

# Testování antibakteriálních vlastností v koncentračním gradientu

Bc. Ivana Jančarová

---

Diplomová práce  
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2019/2020

## **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Ivana Jančarová**  
Osobní číslo: **T18704**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Testování antibakteriálních vlastností v koncentračním gradientu**

### **Zásady pro vypracování**

Zpracování rešerše na téma antibakteriálních látek a jejich testování.  
Testování antibakteriální aktivity bioaktivních látek.  
Srovnání antibakteriálních vlastností testovaných klasickou metodou s testováním látek v koncentračním gradientu.

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

**Seznam doporučené literatury:**

KALIA S. Biopolymers biomedical and environmental applications. ISBN 978-0-470-63923-8.

DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 978-0-387-98160-4

Nicholas P. M. . Microbiology: A Very Short Introduction. ISBN-10: 9780199681686

Daryl S. P. Topical Antimicrobial Testing and Evaluation. ISBN-10: 0824719573

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Zdenka Capáková, PhD.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

---

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

---

**doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2020

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

### **Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

Polymery jsou součástí každodenního života. Některé z nich díky své molekulové struktuře vykazují antibakteriální vlastnosti a představují tak skupinu látek, které pomáhají v boji proti bakteriím. Testování nových antibakteriálních látek je nesmírně důležité, protože v důsledku nadužívání antibiotik dnes čelíme globální krizi v podobě bakteriální rezistence. Proto cílem diplomové práce bylo testování aktivity vybraných polymerů běžně používaných v kosmetických přípravcích. Antibakteriální aktivita byla testována pomocí agarové difúzní metody, která se zakládala na inhibici bakteriálních kmenů *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Koncentrace testovaných polymerů, u kterých byla prokázána inhibice bakteriálního růstu, byly dále testovány pomocí koncentračního gradientu, který umožňoval sledovat vývoj bakteriální adaptace na působení testovaných polymerů v řádu dní. Práce srovnává výsledky získané klasickou metodou agarové difúzní zkoušky a koncentračním gradientem. Antibakteriální vlastnosti byly potvrzeny u poly-L-lysinu a PEI, naopak antibakteriální aktivitu nebylo možné s jistotou potvrdit u PEG 400 a PEG 600.

**Klíčová slova:** polymery, antibakteriální polymery, bakterie, agarová difúzní metoda, koncentrační gradient

## **ABSTRACT**

Polymers are part of our everyday life. Some of them, due to their molecular structure, have antibacterial properties and that is why they represent a group of substances that help in the fight against bacteria. Testing of new antibacterial substances is extremely important, because due to the overuse of antibiotics, we are currently facing a global crisis in the form of bacterial resistance. Therefore the goal of the diploma thesis was to test the antibacterial activity of polymers which are commonly used in cosmetics. Antibacterial activity was tested using the agar diffusion method, which was based on the inhibition of bacterial strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Concentrations of tested polymers, that showed inhibition of bacterial growth, were further tested using a concentration gradient, which was allowed to monitor the development of bacterial adaptation to presence of test polymers over days. The thesis compares the results obtained by the classical method of agar diffusion test and concentration gradient. Antibacterial properties were confirmed for poly-L-lysine and PEI, on the opposite, antibacterial activity could not be confirmed with certainty for PEG 400 and PEG 600.

**Key words:** polymers, antibacterial polymers, bacteria, agar diffusion method, concentration gradient

Mé poděkování patří vedoucí diplomové práce paní Ing. Zdence Capákové, Ph.D. za její čas, cenné rady a připomínky při psaní práce. Poděkování patří také panu Mgr. Janu Vajdákovi za ochotu a pomoc při experimentální práci. Dále děkuji paní Ing. Daniele Veselé za veškerou pomoc v laboratoři.

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

# OBSAH

ÚVOD.....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 POLYMERY.....</b>	<b>12</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA.....	12
1.2 DĚLENÍ POLYMERŮ .....	13
<b>2 KOSMETIKA A KOSMETICKÝ PRŮMYSL .....</b>	<b>17</b>
2.1 LEGISLATIVA.....	17
2.2 APLIKACE POLYMERŮ V KOSMETICE .....	17
2.2.1 Humektanty .....	18
2.2.2 Kondicionéry .....	18
2.2.3 Zahušť'ovadla a emulgátory.....	19
2.2.4 Filmotvorné polymery.....	20
<b>3 BAKTERIE.....</b>	<b>22</b>
3.1 ROZDĚLENÍ BAKTERÍÍ .....	23
3.2 GRAMNEGATIVNÍ BAKTERIE .....	24
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	25
3.3 GRAMPOZITIVNÍ BAKTERIE.....	26
3.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
3.4 BIOFILM .....	28
3.5 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE BAKTERÍÍ .....	29
3.6 BAKTERIÁLNÍ KONTAMINACE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ .....	31
3.6.1 Primární kontaminace .....	31
3.6.2 Sekundární kontaminace .....	32
3.6.3 Mikrobiální limity v kosmetických přípravcích.....	32
<b>4 MECHANISMUS PŮSOBNÍ ANTIBAKTERIÁLNÍCH POLYMERŮ .....</b>	<b>33</b>
4.1 BIOCIDNÍ POLYMERY .....	34
4.2 POLYMERNÍ BIOCIDY .....	35
4.3 POLYMERY UVOLŇUJÍCÍ BIOCIDY .....	36
4.4 ANTIMIKROBIÁLNÍ POLYMERY V KOSMETICE .....	37
4.4.1 Chitosan.....	37
4.4.2 Poly-L-lysin.....	38
4.4.3 Lineární kvarterní amoniové polymery.....	40
4.4.4 Polymery s heterocyklickým dusíkem .....	40
4.4.5 Polymery obsahující guanidinové skupiny .....	41
4.4.6 N-halaminové polymery.....	41
4.5 POLYMERNÍ NANOKOMPOZICE.....	42
4.5.1 Nanočástice stříbra .....	42
4.5.2 Nanočástice zlata.....	43



<b>5</b>	<b>METODY TESTOVÁNÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY .....</b>	<b>44</b>
5.1	KIRBY-BAUER TEST .....	44
5.2	DILUČNÍ METODY .....	45
5.2.1	Diluční metoda v agaru .....	45
5.2.2	Diluční metoda v bujónu .....	45
5.3	E-TEST.....	46
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>49</b>
6.1	TESTOVANÉ BAKTERIE .....	49
6.2	KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	49
6.2.1	Tryptonfan sojový agar .....	49
6.2.2	Mueller Hinton agar .....	50
6.3	ROZTOKY .....	50
6.3.1	Fyziologický roztok .....	50
6.4	TESTOVANÉ POLYMERY.....	50
6.4.1	Poly-L-lysin.....	51
6.4.2	Polyethylenimin (PEI).....	51
6.4.3	Polyethylenglykol (PEG) .....	52
6.5	INOKULACE BAKTERIÍ.....	53
6.6	VLASTNÍ EXPERIMENT .....	53
6.6.1	Testování antibakteriální aktivity.....	54
6.6.2	Testování vývoje bakteriální adaptace .....	55
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>58</b>
7.1	VYHODNOCENÍ INHIBIČNÍCH ZÓN .....	58
7.2	VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ BAKTERIÁLNÍ ADAPTACE .....	65
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>77</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>79</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>88</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>89</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>92</b>

## ÚVOD

Bakterie se vyznačují vysokou schopností se adaptovat na změny prostředí. I z toho důvodu dnes čelíme celosvětové krizi v podobě bakteriální rezistence. Bakterie se staly odolnými vůči běžně používaným antibiotikům, konzervačním látkám a desinfekčním prostředkům. Výzkumy se proto zaměřují na hledání a testování nových antibakteriálních látek s vysokou účinností proti širokému spektru bakterií s co nejnižším rozvojem rezistence. Takovými látkami mohou být polymery, makromolekulární látky, které se vyznačují vysokou molekulovou hmotností a stabilitou. Polymery jsou skupina látek, které mají velké množství aplikací od podlahových krytin až po polymerní nosiče pro léčiva. V posledních letech se výzkum polymerů zaměřil na jejich antibakteriální vlastnosti. Mechanismus antibakteriální aktivity může být pasivní, aktivní nebo může být zprostředkován antibakteriálním činidlem vázaným na polymerní matici. Díky svým vlastnostem jsou polymery považovány za nadějná antibakteriální činidla.

Antibakteriální aktivita je testována pomocí klasických metod, které nás informují pouze o citlivosti bakteriálního kmene vůči testované látce. Jelikož jsou bakterie rychle adaptovatelné na změnu prostředí, je nutné testovat antibakteriální aktivitu látek v delším časovém období a sledovat možný vývoj antibakteriální adaptace.

Předmětem práce bylo porovnat výsledky získané agarovou difuzní metodou s výsledky bakteriální adaptace na testované látky, prostřednictvím koncentračního gradientu připraveného experimentálním zařízením.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 POLYMERY

Polymery jsou chemické látky, které jsou všude kolem nás. Od klasických materiálů, jako jsou plasty nebo sklo, až po biopolymery, například proteiny, které katalyzují chemické reakce v podobě enzymů. Nepochybně nejdůležitějším polymerem na světě je deoxyribonukleová kyselina. Bez své polymerní povahy by DNA nemohla plnit svou základní roli, a to nositelky genetické informace. Polymerní materiály a systémy jsou dnes v moderním světě nepostradatelné. Jejich aplikace sahá od balení potravin po stavebnictví, textil, automobilový a letecký průmysl, barvy, gumy, lepidla nebo lékařských technologií, lze je také nalézt v kosmetice nebo farmaceutických výrobcích. Výrobní kapacita polymerů přesahuje 300 milionů tun ročně. Po době kamenné, bronzové a železné, dnes ve 21. století žijeme v době, která patří polymerům [1].

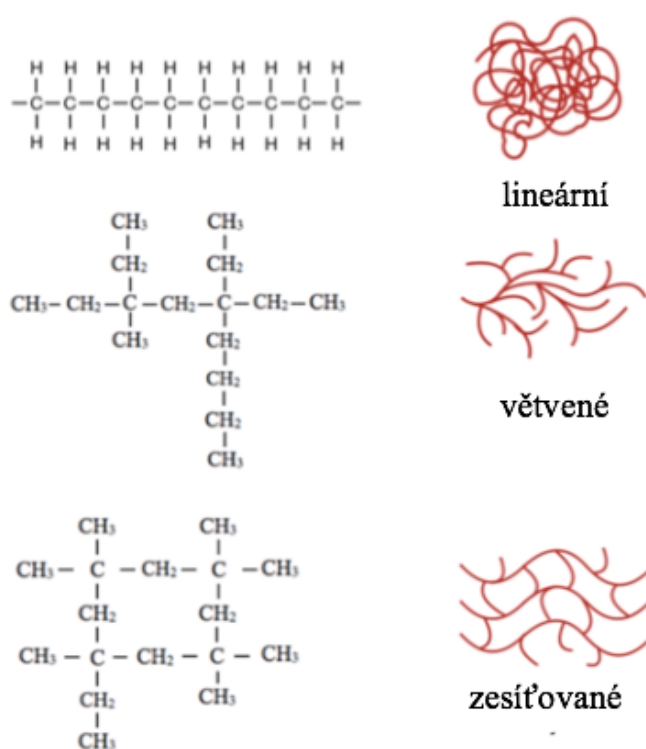
### 1.1 Charakteristika

Polymery jsou makromolekulární látky, jejich název vychází z řečtiny a v překladu znamená mnoho jednotek. To vyplývá z jejich struktury, která je tvořena velkým počtem opakujících se stavebních bloků (monomerů), což jsou druhy nebo skupiny atomů. Ty jsou obvykle spojeny kovalentními vazbami a tvoří obrovské molekuly. Princip názvosloví polymerů je založen na názvu monomeru, před který je přidána předpona poly [1]. Polymery jsou syntetizovány polyreakcemi, které jsou buď řetězové a reakce se označuje jako polymerace nebo stupňovité, při kterých polymery vznikají polykondenzací nebo polyadící. Stupňovité reakce probíhají reakcí funkčních skupin monomerů a vzniká chemická vazba, která charakterizuje vznikající polymer [1][2]. U polykondenzace dochází v každém reakčním kroku, kromě vzniku rostoucího řetězce také k uvolnění vedlejšího nízkomolekulárního produktu, nejčastěji vody. Polyadice je polykondenzační reakce velmi podobná. Při polyadici ale nedochází ke vzniku vedlejších reakčních produktů. Naproti tomu dochází při reakčním kroku, k přesunu atomu vodíku mezi funkčními skupinami monomerů. Příkladem polyadice je syntéza polyuretanu [2]. Polymerace je řetězová reakce. Monomery musí obsahovat alespoň jednu dvojnou vazbu nebo mít cyklickou molekulu. Při reakci zaniká dvojná vazba a vznikají dvě vazby jednoduché, vytváří se makromolekulární řetězec. Pro zahájení polymerace je nutná přítomnost aktivní částice, známé jako iniciátor, následně dojde k řetězové reakci, při které se připojují další monomerní jednotky, dokud se nevyčerpají a reakce není ukončena [1]. Počet monomerů, které tvoří makromolekulární látky, není přesně definován. Obecně je stanoveno číslo  $n$ , které je označováno jako stupeň

polymerace a udává počet monomerních jednotek které tvoří polymer. Makromolekuly, které jsou tvořeny menším počtem monomerů se nazývají oligomery. Polymery, které se skládají pouze z jednoho druhu merů jsou homopolymery a kopolymery jsou tvořeny z více druhů merů [1]. Kopolymery se dělí se na blokové, jejichž makromolekula je tvořena bloky monomerů, které se střídají. Řetězec roubovaných polymerů se skládá ze základního řetězce, který je tvořen jedním druhem monomeru a postranního řetězce, které jsou tvořeny druhým monomerem [2].

## 1.2 Dělení polymerů

Kromě chemické struktury se polymery mohou lišit v molekulovém uspořádání. Lineární polymery vznikají z monomerů, které jsou spojeny se dvěma sousedními jednotkami, typickým příkladem je polyethylen. Makromolekuly, které vznikají reakcí vícefunkčních monomerů se nazývají větvené nebo zesíťované polymery (Obrázek 1) [1][2]. Uspořádání molekul, stupeň polymerace, chemický vazby, typ monomerů, určují výsledné vlastnosti polymeru [1].

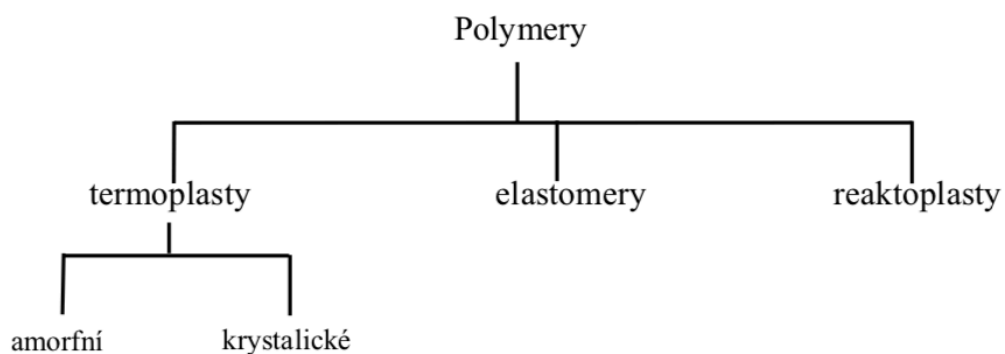


Obrázek 1 – Konstituce makromolekul, upraveno dle [3].

Polymerní materiály můžeme dělit z hlediska jejich teplotního chování do tří skupin na elastomery, termoplasty a reaktoplasty (Obrázek 2). Termoplasty jsou lineární nebo rozvětvené polymery, které při působení tepla přechází do plastického stavu. Vhodnou technikou, například vstřikováním, lisováním nebo vytlačáním mohou být tvarovány do jakéhokoliv tvaru. Tato skupiny představuje největší podíl polymerů v komerční výrobě. Termoplasty se dále dělí na amorfnní a krystalické. Amorfnní plasty mají nahodilé uspořádání a vyznačují se průhledností a teplotou skelného přechodu  $T_g$ . Pod touto teplotou jsou termoplasty ve sklovitém stavu a jsou tvrdé ale křehké, poté přechází do stavu kaučokovitého a jsou deformovány. Naopak krystalické termoplasty jsou charakteristické teplotou tání  $T_M$ , při které dochází k přechodu z tuhého stavu do kapalného. Dochází tedy k rozpadu krystalické struktury a termoplasty mohou být upraveny do požadovaného tvaru [2][4].

Elastomery jsou vysoce elastické, zesíťované polymery, které lze poměrně jednoduše deformovat a poté se vrátí zpět do původního stavu, deformace je tedy vratná. Příkladem elastomeru je kaučuk, ze kterého se vyrábí pryže [4][5].

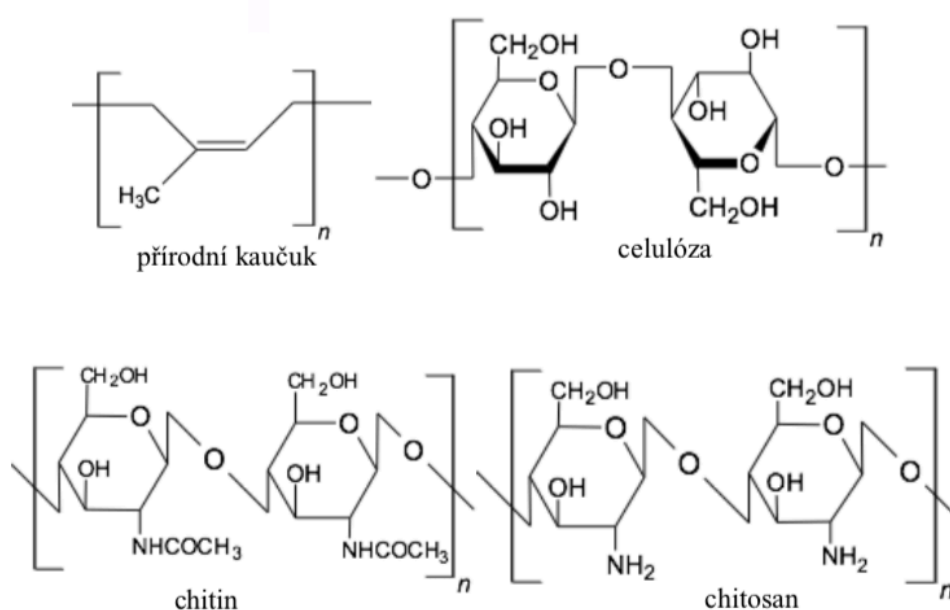
Poslední skupinou jsou reaktoplasty, polymerní materiál, který je tuhý. Při zahřívání taje a lze je omezeně tvarovat. Při delším zahřívání vzniká prostorově zesíťovaný polymer. Přejchod z plastického do tuhého stavu je nevratný [4][5].



Obrázek 2 – Klasifikace polymerů na základě působení teploty [4].

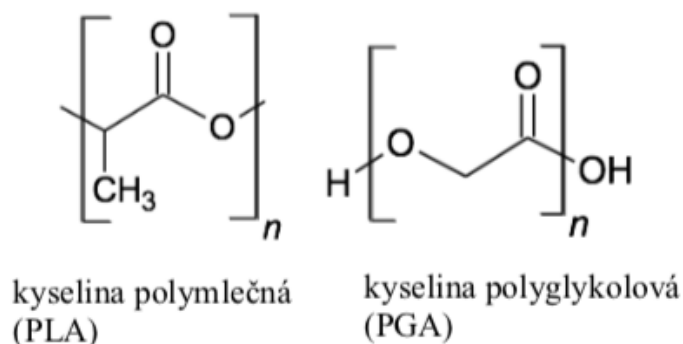
Polymery mohou být přírodního nebo syntetického původu. Přírodní polymery, taktěž biopolymery, jsou makromolekulární látky. Některé z nich, z velké části tvoří lidské tělo, například DNA, RNA, proteiny a polysacharidy. Prvním technologicky využívaným

přírodním polymerem byl přírodní kaučuk (*Obrázek 3*), získáván ze stromu kaučukovníku, jako surová kapalina latex [4][5]. Při zahřívání kaučuku se sírou je získán produkt, který se nazývá pryž a proces jeho výroby vulkanizace. Pryž neboli guma, je materiál, který může být vyráběn jak z přírodního, tak ze syntetického kaučuku. Vyznačuje se vysokou elasticitou a je základním materiálem gumárenského průmyslu [4][6]. Přírodní polymerní materiály jsou například celulóza (*Obrázek 3*), hedvábí [5]. Ale také chitosan a chitin (*Obrázek 3*), vyskytující se v exoskeletu korýšů a měkkýšů [7].



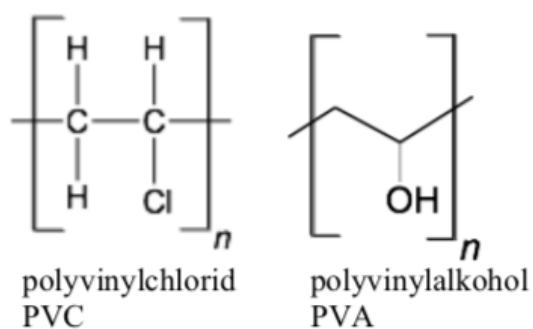
*Obrázek 3 – Strukturní vzorce vybraných přírodních polymerů.*

Další skupinou jsou semi-syntetické polymery, což jsou polymerní materiály, které jsou produkovány z přírodních polymerů. Do této skupiny patří například termoplastické polymery hydroxykyselin, které jsou biologicky kompatibilní a odbouratelné. Jsou degradovány hydrolytickým štěpením esterové vazby. Nacházejí uplatnění v lékařství, v podobě samovstřebatelných chirurgických nití nebo tkáňových náhrad. Jedná se o homopolymery i kopolymery kyseliny mléčné (PLA) kyseliny glykolové (PGA) (*Obrázek 4*). Kombinace polymléčné a polyglykolové kyseliny se využívá k tvorbě implantátů, ve tkáňovém inženýrství nebo jako nosiče aktivních látek [8].



Obrázek 4 – Strukturní vzorce vybraných semi-syntetických polymerů.

Syntetické polymery byly původně vyvinuty jako náhrada přírodních materiálů [1]. Jsou to umělé materiály a představují skupinu polymerů, které jsou vyráběny v největším objemu [4][8]. Tyto polymerní materiály se používají v různých formách. Například polyvinylchlorid (PVC) (Obrázek 5) má ethylenovou kostru s kovalentně vázaným chlorem. Pro jeho výrobu a aplikaci je nutné přidávání stabilizátorů a změkčovadel. Využívá se k výrobě podlahových krytin, ale také v lékařství, kde je jeho aplikace omezena z důvodu přítomnosti změkčovadel, v tomto případě ftalátů, které mohou představovat zdravotní riziko. Ftaláty přemění tuhé PVC na měkký polymer a využívá k výrobě vaků na uchovávání krve nebo mimotělních hadiček [9]. Z toho vyplývá možnost přizpůsobit vlastnosti polymerního materiálu na požadovanou aplikaci [1]. Syntetické polymery se využívají k výrobě katetrů, dialyzační membrány, lékových stentů, implantátů, kloubních náhrad, barev, lepidel, a v řadě dalších aplikací [9]. Příkladem syntetických polymerů jsou polyethylenglykol, povinylalkohol (Obrázek 5), polyamid, polydimethylsiloxany [8][9].



Obrázek 5 – Strukturní vzorce vybraných syntetických polymerů.



## 2 KOSMETIKA A KOSMETICKÝ PRŮMYSL

Pod pojmem kosmetika si můžeme představit nepřehledné množství výrobků, od krémů po dekorativní kosmetiku. Kosmetický průmysl je jedním z nejrychleji rostoucích odvětví. Klasifikace může být někdy obtížná, a to hlavně u těch výrobků, které plní více funkcí. Takové výrobky označujeme jako hraniční. V kosmetickém průmyslu je nejčastěji hraniční výrobek mezi kosmetickým přípravkem a léčivem. K jejich správnému zařazení napomáhá legislativa [10]. Kosmetickými přípravky mohou být krémy, deodoranty a antiperspiranty, gely, emulze, pleťové masky, pudry, pasty, přípravky pro úpravu a barvení vlasů a řada dalších [11].

### 2.1 Legislativa

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu o kosmetických přípravcích. Cílem je sjednotit terminologii v kosmetickém průmyslu. Definuje například kosmetický přípravek, výrobce, dovozce, distributora. Toto nařízení se nevztahuje na léčivé přípravky. Určuje také požadavky na bezpečnost, dodržování správné výrobní praxe, upravuje používání některých látek ve výrobcích. Kosmetický přípravek se definuje jako látka nebo směs, která je určena k aplikaci na pokožku, vlasy, nehty, rty, zevní pohlavní orgány a pro péči o dutinu ústní. To znamená, že kosmetika je určena pouze k použití na vnější povrch lidského těla. Hlavní funkcí je čištění, parfemace, úprava tělesného pachu, ochrana, změna vzhledu a zajištění dobrého stavu. Z toho vyplývá, že kosmetické přípravky nesmí léčit [11]. Dalším právním předpisem je zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví, který určuje požadavky na výrobu, dovoz, balení a uvedení kosmetického přípravku na trh, ale také podmínky provozování kosmetických salónů [12].

