 2216) a dvě gramnegativní kultury (*E. coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955). Hodnocení zákalu probíhalo stejně jako u stanovování MIC fenoxxyethanolu a 1O2P a to vizuálně (Vis), spektrofotometricky před kultivací (Před) a po kultivaci (Po). Výsledky viz tabulka 55.

Před samotným stanovením inhibice růstu bakterií směsí obou látek byl proveden test na ověření MIC fenoxxyethanolu a také 1O2P vůči kultuře *E. coli*. Výsledky MIC tohoto ověření se shodovaly s původními naměřenými hodnotami, tedy 4,5 g.l<sup>-1</sup> pro fenoxxyethanol a 0,5 g.l<sup>-1</sup> pro 1O2P.



**Tab. 54** Sledování účinku směsi fenoxoethanolu (0,0 – 5,0 g.l<sup>-1</sup>) a 1O2P (50 – 200 mg.l<sup>-1</sup>) vůči *E. coli* CCM 3954

Konc. PHE [g.l <sup>-1</sup> ]	Výsledná konc. 1O2P 50 mg.l <sup>-1</sup>			Výsledná konc. 1O2P 100 mg.l <sup>-1</sup>			Výsledná konc. 1O2P 200 mg.l <sup>-1</sup>					
	Vis	MIC		Vis	MIC		Vis	MIC				
		A [I]	Po		A [I]	Po		A [I]	Po			
0,0	+	0,072	0,583	---	+	0,074	0,615	---	+	0,074	0,671	---
0,5	+	0,070	0,630	---	+	0,066	0,624	---	+	0,073	0,596	---
1,0	+	0,100	0,589	---	+	0,074	0,741	---	+	0,075	0,718	---
2,0	+	0,072	0,524	---	+	0,075	0,663	---	+	0,072	0,668	---
3,0	+	0,071	0,583	---	+	0,072	0,599	---	±	0,078	0,770	---
4,0	+	0,071	0,571	---	+	0,075	0,707	---	±	0,076	0,656	---
4,5	+	0,066	0,440	---	+	0,073	0,234	---	-	0,075	0,235	+
5,0	+	0,070	0,427	---	+	0,072	0,416	---	-	0,076	0,175	+
	-	0,067	0,096	+	-	<b>0,073</b>	<b>0,069</b>	+	-	<b>0,076</b>	<b>0,078</b>	-
	-	0,070	0,150	+	-	<b>0,072</b>	<b>0,115</b>	+	-	<b>0,073</b>	<b>0,071</b>	-
	-	<b>0,065</b>	<b>0,066</b>	+	-	0,074	0,066	-	-	0,073	0,068	-
	-	<b>0,069</b>	<b>0,068</b>	+	-	0,071	0,070	-	-	0,075	0,071	-
	-	0,060	0,059	-	-	0,066	0,063	-	-	0,073	0,067	-
	-	0,069	0,062	-	-	0,069	0,067	-	-	0,068	0,078	-
	-	0,065	0,060	-	-	0,071	0,066	-	-	0,070	0,071	-
	-	0,069	0,064	-	-	0,070	0,084	-	-	0,069	0,077	-

+ zákal (MIC)/ růst (MBC)                      ± mírný zákal                      --- nebylo stanovováno

- bez zákalu (MIC)/ bez růstu (MBC)

Tučně zvýrazněné hodnoty byly stanoveny hodnoty MIC směsi pro jednotlivé stanovení. Původní MIC fenoxoethanolu vůči kultuře *E. coli* se po přidavku 1O2P o výsledné koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup> snížila na 4,0 g.l<sup>-1</sup> a s přidavkem 1O2P o výsledné koncentraci 100 a 200 mg.l<sup>-1</sup> došlo ke snížení na 3,0 g.l<sup>-1</sup>. Dále byla stanovena hodnota MBC 4,5 g.l<sup>-1</sup> pro směs s 1O2P o koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup> a 3,0 g.l<sup>-1</sup> pro směs s 1O2P o koncentraci 100 a 200 mg.l<sup>-1</sup>.

Tab. 55 Sledování účinku směsi fenoxoethanolu (0 – 4,5 g.l<sup>-1</sup>) a IO2P (50 – 200 mg.l<sup>-1</sup>) vůči *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

Konc. PHE [g.l <sup>-1</sup> ]	Výsledná konc. IO2P 50 mg.l <sup>-1</sup>			Výsledná konc. IO2P 100 mg.l <sup>-1</sup>			Výsledná konc. IO2P 200 mg.l <sup>-1</sup>		
	Vis	MIC		Vis	MIC		Vis	MIC	
		A [I]	Po		A [I]	Po		A [I]	Po
0,00	++	0,074	1,195	++	0,071	1,125	++	0,062	1,019
0,50	++	0,079	1,182	++	0,073	1,143	++	0,066	1,036
1,00	++	0,070	1,190	++	0,064	1,130	++	0,061	0,853
2,00	++	0,070	1,207	++	0,065	1,139	++	0,066	0,858
3,00	+	0,074	0,826	+	0,070	1,047	+	0,063	0,657
4,00	-	0,069	0,837	±	0,066	1,006	-	0,062	0,790
4,25	-	0,073	0,162	-	0,066	0,672	-	0,061	0,242
4,50	-	0,071	0,103	±	0,064	0,711	+	0,075	0,166
	-	0,078	0,064	-	0,071	0,073	-	0,070	0,075
	-	0,060	0,074	-	0,070	0,333	-	0,070	0,086
	-	0,067	0,065	-	0,076	0,483	-	0,071	0,071
	-	0,073	0,073	-	0,075	0,083	-	0,041	0,070
	-	0,082	0,061	-	0,065	0,068	-	0,061	0,070
	-	0,070	0,065	-	0,068	0,079	-	0,067	0,067
	-			-	0,074	0,054	-	0,064	0,070
	-			-	0,082	0,060	-	0,069	0,076

++ silný zákal (MIC)

+ zákal (MIC)/ růst (MBC)

--- nebylo stanovováno

- bez zákalu (MIC)/ bez růstu (MBC)

Tab. 56 Sledování účinku směsi fenoxoethanolu ( $0 - 4,5 \text{ g.l}^{-1}$ ) a 1O2P ( $400 - 600 \text{ mg.l}^{-1}$ ) vůči *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

Konc. PHE [g.l <sup>-1</sup> ]	Výsledná konc. 1O2P 400 mg.l <sup>-1</sup>			Výsledná konc. 1O2P 500 mg.l <sup>-1</sup>			Výsledná konc. 1O2P 600 mg.l <sup>-1</sup>		
	Vis	MIC		Vis	MIC		Vis	MIC	
		Před	Po		Před	Po		Před	Po
0,00	++	0,060	1,321	++	0,076	1,478	++	0,076	1,442
0,50	++	0,068	1,339	++	0,071	1,460	++	0,063	1,536
1,00	+	0,058	0,682	++	0,069	0,838	+	0,071	1,007
2,00	+	0,055	0,636	++	0,074	0,974	+	0,070	1,118
3,00	+	0,065	0,760	+	0,068	1,142	+	0,071	0,554
4,00	+	0,065	0,812	+	0,069	0,389	+	0,068	0,99
4,25	-	0,070	0,162	-	0,077	0,188	-	0,069	0,082
4,50	-	0,065	0,149	+	0,076	0,156	-	0,066	0,080
	-	0,068	0,052	+	0,075	0,060	+	---	---
	-	0,071	0,054	+	0,073	0,058	+	---	---
	-	0,068	0,053	+	0,053	0,067	+	---	---
	-	0,073	0,059	+	0,053	0,064	+	---	---
	-	0,064	0,053	+	---	---	+	---	---
	-	0,071	0,054	+	---	---	+	---	---
	-	0,062	0,056	+	0,051	0,062	+	---	---
	-	0,072	0,055	+	0,052	0,062	+	---	---

++ silný zákal (MIC)      + zákal (MIC)/ růst (MBC)      --- nebylo stanovováno  
 - bez zákalu (MIC)/ bez růstu (MBC)

Z naměřených výsledů účinnosti směsi fenoxoethanolu a 1O2P oproti kultuře *Pseudomonas aeruginosa* vyplývá, že se zvyšující se koncentrací 1O2P dochází ke zvyšování účinku směsi. Hodnoty MIC pro směs s 1O2P 50 a 100 mg.l<sup>-1</sup> byla okolo hodnoty 4,00 až 4,25 g.l<sup>-1</sup> fenoxoethanolu, po přidavku 1O2P o koncentraci 200 – 500 mg.l<sup>-1</sup> došlo ke snížení hodnoty MIC směsi na 3,0 g.l<sup>-1</sup> fenoxoethanolu. Hodnoty MBC však byly ve všech případech, kromě přidavku 1O2P o výsledné koncentraci 600 mg.l<sup>-1</sup>, vyšší jak 4,5 g.l<sup>-1</sup>.

