



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Vliv vybraných emulgátorů a různých způsobů emulzifikace na  
růst bakterií *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus***

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program: **LABORATORNÍ DIGNOSTIKA**

**Autor:** Kamila Koldová

**Vedoucí práce:** Ing. Marian Hýbl

České Budějovice 2023

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Vliv vybraných emulgátorů a různých způsobů emulzifikace na růst bakterií *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2.5. 2023

Podpis

### **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Ing. Marianu Hýblovi, za odbornou pomoc, cenné rady a za čas, který věnoval tomu, aby tato práce mohla vzniknout. Dále děkuji Zemědělské a Zdravotně sociální fakultě za poskytnutí laboratoří. V poslední řadě mnohokrát děkuji své rodině a příteli za podporu po celou dobu mého studia.

# Vliv vybraných emulgátorů a různých způsobů emulzifikace na růst bakterií *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*

## Abstrakt

Hlavním tématem této bakalářské práce je stanovení minimální inhibiční a baktericidní koncentrace vybraných druhů emulgátorů a rostlinných silic na růst bakterií *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Bakalářská práce se dále zabývá vlivem vybraných emulgátorů a jejich způsobu emulzifikace na stabilitu emulze.

Teoretická část se věnuje základním informacím o použitých bakteriích, jejich morfologickým vlastnostem, patogenезi a onemocněním, které způsobují. Dále jsou popsány emulgátory, jejich obecná charakteristika včetně stability emulze. V poslední teoretické části se bakalářská práce věnuje rostlinným silicím a jejich vlastnostem a možnostem využití.

V metodické části této práce jsou znázorněny postupy přípravy emulgátorů a rostlinných silic a stanovení jejich minimální inhibiční a baktericidní koncentrace. Tato stanovení byla prováděna v mikrotitrační 96-ti jamkových destičkách, měřených spektrofotometricky. Stabilita emulzí byla testována ve skleněných zkumavkách, zkumavkách Eppendorf a centrifugačních zkumavkách. Při těchto metodách byla stanovována stabilita emulze na bázi Mueller – Hinton broth a cukerného roztoku.

Výsledky minimální inhibiční a baktericidní koncentrace byly zpracovány do tabulek a vyhodnoceny. Stabilita emulze byla zpracována a zároveň vyhodnocena za pomoci získaných fotografií.

## Klíčová slova

Bakterie, MIC, MBC, antimikrobiální aktivita, Mueller – Hinton agar, inhibice

# **Impact of selected emulsifiers and different emulsification methods on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli***

## **Abstract**

The main topic of this bachelor's thesis is to determine the minimum inhibitory and bactericidal concentration of selected types of emulsifiers and plant extracts on the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. The thesis also examines the effect of selected emulsifiers and their methods of emulsification on emulsion stability.

The theoretical part provides basic information about the bacteria used, their morphological characteristics, pathogenesis, and the diseases they cause. It also describes emulsifiers and their general characteristics, including emulsion stability. The final theoretical part of the thesis focuses on plant extracts, their properties, and their applications.

The methodology section of this thesis illustrates the procedures for preparing emulsifiers and plant extracts, as well as determining the minimum inhibitory and bactericidal concentrations. These determinations were performed in a 96-well microtiter plate and measured spectrophotometrically. The method for preparing emulsion stability was conducted in glass test tubes, Eppendorf tubes, and centrifuge tubes. Based on these methods, the stability of emulsion of Mueller-Hinton broth and sugar solution was determined.

The results of minimum inhibitory and bactericidal concentration were processed into tables and evaluated. Emulsion stability was processed and evaluated using obtained photographs.