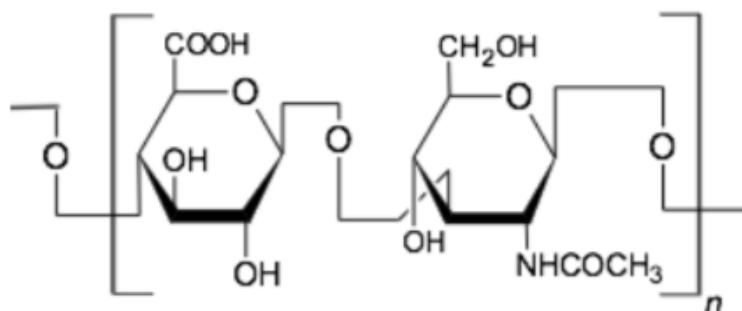
### 2.2 Aplikace polymerů v kosmetice

Polymery představují druhou největší skupinu složek v kosmetických přípravcích. Kosmetický průmysl produkuje velké množství kosmetiky, které se liší složením, funkcí a aplikací. Polymery mohou v kosmetice proto zastávat hned několik funkcí. Nejčastěji se ale využívají jako humektanty, kondicionéry, zahušťovadla nebo filmotvorné látky [13].

### 2.2.1 Humektanty

Humektanty jsou látky, které mají schopnost tvořit ochranný film a přitahovat vodu, tím zajišťují hydrataci a zlepšují celkový vzhled pokožky [7]. Nejpoužívanějším humektantem v kosmetice, je kyselina hyaluronová (Obrázek 6), která se přirozeně vyskytuje v živočišných tkáních. Proces stárnutí kůže je spojen s jejím úbytkem a jelikož se jedná o základní molekulu zodpovědnou za vázání a udržování vody, dojde k dehydrataci a ztrátě elasticity kůže, což má za následek zhoršení celkového vzhledu. Kyselina hyaluronová má hydratační a regenerační účinky, obnovuje elasticitu, vyhlazuje kůži a redukuje vrásky [14].

Dobré účinky v tomto ohledu vykazuje také přírodní polymer chitosan. Schopnost absorpce a retence vlhkosti je ovlivněna molekulovou hmotností a stupněm acetylace. Při snížení molekulové hmotnosti se zvýší kapacita zadržované vlhkosti i retence. Podobné vlastnosti má i chitin, který v komplexu chitin-glukan, vykazuje dobré hydratační účinky v krémech a nezpůsobuje erytém a zmírňuje projevy kůže [7].

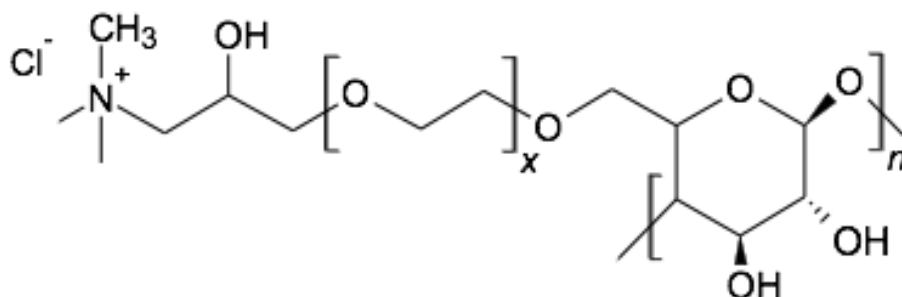


Obrázek 6 – Strukturální vzorec kyseliny hyaluronové

### 2.2.2 Kondicionéry

Kondicionéry se používají převážně ve vlasové kosmetice, jejich funkcí je vyhlazování povrchu vlasu, snadnější rozčesávání mokrých nebo suchých vlasů, zajistit odolnost vůči působení tepla, zlepšit celkový vzhled vlasů a chránit vlasy před škodlivým působením barev. Kondicionéry můžeme dělit na oplachové a bezoplachové. V kondičiačních přípravcích lze nalézt hlavně kationické polymery s kvarterními aminy v základu. Díky kladnému náboji se snadněji vážou na vlasy a omezují elektrizování vlasů způsobené záporně nabitým šampónem. Poměrně často používaným kationickým polymerem je Polyquarternium 10 (Obrázek 7), což je kationtová hydroxyethylcelulóza, která zajišťuje

vyhlazení povrchu vlasu a snadné rozčesávání [13]. Z přírodních polymerů se ve vlasové kosmetice hojně využívá chitin a chitosan, které mají také kondicionační vlastnosti [7].



Obrázek 7 – Strukturní vzorec Polyquarternium 10.

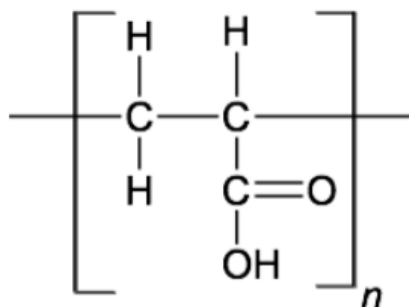
### 2.2.3 Zahušťovadla a emulgátory

Zahušťovadla se v kosmetice aplikují pro získání požadované stability a viskozity kosmetického přípravku. Jsou využívána ve vlasové kosmetice, konkrétně v gelech na vlasy, které jsou zahuštěny karbomery (Obrázek 8), polymery založené na kyselině akrylové, které tvoří gelovou strukturu výrobku. V tělové kosmetice se karbomery používají již od 70. let minulého století, jejich funkcí je stabilizace pleťových mlék proti sedimentaci a zkrémovatění. Další aplikací jsou barvy na vlasy, kde je nutné zajistit takovou texturu výrobku, pro co nejjednodušší nanášení a zabránit stékání barvy do obličeje a očí. Původně byla používána zahušťovadla jako celulóza nebo karbomery, která ale způsobovaly matný odstín a pro získání intenzivní barvy byly nutné vysoké koncentrace. Dobré zahušťovací schopnosti mají také přírodní polymery. Pektin je polysacharid, který působí jako gelující nebo zahušťovací činidlo a emulgátor [13].

Emulze je disperzní systém dvou vzájemně nemísitelných nebo omezeně mísitelných kapalin. Kapičky kapaliny (disperzní fáze) jsou dispergovány v kapalném médiu (kontinuální fáze). Hlavní složení emulze je vodná fáze, kapalná fáze a emulgátor. V kosmetických aplikacích se používají emulze olej ve vodě (O/V) a voda v oleji (V/O), v podobě dekorativní a skin care kosmetiky [15].

Polymerní emulgátory se používají k přípravě emulze typu (O/V). Emulze mohou obsahovat až 90 % dispergované olejové fáze. Emulze se podobají pěně a jsou naplněny olejovými kapičkami. Tato technologie se využívá pro přípravu koncentrovaných emulzí, které jsou při

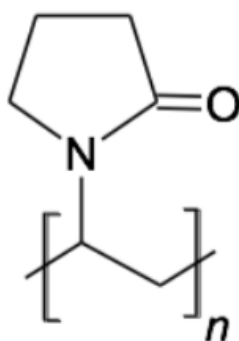
aplikaci zředěny s vodou. Příkladem aplikace jsou hydratační tělová mléka do sprchy, která vytváří na povrchu pokožky okluzivní olejovou vrstvu a tím prodlužují hydrataci. Účinnými polymerními emulgátory jsou též poloxamery [13].



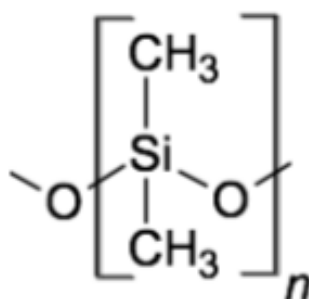
Obrázek 8 – Karbomery – monomerní jednotka kyselina akrylová

#### 2.2.4 Filmotvorné polymery

V kosmetice se polymery jako filmotvorné komponenty, využívají v lacích na nehty, barvách na vlasy nebo v dekorativní kosmetice. Nejčastěji se používají ve fixačních přípravcích na vlasy, jejichž hlavní funkcí je fixace vlasů v požadovaném tvaru. Navíc by měla být zajištěna snadná manipulace, rychlé zasychání, snadné rozčesávání, dodání objemu a lesku bez pocitu lepení. Vlasové fixátory mohou být ve formě pěny, aerosolu nebo gelu. Film musí být nehydrofobní, aby nedošlo k absorpci vlhkosti a tím ke ztrátě fixace [13]. Nejběžněji používaným filmotvorným činidlem je polyvinylpyrrolidon (PVP) (Obrázek 9), který tvoří na povrchu vlasového vlákna tenkou polymerní vrstvu, vyplňuje defekty v kutikule a tím vytváří hladký povrch, dodává lesk a udržuje tvar. Silikony jsou v kosmetice velmi populární kondicionační látky. Vytváří také tenký film na povrchu vlasu a nevytváří dojem mastných nebo ochablých vlasů. Některé silikony (Obrázek 10) jsou odolné vůči vodě a na vlasech zůstávají i po umytí. Do této skupiny patří dimetikony, cyklometikony a amodimetikony. Laky na nehty vytvářejí celistvý film na povrchu nehtu. Nitrocelulóza je primární činidlo, která tvoří film s vhodnou dobou sušení a požadovanou flexibilitou. Podobně jsou využívány také polymetakrylát nebo polyakryláty. Do této skupiny patří již zmíněné dimetikony, cyklometikony a amodimetikony [16].



Obrázek 9 – Strukturní vzorec polyvinylpyrrolidon (PVP).



Obrázek 10 – Monomerní jednotka polydimethylsiloxanů (silikonů).

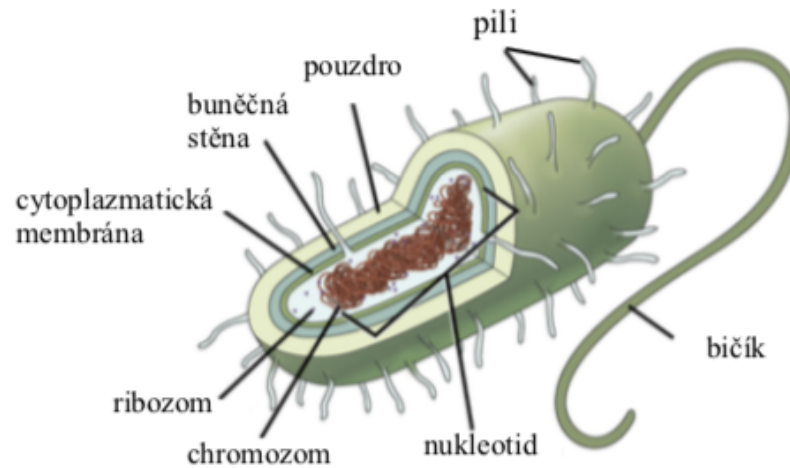
### 3 BAKTERIE

Buňka je strukturální, funkční a vývojová jednotka živé hmoty, která vzniká dělením již existující buňky [17]. Dle vnitřního uspořádání mohou být buňky rozděleny do dvou základních skupin: na prokaryotické a eukaryotické. Domény Bacteria a Archaea jsou klasifikovány jako prokaryotické organismy. Zatímco buňky zvířat, rostlin, plísní a prvoků jsou organismy eukaryotické [18].

K pochopení mechanismu antimikrobiálního působení, je nutné nejprve pochopit strukturu mikroorganismů. Bakterie jsou tedy prokaryotické mikroorganismy (*Obrázek 11*), o velikosti 0,3 až 5  $\mu\text{m}$ , které nemají pravé jádro [19]. Genetická informace je obsažena v chromozomu, který je tvořen jedinou kruhovou molekulou DNA, ve které jsou lokalizovány bakteriální geny. Kromě chromosomální DNA mohou bakterie obsahovat i malé, mimochromosomální DNA, které se nazývají plasmidy. Ty poskytují bakterii určité výhody v podobě rezistence vůči antibiotikům, těžkým kovům nebo produkce toxinů a bakteriocinů. Chromozom je uložen v cytoplazmě, která vyplňuje celý vnitřní prostor bakteriální buňky a tvoří vhodné prostředí pro organely [20].

Často jsou bakterie vystaveny nepříznivým podmínkám. Aby přežily, vyvinuly sofistikovaný buněčný obal, který je chrání, ale umožňuje selektivní průchod živin z okolí a odpadních produktů zevnitř [21]. Vnější obal buňky je tvořen pouzdrém, polysacharidového nebo polypeptidového druhu. Pouzdro se uplatňuje například při adhezi bakterie k pevnému povrchu pro iniciaci a stabilizaci tvorby biofilmu, též chrání buňku před vysušením [22]. Základní strukturou bakteriální buňky je buněčná stěna, která působí jako ochranná vrstva. Tvoří vnější kostru bakterie a tím pomáhá udržet její tvar [18]. Buněčná stěna je složena z peptidoglykanu, neboli mureinu. Jedná se o biopolymer, jehož struktura je tvořena střídavě opakujícími jednotkami N-acetylglukosaminu a kyselinou N-acetylmuramové, které jsou spojeny  $\beta$ -1,4-glykosidickou vazbou [23].

Ne všechny bakterie jsou schopny samostatného pohybu. Pohyb je zprostředkován vláknitými výběžky na povrchu bakteriální buňky. Tyto výběžky se nazývají bičíky, které jsou tvořeny proteinovou podjednotkou flagelinem, a umožňují bakterii pohyb v prostoru. Pili jsou vlákna, které se nachází stejně jako bičíky na povrchu bakterií a jsou složeny z proteinové podjednotky pilinu. Zajišťují schopnost některých bakterií přilnout k povrchům. Naproti tomu F-pili zprostředkovávají bakteriální konjugaci [20].



Obrázek 11 – Struktura prokaryotické buňky, upraveno dle [18].

### 3.1 Rozdělení bakterií

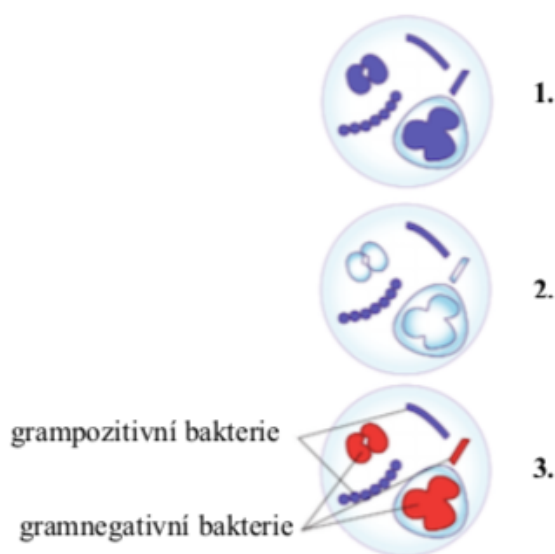
Před více než 100 lety Christian Gram vyvinul postup barvení, který umožňuje klasifikovat téměř všechny bakterie do dvou základních skupin, na grampozitivní a gramnegativní. Základ pro Gramovu diagnostiku spočívá ve strukturních rozdílech v buněčné stěně bakterií. [21]. Postup zahrnuje nanesení kultury na podložní sklíčko, která je fixována teplem. Následuje proces barvení, který je popsán na (Obrázku 12). Barvicí roztoky se nechají působit předepsanou dobou a poté jsou opláchnuty vodou. Grampozitivní bakterie se zbarví fialově [24]. Což je dáno silnou vrstvou peptidoglykanu a přítomností kyseliny teichoové v buněčné stěně, díky které dochází při barvení krystalovou violetí a mořením Lugolových roztokem ke vzniku barevného komplexu, který nelze vymýt přidáním alkoholu. [25]. Naproti tomu u gramnegativních bakterií, kyselina teichoová chybí, dochází při použití alkoholu k vymytí krystalové violetí a odbarvení. K nabarvení kultury dochází až v posledním kroku při použití safraninu. Výsledné zbarvení gramnegativních bakterií je tedy červené [24]

Morfologii bakterií lze poté mikroskopicky rozlišit a umožňuje další klasifikaci bakterií do skupin. Rozlišujeme tři základní tvary bakteriální buňky: koky, bacily, spirily [19]. Koky se mohou vyskytovat buď jako samostatné organismy, nebo ve dvojicích (diplokoky), tetradách, v řetězcích (streptokoky) a klastrech (stafylokoky). Bakterie ve tvaru tyčinek se

stejně jako koky, mohou vyskytovat samostatně (bacily) nebo ve dvojicích (diplobacily) nebo v řetězcích (streptobacily) [20].

Některé druhy bakterií jsou patogenní a ohrožují lidské zdraví. Naopak řada bakterií je pro naše zdraví prospěšná, nazývají se komenzální bakterie, které osídlují kůži a gastrointestinální trakt. Chrání naše tělo před patogeny a pomáhají při trávení. V posledních letech se diskutuje možnost, že tyto bakterie mohou regulovat také náladu [18].

Antibiotika jsou látky, které se používají k léčbě bakteriální infekce. Jejich účinek je baktericidní, kdy dochází k usmrcení bakterií nebo bakteriostatický, ty naopak inhibují bakteriální růst [26]. V důsledku nadužívání těchto léků se bakterie staly odolné a došlo ke vzniku antibiotické rezistence. To představuje celosvětový problém, protože běžné bakteriální infekce se mohou stát neléčitelné [27].



Obrázek 12 Postup Gramova barvení (1. barvení bakteriální kultury krystalovou violetí a Lugolových roztokem, 2. odbarvení alkoholem, 3. dobarvení safraninem), upraveno dle [20].

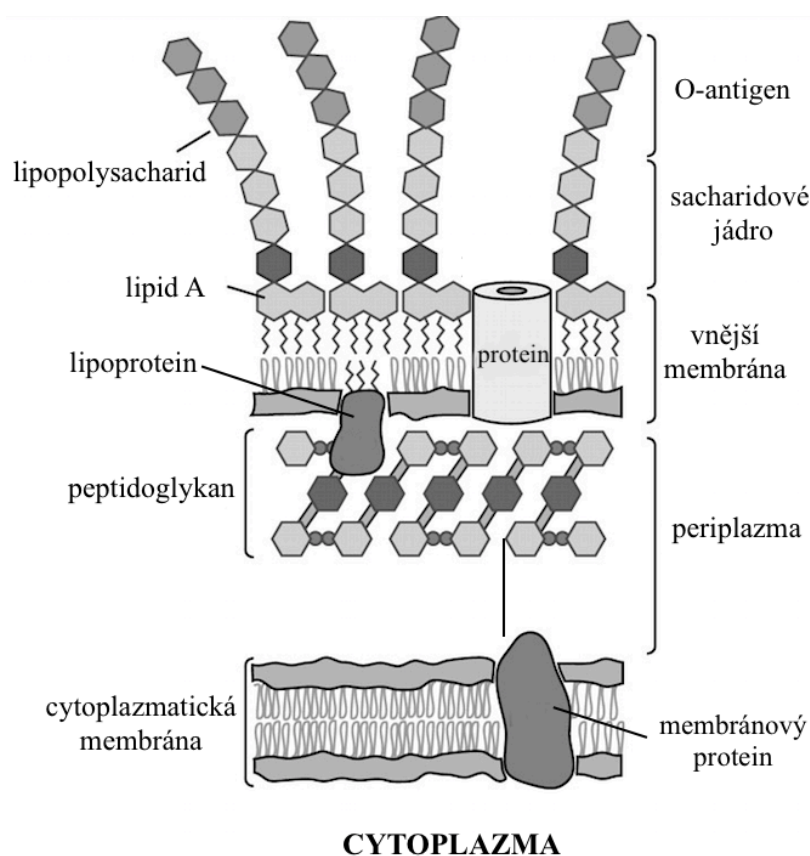
### 3.2 Gramnegativní bakterie

Buněčný obal gramnegativních bakterií se skládá ze tří vrstev: vnější membrány, peptidoglykanové buněčné stěny a cytoplasmatické membrány (Obrázek 13). Vnější membrána je charakteristický znak gramnegativních bakterií, protože grampozitivní bakterie ji postrádají. Je tvořena lipidovou dvojrůstvou. Vnitřní strana obsahuje fosfolipidy a vnější



strana je složena z glykolipidů, především lipopolysacharidů. Ten se skládá z lipidu A, oligosacharidového jádra a O-antigenu. Je schopný stimulovat lidský imunitní systém a vyvolat bakteriální infekci [19]. Díky vnější membráně jsou gramnegativní bakterie odolnější vůči lysozymu, hydrolytickým enzymům, detergentům a také antibiotikům [23]. Prostor mezi vnější membránou a cytoplazmatickou membránou se nazývá periplazma. Nacházejí se zde celá řada proteinů, ale také například hydrolytické enzymy, jako je  $\beta$ -laktamáza, která štěpí  $\beta$ -laktamová antibiotika a vyvolává vůči nim odolnost [22].

Mezi gramnegativní bakterie patří například rody *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* [19].



Obrázek 13 – Struktura buněčné stěny gramnegativní bakterie, upraveno dle [19].

### 3.2.1 *Escherichia coli*

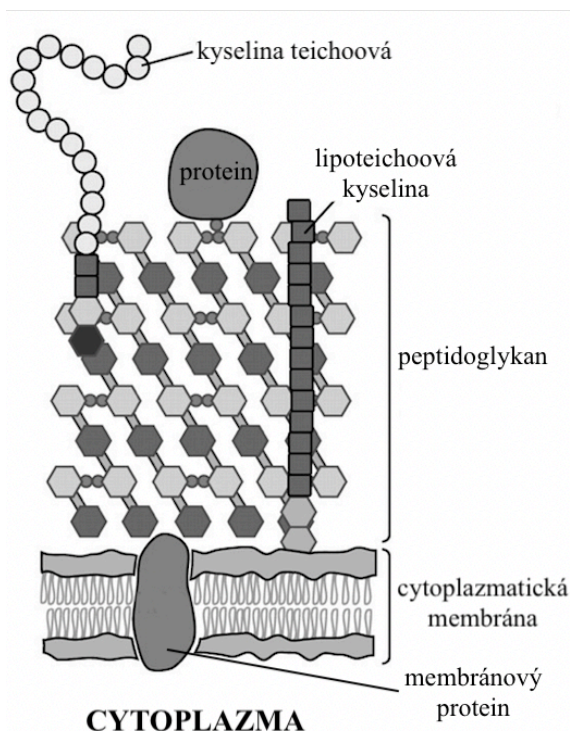
*Escherichia coli* je gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie rodu *Escherichia*, která patří do čeledi *Enterobacteriaceae* [27]. *E. coli* byla podrobně prozkoumána a stala se modelovým mikroorganismem pro výzkum [26]. Je součástí střevní mikroflóry

teplokrevných živočichů, včetně lidí. Do okolí se dostává skrz fekálie a čističky odpadních vod. Při hodnocení kvality vody je indikátorem fekálního znečištění. Některé kmeny *E. coli* jsou patogenní a způsobují řadu onemocnění, na jejíž následky ročně umírá více než 2 miliony lidí. Existuje šest dobře studovaných střevních patogenů *E. coli*. Tyto kmeny jsou klasifikovány dle virulenčního faktoru a mechanismem patogenity, kterým způsobují gastrointestinální onemocnění. Nejznámějším sérotypem je *Escherichia coli* O157:H7, způsobuje krvavé průjmy a je přenášen kontaminovanou vodou nebo potravinami. Vzhledem k tomu, že se *E. coli* nachází v tlustém střevě, při častém užívání antibiotik může docházet ke vzniku antibiotické rezistence [27].

### 3.3 Grampozitivní bakterie

Grampozitivní bakterie jsou obklopeny dvojrstvou membránou mají podstatně silnější buněčnou stěnu než gramnegativní bakterie (Obrázek 14). Vrstva peptidoglykanu je propletená kyselinou teichoovou a lipoteichoovou. Kyselina teichoová je polymer, který je tvořen ribitolfosfátem nebo glycerofosfátem a váže se na aminokyselinu nebo sacharid peptidoglykanu. Povrch bakterie je záporně nabitý, což je dáno přítomností fosfátu v teichoové kyselině a váže  $Mg^{2+}$  kationty, které stabilizují strukturu buněčné stěny [22]. Spolu s kyselinou lipoteichoovou tvoří více než 60 % buněčné stěny a tvoří tak strukturu buněčného obalu grampozitivních bakterií [19].

Mezi grampozitivní bakterie patří například rody *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* [19].



Obrázek 14 – Struktura buněčné stěny grampozitivní bakterie, upraveno dle [19].

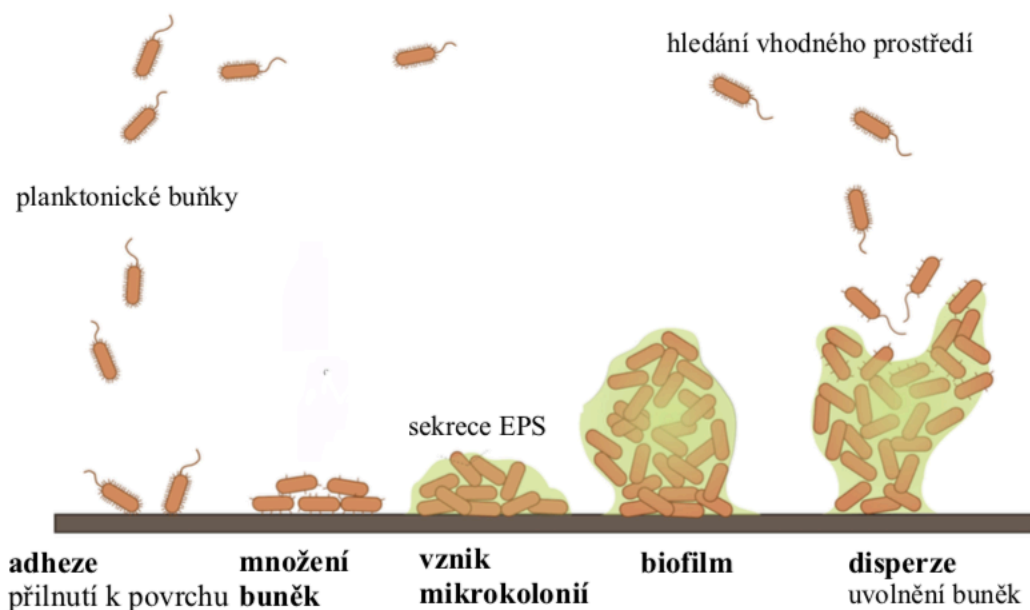
### 3.3.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* je fakultativně anaerobní, grampozitivní bakterie a nejvíce patogenní druh rodu *Staphylococcus*, pro který je typická kulovitý tvar bakterií (koky), které jsou uspořádány v klastrech. Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou kataláza pozitivní, to napomáhá k jejich snadné identifikaci. Kataláza je enzym, který produkují při reakci s peroxidem vodíku. *S. aureus* tvoří zlaté kolonie, což je dáno pigmentem, který produkuje. Syntetizuje také enzym koaguláza, který interaguje v krevním séru s fibrinogen, a mění jej na fibrin za vzniku krevní sraženiny [20]. Je hlavní oportunistický lidský patogen, který má schopnost v lidském těle vyvolat celou řadu infekcí, od povrchové kožní léze až po život ohrožující sepse. Primárně se jedná o lidský komenzál vyskytující se v respiračním ústrojí, převážně v nosních dírkách, odkud se šíří dále [27]. Je původcem infekce močových cest, mastitidy, bronchopneumonie, a septikémie [28]. Tyto infekce jsou velmi obtížně léčené, protože *Staphylococcus aureus* má pozoruhodnou schopnost získat rezistenci na antibiotika [27]. Dobrým příkladem je MRSA, což je kmen *Staphylococcus aureus*, který je rezistentní vůči běžně používaným antibiotikům meticilinu, amoxicilinu nebo penicilinu, a je původcem infekcí kůže, močových cest, které se poměrně jednoduše přenáší ve zdravotnických zařízeních [18]. Tato rezistence je dána přítomností bakteriální genu *mecA* v chromozomu.