Tab. 57 Sledování účinku směsi fenoxoethanolu (0 – 6,0 g.l<sup>-1</sup>) a 1O2P (50 – 200 mg.l<sup>-1</sup>)  
vůči *St. aureus* CCM 3953

Konc. PHE	Výsledná konc. 1O2P 50 mg.l <sup>-1</sup>			Výsledná konc. 1O2P 100 mg.l <sup>-1</sup>			Výsledná konc. 1O2P 200 mg.l <sup>-1</sup>		
	Vis	MIC		Vis	MIC		Vis	MIC	
		A [I]	Po		A [I]	Po		A [I]	Po
0,0	++	0,096	1,349	++	0,102	0,878	++	0,083	0,967
	++	0,105	1,406	++	0,085	1,073	++	0,074	0,897
0,5	++	0,081	1,474	+	0,085	0,841	++	0,104	0,972
	++	0,089	1,498	+	0,101	0,770	++	0,105	0,974
1,0	++	0,092	1,139	+	0,098	0,950	++	0,105	0,997
	++	0,095	1,079	+	0,102	0,994	++	0,108	0,949
2,0	+	0,094	1,138	+	0,102	0,934	+	0,105	0,515
	+	0,081	0,896	+	0,088	0,878	+	0,090	0,551
3,0	+	0,085	0,922	+	0,097	0,502	±	0,091	0,412
	+	0,086	0,695	+	0,109	0,545	-	0,106	0,124
4,0	+	0,098	0,450	+	0,081	0,537	-	0,083	0,103
	+	0,095	0,415	+	0,093	0,556	-	0,100	0,172
5,0	±	0,090	0,202	-	0,096	0,206	-	0,098	0,086
	-	0,091	0,174	-	0,097	0,056	-	0,092	0,083
6,0	-	0,086	0,114	-	0,103	0,099	+	0,088	0,076
	-	0,092	0,103	-	0,105	0,055	+	0,100	0,077

++ silný zákal (MIC)      + zákal (MIC)/ růst (MBC)      --- nebylo stanovováno

- bez zákalu (MIC)/ bez růstu (MBC)

MIC směsi fenoxoethanolu a 1O2P pro *St. aureus* byla v přítomnosti 1O2P (50 a 100 mg.l<sup>-1</sup>) 6,0 g.l<sup>-1</sup> a po přidavku 200 mg.l<sup>-1</sup> 1O2P hodnota MIC směsi klesla na 5,0 g.l<sup>-1</sup>. Hodnoty MBC nebyly zjištěny, byly vyšší jak 6,0 g.l<sup>-1</sup> ve všech třech případech.

Tab. 58 Sledování účinku směsi fenoxxyethanolu ( $0 - 6,0 \text{ g.l}^{-1}$ ) a 1O2P ( $50 - 200 \text{ mg.l}^{-1}$ ) vůči kultuře *Bacillus subtilis* CCM 2216

Konc. PHE [g.l <sup>-1</sup> ]	Výsledná konc. 1O2P 50 mg.l <sup>-1</sup>			Výsledná konc. 1O2P 100 mg.l <sup>-1</sup>				
	Vis	MIC		MBC	Vis	MIC		MBC
		A [1]				A [1]		
		Před	Po			Před	Po	
0,0	++	0,072	1,423	---	++	0,075	1,010	---
	++	0,080	1,475	---	++	0,086	1,042	---
0,5	++	0,076	1,409	---	+	0,079	1,070	---
	++	0,067	1,403	---	+	0,071	0,822	---
1,0	++	0,074	1,298	---	+	0,082	0,950	---
	++	0,076	1,360	---	+	0,081	0,978	---
2,0	+	0,082	1,005	---	+	0,080	0,916	---
	+	0,085	1,018	---	+	0,081	0,753	---
3,0	+	0,077	0,856	---	+	0,080	0,553	---
	+	0,082	0,888	---	+	0,072	0,555	---
4,0	+	0,077	0,581	---	-	<b>0,083</b>	<b>0,083</b>	+
	+	0,080	0,537	---	-	<b>0,083</b>	<b>0,073</b>	+
5,0	-	<b>0,070</b>	<b>0,063</b>	+	-	0,078	0,064	+
	-	<b>0,077</b>	<b>0,066</b>	+	-	0,077	0,067	+
6,0	-	0,069	0,065	-	-	0,075	0,065	+
	-	0,079	0,067	-	-	0,086	0,069	+

++ silný zákal (MIC)

+ zákal (MIC)/ růst (MBC)

--- nebylo stanovováno

- bez zákalu (MIC)/ bez růstu (MBC)

V rámci tohoto testu byla použita kultura *Bacillus subtilis* prekultivovaná 20 hodin. Hodnota MIC směsi pro kulturu *Bacillus subtilis* v přítomnosti  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  1O2P byla  $5,0 \text{ g.l}^{-1}$ , v případě koncentrace  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  1O2P byla hodnota MIC směsi snížena na  $4,0 \text{ g.l}^{-1}$ .

#### 4.4 Stanovení toxicity látek vůči aktivovanému kalu

Principem sledování toxicity sledovaných látek vůči směsné kultuře aktivovaného kalu (AK) bylo měření úbytku kyslíku za časový interval tedy rychlost respirace. Pro tento účel byl použit aerobní aktivovaný kal z ČOV Malenovice. Měření bylo prováděno za konstantního míchání v uzavřené měřící cele s kyslíkovou elektrodou. Pro úpravu kalu bylo použito ředěného minerálního média (ŘMM)

##### 4.4.1 Sledování respirace aerobního kalu s přidavkem fenoxethanolu

###### Stanovení sušiny kalu

Nejdříve byla stanovena sušina v den přivezení kalu, 24 hodin před samotným testem i v den stanovení. Výsledky stanovení sušiny jsou uvedeny v tabulce 59.

**Tab. 59** Stanovení sušiny v testu sledování toxicity fenoxethanolu

$m_{\text{papírku}}$ [g]	$m_{\text{papírku+vzorku}}$ [g]	Sušina [g.l <sup>-1</sup> ]
Sušina v den dovezení kalu		
0,1330	0,1834	5,04
0,1300	0,1804	5,04
0,1230	0,1734	5,03
Průměr		5,04
Sušina 24 hodin před stanovením toxicity		
0,15507	0,21044	5,53
0,15953	0,21686	5,73
0,16310	0,22114	5,80
Průměr		5,69
<u>Sušina v den stanovení toxicity</u>		
0,12693	0,18089	5,40
0,12188	0,17735	5,45
0,13630	0,18777	5,45
Průměr		<b>5,42</b>