Z důvodu závažnosti onemocnění je nutné zaměřit výzkum na nové látky s biocidním účinem, u kterých nedojde k rozvinutí odolnosti [29].

### 3.4 Biofilm

Biofilm je definován jako vysoce strukturovaná komunita bakteriálních buněk [27]. Obecně je tvořen shlukem nebo vrstvou buněk, které jsou obklopeny polymerní matricí [30]. Má schopnost se tvořit na široké škále povrchů, včetně živých tkání, zdravotnických prostředků, rozvodů pitné vody nebo průmyslového potrubí. Rozhraní pevná látka-kapalina tvoří ideální prostředí pro připojení mikroorganismů a jejich růst. K bakteriální kolonizaci jsou náchylnější pevné povrchy, které jsou drsné a hydrofobní, kam se řadí teflon a jiné plasty. Méně náchylné jsou hydrofilní materiály, jako je sklo nebo kov [31]. Vývoj biofilmu na jakémkoliv povrchu zahrnuje sérii organizovaných korků. V prvním kroku buňky hledají prostředí, kde by se mohly přichytit. Následně se připojí k vybranému povrchu. Za vhodných podmínek dojde k množení buněk, a z připojených mikroorganismů vznikají mikrokolonie. Průběžně dochází k sekreci extracelulární polymerní látky za vzniku matrici biofilmu, která lepí a obaluje buňky. Nakonec dojde k finálnímu uvolnění buněk z biofilmu, za účelem iniciovat tvorbu nového biofilmu. Klinickým důsledkem biofilmu jsou infekce. Patogenní role biofilmu na zdravotnických prostředcích a lidské tkáni je dobře známá. Dokonce i komenzální bakterie, které byly zmíněny výše, osídlují povrch lidského těla v biofilmovém režimu. Mezi onemocnění způsobená biofilmem patří běžné infekce dutiny ústní, kůže, zažívacího traktu nebo močových cest. Řada z nich je iantrogenních, jsou způsobeny přenosem z bakteriálně kolonizovaných zdravotnických prostředků, jako jsou katetry, chirurgické implantáty, kontaktní čočky nebo protetické srdeční chlopně [32]. Proces tvorby biofilmu je znázorněn na *Obrázku 15*.



Obrázek 15 – Proces tvorby biofilmu, (EPS–extracelulární polymerní látka), upraveno dle [33].

Buňky biofilmu jsou odolnější vůči působení stresových faktorů, včetně UV záření, antibiotikům a desinfekčním prostředkům, což naznačuje, že odstranění biofilmu je velmi obtížné. Tato ochrana je zajištěna souhrnem více faktorů, včetně extracelulární matrice, která váže antimikrobiální látky a tím snižuje jejich koncentraci, která se dostane k mikroorganismům. [30]. Proto je důležitá prevence vzniku biofilmu, to lze zajistit výběrem vhodného materiálu a konstrukcí zdravotnických prostředků, častým mechanickým čištěním a pravidelnou sanitací [33]. Bakterie, které tvoří biofilmy jsou *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* [34].

### 3.5 Antibiotická rezistence bakterií

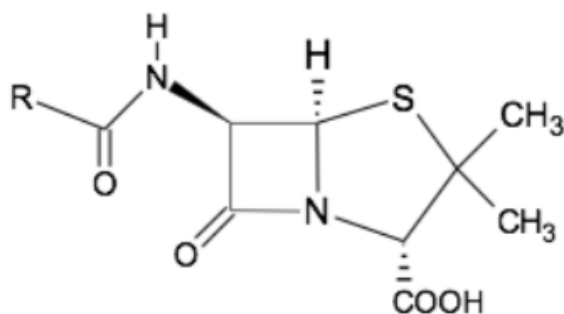
Antibiotika jsou látky přírodního původu produkované mikroorganismy, které inhibují růst bakterií a toxicky nepůsobí vůči eukaryotickým buňkám. Mezi antibiotika patří také jejich semisyntetické deriváty a antibakteriální chemoterapeutika, která jsou vyráběna chemickou syntézou [35][36]. Antibiotika se používají k léčbě nebo prevenci bakteriálních infekcí a poskytují nad nimi kontrolu. Jejich účinnost se pro nás stala samozřejmostí [38]. Dnes, ale čelíme globální krizi v důsledku rozvoje odolnosti bakterií vůči běžně používaným antibiotikům. Rozvoj antibiotické rezistence představuje celosvětové ohrožení lidského

zdraví. Hlavní příčinou odolnosti je nedostatečná identifikace mikroorganismů, a tím spojené nadužívání širokospektrálních antibiotik [38]. Tento znepokojivý stav tlačí výzkumy po celém světě k vývoji nových antimikrobiálních látek [37].

Účinnost antibiotik je hodnocena *in vitro*, stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) nebo inhibičních zón antibiotik. Na základě těchto hodnot jsou stanoveny hraniční koncentrace (breakpoints). Bakterie jsou klasifikovány jako rezistentní, pokud jsou schopné růst při koncentraci antibiotik vyšších, než je hodnotou hraniční koncentrace [38]. Díky schopnosti manipulovat se svým genetickým uspořádáním se bakterie poměrně snadno dokážou adaptovat na toxické účinky antibiotik [37]. Vývoj rezistence u bakterií se dělí na primární a sekundární [39].

Primární rezistence je vrozená, geneticky podmíněná odolnost, která závisí na biochemii a fyziologii bakterií [39]. Na základě toho je nutná identifikace mikroorganismů způsobující infekci, a to z důvodu aplikace vhodných antibiotik, protože řada bakterií je svým strukturálním uspořádáním odolná vůči určitým typům antibiotik. Primární odolnost bakterií nepředstavuje riziko ohrožení veřejného zdraví, protože se jedná o vlastní bakteriální charakteristiku nebo antibiotické omezení, která jsou neměnná a v čase se nevyvíjí. Příkladem je odolnost, vnější membrány bakterie *Pseudomona aeruginosa* vůči aminopenicilinu, nebo nepropustnost vnější membrány gramnegativních bakterií vůči makrolidům. Odolnost je také zvýšena u těch bakterií, které mají schopnost tvořit biofilm [35]. Sekundární rezistence je získaná a vyvíjí se až po kontaktu bakterií s antibiotiky a představuje globální bezpečnostní riziko. S vývojem rezistence, roste počet bakteriálních infekcí, která jsou neléčitelná běžnými antibiotiky a tím roste úmrtnost na onemocnění, která byla považována za banální a snadno léčitelná. Hlavním mechanismem je enzymatická inhibice, při které dochází k transformaci specifického genu nebo genů kódující enzymy, které mají schopnost štěpit antibiotikum [39][40]. Rezistentní bakterie mohou enzymaticky inaktivovat  $\beta$ -laktamová antibiotika (Obrázek 16), například penicilin, působením hydroláz známých jako  $\beta$ -laktamázy. Takový mechanismus je typický například pro MRSA kmeny *Staphylococcus aureus* [35].

V současné době jsou dobře známy kmeny bakterií, které jsou odolné vůči vícero typů antibiotik, jedná se o kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* nebo *Pseudomonas aeruginosa* [39].



Obrázek 16 – Základní struktura  $\beta$ -laktamových antibiotik.

### 3.6 Bakteriální kontaminace kosmetických přípravků

K mikrobiální kontaminaci kosmetických přípravků může docházet ve dvou fázích, a to při výrobě nebo plnění výrobku. Zároveň také hrozí při používání konečným spotřebitelem [41]. Kontaminace mikroorganismy způsobuje znehodnocení výrobků a pokud jsou patogenní, mohou představovat pro zákazníka vážná zdravotní rizika [42]. Před vznikem infekce nás chrání kůže, která má funkci bariéry. Bakterie mají schopnost přilnout, replikovat se a působit tzv. faktorem virulence, který určuje jejich patogenitu. Jakmile bakterie přilne na kůži, musí překonat několik překážek, než dojde ke vzniku infekce. První překážku představuje nejsvrchnější vrstva pokožky *stratum corneum*, která kromě své mechanické ochrany, má kyselý charakter a nízký obsah vody, čímž tvoří nepříznivé podmínky pro bakteriální růst. Navíc rozkladem buněk *stratum corneum*, vznikají mastné kyseliny, polární lipidy a glykosfingolipidy, které mají antibakteriální vlastnosti. Ochrannou funkci má také rezidentní flóra kůže, která je stálá a například lipofilní bakterie *Corynebacteria* produkuje enzym lipázu, který přispívá k obraně vůči patogenním mikroorganismům. Kyselý charakter pokožky podporuje růst *Propionibacteria*, které produkují kyselinu propionovou a má antimikrobiální účinek vůči tranzitním organismům, které mohou být patogenní [43].

#### 3.6.1 Primární kontaminace

Kontaminace mikroorganismy při výrobním procesu, se nazývají primární kontaminace. Častým kontaminantem jsou převážně gramnegativní bakterie, ze surovin jako je například voda, které se používá při výrobě a tím znehodnotí celý výrobek. Prevence primární kontaminace je dodržování správné výrobní praxe, což zahrnuje udržování čistého prostředí,

pravidelný úklid, sterilizace surovin a zařízení, školení pracovníků a řada dalších požadavků [44].

### 3.6.2 Sekundární kontaminace

Sekundární kontaminace vzniká při používání kosmetického přípravku spotřebitelem. Kontaminantem jsou většinou grampozitivní bakterie z rukou spotřebitele okolního prostředí. Z hlediska výrobce, nelze sekundárním kontaminacím zabránit, i přesto společnosti provádí individuální testy na stabilitu výrobku [44].

### 3.6.3 Mikrobiální limity v kosmetických přípravcích

Kosmetické přípravky nemusí být sterilní. Norma ČSN EN ISO 17516 Mikrobiologické limity v kosmetice, udává maximální limit počtu mikroorganismů, které se mohou vyskytovat v konečném kosmetické přípravku a surovinách pro jejich výrobu. V oční kosmetice a kosmetických přípravcích pro děti do 3 let je maximální možný počet mikroorganismů  $10^2$  KTJ·g<sup>-1</sup> nebo  $10^2$  KTJ·ml<sup>-1</sup>. V ostatních kosmetických přípravcích je maximální povolený počet přítomných mikroorganismů  $10^3$  KTJ·g<sup>-1</sup> nebo  $10^3$  KTJ·ml<sup>-1</sup>. Stejný limit platí také pro suroviny. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans* jsou mikroorganismy, které nesmí být přítomny v 1 g nebo 1 ml výrobku [45].



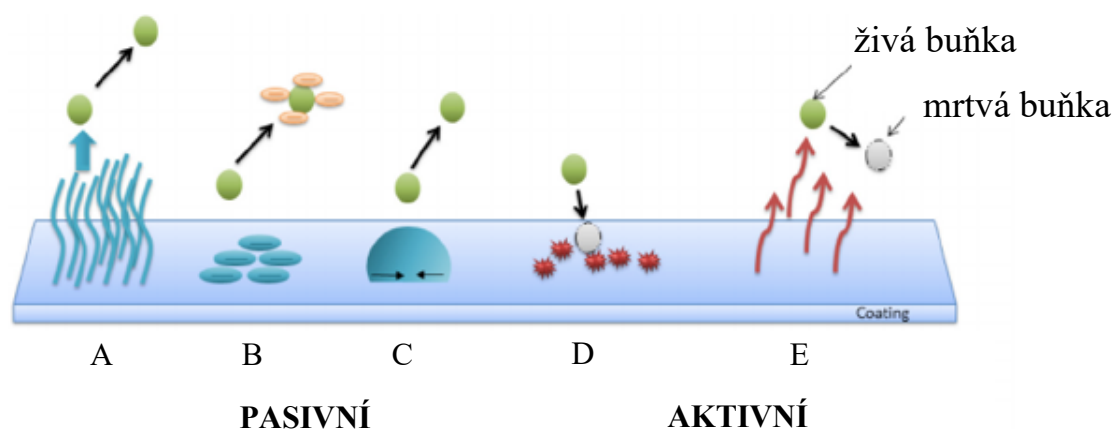
## 4 MECHANISMUS PŮSOBENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍCH POLYMERŮ

Podle Světové zdravotnické organizace způsobují infekční nemoci čtvrtinu úmrtí na zemi. Mezi nejčastější patří infekce vyvolané bakteriemi, pneumonie, průjmové onemocnění a tuberkulóza. V důsledku rozvoje bakteriální rezistence vzniká nebezpečí, že se onemocnění stanou neléčitelná, a proto je nutné zajistit nové antimikrobiální látky. Makromolekulární látky jsou v posledních letech diskutovány jako potenciální antimikrobiální činidla, která mají obrovský potenciál v boji proti mikroorganismům odolným vůči léčivům. Byla zjištěna vynikající aktivita vůči širokému spektru bakterií s nízkou náchylností k rozvoji rezistence [46]. Antibakteriální polymery byly objeveny v roce 1965 a zájem o ně vzrostl v posledních letech v důsledku antibiotické krize. Nejčastější oblast jejich aplikace je lékařství, potravinářství a textilní průmysl, zajímavá je také jejich aplikace ve zdravotnických prostředcích [47].

Dalším rizikem je infekce získána z implantovaných polymerních zdravotnických prostředků, jako jsou močové a endotracheální trubice nebo peritoneální katetry. Infekce vznikají z biofilmů, které kolonizují nemocniční zařízení. Jejich léčba je nesmírně náročná, protože mikroorganismy jsou v biofilmu odolnější vůči antimikrobiálním látkám. Z toho důvodu je nutné vyvinout takové polymerní materiály nebo povlaky, které mají antimikrobiální vlastnosti, omezují tvorbu biofilmu, inhibují vznikající infekci, eliminují bakterie v blízkosti polymerního povrchu a zabraňují jejich přilnutí [48].

Polymerní materiály se schopností zabíjet nebo inhibovat růst mikroorganism, lze primárně rozdělit dle jejich antimikrobiálního mechanismu na **aktivní** a **pasivní**, (*Obrázek 17*). Polymerní vrstva, která působí pasivně, snižuje schopnost adsorpce proteinů na jeho povrch, tím zabraňuje adhezi bakterií a znemožňuje bakteriální růst. Mechanismus působení je založen na odpuzování bakterií. Polymer s bakteriemi aktivně neinteraguje a tudíž přežívají. Tím, že mikroorganismy nesou záporný náboj a jsou hydrofobní, by měla být struktura těchto polymerních vrstev buď hydrofilní, kladně nabitá nebo mít nízkou povrchovou energii, aby došlo k účinnému odpuzení mikroorganismu. Polymery s pasivním antimikrobiálním účinkem jsou například polydimethylsiloxan, polyvinylpyrrolidon, PEG [47].

Aktivní polymery zabíjí bakterie, které ulpí na povrchu polymerní vrstvy. Aktivita je dána účinnými látkami, jako jsou kationtové biocidy nebo antimikrobiální peptidy, které při kontaktu s bakterií způsobí její smrt. Mechanismus působení závisí na aktivní látce, nejčastěji používané polymery jsou funkcionalizovány kvarterní amoniovou skupinou, které interagují s buněčnou stěnou, čímž ovlivní permeability membrány, což má za následek unik intracelulárního bakteriálního obsahu a dojde k usmrcení buňky. Mezi polymery s aktivním působením patří například polyethylenimin (PEI), polyguanidin [47].



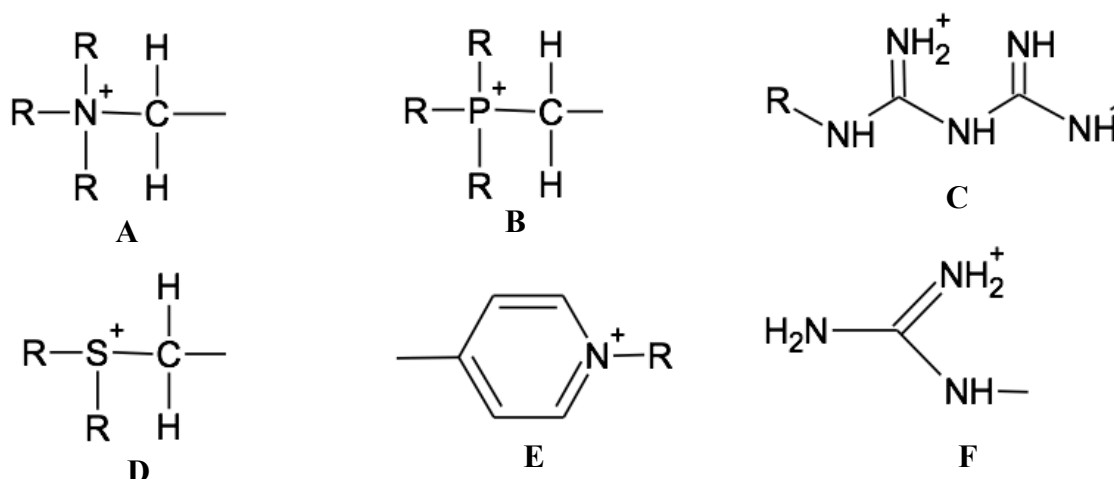
Obrázek 17 – Antimikrobiální mechanismy polymerů (pasivní mechanismus (A) stérická zábrana, (B) elektrostatický odpuzování, (C) nízká povrchová energie; aktivní mechanismu (D) uvolňování biocidů z polymerního povlaku, (E) kontaktní biocidní látka), upraveno dle [48].

Při konstrukci antimikrobiálních povrchů jsou preferovány kontaktní povrchy, při kterých dochází ke zničení mikroorganismů. U povrchů fungujících na principu odpuzování je velká pravděpodobnost rozvoje antimikrobiální rezistence. Polymerní povrchy s biocidní aktivitou lze obecně klasifikovat dle začlenění biocidní látky do polymeru – na biocidní polymery, polymerní biocidy a polymery uvolňující biocidy [49].

#### 4.1 Biocidní polymery

Biocidní polymery jsou polymery, jejichž aktivita je dána působením celé makromolekuly. Polymerní struktura vychází z antimikrobiální aktivity vůči mikrobiálním buňkám, které nesou záporný náboj (Obrázek 19). Záporně nabitý buněčný povrch je dán přítomností membránových proteinů. Buněčná stěna gramnegativních bakterií navíc obsahuje

fosfolipidy a grampozitivní bakterie kyselinu teichoovou [50]. Biocidní polymery jsou polykationty nesoucí kladný náboj, interagují s buněčnou stěnou nebo membránou, čímž dojde k poškození vnější buněčné membrány v důsledku konformačních změn, které jsou způsobeny ztrátou dvojmocných kationtů, které normálně stabilizují bakteriální povrch. Buňka je poškozena a nastává buněčná smrt. Antimikrobiální polykationty obsahují kvarterní amoniové, guanidinové, fosfoniové a sulfoniové funkční skupiny (Obrázek 18). Výhodou je, že tyto polymery neztrácí svou aktivitu a nedochází k rozvoji rezistence. Biocidní vlastnosti antibiotických polymerů jsou odvozené od jejich struktury a přítomných kationtových skupin. Antibiotické polymery mají pozitivně nabitou amfifilní strukturu, díky které interagují s negativně nabitou fosfolipidovou vrstvou. Dojde k narušení cytoplazmatické membrány a smrti buňky [47].

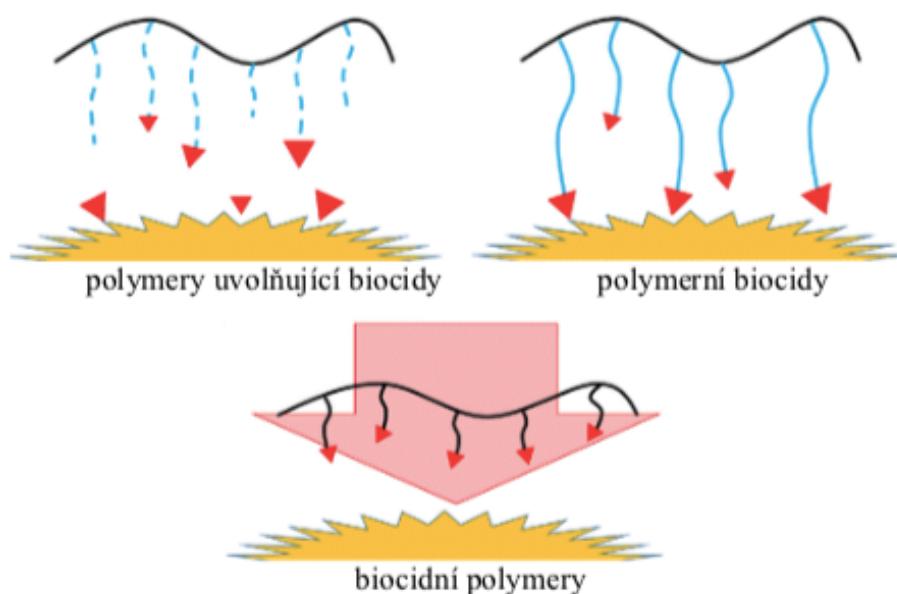


Obrázek 18 – Kationtové funkční skupiny biocidních polymerů (popis: A – kvarterní amoniový kation, B – kvarterní fosfoniový kation, C – biguanidinový kation, D – terciární sulfoniový kation, E – pyridinový kation, F – guanidinový kation).

## 4.2 Polymerní biocidy

Polymerní biocidy jsou polymery, které se skládají z monomerů tvořené bioaktivními jednotkami ty se opakují a jsou kovalentně spojeny (Obrázek 19). Strukturální jednotky mají antibakteriální aktivitu, tvořenou aminoskupinami, karboxylovými nebo hydroxylovými skupinami. Polymerace biocidních monomerů vede ke vzniku antimikrobiálních polymerů, při reakci ale může být ovlivněno antimikrobiální působení [47]. Výsledná aktivita polymerů může být významně inhibována ve srovnání s aktivitou monomeru. Například při polymeraci vankomycinu, antibiotická aktivita vzrostla proti rezistentním enterokokům, ale byla snížena vůči *Staphylococcus aureus*. Z toho vyplývá, že struktura polymeru

i bakteriálních druhů hraje důležitou roli v chování polymerních biocidů. Polymerní antibiotika s imobilizovanými kvartérními amoniiovými solemi jsou široce využívány jako desinfekční prostředky, které působí na membránu bakterií [51].



Obrázek 19 – Klasifikace antimikrobiálních polymerů, upraveno dle [51].

### 4.3 Polymery uvolňující biocidy

Jsou polymerní systémy, které vykazují antimikrobiální vlastnosti prostřednictvím inkorporovaných biocidních látek. Polymerní řetězec má funkci nosiče pro biocidy, které se uvolňují do mikrobiálních buněk (Obrázek 19). Velkou výhodou těchto polymerních systémů je schopnost uvolňovat biocidy v blízkosti bakteriální buňky ve vysokých koncentracích [48]. Příkladem takových polymerních systémů je nanokompozice medipolyanilin, připravená polymerací anilinuza použitím  $\text{CuCl}_2$ . Měďnaté ionty  $\text{Cu}^{2+}$  jsou redukovány a zapouzdřeny do polyanilinové matrice. Měďnaté nanočástice se během aplikace postupně oxidují na  $\text{Cu}^{2+}$  nebo  $\text{Cu}^+$ , uvolňují se a působí biocidním účinkem [51]

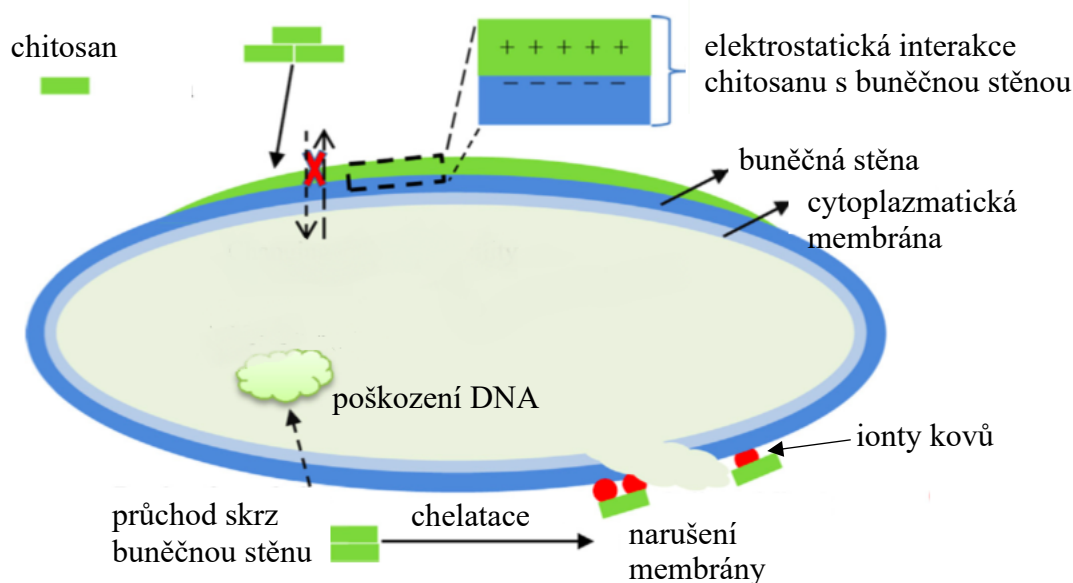
## 4.4 Antimikrobiální polymery v kosmetice

Základním požadavkem na kosmetické přípravky je bezpečnost. Kosmetika nesmí obsahovat škodlivé látky a musí být zajištěna jejich trvanlivost a mikrobiální stabilita. Tu zajišťují antimikrobiální látky nazývané konzervanty. Konzervační látky jsou nezbytné, aby zabránily primární kontaminaci během přípravy a výroby kosmetických přípravků a sekundární kontaminaci při jeho používání. Konzervanty s malou molekulovou hmotností podléhají stále větším kontrolám z toho důvodu, že mohou pronikat skrz kožní bariéru. Antimikrobiální polymery jsou nadějnou alternativou, protože díky své molekulové hmotnosti neprojdou kůží, a navíc vykazují dobré antimikrobiální vlastnosti. Aktivita je dána přítomností funkční skupiny v molekule polymeru [51].