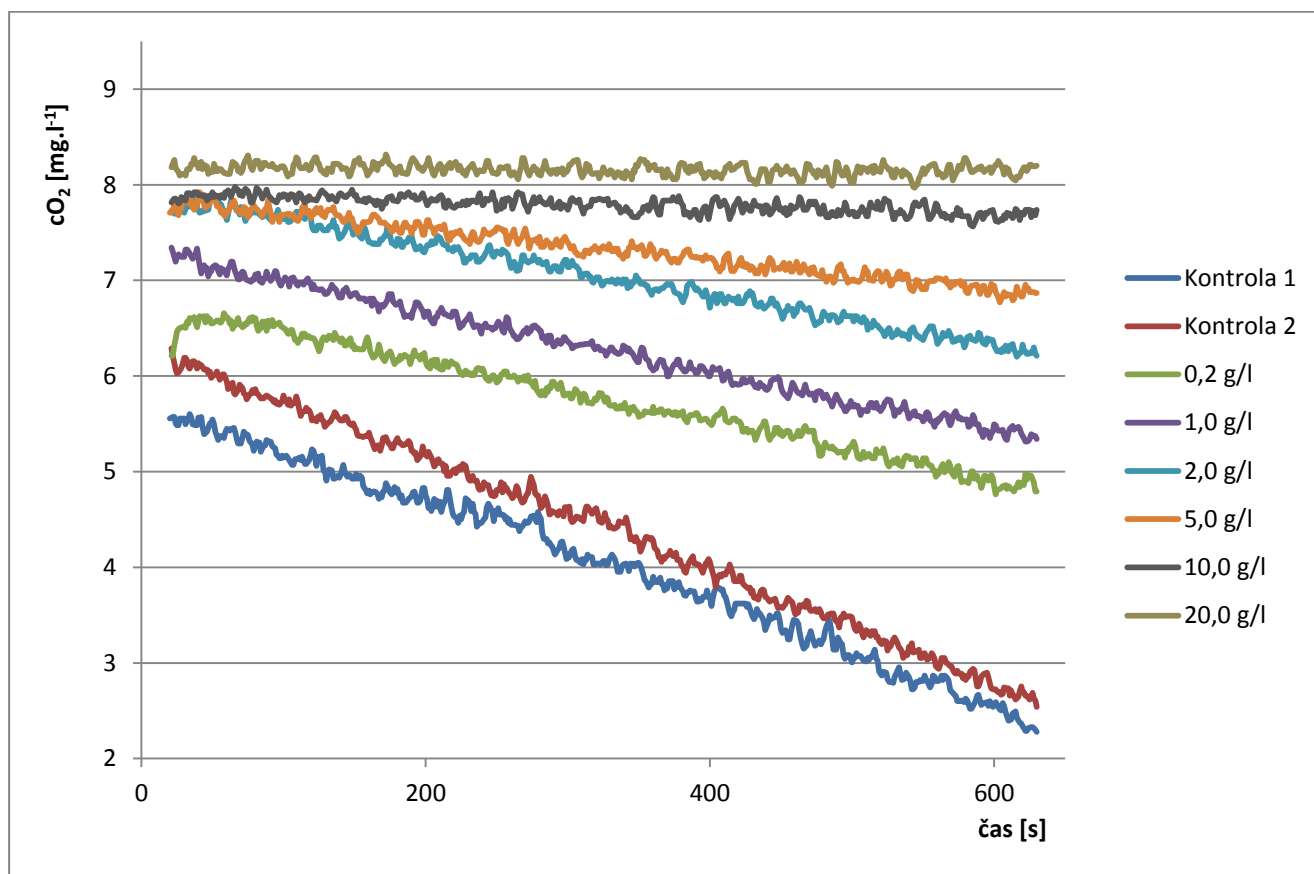
Sušina kalu byla vypočtena dle vztahu /2/.

Protože sušina v den přivezení kalu i v den stanovení odpovídala sušině stanovené normou ČSN ISO 8192, která stanovuje sušinu kalu pro stanovení toxicity  $5 \text{ g.l}^{-1}$ , nebylo zapotřebí kal nijak upravovat.

#### Sledování toxicity fenoxoethanolu vůči AK

Pro posouzení toxicity fenoxoethanolu vůči AK bylo sledováno celkem 6 odstupňovaných koncentrací fenoxoethanolu a také kontrolní vzorky. Byly sledovány koncentrace fenoxoethanolu 0,0; 0,2; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 a 20,0  $\text{g.l}^{-1}$ . Účinnost fenoxoethanolu vůči AK je znázorněna v grafu znázorněném v obrázku 7.

**Obr. 7** Grafické znázornění úbytku kyslíku v důsledku působení fenoxoethanolu na čase



Z grafického znázornění lze pozorovat vysokou účinnost fenoxoethanolu na AK, neboť i  $0,2 \text{ g.l}^{-1}$  způsobilo oproti kontrole podstatnou inhibici respirace. Výsledná koncentrace fenoxoethanolu 10 a  $20 \text{ g.l}^{-1}$  měl na kal praktický úplný inhibiční efekt.

Z jednotlivých grafů byly zjištěny rovnice přímky, které jsou uvedeny na následné straně.

Konc. fenoxoethanolu [ $\text{g.l}^{-1}$ ]	Rovnice přímky
Kontrola_1	$y = -0,0052x + 5,7411$
Kontrola_1	$y = -0,0059x + 6,3245$
0,2	$y = -0,0031x + 6,7654$
1,0	$y = -0,0031x + 7,3004$
2,0	$y = -0,0026x + 7,8959$
5,0	$y = -0,0016x + 7,8620$
10,0	$y = -0,0003x + 7,9028$
20,0	$y = -0,00009x + 8,1897$

Z rovnic přímek byla vždy vypočtena specifická respirační rychlost „ $r_s$ “ dle rovnice /3/ a bylo vypočteno procento inhibice „ $I$ “. Během měření úbytku kyslíku bylo sledováno pH při 20°C měřeného vzorku, z důvodu ověření, že měřený vzorek není příliš okyselen. To by mohlo mít negativní vliv na výsledky. Vypočtené a naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 60.

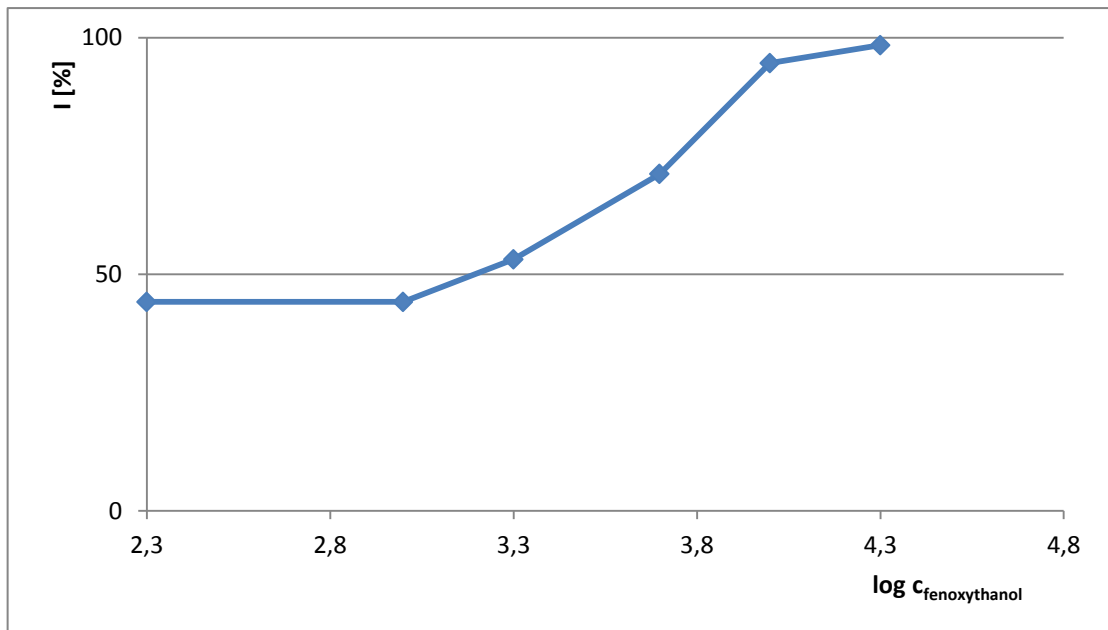
**Tab. 60** Vypočtené hodnoty specifické respirační rychlosti, procenta inhibice a měření pH při sledování účinku fenoxoethanolu vůči AK

Konc. fenoxoethanolu	pH	Logaritmus koncentrace fenoxoethanolu	Směrnice z rovnice regrese	$r_s$	$I$
[ $\text{g.l}^{-1}$ ]	[1]	[1]	[1]	[ $\text{mg.O}_2.\text{hod}^{-1}.\text{g}^{-1}$ ]	[%]
<b>0,0</b>	7,137	---	-0,0052	17,45	18,63
	7,199	---	-0,0059	19,80	
<b>0,2</b>	7,357	2,3010	-0,0031	10,40	44,14
<b>1,0</b>	7,147	3,0000	-0,0031	10,40	44,14
<b>2,0</b>	7,228	3,3010	-0,0026	8,73	53,15
<b>5,0</b>	7,225	3,6990	-0,0016	5,37	71,17
<b>10,0</b>	7,270	4,0000	-0,0003	1,01	94,59
<b>20,0</b>	7,205	4,3010	-0,00009	0,30	98,38

Hodnoty pH byly ve všech případech v optimální hodnotě v rozmezí 7,1 – 7,3. Kvůli nízkým hodnotám koncentrace fenoxoethanolu bylo použito pro výpočet logaritmu koncentrace v jednotkách  $\text{mg.l}^{-1}$ . Z vypočtených procent inhibice byla sestrojena inhibiční křivka, ze závislosti procent inhibice na logaritmu koncentrace. Inhibiční křivka aktivovaného kalu při účinku fenoxoethanolu je zobrazena v obrázku 8.