### 4.4.1 Chitosan

Chitosan je přírodní polysacharid složený z 2-aminodeoxy- $\beta$ -D-glukanových jednotek spojených  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidovou vazbou. Vzniká alkalickou deacetylací chitinu, který se přirozeně vyskytuje v exoskeletu korýšů a měkkýšů. Chitosan je nerozpustný ve vodě, s kyselinami vytváří soli a vykazuje antimikrobiální vlastnosti [7]. Mechanismus, jakým působí na mikroby není úplně jasný. Proto byly navrženy tři modely, které charakterizují možnou antimikrobiální aktivitu chitosanu. První model je založen na interakci mezi kladně nabitou molekulou chitosanu a záporně nabitou mikrobiální buňkou. Interakce je zprostředkována elektrostatickými silami mezi protonovanými skupinami  $\text{NH}_3^+$  a záporným mikrobiálním povrchem. Elektrostatická interakce způsobí změnu v propustnosti membrány, čímž vyvolá osmotickou nerovnováhu a inhibuje růst mikroorganismu. Dojde také k hydrolyze peptidoglykanu v buněčné stěně, což má za následek únik intracelulárního obsahu a buněčnou smrt. Antimikrobiální aktivita klesá se zvyšující koncentrací polykationtového chitosanu. To je způsobeno přítomností velkého počtu nabitých míst v polymerním řetězci, který má tendenci se shlukovat a tvořit agregát, tomu lze předejít úpravou pH. Dalším antimikrobiálním modelem je proniknutí chitosanu do mikroorganismu. Tam se váže k mikrobiální DNA a tím inhibuje syntézu mRNA a proteinů. Ačkoliv byl tento model přijat jako možný mechanismus, pravděpodobnost jeho výskytu je velmi nízká. Poslední model je založen na chelatačním účinku chitosanu, který se dobře váže na kovy. Aminoskupiny v struktuře chitosanu jsou zodpovědné za vychytávání kovových kationtů chelatací, dojde k zesílení pozitivního náboje a inhibici mikrobiálního růstu [52]. Vzhledem k chemickým a fyzikálním vlastnostem se chitosan využívá v celé řadě produktů

a aplikacích, od kosmetických přípravků až po potravinářské aditiva. V kosmetice může zastávat funkci hydrokoloida, při neutralizaci kyselinou se stává viskózní a je přidáván do krémů, tělových mlék nebo laků na nehty k úpravě textury výrobku [53]. V lékařství se používá v obvazových materiálech ke krytí ran, zpomaluje krvácení a působí jako antibakteriální činidlo [49]. Mechanismus antibakteriálního působení chitosanu je znázorněn na *Obrázku 20*.



*Obrázek 20 – Mechanismus antibakteriálního působení chitosanu, upraveno dle [53].*

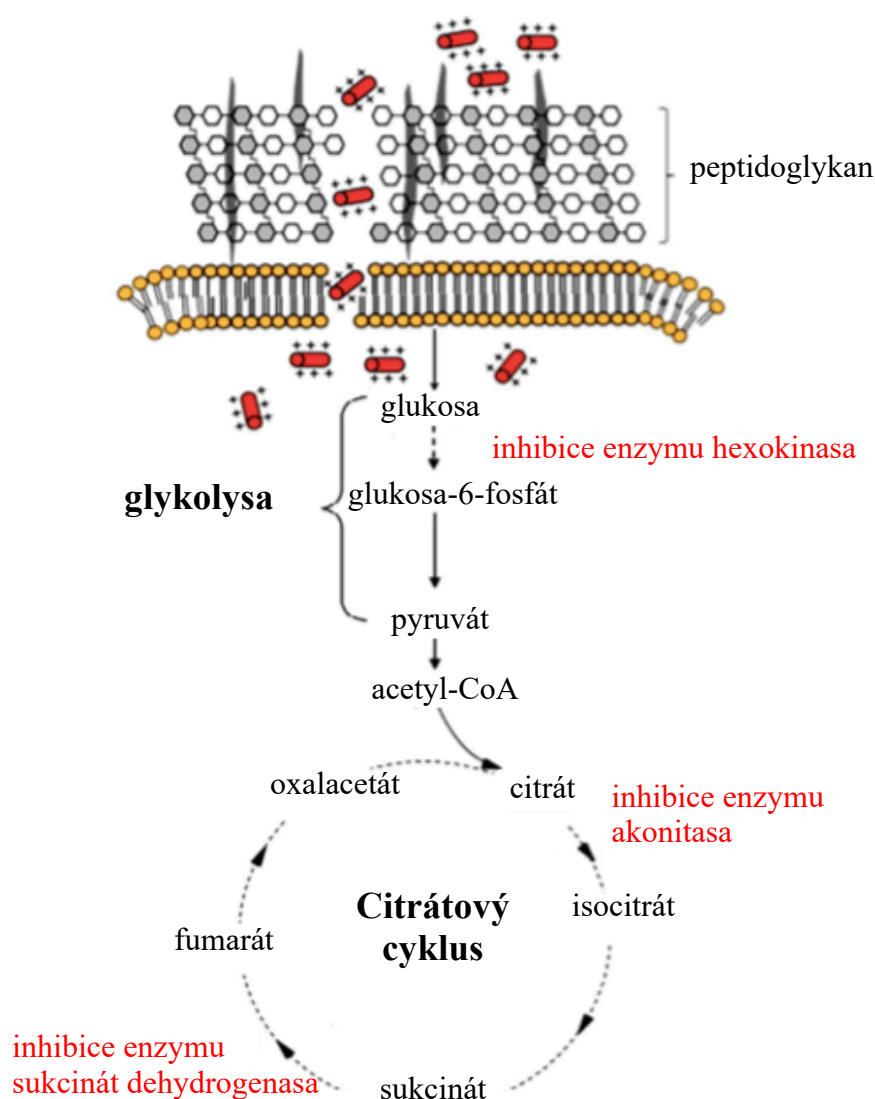
#### 4.4.2 Poly-L-lysin

Je přirozeně vyskytující homopolyamid L-lysinu s amidovou vazbou mezi  $\epsilon$ -amino a  $\alpha$ -karboxylovými skupinami. Jeho výskyt byl poprvé zaznamenán u vláknité bakterie *Streptomyces albus*. Jedná se o tepelně stabilní polykationt, který se vyznačuje biodegradabilitou, netoxicitou, rozpustností ve vodě a stabilitou v širokém rozmezí pH. Je účinný vůči gram pozitivním i gram negativním bakteriím. Antibakteriální aktivita lze vysvětlit elektrostatickou absorpcí na bakteriální povrch a následným stripováním membrány, čímž dochází k fyziologickému poškození buňky [49].

Na *Obrázku 21* je popsán mechanismus antibakteriální aktivity poly-L-lysinu při použití rozdílných koncentrací. Při použití nízkých koncentrací, byla intracelulární koncentrace glukózy asi 2,5krát zvýšena, což bylo způsobeno inhibicí glykolytické dráhy. Zatímco při použití vyšší koncentrace poly-L-lysinu dochází ke zvyšování obsahu alaninu, valinu a leucinu, které jsou produkovány obranným mechanismem bakterie. Zvýší se také obsah

citrátu, protože poly-L-lysin působí na citrátový systém prostřednictvím inhibice enzymu akonitasa. Inhibicí těchto důležitých metabolických dějů dochází k usmrcení bakteriální buňky[55].

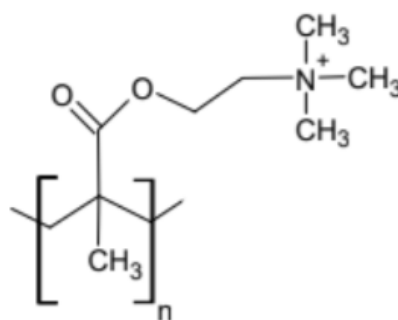
V kosmetice se poly- $\epsilon$ -lysin využívá v zubních pastách nebo ústních vodách, kde působí proti kariogenním bakteriím, které jsou zodpovědné za onemocnění parodontu a vzniku zubního kazu [56]. Byla také popsána role poly- $\epsilon$ -lysin při inhibici lidské pankreatické lipázy, při které se docílilo normálního příjmu tuků, a proto je diskutována jeho aplikace jako dietního činidla u obézních pacientů. Studie ukazují široké množství aplikací od potravinových konzervantů, obalových materiálů pro mikročipy až po emulgátory [49].



Obrázek 21 Mechanismus antibakteriálního působení poly-L-lysinu, upraveno dle [55].

#### 4.4.3 Lineární kvarterní amoniové polymery

Polymery obsahující kvarterní amoniovou skupinu a jsou jedny z nejrozšířenějších antibakteriálních polymerů. Jsou ve srovnání s gramnegativními bakteriemi více účinné vůči grampozitivním bakteriím. To vyplývá ze struktury bakterií, gramnegativní bakterie mají vnější membránu, která je chrání před působením kvarterních amoniových skupin. Ta ale u grampozitivních bakterií chybí a polymery tak lépe pronikají do buněčné struktury. Jedním z příkladů těchto polymerů je poly-(2-dimethylaminoethyl)metakrylát (Obrázek 22), který vykazuje dobrou antibakteriální aktivitu vůči širokému spektru bakterií. V kosmetice se kvarterní amoniové polymery používají v přípravcích v péči o tělo a vlasy. Působí antistaticky, vytváří tenký film na vlasech a pokožce, zajišťuje dobrou hydrataci a pěnovost výrobku [57].

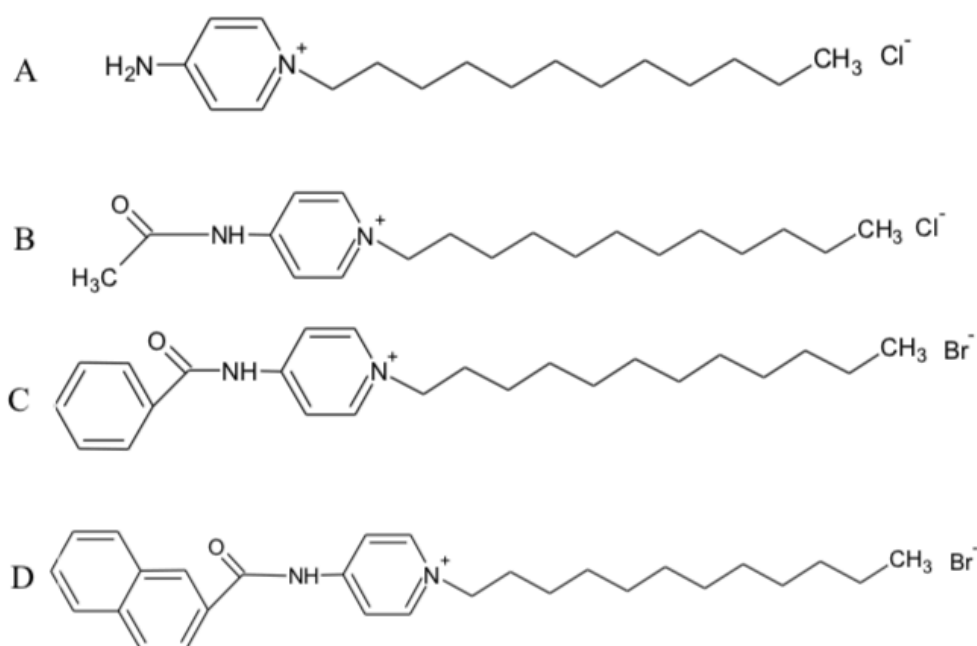


Obrázek 22 – Strukturní vzorek poly(2-dimethylaminoethyl)metakrylátu.

#### 4.4.4 Polymery s heterocyklickým dusíkem

Jsou polymery s pyridinovou funkční skupinou, která nese kladný náboj a zajišťuje interakci s bakteriálním povrchem. Příkladem takových polymerů jsou: 4-aminododecylpyridinium chlorid, 4-acetylamino-dodecylpyridinium chlorid 4- benzoylamino-dodecylpyridinium bromid, a 4-(1-naftoyl)aminododecylpyridinium bromid (Obrázek 23). Polymery mají stejnou délku řetězce, liší se pouze v hydrofobních skupinách na konci pyridinové skupiny. Byla testována antibakteriální aktivita vůči *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*, která se u jednotlivých polymerů lišila právě v důsledku různých hydrofobních skupin. U polymerů s větší hydrofobní skupinou byla antibakteriální aktivita výrazně vyšší [49][57].





Obrázek 23 – Polymery s pyridinovou skupinou (popis A: 4-aminododecylpyridinium chlorid, B: 4-aminododecylpyridinium chlorid, C: 4-benzoylamino-dodecylpyridinium bromid, D: 1-(4-naftoyl)aminododecylpyridinium bromid).

#### 4.4.5 Polymery obsahující guanidinové skupiny

Polyguanidin a polybiguanidin představují významnou antimikrobiální třídu polymerů. Jsou netoxické, rozpustné ve vodě a účinné vůči širokému spektru mikroorganismů. Mechanismus je založen na elektrostatické interakci. Vykazují vyšší aktivitu vůči grampozitivním bakteriím, jejichž struktura je jednodušší a umožňuje průnik polymerních biocidů s vysokou molekulovou hmotností [49][57]. Guanidinová činidla jsou stabilní vůči vysokým teplotám, a proto jsou využívány jako aditiva do polymerních materiálů. Antimikrobiální činidlo je dispergováno do polymerní matrice během tavení, poté migrují na povrch matrice a zajišťují antimikrobiální aktivitu [49].

#### 4.4.6 N-halaminové polymery

N-halaminové sloučeniny obsahují alespoň jednu kovalentní vazbu mezi dusíkem a halogenem. Vznikají halogenací polymeru, do kterého byly zavedeny amidové, imidové nebo aminové skupiny. Nejčastěji používaným halogenem je chlór. Halogenované aminy vykazují nejsilnější biocidní aktivitu, ale jsou nejméně stabilní. Jsou účinné vůči širokému spektru mikroorganismů. Antimikrobiální aktivita je zprostředkována oxidačním chlorem v

N-halaminové sloučenině. Mechanismus je založen na výměně halogenů mezi N - halaminem a mikroorganismem, což způsobuje buněčnou smrt. Primární aplikace jsou antibakteriální obvazové materiály, které slouží k zabránění vzniku infekce, biocidně působí na nežádoucí bakteriální růst a v poslední řadě zlepšují proces hojení, který může být zpomalen vlivem doprovodných onemocnění, například cukrovkou [58][59].

## 4.5 Polymerní nanokompozice

Polymerní nanokompozice jsou kombinace polymerů, které obsahují organických nebo anorganické plnivo. Předpoklad pro výrobu jsou plnivo o velikosti nanometrů. Nanokompozice jsou často vyráběny v kombinaci s kovy nebo oxidy kovů, které jsou používány jako antimikrobiální látky a tím zajišťují vznik polymerním nanokompozicím s antimikrobiální aktivitou. Takovými kovy jsou stříbro, zlato nebo oxid zinečnatý [60].

### 4.5.1 Nanočástice stříbra

Nanočástice jsou definovány jako částice, které měří méně než 100 nm alespoň v jednom rozměru. Bezpečnost nanomateriálů je velkou otázkou, důvodem je právě jejich velikost. Při jejich aplikaci v kosmetice, může hrozit riziko průniku pokožkou. Studie akutní dermální toxicity prokázaly bezpečnost nanočástic stříbra pro lokální aplikaci. Nanočástice stříbra vykazují dostatečné konzervační vlastnosti. Působí biocidním účinkem proti širokému spektru mikroorganismů, včetně infekčních bakterií, která jsou odolná vůči antimikrobiálním látkám, jako je *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. Mechanismus jejich působení ale není zcela objasněn. Předpokládá se, že nanočástice pronikají skrz buněčnou stěnu, tím ji naruší a způsobí buněčnou smrt. Další možností je uvolnění nanočástic stříbra, které jsou deportovány vezikulem do buňky, kde vezikul vlivem osmotického tlaku praskne a uvolněné nanočástice interagují s proteinem, což způsobí inaktivaci a inhibici metabolických pochodů v buňce. Nanočástice stříbra mohou být inkorporovány do polymerní struktury několika mechanismy. Například syntézou nanočástic stříbra na povrchu hemodialyzačních polyurethanových katetrů, která probíhá fotoreakcí stříbrných solí v alkoholu. Antibakteriální aktivita byla prokázána již při použití 0,1 g stříbra na m<sup>2</sup> [60]. Nanočástice stříbra se využívají v pleťových čistících přípravcích k léčbě akné. Dále v přípravcích určených k čištění dutiny ústní. Biocidně působí vůči mikroorganismům, které způsobují infekce a vznik zubního kazu. Další antibakteriální aplikací nanočástic stříbra je zabudování do obvazů, obuvi a oblečení [61][62].

#### 4.5.2 Nanočástice zlata

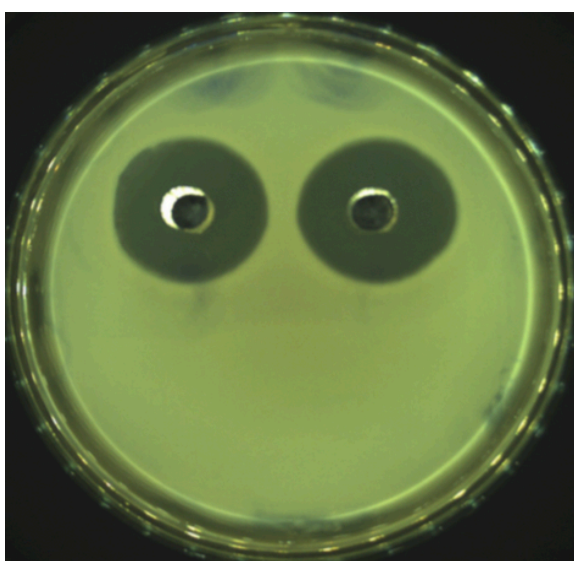
Nanokompozice obsahující zlato vykazují dobré antibakteriální účinky vůči gram pozitivním i gram negativním bakteriím v molárních koncentracích. Nanokompozice na bázi polymeru a kovu se připravují vstříkáním kovu na povrch polymeru v kombinaci s polytetrafluorethylenovou složkou. Antibakteriální aktivita zlata byla prokázána při extrémně nízkém množství  $1 \text{ mg/m}^2$  vůči *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermis*, což jsou nejčastější původci infekcí v lékařských zařízeních [60].

## 5 METODY TESTOVÁNÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY

K vyhodnocení antimikrobiální aktivity lze použít celou řadu laboratorních metod. Mezi základní a nejznámější patří difúzní a diluční metody. Cílem je za definovaných, testovacích podmínek stanovit hodnotu MIC, která je definována jako nejnižší koncentrace testovaného antimikrobiálního činidla, který inhibuje viditelný růst testovaného mikroorganismu a obvykle se vyjadřuje v jednotkách  $\mu\text{g/ml}$  nebo  $\text{mg/l}$ . Tato hodnota se využívá ke stanovení citlivosti bakterií a k hodnocení aktivity nových antibakteriálních látek [63].

### 5.1 Kirby-Bauer test

Byla objevena v roce 1940, v literatuře označována také jako disková difúzní metoda. Ta se stala běžně používanou pro testování antimikrobiální citlivosti. Principem metody je naočkování agarové plotny Mueller-Hinton, standardizovaným inokulem testovaného mikroorganismu o koncentraci  $1-2 \times 10^8 \text{CFU/ml}$ . Na povrch agarů se umístí kotouče z filtračního papíru, které obsahují testovanou sloučeninu v požadované koncentraci. Následně se Petriho misky inkubují 16 až 24 hodin při teplotě  $35^\circ\text{C}$ . Antimikrobiální látka se difunduje do agarů, inhibuje germinaci a růst testovaného mikroorganismu a poté se měří průměry inhibičních zón (*Obrázek 24*). Výhodou této metody je její jednoduchost, nenáročnost, možnost testování velké množství mikroorganismů a antimikrobiálních látek. Nevýhodou je, že touto metodou nelze stanovit přesnou hodnotu MIC, protože není možné kvantifikovat množství antimikrobiální látky rozptýlené do média [[63]



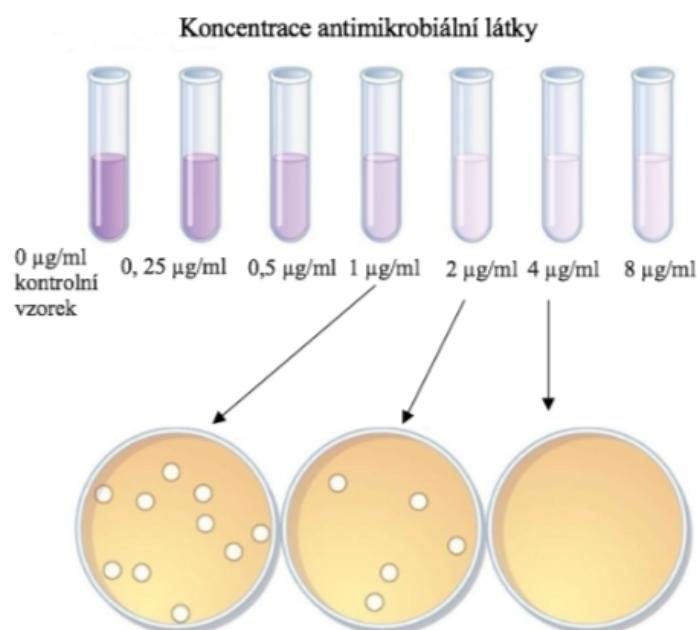
Obrázek 24 – Kirby-Bauer test [Centrum polymerních systémů ve Zlíně].

## 5.2 Diluční metody

Diluční metody se používají ke stanovení MIC antimikrobiální látky, potřebné k inhibici růstu nebo usmrcení bakterií, tedy hodnotu MBC, která udává minimální baktericidní koncentraci. Ke kvantitativnímu měření antimikrobiální aktivity in vitro proti bakteriím nebo plísním, lze použít metodu agarové nebo bujónové diluční metody [64]

### 5.2.1 Diluční metoda v agaru

Principem metody je přidání různých koncentrací antimikrobiální látky, obvykle je používáno dvojnásobné ředění, do agarového média (*Obrázek 25*). Poté je na povrch agaru nanášeno definované množství mikrobiálního inokula [64].

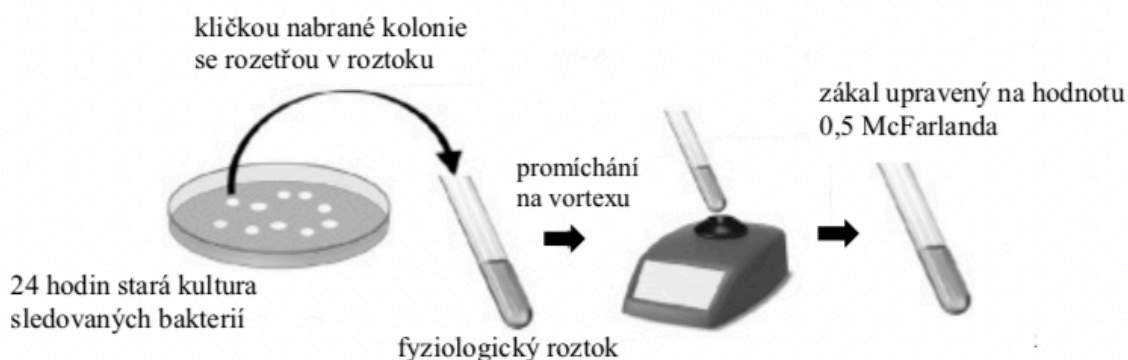


Obrázek 25 – Diluční metoda v agar, upraveno dle [65].

### 5.2.2 Diluční metoda v bujónu

Mikrodiluční a makrodiluční metoda v bujónu je jednou z nejzákladnějších metod pro testování antimikrobiální citlivosti. Postup zahrnuje ředění antimikrobiálního činidla v kapalném, růstovém médiu rozděleném do zkumavek nebo při mikrodiluční metodě v mikrotitrační destičce s 96 jamkami. Poté se každá zkumavka nebo jamka, naočkuje inokulem o koncentraci 0,5 stupnici McFarlanda (*Obrázek 26*). Po důkladném promíchání

se inokulované zkumavky (mikrotitrační destička), inkubuje za vhodných podmínek v závislosti na testovaném mikroorganismu. Po inkubaci je sledován viditelný, bakteriální růst, který dokládá zákal. Nejnižší koncentrace antimikrobiálního činidla, která brání jejich růstu, představuje hodnotu MIC [64] [66].



Obrázek 26 – Příprava bakteriální suspenze o hodnotě zákalu 0,5 stupnice McFarlanda [66].

### 5.3 E-test

Je metoda antimikrobiálního, koncentračního gradientu, která kombinuje princip diluční a difúzní metody pro stanovení hodnoty MIC. Je založena na vytvoření koncentračního gradientu antimikrobiálními látkami, testovanými v agarovém médiu. E-test, také známý jako epsilometrový test, je komerční verzí této techniky. Testovací proužek je široký 5 mm a dlouhý 60 mm. Na jeho povrchu je definovaný gradient antimikrobní látky. Proužek je přenesen na naočkovanou agarovou půdu a následně dojde k uvolnění látky do agaru. Po inkubaci kolem proužku vznikají inhibiční zóny ve tvaru elipsy (Obrázek 27), v místě kde zóna protne proužek je hledaná hodnota MIC [63].



*Obrázek 27 – E-test, upraveno, dle [63].*

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 6 MATERIÁL A METODIKA

### 6.1 Testované bakterie

V experimentu byly použity dva druhy bakterií, gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*. Jedná se o modelové organismy v mikrobiologii a jsou obvykle primární volbou při testování antibakteriální aktivity látek či vývoje bakteriální adaptace. Bakterie byly zakoupeny z České sbírky mikroorganismů, Přírodovědecké fakulty, Masarykovy univerzity v Brně. Byly vybrány kmeny *Staphylococcus aureus* CCM 4516 a *Echerichia coli* CCM 4517 a biofilm tvořící kmeny *Staphylococcus aureus* CCM 2022 a *Escherichia coli* 3954.

### 6.2 Kultivační média

Byla použita dvě kultivační média tryptofan sojový-agar pro izolaci bakteriálního kmene a Mueller Hinton (MH) agar, který byl použit při testování antibakteriální aktivity.

#### 6.2.1 Tryptofan sojový agar

Tryptofan-sojový agar je neselektivní kultivační půda, používaná ke kultivaci široké škály mikroorganismů. Základem média je sojový pepton a kaseinát, které tvoří nutriční základ. Kultivační médium bylo připraveno navážením 16 g TSA a rozpuštěním ve 400 ml destilované vody, poté sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Konečné pH při teplotě 25 °C  $7,3 \pm 0,1$ . Vychladnuté médium bylo uchováváno při 5 °C v laboratorní lednici.

Tabulka 1 – Složení Tryptofan sojový agar (HiMedia, M2930–500 g).

Složení	Množství
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	15,0 g/l
Sojový pepton	5,0 g/l
Chlorid sodný	5,0 g/l
Agar	15,0 g/l

### 6.2.2 Mueller Hinton agar

MH agar je médium využívané v metodách pro testování citlivosti bakterií k antibakteriální látce. Hovězí extrakt a hydrolyzát kaseinu tvoří nutriční základ, zatímco škrob má schopnost absorbovat látky produkované bakteriemi, které by mohly působit vůči testované látce.

Pro přípravu MH bylo naváženo 15,2 g média a rozpuštěno ve 400 ml destilované vody. Médium bylo poté sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut, konečné pH při 25 °C  $7,3 \pm 0,1$ . Po vychladnutí byl MH agar uchovávan v laboratorní lednici při 5 °C.

Tabulka 2 – Složení Mueller Hinton agar (HiMedia, M173–500G).

Složení	Množství
Hovězí masový extrakt	300,0 g/l
Kyselý hydrolyzát kaseinu	15,5 g/l
Škrob	1,5 g/l
Agar	17,0 g/l

## 6.3 Roztoky

### 6.3.1 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven navážením 3,4 g NaCl (Penta, CAS 7647-74-5) a rozpuštěním ve 400 ml destilované vody. Roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí byl uchovávan v laboratorní lednici při 5 °C.

## 6.4 Testované polymery

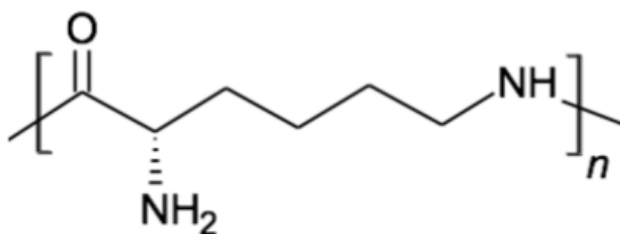
V experimentu byly testovány antibakteriální vlastnosti vybraných polymerů, které se běžně používají v kosmetických přípravcích jako emulgátory, kondicionéry nebo modifikátory reologických vlastností. Současně je diskutována jejich aplikovatelnost jako antimikrobiální činidla v kosmetice.

### 6.4.1 Poly-L-lysin

Je přirozeně vyskytující homopolyamid L-lysinu s amidovou vazbou mezi  $\epsilon$ -amino a  $\alpha$ -karboxylovými skupinami (Obrázek 28). Jedná se o tepelně stabilní polykation, rozpustný ve vodě a stabilní v širokém rozmezí pH [49].

Tabulka 3 – Testovaný poly-L-lysin.

Název	Poly-L-lysin solution 0,1 % (w/v)
Výrobce	Sigma Aldrich
CAS	25988-63-0



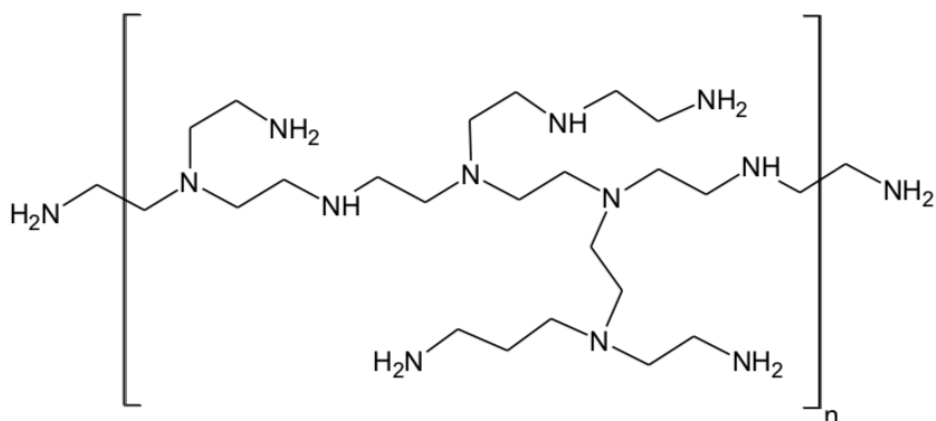
Obrázek 28 – Strukturální vzorec poly-L-lysinu.

### 6.4.2 Polyethylenimin (PEI)

Polyethylenimin (PEI) je syntetický, nebiodegradabilní polymer. Rozvětvená struktura je tvořena primárními, sekundárními a terciárními aminoskupinami (Obrázek 29), které tvoří v makromolekulárním řetězci celkový kladný náboj, jenž přispívá k antibakteriální aktivitě. V experimentu byl použit rozvětvený PEI s průměrnou molekulovou hmotností 800 g/mol.

Tabulka 4 – Testovaný polymer PEI

Název	Polyethylenimin
Výrobce	Sigma-Aldrich
CAS	25987-06-8



Obrázek 29 – Strukturní vzorec větveného polyethyleniminu (PEI).

### 6.4.3 Polyethylenglykol (PEG)

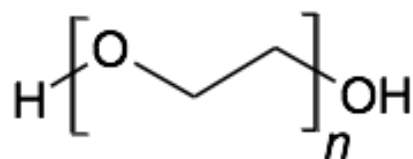
PEG je biodegradabilní polymer, který je syntetizován polykondenzací ethylenoxidu. V kosmetických přípravcích plní funkci emulgátoru, kondicionérů pokožky nebo humektanta [13]. V experimentu byl použit PEG s průměrnou molekulovou hmotností 400 g/mol a PEG s průměrnou molekulovou hmotností 600 g/mol. Struktura polyethylenglykolu je znázorněna na (Obrázku 30).

Tabulka 5 – Testovaný polymer PEG 400

<b>Název</b>	PEG 400
<b>Výrobce</b>	MERC
<b>CAS</b>	25322-68-3

Tabulka 6 – Testovaný polymer PEG 600

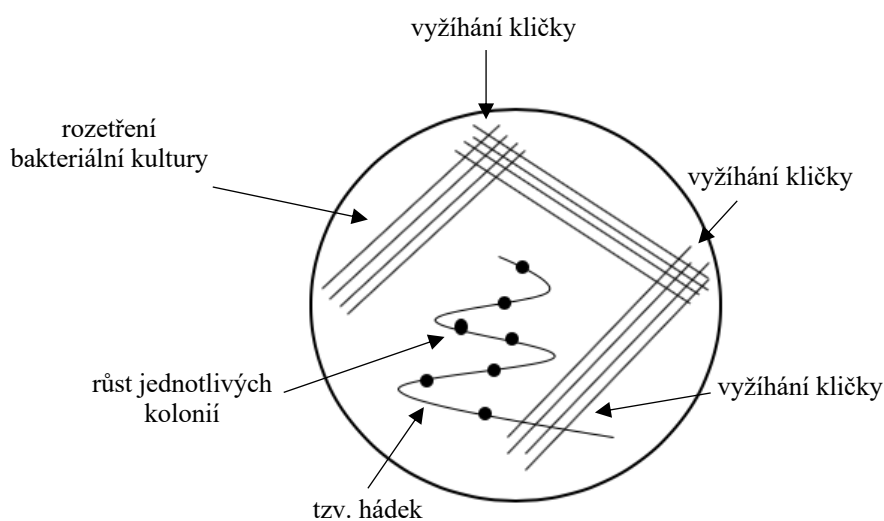
<b>Název</b>	PEG 570-630
<b>Výrobce</b>	Sigma-Aldrich
<b>CAS</b>	25322-68-3



Obrázek 30 – Strukturální vzorec polyethylenglykolu (PEG).

## 6.5 Inokulace bakterií

K inokulaci bakteriálního kmene byla použita metoda křížového rozetření, při které se původní kultura ředí a vyrůstají jednotlivé kolonie. Prvním krokem je sterilizace kličky v plamenu, po vychladnutí je kultura přenesena na TSA médium, rozetřena do čtyř pruhů. Klička je opět sterilizována a postup se opakuje rozetřením vzniklých pruhů do dalších čtyř pruhů. Další krok se opakuje. V posledním kroku je klička sterilizována a pruhy jsou rozetřeny do tzv. hádek, kde vyrůstají jednotlivé kolonie. Postup je znázorněn na *Obrázku 31*.



Obrázek 31 – Postup křížové rozetřer [vlastní zdroj].

## 6.6 Vlastní experiment

V experimentu byly provedeny dvě nezávislé testování antibakteriálních vlastností vybraných polymerů. První metodou byla agarová difuzní metoda, kde byl sledován vznik inhibičních zón jednotlivých koncentrací polymerů jako důkaz antibakteriální aktivity studovaných látek. V druhé části testování byl připraven koncentrační gradient testovaných látek pomocí experimentálního zařízení viz. *obrázek 29*, které umožňovalo sledovat

antibakteriální působení látky v řádu dní a rozvoj bakteriální adaptace. Veškerá práce byla prováděna v očkovacím boxu (Biosan). Použité pomůcky a přístroje byly desinfikovány 70% etanolem, aby bylo zamezeno případné kontaminaci. Jak je uvedeno níže, ani tyto opatření nebyla dostatečná a kontaminace se na vzorcích objevila.

## 6.6.1 Testování antibakteriální aktivity

### 6.6.1.1 Příprava inokula

Bakteriální inokulum bylo připraveno jako suspenze ve fyziologickém roztoku. Sterilní kličkou byly z povrchu TSA agarů odebrány kolonie 24h kultury a přeneseny do 5 ml sterilního fyziologického roztoku s přibližnou koncentrací inokula  $1-2 \cdot 10^8$  CFU/ml. Suspenze byla důkladně promíchána na vortexu V-1 plus (Biosan).

### 6.6.1.2 Agarová difuzní zkouška

Pro zjištění antibakteriální aktivity testovaných polymerů byla použita agarová difuzní zkouška ve formě jamkové metody. Byl napipetován 1 ml připravené bakteriální suspenze do sterilní Petriho misky a přelit 15 ml MH agaru, který byl vytemperován na 50 °C. Po ztuhnutí média byly na povrchu pomocí korkovrtu vysekány dvě jamky. Do těchto jamek bylo pipetováno 100 µl testované látky o dané koncentraci. Misky byly přelepeny fólií a inkubovány v termostatu INCU-Line (VWR™) při 35 °C do dalšího dne.

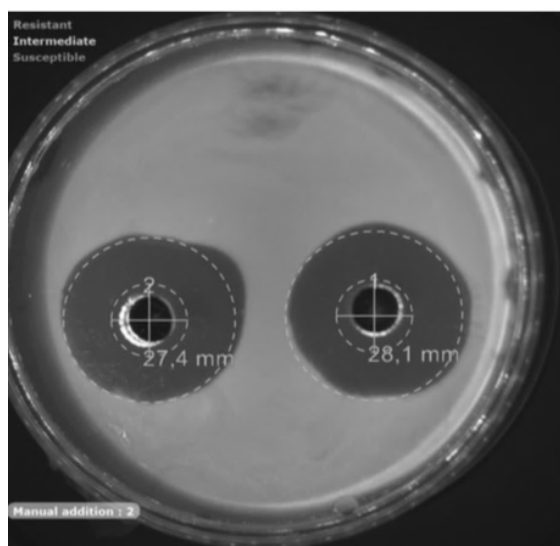
Tabulka 7- Koncentrace testovaných polymerů.

Testovaný polymer	Testované bakterie	Koncentrace [mg/ml]				
		25	50	75	100	150
*poly-L-Lysin	<i>E. coli</i> CCM 4517	25	50	75	100	150
	<i>S. aureus</i> CCM 4516	25	50	75	100	150
	<i>E. coli</i> CCM 3954	50	75	100	-	-
	<i>S. aureus</i> CCM 2022	59	75	100	-	-
PEG 400	<i>E. coli</i> CCM 4517	100	200	400	800	1000
	<i>S. aureus</i> CCM 4516					
PEG 600	<i>E. coli</i> CCM 4517	1500	1800	2000	50 µl	80 µl
	<i>S. aureus</i> CCM 4516					

PEI	<i>E. coli</i> CCM 4517	10	30	90	150	-
	<i>S. aureus</i> CCM 4516					
	<i>E. coli</i> CCM 3954					
	<i>S. aureus</i> CCM 2022					

\*koncentrace pro poly-L-lysin jsou v jednotkách [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]

Hodnoty inhibičních zón (Obrázek 32) v [mm] byly odečteny pomocí počítačového programu Scan 500 inhibiton zone reader (Interscience) a statisticky zpracovány (Dixonův test) k posouzení hodnot zatížených hrubou chybou. Žádnou hodnotu nebylo nutné vyloučit.

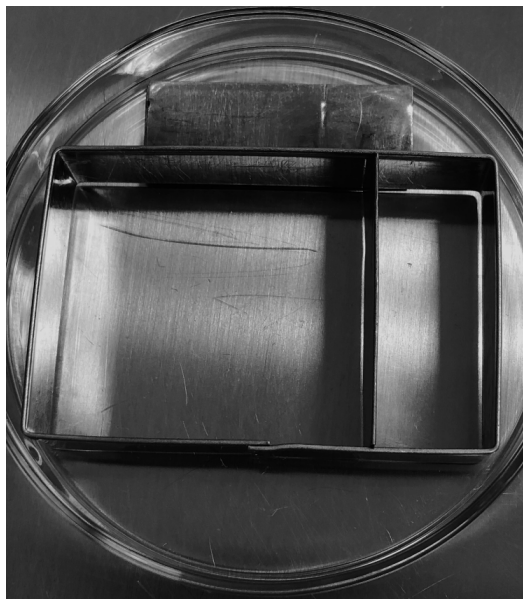


Obrázek 32 – Inhibiční zóny poly-L-lysinu vůči *Escherichia coli* CCM 4517, koncentrace (100; 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 6.6.2 Testování vývoje bakteriální adaptace

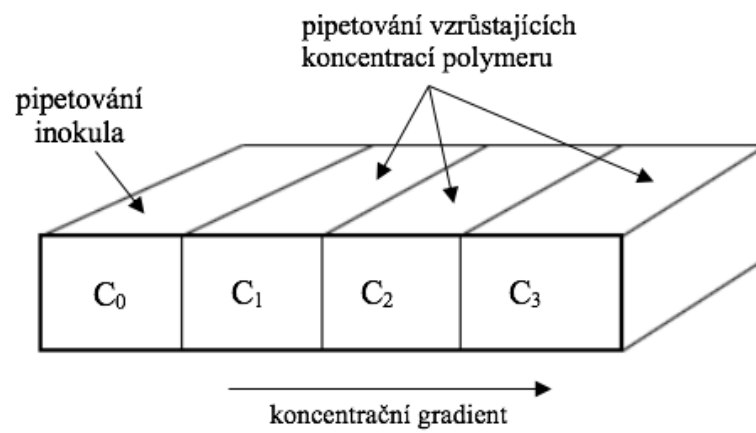
Pro testování vývoje bakteriální adaptace bylo použito experimentální zařízení umožňující připravit experimentální vzorek obsahující koncentrační gradient testované látky tzv. koncentrační bloky. Tím bylo umožněno sledovat antibakteriální aktivitu testovaných polymerů v průběhu dní. Experimentální zařízení bylo konstruováno z nerezové formy o rozměru 4 x 6 cm. Jednotlivé koncentrační oblasti byly definovány pomocí nerezové přepážky, díky které byly vytvořeny 4 bloky o velikosti 4 x 1,5 cm (Obrázek 33). V experimentu byl opět použit MH agar. Všechny pomůcky byly desinfikovány 70% etanolem.

Na sterilní Petriho misku bylo položeno experimentální zařízení představující formu, ve které byl pomocí přepážky vytvořen první blok a byl naplněn 5 ml MH agarů vytemperovaného na 50 °C. Po ztuhnutí je přepážka přemístěna k vytvoření dalšího bloku o stejné velikosti a takovým způsobem byly vytvořeny čtyři bloky tvořící tzv. chodník. Na první blok bylo napipetováno 100 µl bakteriální suspenze a na další bloky byly postupně pipetovány zvyšující koncentrace testovaných polymerů o objemu 100 µl. Díky tomu byly na povrchu média vytvořeny koncentrační hladiny testovaných látek. Spojením bloků došlo pravděpodobně k rozmazání ostré hranice koncentračních bloků. Z důvodu omezení v době pandemie Covid-19 nebylo možné zajistit další experimenty k definování prolnutí koncentrací testovaných látek. Poté bylo zařízení odebráno a takto připravené koncentrační bloky byly kultivovány při 36 °C v inkubátoru. Do inkubátoru byla též přidána miska s destilovanou vodou, aby se předcházelo vysychání kultivačního média. Koncentrační bloky jsou znázorněny na (Obrázku 34).



Obrázek 33 – Experimentální zařízení pro přípravu koncentračního gradientu.





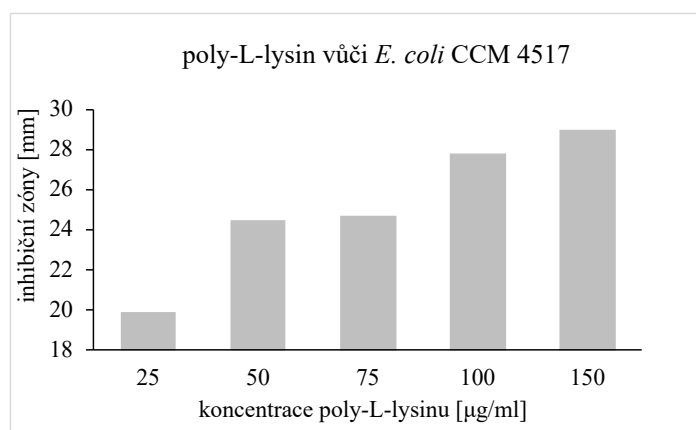
Obrázek 34 – Koncentrační gradient vytvořený experimentálním zařízením.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

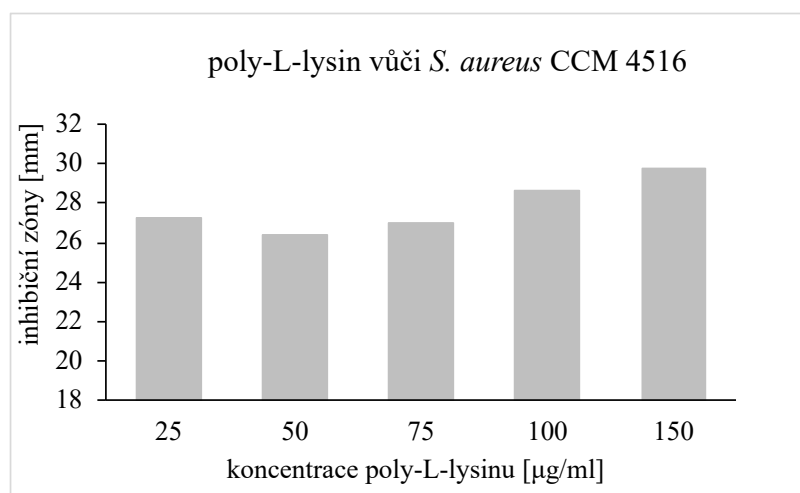
V kapitole jsou diskutovány výsledky provedených testů. U agarové difúzní metody byly diskutovány inhibiční zóny, které vznikly difúzí testovaných látek do naočkovaného MH média. U koncentračního média bylo hodnoceno přerůstání bakteriální kultury přes bloky tvořící koncentrační gradient.

### 7.1 Vyhodnocení inhibičních zón

Výsledkem agarové difúzní metody byl vznik inhibičních zón, které charakterizují citlivost daného kmene bakterií k testované látce. Čím větší je průměr inhibiční zóny tím je antibakteriální látka účinnější a více inhibuje růst bakterií. Grafy představují závislost použitých koncentrací testovaných látek na velikosti vzniklých inhibičních zón uváděných v [mm]. Pro každou koncentraci byl test proveden třikrát, byl vypočítán průměr velikostí inhibičních zón a přenesen na osu y v závislosti na danou koncentraci.



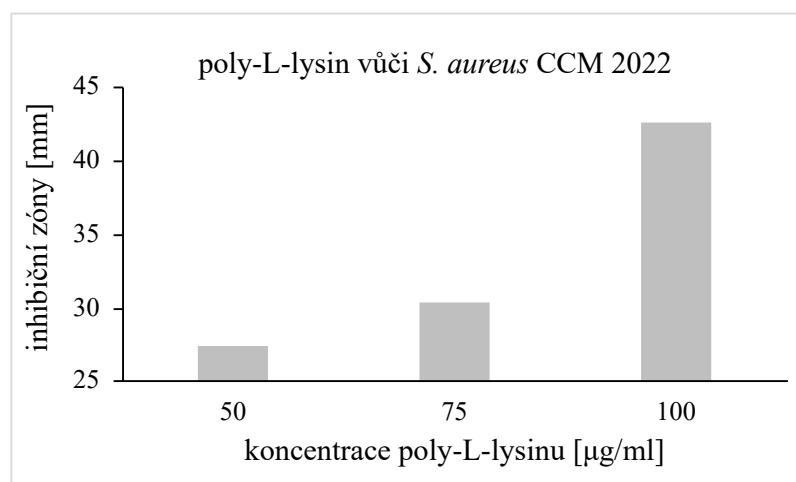
Obrázek 35 – Velikost inhibičních zón testovaného poly-L-lysinu proti *Escherichia coli* CCM 4517.



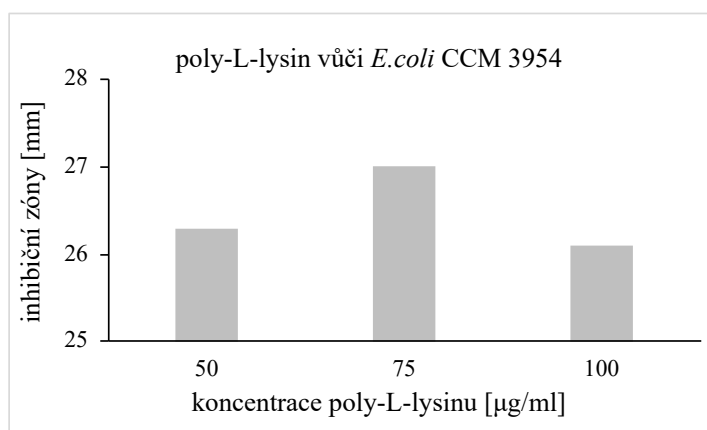
Obrázek 36 – Velikost inhibičních zón testovaného poly-L-lysinu proti *Staphylococcus aureus* CCM 4516.

Pro testování antibakteriálních vlastností poly-L-lysinu byla zvolena koncentrační řada (25; 50; 75; 100; 125  $\mu\text{g/ml}$ ) pro bakteriální kmeny *S. aureus* CCM 4516 *E. coli* CCM 4517, pro kmeny *E. coli* CCM 3954 a *S. aureus* CCM 2022 koncentrace (50; 75; 100  $\mu\text{g/ml}$ ).

Na Obrázku 35 je graficky vyjádřena závislost testovaných koncentrací poly-L-lysinu na velikosti inhibičních zón vůči bakteriálnímu kmenu *E. coli* CCM 4517. Již při nejnižší koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$ , došlo ke vzniku inhibiční zóny o velikosti ( $19,9 \pm 0,3$ ) mm a velikost inhibičních zón rostla se zvyšující se koncentrací testované látky. Stejný trend lze sledovat i při působení proti kmenu *S. aureus* CCM 4516, kde velikost inhibiční zóny byla ( $27,3 \pm 0,1$ ) mm. Tím lze potvrdit, že poly-L-lysine má vyšší účinek proti gram pozitivním bakteriím, jejichž buněčná struktura je jednodušší a jsou na působení antibakteriálních látek citlivější.