Obr. 8 Inhibiční křivka účinku fenoxxyethanolu vůči AK



Z vypočtených hodnot inhibice byla stanovena efektivní koncentrace inhibující 50% respirace ( $EC_{50}$ ).

Hodnota  $EC_{50}$  pro fenoxxyethanol vůči směsné kultuře v aktivovaném kalu byla vypočtena na  **$EC_{50} = 1,88 \text{ g.l}^{-1}$** .

## 4.4.2 Sledování respirace aerobního kalu s přidavkem 1O2P

Stanovení sušiny kalu

Stanovení sušiny kalu probíhalo stejně jako v předchozím testu.

**Tab. 61** Stanovení sušiny v testu sledování toxicity 1O2P

$m_{\text{papírku}}$ [g]	$m_{\text{papírku+vzorku}}$ [g]	Sušina [g.l <sup>-1</sup> ]
Sušina v den dovezení kalu		
0,12815	0,17402	4,59
0,13128	0,17165	4,04
0,12561	0,17783	5,22
Průměr		4,62
Sušina 24 hodin před stanovením toxicity		
0,1237	0,1856	6,19
0,1168	0,1805	6,37
0,1251	0,1817	5,63
Průměr		6,06
<u>Sušina v den stanovení toxicity</u>		
0,12987	0,19275	6,30
0,12800	0,18406	5,61
0,12970	0,18992	6,02
Průměr		<b>5,98</b>

Vlivem nízké počáteční sušiny, bylo během centrifugace používáno pro resuspendaci 600 ml ředěného minerálního média místo původních 500 ml. Po poslední resuspendaci byl kal doplněn na celkový objem 1,5 l.

Sušina AK v den stanovení byla 5,98 g.l<sup>-1</sup> proto byl kal zředěn minerálním ředěným médiem. Objem pro zředění AK byl vypočten podle vztahu 5.

$$V_1 c_1 = V_2 c_2$$

/5/

Kde:

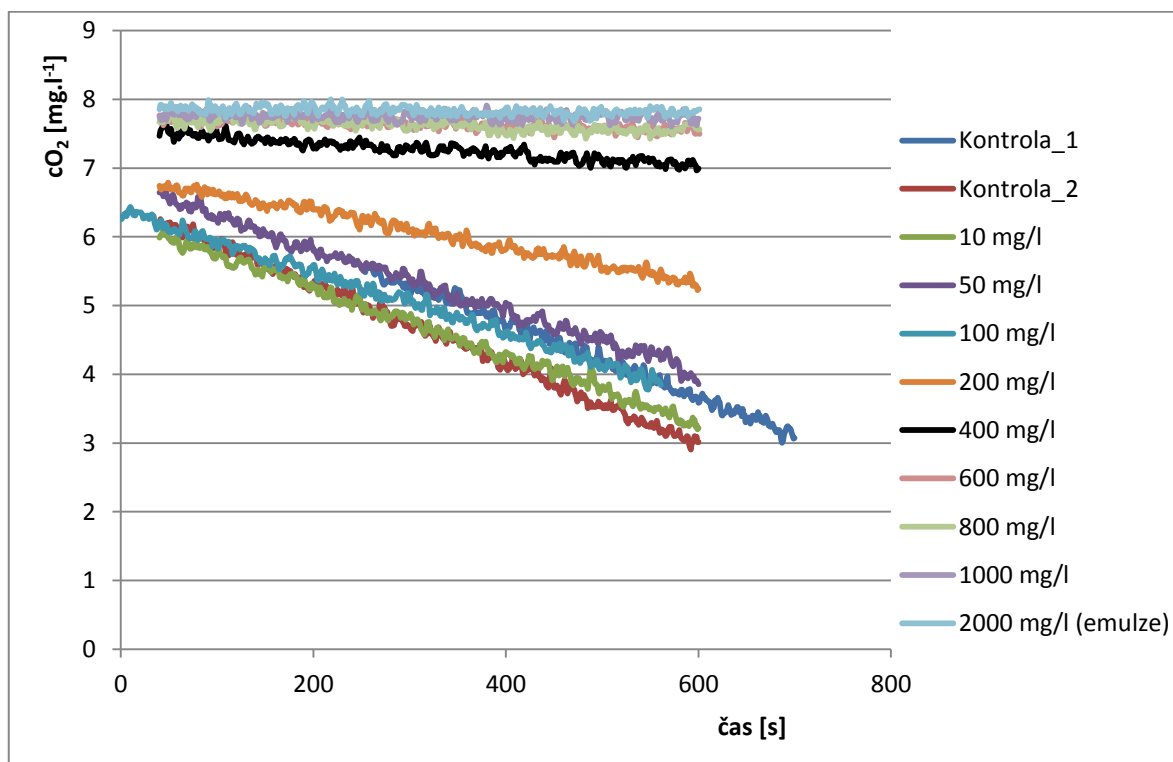
$V_1$	- Původní objem zásobního roztoku kalu	[ml]
$V_2$	- Konečný objem roztoku kalu	[ml]
$c_1$	- Původní sušina zásobního roztoku kalu	[g.l <sup>-1</sup> ]
$c_2$	- Výsledná sušina kalu	[g.l <sup>-1</sup> ]

Na základě výpočtu bylo zjištěno, že potřebný objem pro zředění kalu na požadovanou hodnotu sušiny kalu 5,0 g.l<sup>-1</sup> bylo zapotřebí 294 ml ŘMM.

#### Sledování toxicity 1O2P vůči AK

Pro stanovení toxicity 1O2P bylo použito výsledných koncentrací 1O2P v roztoku 0,01; 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00 g.l<sup>-1</sup> a dále emulze 2,00 g.l<sup>-1</sup> a kontrolní vzorek. Výsledky respirace jsou uvedeny v obrázku 9.

**Obr. 9** Grafické znázornění úbytku kyslíku v důsledku působení 1O2P na čase



Výsledky grafického znázornění ukazují na to, že nízké koncentrace 1O2P (10 – 100 mg.l<sup>-1</sup>) nemají podstatný vliv na respiraci aktivovaného kalu. Účinnost 1O2P se projevila až při výsledné koncentraci 0,2 g.l<sup>-1</sup>. Při přidavku 0,4 g.l<sup>-1</sup> již byla prokázána téměř úplná inhibice AK. Přídavek 1O2P o výsledné koncentraci 0,4 – 0,8 mg.l<sup>-1</sup> také ukázala nejvyšší pěnivost. Při vyšších koncentracích 1O2P nebylo pění tak výrazné jak v předchozím případě. Stejně jako u testu s fenoxethanolem, vůči AK byly stanoveny

hodnoty specifické respirační rychlosti a procenta inhibice. Během měření respirace bylo měření i pH měřených vzorků. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 62. Z jednotlivých grafů byly zjištěny rovnice přímků, které jsou uvedeny níže.

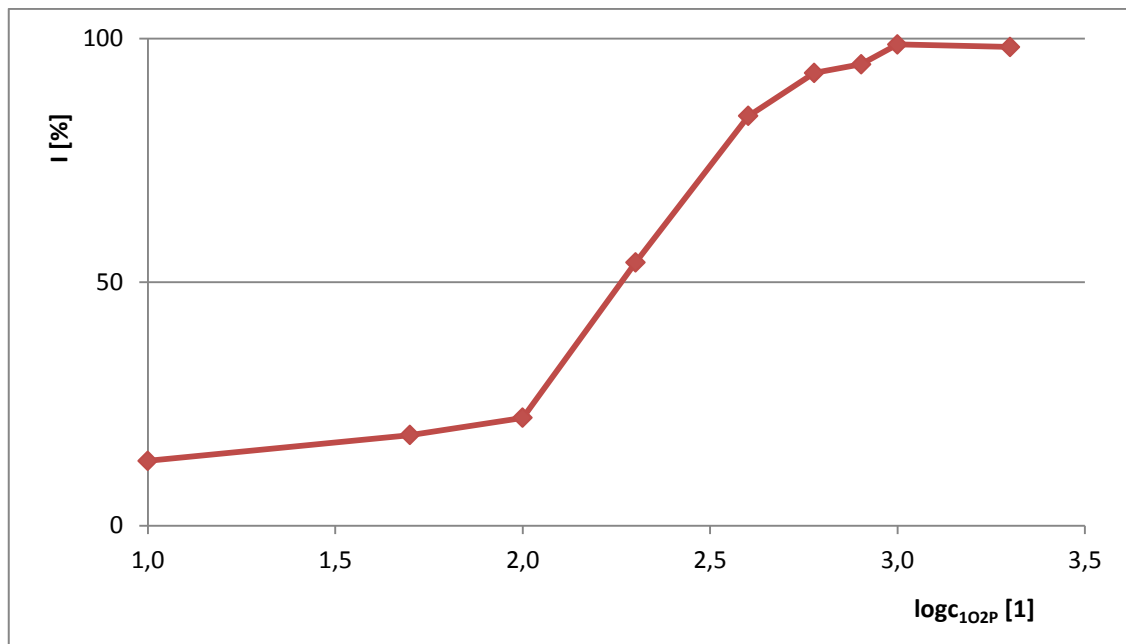
Konc. 1O2P [g.l <sup>-1</sup> ]	Rovnice přímků
Kontrola_1	$y = -0,0055x + 6,9445$
Kontrola_1	$y = -0,0058x + 6,4726$
0,01	$y = -0,0049x + 6,2382$
0,05	$y = -0,0046x + 6,7464$
0,1	$y = -0,0044x + 6,5462$
0,2	$y = -0,0026x + 6,8783$
0,4	$y = -0,0009x + 7,5461$
0,6	$y = -0,00004x + 7,7582$
0,8	$y = -0,00003x + 7,7131$
1,0	$y = -0,000007x + 7,7764$
2,0	$y = -0,00001x + 7,78722$

**Tab. 62** Vypočtené hodnoty specifické respirační rychlosti, procenta inhibice a měření pH při sledování účinku 1O2P vůči AK

Konc. 1O2P	pH	Logaritmus koncentrace 1O2P	Směrnice z rovnice regrese	$r_s$	I
[g.l <sup>-1</sup> ]	[1]	[1]	[1]	[mg.O <sub>2</sub> .hod <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> ]	[%]
0,00	7,156	---	-0,0055	19,80	---
0,00	7,202	---	-0,0058	20,88	20,34
0,01	7,230	1,0000	-0,0049	17,64	13,27
0,05	7,180	1,6990	-0,0046	16,56	18,58
0,10	7,190	2,0000	-0,0044	15,84	22,12
0,20	7,214	2,3010	-0,0026	9,36	53,98
0,40	7,149	2,6021	-0,0009	3,24	84,07
0,60	7,158	2,7782	-0,0004	1,44	92,92
0,80	7,167	2,9031	-0,0003	1,08	94,69
1,00	7,190	3,0000	-0,00007	0,25	98,76
2,00	7,178	3,3010	-0,0001	0,36	98,29

Měření respirace probíhalo za optimálních podmínek pH, které bylo v rozmezí 7,1 – 7,3. Z vypočtených hodnot procentuální inhibice respirace byla sestrojena křivka inhibice v závislosti na logaritmu koncentrace. Inhibiční křivka pro 1O2P je vyobrazena v grafu obrázku 10.

**Obr. 10** Inhibiční křivka účinku 1O2P vůči AK



Z naměřených dat inhibice, byla vypočtena hodnota **EC<sub>50</sub> = 0,185g.l<sup>-1</sup>**.

## ZÁVĚR

V rámci diplomové práce jsem se zabýval protibakteriálními účinky fenoxylethanolu a 1-oktyl-2-pyrrolidonu (1O2P) vůči čistým bakteriálním kulturám a oproti směsné kultuře v aktivovaném kalu.

Vůči čistým bakteriálním kulturám byly stanoveny hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) metodou sledování růstu kultur v živném médiu v 96-jamkových mikrotitračních destičkách, s odstupňovanými koncentracemi sledovaných látek, případně jejich směsí. Stanovení MIC a MBC probíhalo primárně s použitím čtyř grampozitivních a čtyř gramnegativních kultur.

Stanovené hodnoty MIC a MBC pro obě látky jsou uvedeny v souhrnné tabulce 63.

**Tab. 63** Souhrnná tabulka MIC a MBC vůči testovacím bakteriálním kulturám

Kultura	Fenoxyethanol		1-oktyl-2-pyrrolidon	
	MIC	MBC	MIC	MBC
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]
<b>Grampozitivní</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	6,0	7,5	0,25	0,25-0,50
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	7,5	15,0	0,25	0,25
<i>Rhodococcus erythropolis</i> FR6	7,0	> 13,0	0,10	0,10
<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216				
- prekultivovaný 72 hod.	6,0	> 15,5	0,10	> 1,0
- prekultivovaný 20 hod.	7,5	7,5	0,10	0,1
<b>Gramnegativní</b>				
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	4,5	6,0	0,50	0,50
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4416	6,0	6,0	0,25	0,50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	4,5	7,5	> 2,00	
<i>Pseudomonas</i> sp. MP11	4,5	6,0	> 1,00	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MS1	6,0	> 7,0	> 1,00	

Ze zjištěných hodnot MIC a MBC fenoxylethanolu vyplývá, že grampozitivní kultury jsou vůči němu poněkud odolnější než kultury gramnegativní. Schopnost rozmnožovat se a růst u grampozitivních bakterií i za zvýšených koncentrací fenoxylethanolu v roztoku může být dána charakterem jejich buněčné stěny. Ta má oproti

stěně gramnegativních bakterií silnější vrstvu peptidoglykanu a nemá tzv. vnější membránu, která by mj. mohla být fenoxxyethanolem narušována.

Zkoušky s 1O2P vůči čistým kulturám bakterií ukázaly mnohem vyšší toxicitu 1O2P než fenoxxyethanolu. Hodnoty MIC a MBC se (až na výsledek u *Klebsiella pneumoniae*) shodovaly, což také ukazuje na vyšší účinnost 1O2P inhibovat bakterie. Mezi testovacími organismy však prokázaly vysokou schopnost odolávat 1O2P bakterie rodu *Pseudomonas*. Kromě kultury *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 byly na toxicitu 1O2P zkoumány také kultury *Pseudomonas aeruginosa* kmeny FT1, FT2 a FT4, *Pseudomonas fluorescens* MS1 a *Pseudomonas putida* FR3, a i tyto kultury prokázaly schopnost odolávat i koncentraci 1O2P 1 g.l<sup>-1</sup> (hranice rozpustnosti 1O2P ve vodě).

Určitá pozornost byla věnována sporulující bakterii *Bacillus subtilis* CCM 2216, která byla použita po dvojí prekulivaci, a to 20 a 72 hodin. Kultura prekulivovaná 72 hodin prokázala velkou schopnost odolávat i vysokým koncentracím fenoxxyethanolu i 1O2P oproti kultuře prekulivované jen 20 hodin.

Mimo sledování účinnosti jednotlivých látek na čisté kultury byl experimentálně posouzen účinek směsi fenoxxyethanolu a 1O2P vůči čistým kulturám. Pro posouzení byly použity zástupci gramnegativních bakterií *E. coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Z grampozitivních bakterií byly použity kultury *St. aureus* CCM 3953 a *Bacillus subtilis* CCM 2216 prekulivovaný 20 hodin. U všech sledovaných kultur došlo ke zvyšování účinnosti směsi s narůstající koncentrací 1O2P. U bakterie *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, která byla nejodolnější ze všech zkoumaných kultur vůči 1O2P, byl zaznamenán účinek směsi i při přidavku 1O2P v koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup>. Účinnost směsi se zvyšující se koncentrací 1O2P byla taková, že umožnila snížit koncentraci fenoxxyethanolu ze 4,5 g.l<sup>-1</sup> na 3,0 g.l<sup>-1</sup>. U kultury *E. coli* CCM 3954, kde MIC samotného fenoxxyethanolu byla 4,5 g.l<sup>-1</sup>, při přidavku 1O2P v koncentraci 200 mg.l<sup>-1</sup>, došlo ke snížení potřebné koncentrace fenoxxyethanolu na 3,0 g.l<sup>-1</sup> a za těchto podmínek i docházelo k usmrcení buněk. Tím bylo prokázáno, že směs fenoxxyethanolu a 1O2P na bakteriální buňky působí účinněji než látky samotné. To může být způsobené například tím, že fenoxxyethanol působí převážně na bakteriální stěnu a tím může napomáhat proniknout toxickejšímu 1O2P do cytoplasmy nebo narušením významných buněčných struktur na různých místech. Praktické využití této skutečnosti však bude závislé na toxikologických vlastnostech 1O2P.