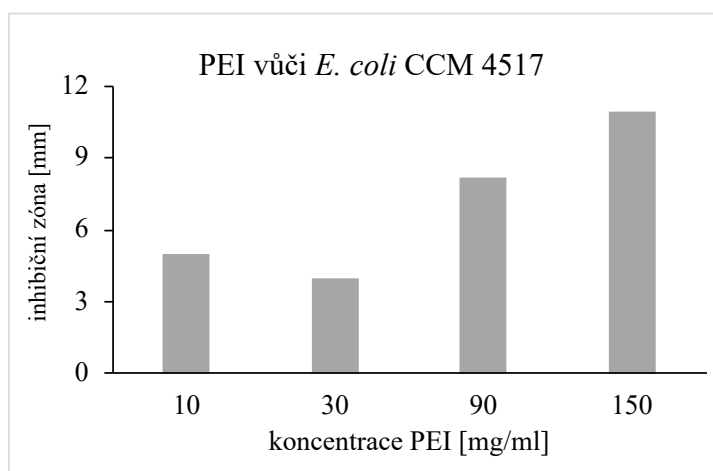


Obrázek 37 – Velikost inhibičních zón testovaného poly-L-lysinu proti *Staphylococcus aureus* CCM 2022.

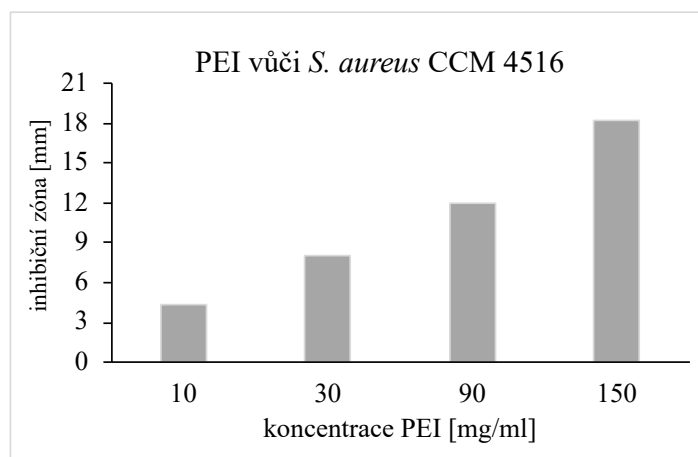


Obrázek 38 – Velikost inhibičních zón testovaného poly-L-lysinu proti *Escherichia coli* CCM 3954.

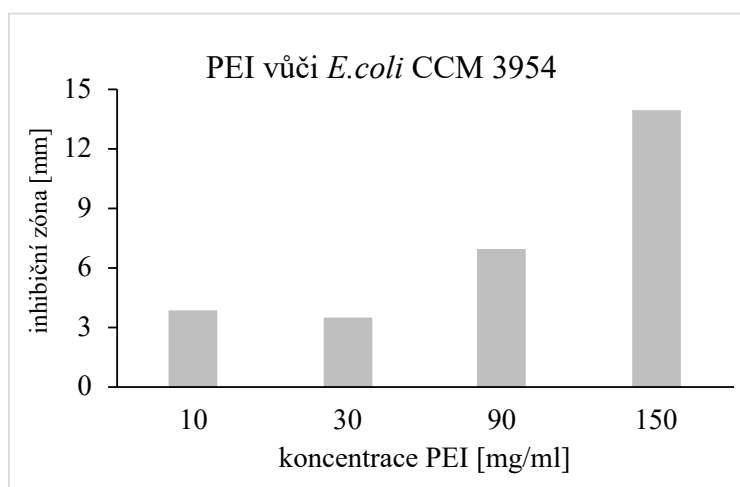
Na obrázcích 37–38 je znázorněno antibakteriální působení poly-L-lysinu vůči bakteriálním kmenům *E. coli* CCM 3954 a *S. aureus* CCM 2022, jedná se o kmeny, které jsou schopny tvořit biofilm a obecně jsou považovány za odolnější. Velikost inhibičních zón při koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  byla u *E. coli* CCM 3954 ( $26,3 \pm 0,1$ ) mm a ( $27,2 \pm 0,7$ ) mm pro *S. aureus* CCM 2022. Podobné velikosti inhibičních zón lze sledovat i u kmenů *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516 a na základě toho nelze zhodnotit, jestli jsou bakteriální kmeny vůči působení poly-L-lysinu odolnější.



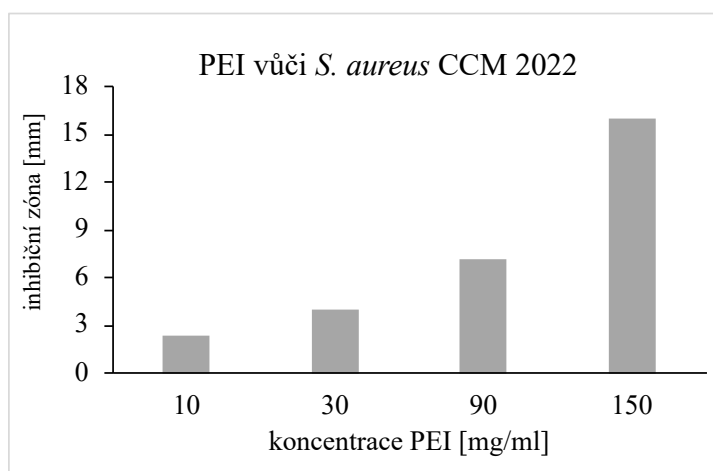
Obrázek 39 – Velikost inhibičních zón testovaného PEI proti *E. coli* CCM 4517.



Obrázek 40 – Velikost inhibičních zón testovaného PEI proti *S. aureus* CCM 4516.

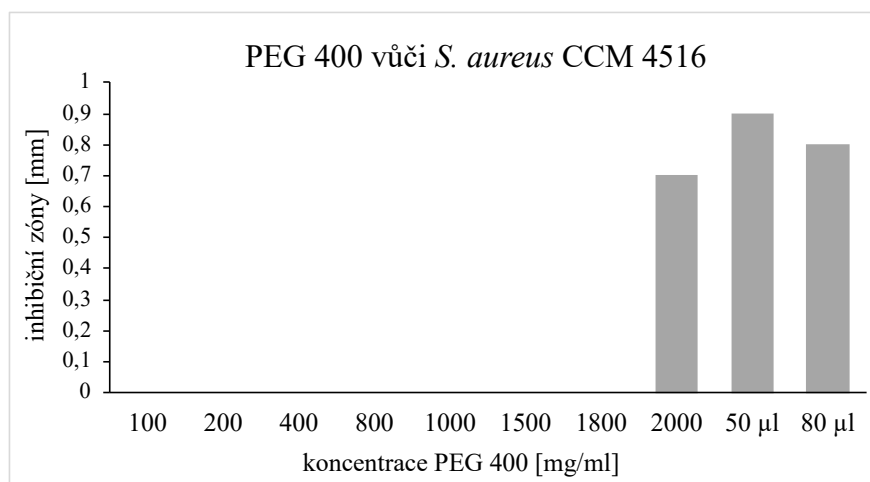


Obrázek 41 – Velikost inhibičních zón testovaného PEI proti *E. coli* CCM 3954.

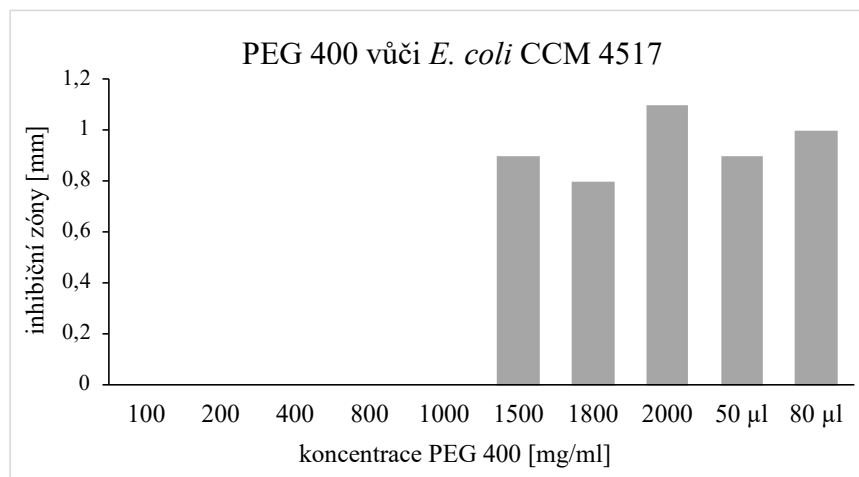


Obrázek 42 – Velikost inhibičních zón testovaného PEI proti *S. aureus* CCM 2022.

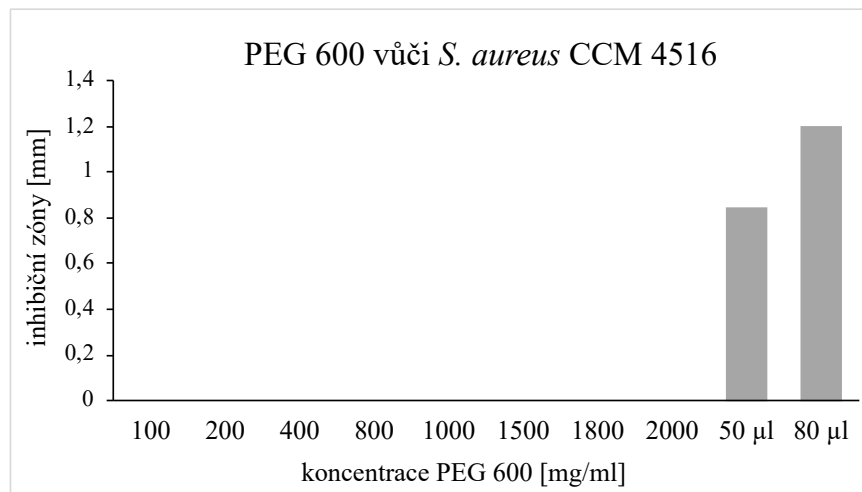
Dalším testovaným polymerem byl polyethylenimin (PEI) v koncentracích (10; 30; 90; 150 mg/l) na *obrázcích* 39 – 42. U všech čtyř testovaných kmenů došlo k inhibici při nejnižší použité koncentraci 10 mg/ml. U kmene *Escherichia coli* CCM 4517 lze sledovat menší velikost inhibiční zóny ( $4 \pm 0,4$ ) mm při koncentraci 30 mg/ml, než u koncentrace 10 mg/ml, což mohlo být způsobeno přelitím testované látky z jamky na povrch média a tím vznik větší inhibiční zóny. U ostatních kmenů lze sledovat trend, že se zvyšující koncentrací roste velikost inhibičních zón.



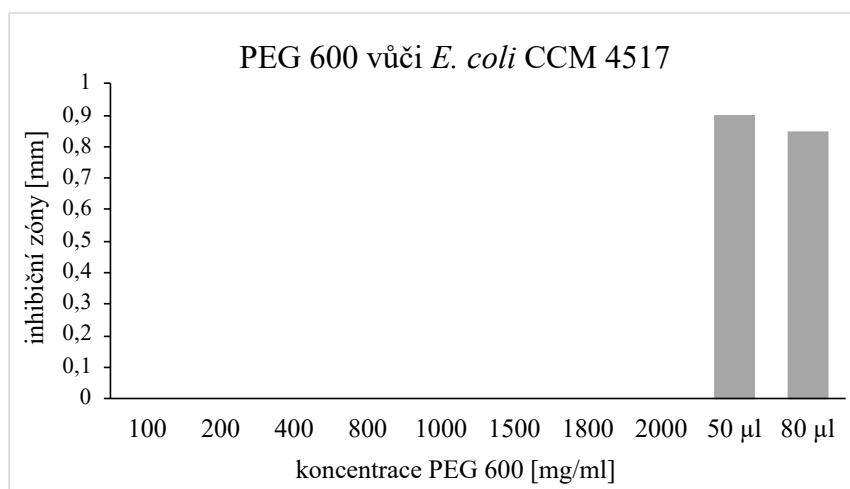
Obrázek 43 – Velikost inhibičních zón testovaného PEG 400 vůči *S. aureus* CCM 4516.



Obrázek 44 – Velikost inhibičních zón testovaného PEG 400 vůči *E. coli* CCM 4517.



Obrázek 45 – Velikost inhibičních zón testovaného PEG 600 vůči *E. coli* CCM 4516.



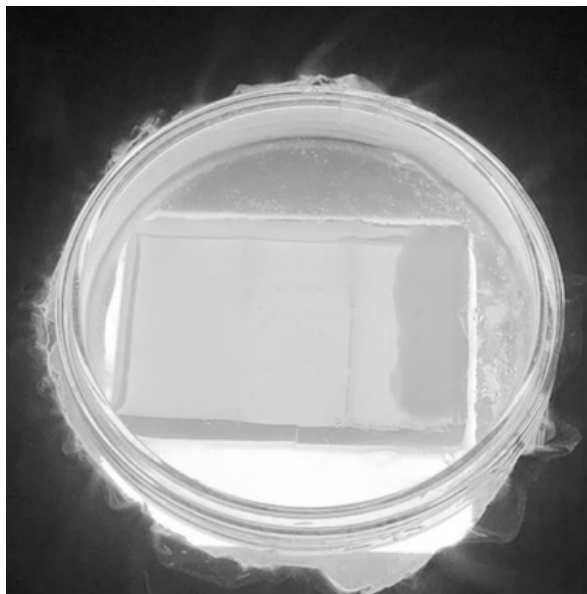
Obrázek 46 – Velikost inhibičních zón testovaného PEG 600 vůči *E. coli* CCM 4517.

Posledním testovaným polymerem byl polyethylenglykol (PEG) s průměrnou molekulovou hmotností 400 g/mol a 600 g/mol o koncentraci (100; 200; 400; 800; 1000; 1500; 1800; 2000 mg/ml) a neředění PEG o objemu 50 a 80 µl. Antimikrobiální aktivita PEGu je stále testována a diskutována. Na *obrázcích 43–46* lze sledovat, že ke vzniku malých inhibičních zón došlo až při koncentraci 1500 mg/ml u kmene *E. coli* CCM 4517 ( $0,9 \pm 0,0$ ) mm. Nižší koncentrace PEG 400 a PEG 600 neměli inhibiční účinek vůči testovaným bakteriálním kmenům. U PEG 600 došlo ke vzniku inhibiční zóny při přidavku 50 µl o velikosti ( $0,9 \pm 0,1$ ) mm u kmene *E. coli* CCM 4517 ( $0,85 \pm 0,12$ ) mm u kmen *S. aureus* CCM 4516.



## 7.2 Výsledky testování bakteriální adaptace

K vytvoření koncentračního gradientu na povrchu připraveného tzv. chodníku, byly použity koncentrace testované v první části experimentu. Výsledky jsou tedy srovnatelné. Koncentrační gradient byl připraven pomocí experimentálního zařízení a byly použity koncentrace testované v první části experimentu. Výsledky jsou tedy srovnatelné. Před nanesením bakteriální suspenze byl agar sterilizován UV zářením po dobu 30 minut a při kultivaci byla Petriho miska balena do fólie aby se maximalizovala ochrana před případnou kontaminací. Po inkubaci byl sledován bakteriální růst skrz koncentrační gradient, který byl zaznamenáván pomocí fotoaparátu (Panasonic Lumix) a pro lepší vizualizaci podsvěcován 6W LED čipem (Obrázek 47). Při focení byla Petriho miska otevřena, což vedlo k silným kontaminacím. Z toho důvodu focení probíhalo pouze jednou týdně.



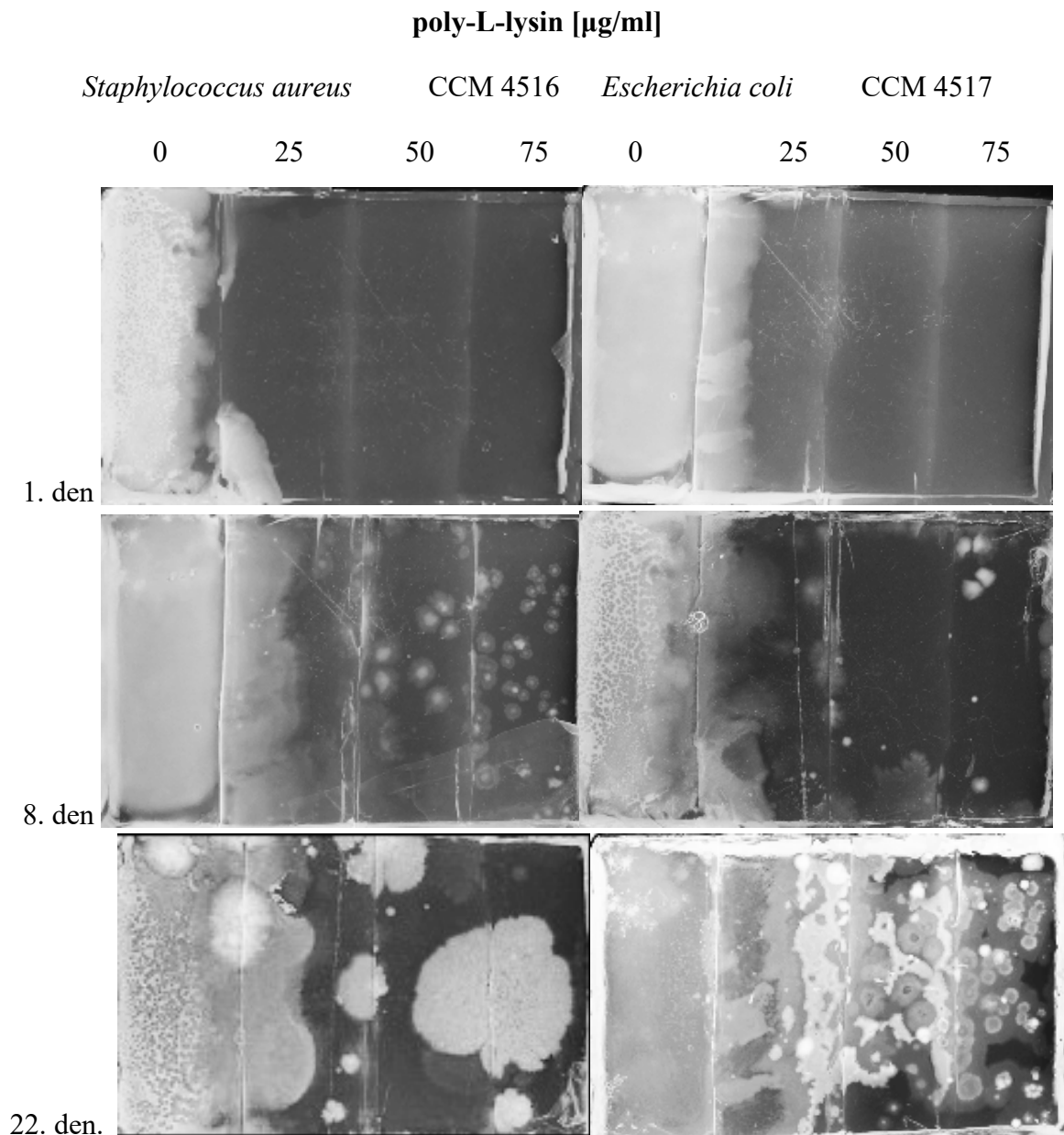
Obrázek 47 – Petriho miska s bloky představující koncentrační gradient.

Tabulka 8 – Popis bakteriální růst skrz koncentrační gradient.

Testovaný polymer	Bakteriální kmeny	Koncentrace [mg/ml]			Popis bakteriální adaptace
		1. blok	2. blok	3. blok	
poly-L-Lysin	<i>E. coli</i> CCM 4517	25	50	75	Přerůstání na ½ prvního bloku od 1 dne. 22.. povrch je pokryt kontaminací.
	<i>S. aureus</i> CCM 4516				1. den viditelné narušení agaru. Od 8. dne na povrchu zřetelná kontaminace.
	<i>E. coli</i> CCM 4517	100	150	K přerůstání na další blok došlo 8. den. Narůst byl 15. den stále stejný. 35. den je možné sledovat drobnou kontaminaci a znaky vysychání agaru, nárůst na 1/3 prvního bloku.	
	<i>S. aureus</i> CCM 4516	100	150	K přerůstání došlo 8. den. 15. den 1/2 nárůstu na prvním bloku. 22. den silná kontaminace na celém povrchu.	
PEG 400	<i>E. coli</i> CCM 4517	1500	1800	2000	Již od 1. dne došlo k přerůstání do prvního bloku. Silná povrchová kontaminace.
	<i>S. aureus</i> CCM 4516				
PEG 600	<i>E. coli</i> CCM 4517	1500	1800	2000	Přerůstání od 1. dne a silná kontaminace.
	<i>S. aureus</i> CCM 4516				Silná kontaminace od 1. dne. Ale nedošlo k přerůstání.

PEI	<i>E. coli</i> CCM 4517	10	30	50	K přerůstání dochází od 1. dne na 1/3 prvního bloku. 16. Den nárůst na 1/2 prvního bloku. 26. den nárůst na celém 1. bloku, viditelná kontaminace.
	<i>S. aureus</i> CCM 4516				Přerůstání od 1. dne, V následujících dnech růst inhibován. 26. den povrchová kontaminace.

\*koncentrace pro poly-L-lysin v jednotkách [ $\mu\text{g/ml}$ ]

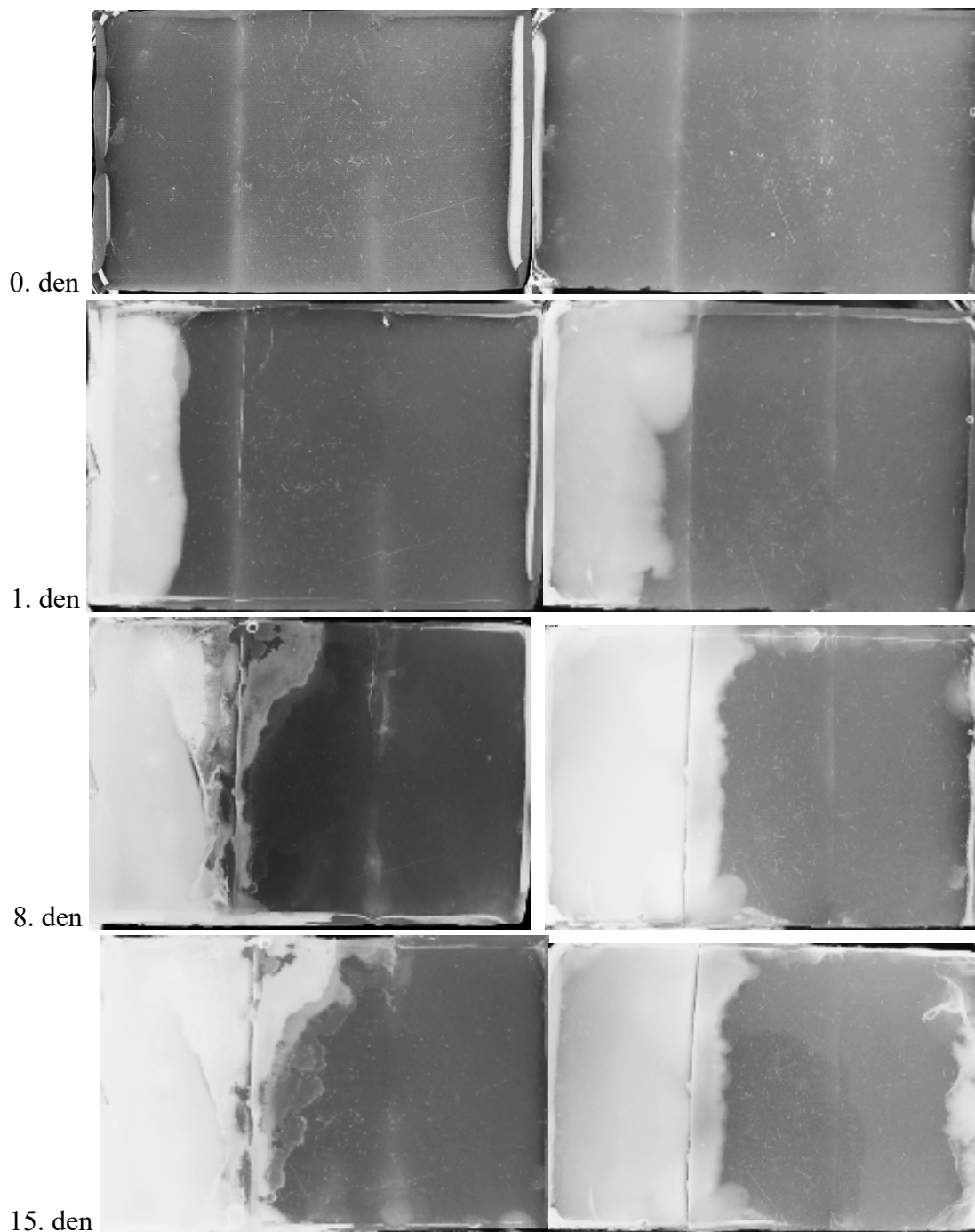


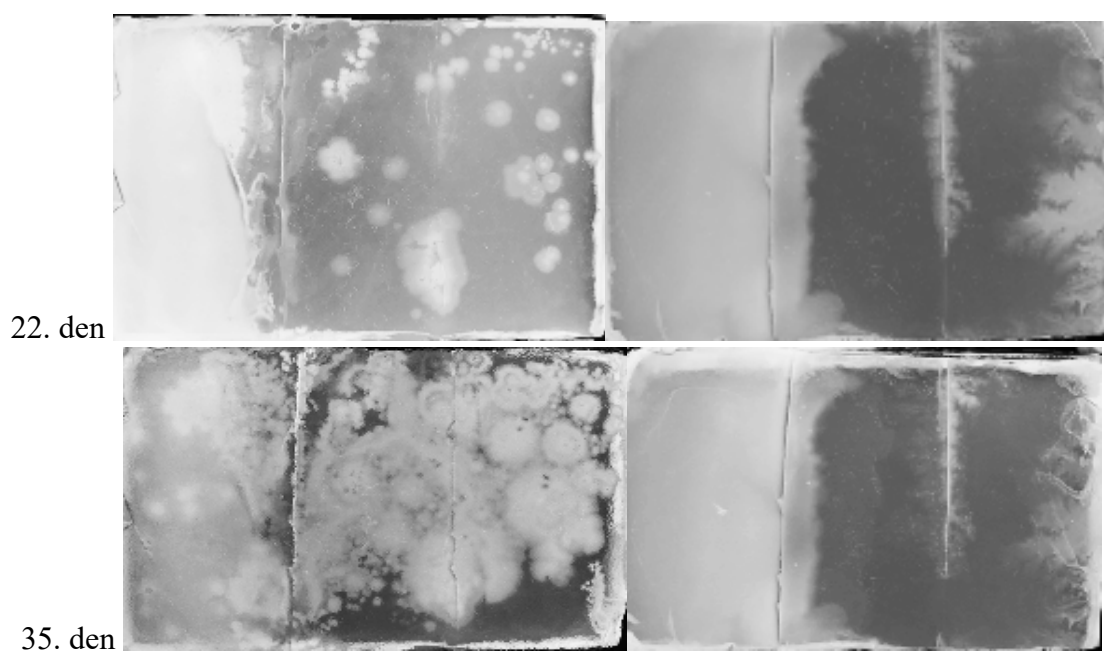
Obrázek 48 – Koncentrační gradientem poly-L-lysin působící proti růstu *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516 (koncentrace  $\mu\text{g/ml}$ ).