Poslední část diplomové práce se zabývala toxicitou fenoxxyethanolu a IO2P vůči směsné kultuře aktivovaného kalu (AK) z čistírny odpadních vod. Principem bylo sledování rychlosti respirace s odstupňovanými koncentracemi každé látky. Z naměřených dat bylo zjištěno, že přídavek fenoxxyethanolu o relativně nízké koncentraci  $0,2 \text{ g.l}^{-1}$  již má na aktivovaný kal významný inhibiční účinek (44%-tní snížení respirační rychlosti), a že přídavek fenoxxyethanolu o koncentracích  $10,0 - 20,0 \text{ g.l}^{-1}$  způsobuje téměř úplnou inhibici respiraci kalu. V případě IO2P měly nejnižší zkoumané koncentrace ( $10 - 50 \text{ mg.l}^{-1}$ ) na respirační schopnost kalu jen účinek (inhibice  $13 - 18\%$ ). Důvodem může být, že nižší koncentrace IO2P nejsou pro AK toxické nebo došlo k vychytání IO2P na buněčnou složku vloček AK. Koncentrace IO2P  $0,6 - 2,0 \text{ g.l}^{-1}$  však již měli na AK téměř úplný inhibiční účinek. Dále byly vypočteny hodnoty  $EC_{50}$  pro fenoxxyethanol  $1,88 \text{ g.l}^{-1}$  a pro IO2P  $0,185 \text{ g.l}^{-1}$ . Z toho je patrné, že IO2P je přibližně 10x toxicitější než fenoxxyethanol.

Stanovení MIC a MBC v mikrotitračních destičkách umožňuje stanovit účinné koncentrace, které zamezí množení bakterií a je to tedy metoda vhodná pro sledování účinnosti konzervačních látek. Navíc tato metoda umožňuje sledovat více koncentrací a kultur najednou na malé ploše, čímž je velmi efektivní a nenákladná, zároveň ale neumožňuje zaznamenat účinky nižších koncentrací než MIC na testovací organismy. Nevýhodami této metody jsou však nutnost přípravy dvou paralelních mikrotitračních destiček, pro počáteční a konečné přístrojové stanovení absorbance, v zájmu vyloučení kontaminace jamek. S tímto také souvisí nutnost velmi obezřetné práce při přípravě destiček, vzhledem ke snadné kontaminaci sousedních jamek.

Metoda sledování respirace AK je zcela odlišná a její význam spočívá ve sledování toxicity širokého rozpětí koncentrací studovaných látek kompletní kalové mikrobiální společenstvo. Metoda tedy může postihnout i účinky nízkých koncentrací látek na aktivovaný kal a umožňuje tak posoudit dopad na přítomnost toxických sloučenin na tohoto klíčového činitele čistírenských technologií. Nevýhodou metody je však nemožnost sledovat více jak jeden vzorek najednou a také potřeba většího množství vzorků i chemikálií.



## 5 LITERATURA

- ABDEL MALEK, S. M. A. a Y. R. BADRAN, 2010. Pseudomonas aeruginosa PAO1 Adapted to 2-Phenoxyethanol Shows Cross-Resistance to Dissimilar .... *Folia Microbiologica*, č 55, s. 588-92 [cit. 2014-11-24]. Dostupné z: [www.proquest.com](http://www.proquest.com)
- ANSELL, J. M. a J. A. FOWLER, 1988. The acute oral toxicity and primary ocular and dermal irritation of selected N-alkyl-2-pyrrolidones. *Fd Chem. Toxic*, **5** (26), a2475-479.
- ARCTANDER, S., 1969. Perfume and Flavor Chemicals (Aroma Chemicals). Montclair (New Jersey), **1** (1223).
- BASF THE CHEMICAL COMPANY, 2009. Technical Data Sheet. [N-Octyl-2-pyrrolidone dist. (NOP)] In: BASF THE CHEMICAL COMPANY. *BASF Corporation* [online].2009 [cit. 2014-12-31]. Technical Data Sheet. Dostupné z: [http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/ChemicalsNAFTA/doc4/BASF/PRD/30036600/.pdf?title=&asset\\_type=pds/pdf&language=EN&urn=urn:documentum:eCommerce\\_sol\\_EU:09007bb280063b67.pdf](http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/ChemicalsNAFTA/doc4/BASF/PRD/30036600/.pdf?title=&asset_type=pds/pdf&language=EN&urn=urn:documentum:eCommerce_sol_EU:09007bb280063b67.pdf)
- BASF THE CHEMICAL COMPANY , 2013. Safety Data Sheet. [N-Octyl-2-pyrrolidone dist.] In: *BASF CORPORATION* [online]. 11. 02. 2013, verze 1.0 [cit. 2014-12-31]. Dostupné z: [http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/ChemicalsNAFTA/doc4/BASF/PRD/30036600/.pdf?title=&asset\\_type=msds/pdf&language=EN&validArea=US&urn=urn:documentum:ProductBase\\_EU:09007af8800937b1.pdf](http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/ChemicalsNAFTA/doc4/BASF/PRD/30036600/.pdf?title=&asset_type=msds/pdf&language=EN&validArea=US&urn=urn:documentum:ProductBase_EU:09007af8800937b1.pdf)
- BEILFUSS, W., M. LESCHKE a K. WEBER, 2005. A New Concept to Boost the Preservative Efficacy of Phenoxyethanol. *SöFW Journal*, č 131 [cit. 2014-12-17]. International Journal for Applied Science; Personal Care, Detergents, Specialities. Dostupné z: <http://microsites.schuelke.com/preservative-booster/documents/ANewConcepttoBoostthePreservativeEfficacyofPhenoxyethanol-SFW-2005.pdf>
- BEVERIGEDGE, E. G. et al., 1991. Electron and light microscopy of damaged bacteria. *Blackwell Scientific Publications*. Oxford, s. 135-53.
- BIRNIE, A. J. a J. S. ENGLISH, 2006. 2-Phenoxyethanol-induced contact urticaria. *Contact Dermatitis*, **6** (54), 349.

- CADBY, P., W. TROY a M. VEY, 2002. Consumer exposure to fragrance ingredients: providing estimates for safety evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, č 36, s. 246-52.
- ČESKO. Vyh. č. 448/2009 Sb. o stanovení hygienických požadavků na kosmetické prostředky, Příloha 6; Část 1 - Seznam konzervačních přísad povolených v kosmetických prostředcích, nejvyšší přípustné koncentrace, požadavky na čistotu vybraných konzervačních přísad a podmínky použití.
- ČSN EN ISO 8192, 2007. *Jakost vod - Zkouška inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem při oxidaci uhlikatých látek a ...*. Praha: Český normalizační institut. Třídící znak 75 7731.
- GILBERT, P. et al., 2001. Assessment of resistance towards biocides following the attachment of micro-organisms to, and .... *Journal of Applied Microbiology*, č 91, s. 248-54 [cit. 2014-08-08]. Dostupné z: [www.onlinelibrary.wiley.com](http://www.onlinelibrary.wiley.com)
- HANCOCK, R. E., 2000. Antibiotic resistance in *P. aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist. Update*, s. 247-55.
- HIGGINS, D. a J. DWORKIN, 2011. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews* [PDF online]. FILLOUX, P. A. (ed.). New York (USA, Columbia University): 25. 10. 2011, s. 131-48 [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: <http://femsre.oxfordjournals.org/content/36/1/131>
- HOWARD, P. H. *Handbook of environmental fate and exposure data For organic chemicals*, sv. IV. 2. Chelsea (Michigan, USA): Lewis Publisher [cit. 2014-12-17]. 0-87371-413-X. náhled knihy. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=HdhohbQrg8IC&pg=PA498&dq=phenoxyethanol&hl=cs&sa=X&ei=27yJVI60Lom7Uf\\_ygLgF&ved=0CDsQ6AEwBA#v=onepage&q=phenoxyethanol&f=false](https://books.google.cz/books?id=HdhohbQrg8IC&pg=PA498&dq=phenoxyethanol&hl=cs&sa=X&ei=27yJVI60Lom7Uf_ygLgF&ved=0CDsQ6AEwBA#v=onepage&q=phenoxyethanol&f=false)
- LOUGHLIN, M. F., M. V. JONES a P. A. LAMBERT, 2002. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other .... *J. Antimicrob. Chemother*, č 49, s. 631-39.
- LUNDOV, M. D. et al., 2011. Low-level efficacy of cosmetic preservatives. *International Journal of Cosmetic Science*, č 33, s. 190-96 [cit. 2014-12-23]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.proxy.k.utb.cz/doi/10.1111/j.1468-2494.2010.00619.x/abstract>