Poly-L-lysin [ $\mu\text{g/ml}$ ]

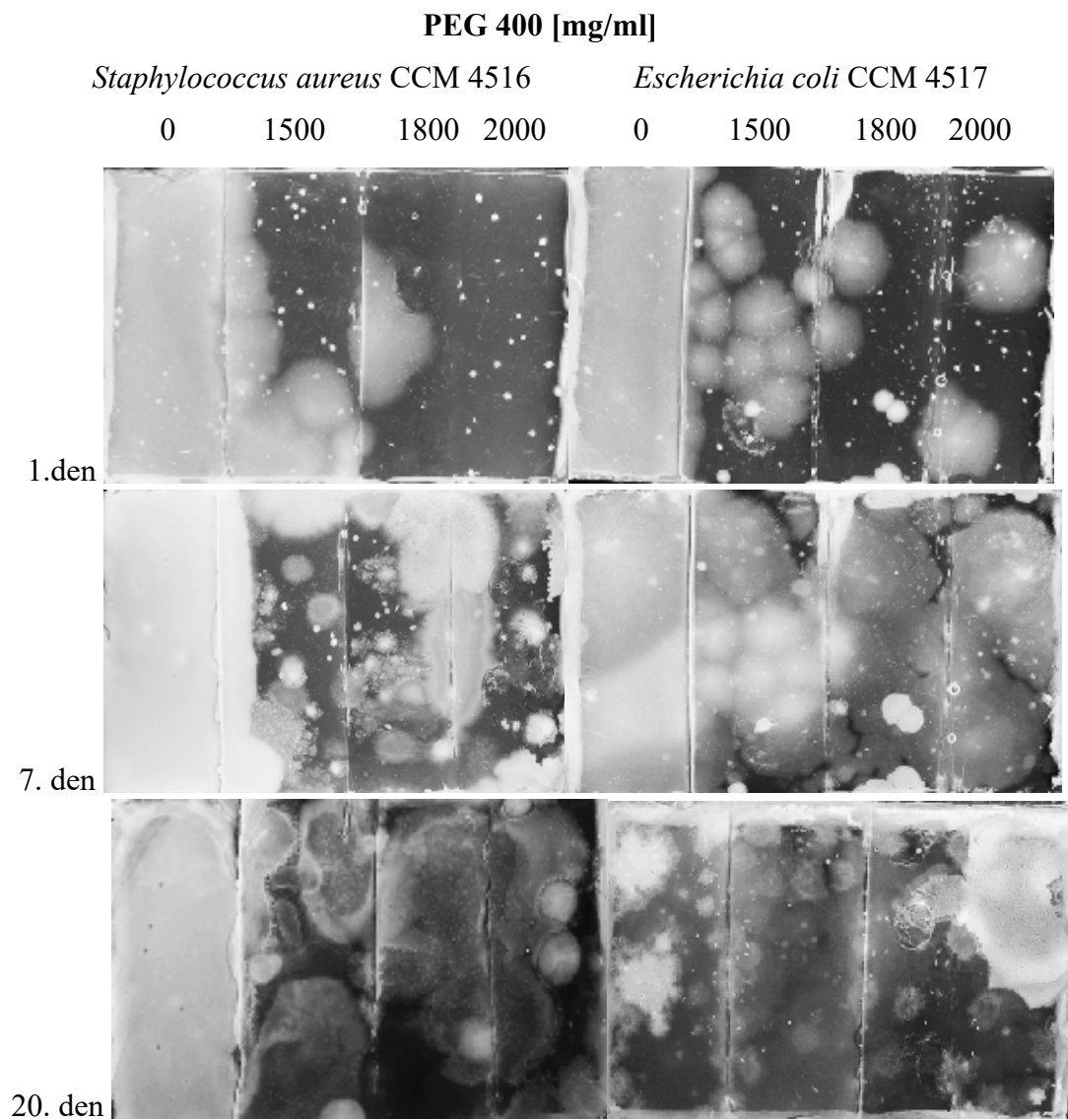
*Staphylococcus aureus* CCM 4516    *Escherichia coli* CCM 4517

0            100            150            0            100            150

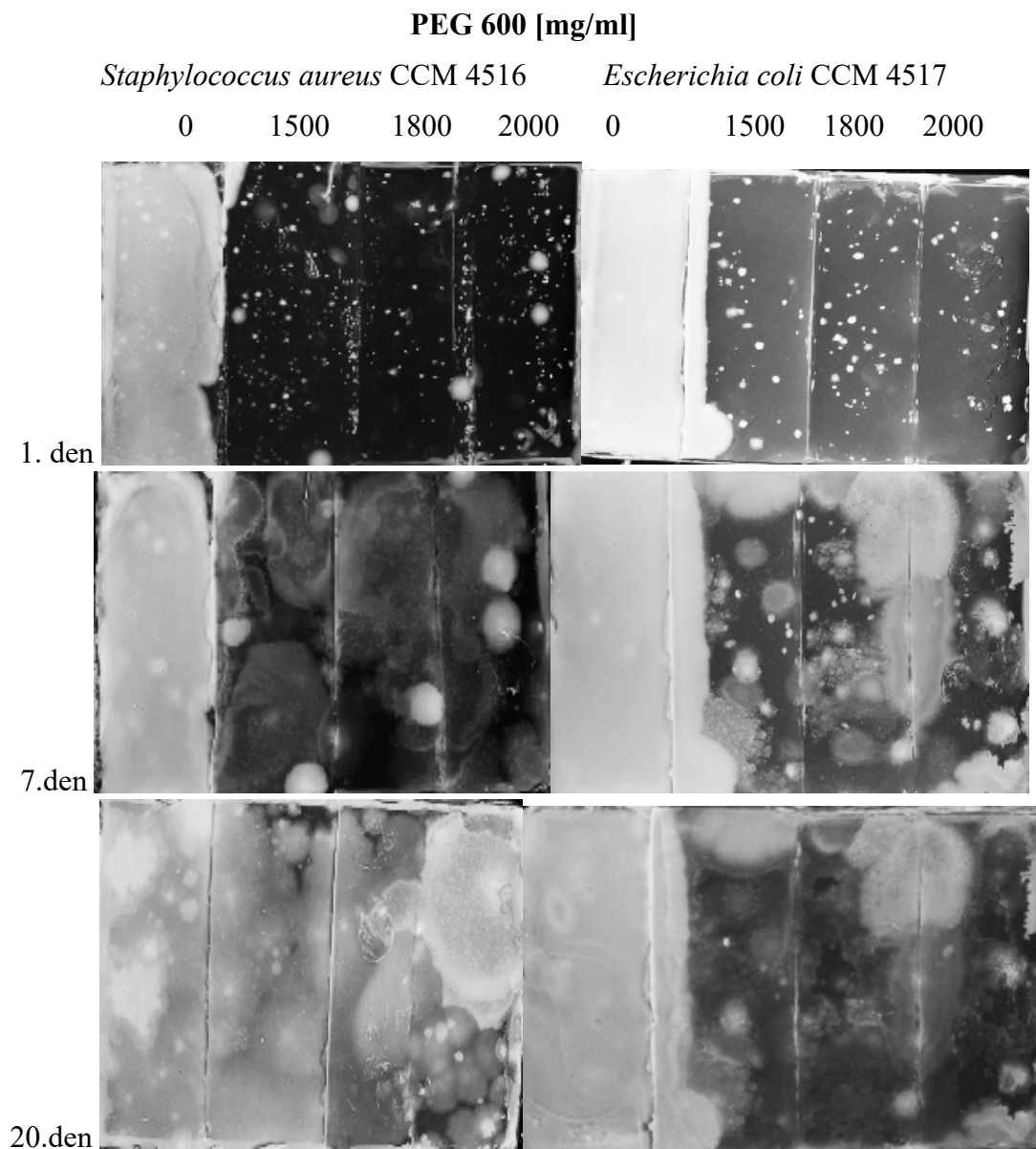




Obrázek 49 – Koncentrační gradientem poly-L-lysin působící proti růstu *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516 (koncentrace  $\mu\text{g/ml}$ ).



Obrázek 50 – Koncentrační gradientem PEG 400 působící proti růstu *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516 (koncentrace mg/ml).



Obrázek 51 – Koncentrační gradientem PEG 600 působící proti růstu *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516 (koncentrace mg/ml).



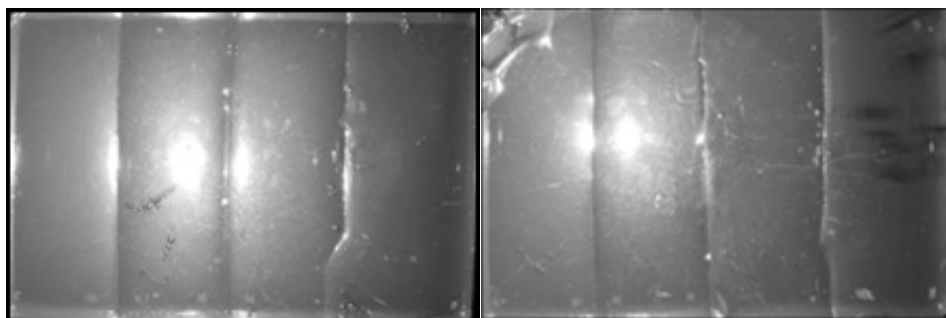
PEI [mg/ml]

*S. aureus* CCM 4516

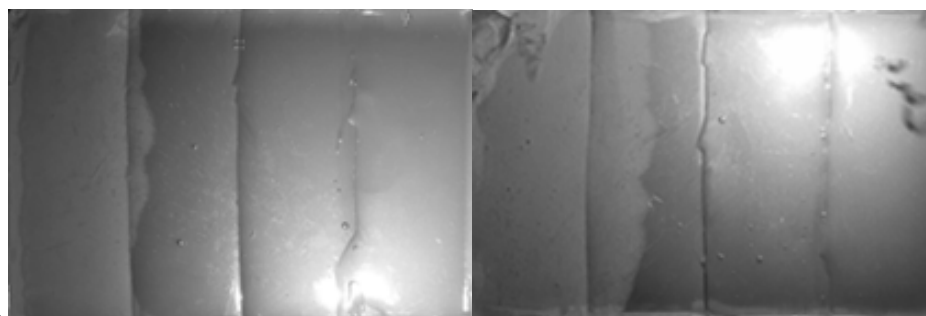
*E. coli* CCM 451

0      10      30      50      0      10      30      50

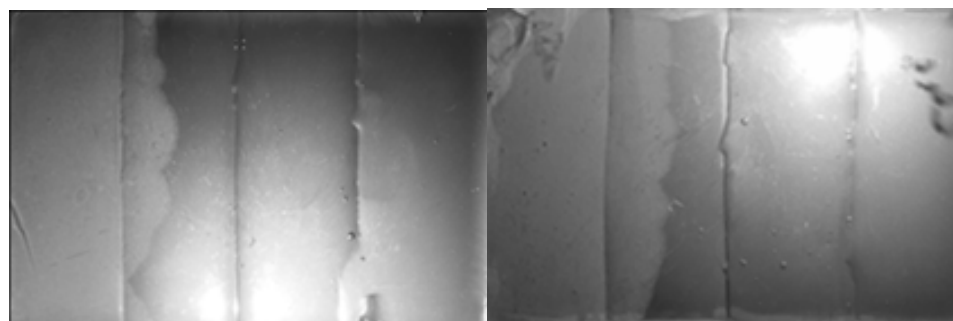
0. den



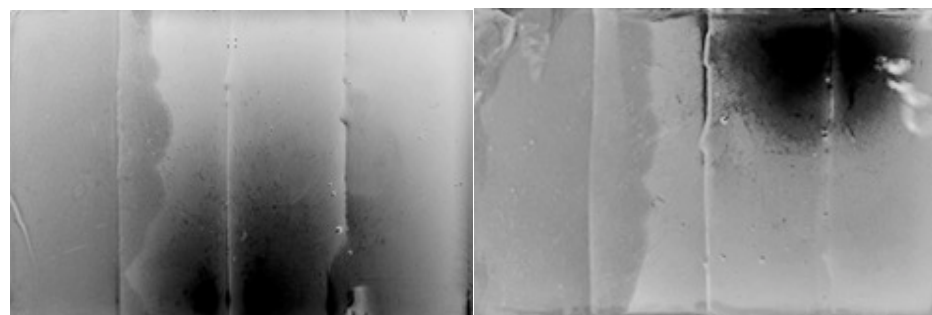
1. den

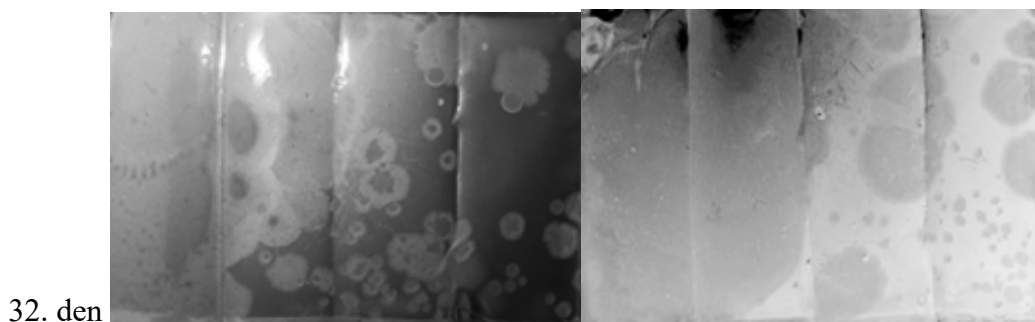


8. den



16. den





32. den

Obrázek 52 – Koncentrační gradientem PEI působící proti růstu *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516 (koncentrace mg/ml).

Testování vývoje bakteriální adaptace je velmi důležitým ukazatelem antibakteriálních vlastností látky. První použitá metoda, při které byla sledována velikost inhibičních zón, nám podává informace pouze o tom, do jaké míry je bakteriální kmen citlivý k testované látce. Neříká ale nic o vývoji bakteriálního růstu při dlouhodobém působení antibakteriální látky. Je velmi důležité si uvědomit, že bakterie si v průběhu jejich existence vyvinuly adaptační systémy, které jim umožňují se adaptovat a růst i v nepříznivých podmínkách.

Prvním testovaným polymerem na vývoj bakteriální adaptace byl poly-L-lysin (obrázek 48). Od 1. dne je znatelné přerůstání u obou kmenů na první blok s nejnižší koncentrací 25  $\mu\text{g/ml}$ . od 8. dne lze sledovat drobnou kontaminaci a od 22. dne silnou kontaminaci na povrchu agaru a nebylo možné sledovat přerůstání bakteriálních kmenů. Silná kontaminace mohla být způsobena tím, že poly-L-lysin má dobré antibakteriální vlastnosti. Ale při nízkých koncentracích nepůsobí proti plísním, které jsou zdrojem sekundární kontaminace. Na obrázku 49 lze sledovat koncentrační gradient tvořený pouze dvěma koncentračními bloky o koncentraci (100; 150  $\mu\text{g/ml}$ ), při které jsme chtěli otestovat účinnost poly-L-lysinu při vysokých koncentracích vůči kontaminantům. Můžeme sledovat, že u obou bakteriálních kmenů byl růst zpomalen. U kmene *E. coli* CCM 4517 došlo přerůstání do 1. bloku až 8. den a poté se růst mutantních bakterií zastavil. Po 35 dnech přerostla populace do 1/3 1. bloku o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . U kmene *S. aureus* CCM 4516 došlo taktéž k přerůstání 8. den experimentu do 1/3 1. bloku, přerůstání dále pokračovalo a 15. den se populace dostala na 1/2 1. prvního bloku. Od 22. dne můžeme sledovat první známky kontaminace, které byla pravděpodobně způsobena špatnou manipulací s Petriho miskou. A 35. den kontaminace pokrývala celý povrch média. Ani u jednoho kmene nedošlo k přerůstání do 2. bloku o koncentraci 150  $\mu\text{g/ml}$ ). Jednoznačně ale nelze říct, že koncentrace 150  $\mu\text{g/ml}$  skutečně inhibuje růst bakterií nebo bylo zapotřebí delší časové období k adaptaci bakterií na nové

prostředí. Navíc u kmene *E. coli* CCM 4517 nedošlo ke kontaminaci, tudíž poly-L-lysin při vyšších koncentracích pravděpodobně působí proti kontaminujícím mikroorganismům.

Dalšími testovanými polymery byly PEG 400 a PEG 600 na *obrázku 50 – 51*, na kterém lze vidět gradient tvořený koncentracemi (1500; 1800; 2000 mg/ml). U PEG 400 je patrné přerůstání u obou testovaných kmenů do 1. bloku o koncentraci 1500 mg/ml. Od prvního dne je přítomná kontaminace, která mohla být způsobena v průběhu přípravy. Zdrojem primární kontaminace mohlo být například nedostatečně umyté nádoby. Stejná kontaminace se vyskytovala i u PEG 600. Je tedy možné, že zdrojem kontaminace mohlo být médium. Kmen *E. coli* CCM 4517 přerůstá již první den do 1/4 1. bloku, zatímco *S. aureus* CCM 4516, nepřerůstá ani po 7. dnech, bohužel nemůžeme s jistotou říct, zda byl bakteriální růst inhibován působením PEG 600 nebo působením kontaminujících mikroorganismů. 20. den můžeme sledovat kontaminaci u obou kmenů. S jistotou nelze říct, že PEG 600 neinhiboval bakteriální růst, protože na povrchu se vyskytovala silná kontaminace. Na základě výsledků ale můžeme říct, že PEG 400 ani PEG 600 nepůsobí proti kontaminujícím mikroorganismům.

Posledním testovaným polymerem byl PEI o koncentraci (10; 30; 50 mg/ml) (*Obrázek 52*). U kmene *E. coli* CCM 4517 dochází k přerůstání od 1. dne do 1/2 1. bloku, bakterie se dokázaly přizpůsobit prostředí s testovanou látkou o koncentraci 10 mg/ml. Růst se zpomalil, protože bakteriální kmen nebyl pravděpodobně schopný se přizpůsobit vyšší koncentraci 30 mg/ml. Od 30. dne byla na povrchu sledována kontaminace. Kmen *S. aureus* 4516 slabě přerůstá od 1. dne do prvního bloku, přerůstání bylo plynulé a po 8 dnech došlo k nárůstu do 1/2 bloku. Po dalších 8 dnech se bakteriální růst nezměnil. Po 32 dnech je opět na povrchu sledována kontaminace.

Můžeme tedy říct, že koncentrace 10 mg/ml PEI nebyla dostatečná k inhibici bakteriálního růstu. A zároveň bakterie se nepřizpůsobily prostředí o vyšší koncentraci, tedy 30 mg/ml.

Největším problémem experimentu byla kontaminace, která se nakonec objevila u všech připravených koncentračních bloků. Kontaminace mohla být způsobena jednak nedostatečnou desinfekcí pomůcek nebo laboratorního zařízení. Dalším důvodem, může být aktivita testovaných látek, které nepůsobí proti kontaminujícím mikroorganismům.

Výsledky můžeme srovnat s literaturou, ve článku Jain a kol. [49] se udává inhibiční koncentrace poly-L-lysinu proti bakteriím v rozmezí 1 – 8 µg/ml, námi zjištěná hodnota 150 µg/ml je mnohonásobně vyšší. To může být způsobeno tím, že v experimentu byly použity jiné bakteriální kmeny a polymer byl zakoupen od jiného výrobce.

Výsledky PEI můžeme srovnat s poznatky z publikace Gibney a kol. [67] ve článku popisují postup pro stanovení inhibiční koncentrace PEI a tvrdí, že se zvyšující molekulovou hmotností nedochází ke zvyšování antibakteriální aktivity. Lineární PEI podle článku vykazují podstatně nižší MIC 31  $\mu\text{g/ml}$  proti *E. coli* v porovnání PEI o molekulové hmotnosti 600 s MIC 500  $\mu\text{g/ml}$  proti *E. coli*. V experimentu byly použity vyšší koncentrace PEI, při testování bakteriální adaptace se bakterie poměrně jednoduše adaptovaly na prostředí s testovanou látkou o koncentraci 10 mg/ml. K přerůstání do 2. bloku o vyšší koncentraci nedošlo, bohužel v důsledku kontaminace nemůžeme říct, že koncentrace 30 mg/ml je pro dané bakteriální kmeny inhibující.

Testovaný polyethylenglykol jako jediný z testovaných polymerů působí na bakterie pasivním mechanismem. To znamená, že princip jeho antibakteriální aktivity je odpuzování bakteriálních buněk. Ostatní dva zmíněné polymery fungují na principu elektrostatické interakce, absorbují se na buněčný povrch a způsobí narušení membrány, což vede k buněčné smrti.

Už na základě toho lze předpokládat, že antibakteriální aktivita bude podstatně nižší než u ostatních testovaných polymerů. Ze získaných výsledků nelze s jistotou určit, jestli PEG vykazuje antibakteriální vlastnosti. Jeho antibakteriální aktivita byla testována už v roce 1983 v článku Charife a kol., kde pracují s koncentrací 4,6 g/ml a PEG je zde popisován jako potenciální antibakteriální činidlo. V dalším testování by tedy bylo možné otestovat vyšší koncentrace PEG pro lepší reprodukovatelnost výsledků. Je důležité zmínit, že PEG má široké množství aplikací, například vehikulum ve farmacii, které usnadňuje podávání léčivých látek, polymerních nosičů, zajišťující specifické působení léčiv. V širším měřítku jsou tyto aplikace PEGu důležitější než jeho aplikace jako antimikrobiálního činidla.

## ZÁVĚR

Bakterie jsou mikroorganismy, které mají schopnost se poměrně jednoduše přizpůsobit prostředí, které obývají. Riziko představují hlavně patogenní bakterie, které se po určité době mohou adaptovat na působení antibakteriální látky, což způsobuje problémy při konzervaci výrobku a desinfekci povrchu, jejíž kontaminace představuje riziko pro lidské zdraví. Z toho důvodu jsou testovány nové antibakteriální látky, které budou účinné a budou zamezovat bakteriální adaptaci.

Cílem diplomové práce bylo testovat antibakteriální vlastnosti vybraných polymerů, a to pomocí klasické metody a její srovnání s testováním v koncentračním gradientu. Klasické metody jsou krátkodobé a popisují pouze schopnost látek inhibovat bakteriální růst, ale neposkytují informace o vývoji vztahu mezi bakterií a testovou látkou při dlouhodobějším působení. Z toho důvodu bylo použito zařízení, které umožňovalo sledovat bakteriální růst a vývoj adaptace v koncentračním gradientu v delším časovém období.

Antibakteriální aktivita polymerů byla testována vůči bakteriálním kmenům *Escherichia coli* CCM 4517 a *Staphylococcus aureus* CCM 4516, biofilm tvořícím kmenům *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 2022.

Prvním testovaným polymerem byl poly-L-lysin o koncentraci (25; 50; 75; 100; 150 µg/ml), dále polyethylenimin (PEI) o koncentraci (10; 30; 50; 150 mg/ml) a polyethylenglykol PEG 400, PEG 600 o koncentraci (100; 200; 400; 800; 1000; 1500; 1800; 2000 mg/ml) a (50; 80 µl) neředěného PEG 400 a PEG 600.

Pro stanovení antibakteriální aktivity byla použita agarová difúzní zkouška ve formě jamkové metody za vzniku inhibičních zón. U poly-L-lysinu došlo ke vzniku inhibičních zón již u testované koncentrace 25 µg/ml, větší zóny byly vytvořeny u *Staphylococcus aureus* CCM 4516. U biofilm tvořících kmenů byla nejnižší testovaná koncentrace 50 µg/ml a vzniklé inhibiční zóny odpovídali zónám vzniklých u ostatních kmenů při použití stejné koncentrace. Nelze tedy s jistotou říct, že biofilm tvořící kmeny jsou vůči poly-L-lysinu odolnější, ale z velikostí inhibičních zón vyplývá, že grampozitivní bakterie jsou na působení poly-L-lysinu citlivější.

Dalším testovaným polymerem byl PEI, ke vzniku inhibičních zón došlo při nejnižší testované koncentraci 10 mg/ml. Při vyšších testovaných koncentracích lze sledovat, že velikost inhibičních zón je větší u grampozitivních bakterií *S. aureus* CCM 4516 a CCM 2022, které mají jednodušší buněčnou strukturu.