- MARON, D., J. KATZENELLENBOGEN a B. N. AMES, 1981. Compatibility of organic solvents with the salmonella/microsome test. *Mutat. Res.- Reviews*, č 88, s. 343-50.
- MOODY, J., 2004. *Synergism testing: broth microdilution checkboard and broth microdilution*. Washington DC: ASM Press. 5.12.1-5.12.23.
- NCCLS document M27-A2, 2002. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved Standards, ....*
- NCCLS document M38-A, 2002. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; ....*
- NCCLS document M7-A6, 2003. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; ....*
- NIJSSEN, L. M., C. A. INGEN-VISSCHER a J.J. H. E. VAN DONDERS, 2009. TNO Quality of Life [database]. *Volatile Compounds in Food*. Zeist (The Netherlands): 1963-2009. Version 11.1.1.
- PÉRIAMÉ, M., J.M. PAGÈS a A. DAVIN-REGLI, 2014. Enterobacter gergoviae adaptation to preservatives commonly used in cosmetic industry. *International Journal of Cosmetic Science*, č 36, s. 386-95 [cit. 2015-01-13]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.proxy.k.utb.cz/>
- RIFM, 1978. Acute toxicity studies in rats, mice, rabbits, and guinea pigs. *Research Institute for Fragrance Materials Inc.* Woodcliff Lake (New Jersey, USA): 3. 11. 1978, č 1699.
- RIFM, 1978. Repeated insult patch test of 2-phenoxyethanol in human subjects. Unpublished report from .... *Research Institute for Fragrance Materials Inc.* Woodcliff Lake (New Jersey, USA): 1978b, č 7690.
- RIFM, 1978. Report on human maximization studies. *Research Institute for Fragrance Materials Inc.* Woodcliff Lake (New Jersey, USA): 21. 7. 1978, č 1698.
- RIFM, 1982. Acute toxicity studies. *Research Institute for Fragrance Materials Inc.* Woodcliff Lake (New Jersey, USA): 13. 2. 1982, č 1689.
- RIFM, 1983. Union Carbide's submission to EPA of test data on 2-phenoxyethanol. Unpublished report from Union .... *Research Institute for Fragrance Materials Inc.* Woodcliff Lake (New Jersey, USA): 1983a, č 7155.

- RIFM, 1984. Kodak's submission to EPA of test data on 2-phenoxyethanol. Unpublished report from Eastman Kodak .... *Research Institute for Fragrance Materials Inc.* Woodcliff Lake (New Jersey, USA): 1984a, č 7157.
- RIFM, 1987. Emery's submission to EPA of test data on 2-phenoxyethanol. Unpublished report from Emery Chemicals. *Research Institute for Fragrance Materials Inc.* Woodcliff Lake (New Jersey, USA): 1987a, č 18899.
- SCOGNAMIGLIO, J. et al., 2012. Fragrance material review on 2-phenoxyethanol. *Food and Chemical Toxicology*, č 50, s. 244-55 [cit. 2014-11-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/>
- SCHÜLKE & MAYER GMBH, 2010. s&m Phenoxyethanol. *Preservative for cosmetics & toiletries*. Norderstedt: 7. 9. 2010.
- TAMURA, I. et al., 2013. Ecotoxicity and screening level ecotoxicological risk assessment of five antimicrobial agents: .... *Journal of Applied Toxicology*, **33** (11), a21222-1229 [cit. 2014-08-08]. [wileyonlinelibrary.com](http://www.wileyonlinelibrary.com). Dostupné z: [www.wileyonlinelibrary.com](http://www.wileyonlinelibrary.com)
- VYORALOVÁ, M., 2012. *Předpoklady mikrobiálního rozkladu polyvinylpyrrolidonu*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí.
- WILSON, M. et al., 1990. Effect of phenoxyethanol, chlorhexidine and their combination on subgingival plaque bacteria. *J. Antimicrob. Chemother*, roč. XXV, s. 921-29.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

1O2P	1-oktyl-2-pyrrolidonu
FHE	Fenoxyethanol
CFU	Kolonie tvořící jednotku
MCI/MI	Methylchloroisothiazolinon /methylisothiazolinon
MI	Methylisothiazolinon
FIC	Zlomková inhibiční koncentrace
PHMB	Polyhexamethylen biguanid
BSK	Biochemická spotřeba kyslíku
TSB	Trypton sójový bujón
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
AK	Aktivovaný kal
EC <sub>50</sub>	Efektivní koncentrace inhibující 50% respirace

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<b>Obr. 1</b> Struktura fenoxýethanolu.....	12
<b>Obr. 2</b> Grafické znázornění úbytku kolonií v závislosti na době kultivace u kultury <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BEILFUSS et. al. , 2005).....	16
<b>Obr. 3</b> Grafické znázornění úbytku kolonií v závislosti na době kultivace u vláknité mikroskopické houby <i>Aspergillus niger</i> (BEILFUSS et. al. , 2005) .....	16
<b>Obr. 4</b> Přežívání volných buněk (prázdné symboly) <i>Escherichia coli</i> a biofilmových buněk (plné symboly) (GILBERT et. al. , 2001) .....	21
<b>Obr. 5</b> Přežívání volných buněk (prázdné symboly) <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	21
<b>Obr. 6</b> Tvar buněk <i>E. coli</i> CCM 3954 bez přídavku 1O2P pod mikroskopem při zvětšení 400x .....	69
<b>Obr. 7</b> Grafické znázornění úbytku kyslíku v důsledku působení fenoxýethanolu na čase .....	87
<b>Obr. 8</b> Inhibiční křivka účinku fenoxýethanolu vůči AK .....	89
<b>Obr. 9</b> Grafické znázornění úbytku kyslíku v důsledku působení 1O2P na čase .....	91
<b>Obr. 10</b> Inhibiční křivka účinku 1O2P vůči AK .....	93

**SEZNAM TABULEK**

<b>Tab. 1</b> Stanovení MIC fenoxylethanolu oproti Euxylu <sup>®</sup> PE 9010 (BEILFUSS et. al. , 2005).....	17
<b>Tab. 2</b> Stanovení MIC vybraných bakteriálních kultur (SCHÜLKE & MAYER GMBH , 2010) .....	18
<b>Tab. 3</b> Stanovení MIC vybraných druhů kvasinek a hub (SCHÜLKE & MAYER GMBH , 2010) .....	19
<b>Tab. 4</b> MIC pro diazolidinyl močovinu, MCI/MI, MI a fenoxylethanol (LUNDOV et. al. , 2011) .....	23
<b>Tab. 5</b> FIC pro kombinace konzervantů s fenoxylethanolem (LUNDOV et. al. , 2011).....	23
<b>Tab. 6</b> Dávkování jednotlivých složek do mikrotitračních destiček pro stanovení MIC fenoxylethanolu v první části pokusu .....	33
<b>Tab. 7</b> Dávkování jednotlivých složek do mikrotitračních destiček pro stanovení MIC fenoxylethanolu v druhé části pokusu.....	33
<b>Tab. 8</b> Dávkování jednotlivých složek do mikrotitračních destiček pro stanovení MIC fenoxylethanolu ve třetí části pokusu .....	34
<b>Tab. 9</b> Dávkování jednotlivých složek do mikrotitračních destiček pro stanovení MIC fenoxylethanolu ve čtvrté části pokusu.....	35
<b>Tab. 10a</b> Dávkování jednotlivých složek do mikrotitračních destiček pro stanovení MIC fenoxylethanolu pro <i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216 prekultivovaný 20 hodin – testované koncentrace fenoxylethanolu 0 – 3 g.l <sup>-1</sup> .....	35
<b>Tab. 11</b> Dávkování složek do roztoku TSB pro stanovení MIC 1O2P v I. části testu.....	37
<b>Tab. 12</b> Dávkování složek do lahvíček pro stanovení MIC 1O2P v II. části testu .....	38
<b>Tab. 13</b> Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení účinnosti směsi fenoxylethanolu s přídatkem 1O2P o konc. 200 mg.l <sup>-1</sup> pro kulturu <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	40
<b>Tab. 14</b> Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxylethanolu s přídatkem 1O2P o konc. 100 mg.l <sup>-1</sup> pro kulturu <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	41
<b>Tab. 15</b> Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxylethanolu s přídatkem 1O2P o konc. 50 mg.l <sup>-1</sup> pro kulturu <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	41
<b>Tab. 16</b> Příprava mikrotitračních destiček pro ověření MIC fenoxylethanolu pro kulturu <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	42