Posledními testovanými polymery byly PEG 400 a PEG 600, u kterých byl vznik inhibičních zón v malé míře sledován až při koncentraci 1500 mg/ml u kmene *E. coli* CCM 4517 a při

koncentraci 2000 mg/ml u kmene *S. aureus* CCM 4516. Avšak velikost vzniklých inhibičních zón byla tak malá, že mohly vzniknout i při samotné přípravě, kdy byly jamky vysekány pomocí korkovrtu, který byl desinfikován etanolem, jehož zbytky mohly difundovat do agaru.

Další částí experimentu bylo testování bakteriální adaptace pomocí koncentračních bloků, které byly připraveny pomocí experimentálního zařízení. K testování byly použity koncentrace, u kterých došlo ke vzniku inhibičních zón v první části experimentu. Největším problémem experimentu byla kontaminace, která se nakonec objevila na všech testovaných koncentračních gradientech, s výjimkou u *E. coli* CCM 4517 s koncentrací poly-L-lysinu (100; 150 µg/ml). Poly-L-lysin vykazoval nejlepší inhibiční vlastnosti při koncentraci 150 µg/ml, můžeme také říct, že tato koncentrace působila vůči kontaminujícím koncentracím.

V přítomnosti PEI oba testované kmeny poměrně rychle přerostly do 1. koncentračního bloku, poté byl ale jejich růst zpomalen a dále nepřerůstaly. Bakterie tedy nebyly schopné se adaptovat na vyšší koncentrační hladinu nebo neměli dostatečné množství času.

Koncentrační gradient byl připraven také pro PEG 400 a PEG 600 o koncentraci (1500; 1800; 2000 mg/ml), Zde bylo velmi těžké hodnotit bakteriální přerůstání, protože hned 1. den experimentu došlo ke kontaminaci a bakteriální růst mohl být ovlivněn právě kontaminujícími mikroorganismy. S jistotou můžeme říct, že PEG 400 a PEG 600 při těchto koncentracích nevykazují aktivitu proti kontaminujícím mikroorganismům.

K posouzení antibakteriální aktivity byly použity takové metody, které nám umožnily srovnat jednak antibakteriální aktivitu polymerů ale také vývoj vztahu mezi bakteriemi a antibakteriální látkou v delším časovém období. Z výsledků vyplývá, že poly-L-lysin a PEI mají antibakteriální vlastnosti a stojí za další testování. Naopak antibakteriální vlastnosti PEG 400 a PEG 600 nebyly jednoznačně prokázány.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] KOLTZENBURG, Sebastian, Michael MASKOS a Oskar NUYKEN. *Polymer Chemistry* [online]. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2017 [cit. 2020-04-04]. ISBN 978-3-662-49279-6. Dostupné z: DOI: 10.1007/978-3-662-49279-6
- [2] PROKOPOVÁ, Irena. *MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE* [online]. Verze 1.0. Praha: VŠCHT Praha, 2015 [cit. 2020-05-04]. ISBN ISBN 978-80-7080-662-3. Dostupné z: [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-978-80-7080-662-3/pages-img/obalka-1.html>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-662-3/pages-img/obalka-1.html). I
- [3] DEMIRBAY, Barış. *Film formation, morphological, optical and electrical percolation behaviors of PS/MWCNT and PS/GO nanocomposite films* [online]. Istanbul, 2017 [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/323689828\\_Film\\_formation\\_morphological\\_optical\\_and\\_electrical\\_percolation\\_behaviors\\_of\\_PSMWCNT\\_and\\_PSGO\\_nanocomposite\\_films](https://www.researchgate.net/publication/323689828_Film_formation_morphological_optical_and_electrical_percolation_behaviors_of_PSMWCNT_and_PSGO_nanocomposite_films). Master Thesis. Istanbul Technical University.
- [4] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymer - výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. [online]. 2 vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2006 [cit. 2020-05-04]. ISBN 80-7080-617-6. Dostupné z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_isbn-80-7080-617-6/pages-img/001.html](http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-617-6/pages-img/001.html)
- [5] YOUNG, Robert J a Peter A LOVELL. *INTRODUCTION TO POLYMERS* [online]. 3. Boca Raton: CRC Press, 2011 [cit. 2020-03-04]. ISBN 9781439894156. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=7BbSBQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?id=7BbSBQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- [6] CARRAHER JR, Charles E. *Introduction to Polymer Chemistry* [online]. 6th edition. New York: MARCEL DEKKER, 2003 [cit. 2020-05-04]. ISBN 0-8247-0806-7. Dostupné z: <http://hysz.nju.edu.cn/wangxl/download-polymer/Polymer%20Chemistry%20%28Carragher%29.pdf>
- [7] GOY; Rejane C Odilio B. G. Assis, Douglas DE BRITTO a Odilio B.G. ASSIS. A review of the antimicrobial activity of chitosan. D, Douglas. *Polímeros* [online]. 2009, **19**(3) [cit. 2020-05-05]. ISSN 1678-5169. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>

- [8] CHO, Dong-Woo a . *Organ Printing* [online]. 20151001. Morgan & Claypool, 2015 [cit. 2020-05-04]. ISBN 978-1-6817-4079-9. Dostupné z: DOI: 10.1088/978-1-6817-4079-9
- [9] MAITZ, M. F. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology* [online]. 2015, 1(3), 161-176 [cit. 2020-04-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.002>
- [10] ELSNER, Peter Maibach, Howard a Howard I. MAIBACH. *Cosmeceuticals : Drugs Vs. Cosmetics* [online]. New York: Informa Healthcare, 2000 [cit. 2020-05-10]. ISBN 9780585368214. Dostupné z: databáze eBook Academic Collection
- [11] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. Dostupné také z: <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>
- [12] Zákon č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2000-258>
- [13] LOCHHEAD, Robert Y. The Role of Polymers in Cosmetics: Recent Trends. *Cosmetic Nanotechnology*[online]. Washington, DC: American Chemical Society, 2007, s. 3-56 [cit. 2020-04-17]. ISBN 9780841220799.
- [14] PAPAKONSTANTINOOU, Eleni, Michael ROTH a George KARAKIULAKIS. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato Endocrinology* [online]. 2012, 4(3), 253-258 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.4161/derm.21923. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3583886/>
- [15] Formulation of cosmetic emulsion. TADROS, Tharwat F. *Formulations: In Cosmetic and Personal Care*[online]. De Gruyter, 2016, s. 105-107 [cit. 2020-05-10]. ISBN 978-3-11-045238-9. Dostupné z: databáze ProQuest Ebook Central
- [16] BAKI, Gabriella a Alexander S. KENNETH. *Introduction to Cosmetic Formulation and Technology* [online]. John Wiley, 2015 [cit. 2020-05-04]. ISBN 978-1-118-76378-0. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/techlib-ebooks/reader.action?docID=1895584>



- [17] MÜLLER-WILLE, Steffan. Cell theory, specificity, and reproduction, 1837–1870. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* [online]. 2010, **41**(3), 225-231 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.1016/j.shpsc.2010.07.008. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2010.07.008>.
- [18] *Biology* [online]. OpenStax College, 2013 [cit. 2020-04-09]. Dostupné z: [https://cnx.org/contents/GFy\\_h8cu@11.10:rZudN6XP@2/Introduction](https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@11.10:rZudN6XP@2/Introduction)
- [19] HUNGATE, Robert E. a kol. *Bacteria* [online]. [cit. 2020-04-09]. DOI: <https://doi.org/10.1036/1097-8542.068100>. Dostupné z: <https://www.accessscience.com/content/068100>.
- [20] DÜZGÜNES, Nejat. *Medical Microbiology and Immunology for Dentistry* [online]. Quintessence Publishing Co, 2015 [cit. 2020-04-10]. ISBN 9780867159103. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/techlib-ebooks/detail.action?docID=5985162>
- [21] SILHAVY, Thomas J. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect in Biology* [online]. 2010, **2**(5) [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.1101/cshperspect.a000414. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857177/>
- [22] Composition and structure of prokaryotic cells. KIM, Byung Hong a Geoffrey Michael GADD. *Bacterial Physiology and Metabolism* [online]. Cambridge University Press, 2012, s. 7–34 [cit. 2020-04-09]. ISBN 9780511790461. Dostupné z: <https://www.cambridge.org/core/terms>. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511790461.003>
- [23] VOLLMER, Waldemar a Ute BERTSCHE. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2008, **1778**(9), 1714-1734 [cit. 2020-04-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.007>
- [24] STRUTHERS, J. Keith. *Clinical Microbiology* [online]. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2017 [cit. 2020-04-09]. ISBN 978-1498786898. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/techlib-ebooks/reader.action?docID=5477131&ppg>

- [25] DASCANIO, John a Patrick MCCUE. *Equine Reproductive Procedures* [online]. John Wiley, 2014 [cit. 2020-04-09]. ISBN 9781118904398. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/techlib-ebooks/detail.action?docID=1718757>
- [26] NEMETH, Johannes, Gabriela OESCH a Stephan P. KUSTER. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2015, **70**(2), 382-395 [cit. 2020-04-17]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://doi.org.ezproxy.techlib.cz/10.1093/jac/dku379>
- [27] POLLITT, Eric J. G., Piotr T. SZKUTA, Nicola BURNS a Simon J. FOSTER. Staphylococcus aureus infection dynamics. *PLOS PATHOGENS* [online]. 2018, **14**(6) [cit. 2020-04-17]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007112>
- [28] OPOKU, Solomon a Isaac NYANOR. In Vitro Inhibition of Staphylococcus aureus subsp. aureus(ATCC® 6538TM) by Artemether-Lumefantrine Tablets: A Comparative Study of Three Dosage Strengths. *The Open Microbiology Journal* [online]. **12**, 397-403 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.2174/1874285801812010397.
- [29] DAVID, Michael Z. a Robert S. DAUM. Treatment of Staphylococcus aureus Infections. DAVID, Michael Z. *Staphylococcus aureus. Current Topics in Microbiology and Immunology* [online]. Cham: Springer, 2017, s. 325-383 [cit. 2020-04-17]. ISBN 978-3-319-72063-0. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/82\\_2017\\_42](https://doi.org/10.1007/82_2017_42)
- [30] TEH, Koon Hoong, Steve FLINT, John BROOKS a Geoff KNIGHT. *Biofilms in the Dairy Industry* [online]. John Wiley, 2015 [cit. 2020-04-17]. ISBN 978-1-118-87621-3.
- [31] DONLAN, Rodney M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2002, **8**(9), 881-890 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.3201/eid0809.020063. ISSN 1080-6059.
- [32] SENEVIRATNE, Chaminda Jayampath. *Microbial Biofilms Omics Biology, Antimicrobials and Clinical Implications* [online]. CRC Press, 2017 [cit. 2020-04-17]. ISBN 9781498722193. Dostupné z: databáze ProQuest Ebook Central

- [33] MAUNDERS, Eva a Martin WELCH. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2017, **364**(13) [cit. 2020-04-17]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx120>
- [34] MARSH, Philip D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health* [online]. 2016, **6**(1) [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1186/1472-6831-6-S1-S14.
- [35] JANG, J a kol. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2017, **123**, 570-581 [cit. 2020-04-17]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
- [36] Látky používané k prevenci a terapii léčení infekčních a parazitických chorob. HAMPL, František, Stanislav RADL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 3rd ed. Praha: VŠCHT PRAHA, 2015, s. 486-490. ISBN 978-80-7080-857-7.
- [37] SKÖLD, Ola. *Antibiotics and Antibiotic Resistance* [online]. John Wiley, 2011 [cit. 2020-03-14]. ISBN 9781118075609. Dostupné z: DOI: 10.1002/9781118075609
- [38] FRIERI, Marianne, Krischan KUMARB a Anthony BOUTINC. Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health* [online]. 2017, **10**(4), 369-378 [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: databáze ScienceDirect
- [39] ANIL, Kumar a Nikita CHORDIA. Bacterial Resistance Against Antibiotics. *Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer* [online]. Springer International Publishing, 2017, s. 171-191 [cit. 2020-05-10]. ISBN 978-3-319-48683-3. Dostupné z: databáze SpringerLink
- [40] KON, Kataryna. *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches* [online]. Academic Press, 2016 [cit. 2020-05-04]. ISBN 9780128036686. Dostupné z: databáze ProQuest Ebook Centra
- [41] MICHALEK, I. M., S. M. JOHN a F. L. CAETANO DOS SANTOS. Microbiological contamination of cosmetic products – observations from Europe, 2005–2018. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. 2019, **33**(11) [cit. 2020-04-17]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jdv.15728>

- [42] CAMPANA, R a kol. Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems. *Society for Applied Microbiology* [online]. 2006, **43**(3), 301-306 [cit. 2020-02-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01952.x>
- [43] LENICK, Anthony. *Microorganisms and Cosmetics*. Allured Business Media, 2009. ISBN 978-1-932633-56-6.
- [44] Primary and secondary contamination. MITSIU, T. *New Cosmetic science* [online]. Elsevier Science, 1997, s. 200-201 [cit. 2020-05-10]. ISBN 9780080537498. Dostupné z: Katalog NTK
- [45] ČSN EN ISO 17516. *Kosmetika-Mikrobiologie-Mikrobiologické limity*. Obor: Výrobky chemického průmyslu. Trídící znak 68 1562. Katalogové číslo 96803.
- [46] Polymers Against Microorganisms. RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, Juan. *Polymers against Microorganisms: On the Race to Efficient Antimicrobial Materials* [online]. Springer International Publishing, 2017, s. 1-2 [cit. 2020-05-10]. ISBN 978-3-319-47961-3. Dostupné z: DOI: 10.1007/978-3-319-47961-3
- [47] SIEDENBIEDEL, Felix a Joerg TILLER. Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers*. 2012, **4**(1), 46 – 71. DOI: 10.3390/polym4010046.
- [48] SINGHAA, PriyadarshinishHandaa, Jason LOCKLINAB a Hitesh HANDAA. A review of the recent advances in antimicrobial coatings for urinary catheters. *Acta Biomaterialia* [online]. 2017, **50**(1), 20-40 [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.070>
- [49] JAIN, Anjali a kol. Antimicrobial polymers. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2014, **3**, 1969-1985 [cit. 2020-01-05]. Dostupné z: <https://onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.techlib.cz/doi/epdf/10.1002/adhm.201400418>
- [50] ÁLVAREZ, Paino M, Bonilla A MUÑOZ a Marta M GARCÍA. Antimicrobial Polymers in the Nano-World. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* [online]. [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.3390/nano7020048. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano7020048>

- [51] CHEN, Ao, Hui PEG, Indriss BLAKEY a Andrew K WHITTAKER. Biocidal Polymers: A Mechanistic Overview. *Polymer Reviews* [online]. 2016, **74**(2), 276-310 [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: <https://www-tandfonline-com.ezproxy.techlib.cz/doi/full/10.1080/15583724.2016.1223131>
- [52] GOY, Rejane C. Goy; Douglas de Britto; Odilio B. G. Assi a . *A review of the antimicrobial activity of chitosan* [online]. 2009 [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-1428200900030001>
- [53] ARANAZ, Inmaculada a kol. Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives. *Polymers* [online]. 2018, **10**(213) [cit. 2019-12-04]. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4360/10/2/213/htm>
- [54] HOSSEINNEJADA, Mahmoud a Seid MAHDI-SAFARI. *Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan* [online]. 2016, **85**, 467-475 [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>
- [55] TANKESHWAR, Zhilei, Yifei SHI, Ber XING, Ying HOU, Jiandong CUI a Shiru Jia JIA. The antimicrobial effects and mechanism of  $\epsilon$ -poly-lysine against *Staphylococcus aureus*: Zhilei Tan, Yifei Shi, Shi,, Ying Hou, Jiandong Cui\* and Shiru Jia\*. *Bioresources and Bioprocessing* [online]. 2019, **6**(11), 1-10 [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0246-8>
- [56] NAJJAR, Mohamed Badaoui, Dimitri KASHTANOV a Michael L. CHIKINDAS. Natural Antimicrobials  $\epsilon$ -Poly-L-lysine and Nisin A for Control of Oral Microflora. *Probiotics Antimicrob Proteins* [online]. 2009, **1**(2) [cit. 2020-04-17]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12602-009-9020-0>
- [57] LOH, X. J. *Polymers for personal care products and cosmetics*. The Royal Society of Chemistry, 2016, ISBN 978-1-78262-295-6
- [58] ABD EL-SHAFFEY, Ahmed I. a a kol. *Biocidal polymers (II): Determination of biological activity of novel N-halamine biocidal polymers and evaluation for use in water filters* [online]. 2008, **68**(10), 1448-1458 [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2008.06.021>
- [59] DEMIR, Buket a A kol. N-Halamine Biocidal Materials with Superior Antimicrobial Efficacies for Wound Dressings. *Molekules* [online]. 2017, **22**(10) [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules2210158>

- [60] CHAUHAN, Narendra Pai Singh. Polymer–metal Nanocomposites with Antimicrobial Activity. *Biocidal polymers* [online]. Smithers Rapra Publishing, 2016, s. 80-97 [cit. 2020-05-14]. ISBN 9781910242261. Dostupné z: databáze Ebsco.
- [61] GAJBHIYE, Swati a Satish SAKHARWADE. *Silver Nanoparticles in Cosmetics* [online]. [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/jcdsa> <http://dx.doi.org/10.4236/jcdsa.2016.61007>
- [62] MARÁKOVÁ, Nela, Petr HUMPOLÍČEK, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Zdenka CAPÁKOVÁ, Lenka MARTINKOVÁ, Patrycja BOBER, Miroslava TRCHOVÁ a Jaroslav STEJSKAL. Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Cotton Fabric Coated With Conducting Polymers, Polyaniline or Polypyrrole, and with Deposited Silver Nanoparticles. *Applied Surface Science*. 2017, **396**, 169 – 176. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.11.024.
- [63] RELER, L. Barth. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2009, **49**(11), 1749-1755 [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1086/647952>
- [64] WIEGAND, Irith a kol. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* [online]. 2008, **3**(2), 163-175 [cit. 2020-02-24]. Dostupné z: <https://search-proquest-com.ezproxy.techlib.cz/docview/1041221991?pq-origsite=summon>
- [65] TANKESHWAR, Acharya. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). *Microbe Online* [online]. 2020 [cit. 2020-05-14]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/minimum-inhibitory-concentration-and-minimum-bactericidal-concentration-mbc/>
- [66] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SAIDIKY a Saad Kouraichi IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, **6**(2), 71-79 [cit. 2020-05-14]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

- [67] GIBNEY, Katherine. Poly(ethylene imine)s as antimicrobial agents with selective activity. *Macromo Biosci*[online]. 2012, **12**(9), 1279-1289 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1002/mabi.201200052.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3970578>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

CCM	Česká sbírka mikroorganismů
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PEI	polyethylenimin
PEG	polyethylenglykol
PEG 400	polyethylenglykol s průměrnou molekulovou hmotností 400
PEG 600	polyethylenglykol s průměrnou molekulovou hmotností 600
TSA	tryptofa-sojový agar
MH	Mueller HInton agar
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 – Konstituce makromolekul, upraveno dle [3].	13
Obrázek 2 – Klasifikace polymerů na základě působení teploty [4].	14
Obrázek 3 – Strukturní vzorce vybraných přírodních polymerů	15
Obrázek 4 – Strukturní vzorce vybraných semi-syntetických polymerů.	16
Obrázek 5 – Strukturní vzorce vybraných syntetických polymerů.	16
Obrázek 6 – Strukturní vzorec kyseliny hyaluronové [ChemSketch]	18
Obrázek 7 – Strukturní vzorec Polyquartermium 10.	19
Obrázek 8 – Karbomery – monomerní jednotka kyselina akrylová	20
Obrázek 9 – Strukturní vzorec polyvinylpyrrolidon (PVP).	21
Obrázek 10 – Monomerní jednotka polydimethylsiloxanů (silikonů).	21
Obrázek 11 – Struktura prokaryotické buňky, upraveno dle [18].	23
Obrázek 12 Postup Gramova barvení (1. barvení bakteriální kultury krystalovou violetí a Lugolových roztokem, 2. odbarvení alkoholem, 3. dobarvení safraninem), upraveno dle [20].	24
Obrázek 13 – Struktura buněčné stěny gramnegativní bakterie, upraveno dle [19].	25
Obrázek 14 – Struktura buněčné stěny grampozitivní bakterie, upraveno dle [19].	27
Obrázek 15 – Proces tvorby biofilmu, (EPS–extracelulární polymerní látka), upraveno dle [33].	29
Obrázek 16 – Základní struktura $\beta$ -laktamových antibiotik.	31
Obrázek 17 – Antimikrobiální mechanismy polymerů (pasivní mechanismus (A) stérická zábrana, (B) elektrostatický odpuzování, (C) nízká povrchová energie; aktivní mechanismu (D) uvolňování biocidů z polymerního povlaku, (E) kontaktní biocidní látka), upraveno dle [48].	34
Obrázek 19 – Klasifikace antimikrobiálních polymerů, upraveno dle [51].	36
Obrázek 20 – Mechanismus antibakteriálního působení chitosanu, upraveno dle [55].	38
Obrázek 21 Mechanismus antibakteriálního působení poly-L-lysinu, upraveno dle [56].	39
Obrázek 22 – Strukturní vzorek poly(2-dimethylaminoethyl)metakrylátu.	40

Obrázek 23 – Polymery s pyridinovou skupinou.....	41
Obrázek 24 – Kirby-Bauer test [Centrum polymerních systémů ve Zlíně].....	44
Obrázek 25 – Diluční metoda v agar, upraveno dle [66].....	45
Obrázek 26 – Příprava bakteriální suspenze o hodnotě zákalu 0,5 stupnice McFarlanda [67]. .....	46
Obrázek 27 – E-test, upraveno, dle [64]. .....	47
Obrázek 28 – Strukturní vzorec poly-L-lysinu . .....	51
Obrázek 29 – Strukturní vzorec větveného polyethyleniminu (PEI).....	52
Obrázek 30 – Strukturní vzorec polyethylenglykolu (PEG).....	53
Obrázek 31 – Postup křížové roztěru [vlastní zdroj]. .....	53
Obrázek 32 – Inhibiční zóny poly-L-lysinu vůči <i>Escherichia coli</i> CCM 4517, koncentrace (100; 150 µg /ml). .....	55
Obrázek 33 – Experimentální zařízení pro přípravu koncentračního gradientu. ....	56
Obrázek 34 – Koncentrační gradient vytvořený experimentálním zařízením. ....	57
Obrázek 35 – Velikost inhibičních zón testovaného poly-L-lysinu proti <i>Escherichia coli</i> CCM 4517.....	58
Obrázek 36 – Velikost inhibičních zón testovaného poly-L-lysinu proti <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> CCM 4516.....	59
Obrázek 37 – Velikost inhibičních zón testovaného poly-L-lysinu proti <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> CCM 2022.....	60
Obrázek 38 – Velikost inhibičních zón testovaného poly-L-lysinu proti <i>Escherichia coli</i> CCM 3954.....	60
Obrázek 39 – Velikost inhibičních zón testovaného PEI proti <i>E.coli</i> CCM 4517.....	61
Obrázek 40 – Velikost inhibičních zón testovaného PEI proti <i>S. aureus</i> CCM 4516. ....	61
Obrázek 41 – Velikost inhibičních zón testovaného PEI proti <i>E. coli</i> CCM 3954.....	61
Obrázek 42 – Velikost inhibičních zón testovaného PEI proti <i>S. aureus</i> CCM 2022. ....	62
Obrázek 43 – Velikost inhibičních zón testovaného PEG 400 vůči <i>S. aureus</i> CCM 4516. 62	
Obrázek 44 – Velikost inhibičních zón testovaného PEG 400 vůči <i>E.coli</i> CCM 4517.....	63

Obrázek 45 – Velikost inhibičních zón testovaného PEG 600 vůči <i>E.coli</i> CCM 4516.....	63
Obrázek 46 – Velikost inhibičních zón testovaného PEG 600 vůči <i>E.coli</i> CCM 4517.....	64
Obrázek 47 – Petriho miska s bloky představující koncentrační gradient.....	65
Obrázek 48 – Koncentrační gradientem poly-L-lysin působící proti růstu <i>E. coli</i> CCM 4517 a <i>S. aureus</i> CCM 4516 (koncentrace $\mu\text{g/ml}$ ).....	68
Obrázek 49 – Koncentrační gradientem poly-L-lysin působící proti růstu <i>E. coli</i> CCM 4517 a <i>S. aureus</i> CCM 4516 (koncentrace $\mu\text{g/ml}$ ).....	70
Obrázek 50 – Koncentrační gradientem PEG 400 působící proti růstu <i>E. coli</i> CCM 4517 a <i>S. aureus</i> CCM 4516 (koncentrace $\text{mg/ml}$ ).....	71
Obrázek 51 – Koncentrační gradientem PEG 600 působící proti růstu <i>E. coli</i> CCM 4517 a <i>S. aureus</i> CCM 4516 (koncentrace $\text{mg/ml}$ ).....	72
Obrázek 52 – Koncentrační gradientem PEI působící proti růstu <i>E. coli</i> CCM 4517 a <i>S. aureus</i> CCM 4516 (koncentrace $\text{mg/ml}$ ).....	74

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – Složení Tryptofan sojový agar (HiMedia, M2930–500 g). .....	49
Tabulka 2 – Složení Mueller Hinton agar (HiMedia, M173–500G). .....	50
Tabulka 3 – Testovaný poly-L-lysin.....	51
Tabulka 4 – Testovaný polymer PEI .....	51
Tabulka 5 – Testovaný polymer PEG 400.....	52
Tabulka 6 – Testovaný polymer PEG 600.....	52
Tabulka 7- Koncentrace testovaných polymerů. ....	54
Tabulka 8 – Popis bakteriální růst skrz koncentrační gradient. ....	66