<b>Tab. 17</b> Příprava mikrotitračních destiček pro ověření MIC 1O2P pro kulturu <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	42
<b>Tab. 18</b> Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přídávkem 1O2P o konc. 50 mg.l <sup>-1</sup> pro kulturu <i>Ps. aeruginosa</i> CCM 3955.....	43
<b>Tab. 19</b> Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přídávkem 1O2P o konc. 100 mg.l <sup>-1</sup> pro kulturu <i>Ps. aeruginosa</i> CCM 3955.....	43
<b>Tab. 20</b> Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přídávkem 1O2P o konc. 200 mg.l <sup>-1</sup> pro kulturu <i>Ps. aeruginosa</i> CCM 3955.....	44
<b>Tab. 21</b> Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přídávkem 1O2P o konc. 400 mg.l <sup>-1</sup> pro kulturu <i>Ps. aeruginosa</i> CCM 3955.....	44
<b>Tab. 22</b> Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přídávkem 1O2P o konc. 500 mg.l <sup>-1</sup> pro kulturu <i>Ps. aeruginosa</i> CCM 3955.....	44
<b>Tab. 23</b> Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přídávkem 1O2P o konc. 600 mg.l <sup>-1</sup> pro kulturu <i>Ps. aeruginosa</i> CCM 3955.....	45
<b>Tab. 24</b> Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přídávkem 1O2P o konc. 50 mg.l <sup>-1</sup> pro kultury <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953 a <i>Bacillus subtilis</i> CCM 4224.....	46
<b>Tab. 25</b> Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přídávkem 1O2P o konc. 100 mg.l <sup>-1</sup> pro kultury <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953 a <i>Bacillus subtilis</i> CCM 4224.....	46
<b>Tab. 26</b> Příprava mikrotitračních destiček pro stanovení MIC směsi fenoxxyethanolu s přídávkem 1O2P o konc. 200 mg.l <sup>-1</sup> pro kultury <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953 a <i>Bacillus subtilis</i> CCM 4224.....	47
<b>Tab. 27</b> Dávkování jednotlivých složek pro stanovení respirace aktivovaného kalu s přídávkem fenoxxyethanolu .....	49
<b>Tab. 28</b> Dávkování jednotlivých složek pro stanovení respirace aktivovaného kalu s přídávkem 1O2P .....	51
<b>Tab. 29</b> Sledování růstu grampozitivních kultur s přídávkem fenoxxyethanolu o výsledné koncentraci 0 – 3 g.l <sup>-1</sup> .....	53
<b>Tab. 30</b> Sledování růstu gramnegativních s přídávkem fenoxxyethanolu o výsledné koncentraci 0 – 3 g.l <sup>-1</sup> .....	54
<b>Tab. 31</b> Sledování růstu grampozitivních kultur s přídávkem fenoxxyethanolu o koncentraci 0,0 – 6,3 g.l <sup>-1</sup> .....	54



<b>Tab. 32</b> Sledování růstu gramnegativních s přidavkem zásobního roztoku fenoxylethanolu o výsledné koncentraci 0,0 – 6,3 g.l <sup>-1</sup> .....	55
<b>Tab. 33</b> Porovnávací tabulka z vyhodnocení MIC fenoxylethanolu o konc. 3 – 13 g.l <sup>-1</sup> vizuálně i přístrojově pro gramnegativní bakterie .....	56
<b>Tab. 34</b> Porovnávací tabulka z vyhodnocení MIC fenoxylethanolu o konc. 3 – 13 g.l <sup>-1</sup> vizuálně i přístrojově pro grampozitivní bakterie.....	57
<b>Tab. 35</b> Porovnávací tabulka pro zpřesnění MIC fenoxylethanolu o konc. 3 – 7 g.l <sup>-1</sup> pro gramnegativní bakterie.....	59
<b>Tab. 36</b> Porovnávací tabulka pro zpřesnění MIC fenoxylethanolu o konc. 3 – 7 g.l <sup>-1</sup> pro gramnegativní bakterie.....	60
<b>Tab. 37</b> Stanovení MBC fenoxylethanolu pro grampozitivní bakterie .....	61
<b>Tab. 38</b> Stanovení MBC fenoxylethanolu v koncentracích 13,0 – 15,5 g.l <sup>-1</sup> pro kultury <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 a <i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216 .....	62
<b>Tab. 39</b> Stanovení MBC fenoxylethanolu pro gramnegativní bakterie .....	63
<b>Tab. 40</b> Zpřesnění výsledků MBC fenoxylethanolu pro gramnegativní kultury .....	64
<b>Tab. 41</b> Stanovení MIC a MBC fenoxylethanolu pro kulturu <i>Bacillus subtilis</i> prekultivovanou 20 hodin.....	65
<b>Tab. 42</b> Vizuelní hodnocení zákalu pro stanovení MIC 1O2P pro gramnegativní bakterie .....	66
<b>Tab. 43</b> Vizuelní hodnocení zákalu pro stanovení MIC 1O2P pro grampozitivní bakterie .....	67
<b>Tab. 44</b> Mikroskopické pozorování účinku 1-oktyl-2-pyrrolidonu na <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	68
<b>Tab. 45</b> Kultivační hodnocení účinku 1O2P na <i>E. coli</i> CCM 3954.....	70
<b>Tab. 46</b> Mikroskopické pozorování účinku 1O2P na <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 .....	71
<b>Tab. 47</b> Stanovení MIC 1O2P vůči gramnegativním bakteriím .....	73
<b>Tab. 48</b> Stanovení MIC 1O2P vůči grampozitivním bakteriím .....	74
<b>Tab. 49</b> Opakování stanovení MIC pro 1O2P vůči grampozitivním kulturám.....	76
<b>Tab. 50</b> Opakování stanovení MIC pro 1O2P vůči gramnegativním kulturám .....	77
<b>Tab. 51</b> Vizuelní sledování účinku 1O2P vůči vybraným kulturám rodu <i>Pseudomonas</i> .....	78
<b>Tab. 52</b> Stanovení MBC 1O2P vůči gramnegativním bakteriím .....	79
<b>Tab. 53</b> Stanovení MBC 1O2P vůči grampozitivním bakteriím.....	79

<b>Tab. 54</b> Sledování účinku směsi fenoxxyethanolu (0,0 – 5,0 g.l <sup>-1</sup> ) a 1O2P (50 – 200 mg.l <sup>-1</sup> ) vůči <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	81
<b>Tab. 55</b> Sledování účinku směsi fenoxxyethanolu (0 – 4,5 g.l <sup>-1</sup> ) a 1O2P (50 – 200 mg.l <sup>-1</sup> ) vůči <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 .....	82
<b>Tab. 56</b> Sledování účinku směsi fenoxxyethanolu (0 – 4,5 g.l <sup>-1</sup> ) a 1O2P (400 – 600 mg.l <sup>-1</sup> ) vůči <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 .....	83
<b>Tab. 57</b> Sledování účinku směsi fenoxxyethanolu (0 – 6,0 g.l <sup>-1</sup> ) a 1O2P (50 – 200 mg.l <sup>-1</sup> ) vůči <i>St. aureus</i> CCM 3953 .....	84
<b>Tab. 58</b> Sledování účinku směsi fenoxxyethanolu (0 – 6,0 g.l <sup>-1</sup> ) a 1O2P (50 – 200 mg.l <sup>-1</sup> ) vůči kultuře <i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216 .....	85
<b>Tab. 59</b> Stanovení sušiny v testu sledování toxicity fenoxxyethanolu .....	86
<b>Tab. 60</b> Vypočtené hodnoty specifické respirační rychlosti, procenta inhibice a měření pH při sledování účinku fenoxxyethanolu vůči AK.....	88
<b>Tab. 61</b> Stanovení sušiny v testu sledování toxicity 1O2P .....	90
<b>Tab. 62</b> Vypočtené hodnoty specifické respirační rychlosti, procenta inhibice a měření pH při sledování účinku 1O2P vůči AK.....	92
<b>Tab. 63</b> Souhrnná tabulka MIC a MBC vůči testovacím bakteriálním kulturám .....	94

## SEZNAM PŘÍLOH

**PŘÍLOHA 1P: SCHÉMA MĚŘENÍ RESPIRACE**

# PŘÍLOHA P I: SCHÉMA MĚŘENÍ RESPIRACE