## **Key words**

Bacteria, MIC, MBC, antimicrobial activity, Mueller-Hinton agar, inhibition

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Escherichia Coli</b> .....	<b>10</b>
2.1	Morfologické vlastnosti .....	10
2.2	Fyziologie .....	10
2.3	Antigenní charakter .....	11
2.4	Patogeneze.....	11
2.4.1	Extraintestinální formy.....	11
2.5	Enteropatogenní kmeny rozdělení .....	12
2.5.1	Enteropatogenní (EPEC) .....	12
2.5.2	Enterotoxigenní (ETEC).....	12
2.5.3	Enteroinvazivní (EIEC) .....	13
2.5.4	Enterohemoragické (EHEC) .....	13
2.6	Onemocnění .....	13
2.6.1	Močové infekce.....	13
2.6.2	Pyelonefritida .....	14
2.6.3	Prostatitida .....	14
2.6.4	Cystitida.....	14
<b>3</b>	<b>Staphylococcus aureus</b> .....	<b>15</b>
3.1	Morfologické vlastnosti .....	15
3.2	Fyziologie .....	16
3.3	Antigenní Charakter.....	16
3.4	Patogeneze.....	17
3.5	Onemocnění .....	17
3.5.1	Syndrom toxického šoku .....	17
3.5.2	Stafylokokový syndrom opařené kůže .....	18
3.5.3	Stafylokoková otrava jídlem .....	18
<b>4</b>	<b>Emulgátory</b> .....	<b>19</b>
4.1	Dimethylsulfoxid (DMSO).....	19
4.2	Lecitin.....	20

4.3	Tween .....	20
4.3.1	Tween 20 .....	21
4.3.2	Tween 80 .....	21
4.4	Ethanol .....	21
4.5	Stabilita emulze .....	22
<b>5</b>	<b>Rostlinné silice .....</b>	<b>23</b>
5.1	Máta peprná .....	23
5.2	Skořice .....	23
5.3	Tymián .....	24
5.4	Hřebíček .....	24
<b>6</b>	<b>Materiál a metodika .....</b>	<b>26</b>
6.1	Mueller – Hinton agar (MHA) .....	27
6.2	Příprava kultivačních misek .....	28
6.3	Příprava kultur Staphylococcus aureus a Escherichia coli .....	28
6.4	Stanovení antimikrobiální aktivity .....	29
6.4.1	Příprava inokula .....	29
6.4.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace 10, 5, 2,5 a 1,25 % roztoků emulgátorů .....	29
6.4.3	Stanovení minimální inhibiční koncentrace 5 % roztoků emulgátorů s přidavkem rostlinných silic a rostlinných silic samotných .....	30
6.5	Stanovení MBC .....	31
6.6	Stabilita emulze v kultivačním médiu .....	32
6.6.1	Stabilita emulze ve skleněných zkumavkách .....	32
6.6.2	Stabilita emulze ve zkumavkách Eppendorf .....	32
6.6.3	Stabilita emulze v cukerném roztoku .....	33
<b>7</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>35</b>
7.1	Stanovení minimální inhibiční koncentrace 10, 5, 2,5 a 1,25 % roztoků emulgátorů .....	35
7.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace samostatných rostlinných silic .....	36
7.3	Stanovení minimální inhibiční koncentrace 5 % emulgátorů s přidavkem rostlinných silic .....	38
7.4	Stabilita emulze v kultivačním médiu .....	43

7.4.1	Stabilita emulze ve skleněných zkumavkách.....	43
7.4.1.1	Tween 20 .....	43
7.4.1.2	Tween 80 .....	45
7.4.1.3	Lecitin .....	46
7.4.1.4	DMSO .....	47
7.4.1.5	Ethanol .....	48
7.4.2	Stabilita emulze ve zkumavkách Eppendorf.....	50
7.4.3	Stabilita emulze v cukerném roztoku.....	51
<b>8</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>58</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitelných zdrojů .....</b>	<b>59</b>
<b>11</b>	<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>65</b>
<b>12</b>	<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>66</b>
<b>13</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>68</b>



# 1 Úvod

Rostlinné silice byly používány již od středověku pro své baktericidní, virucidní, antiparazitární, léčebné a kosmetické účinky. Silice jsou těkavé, přírodní a vyznačují se silným zápachem (Bakkali et al., 2008). Jsou také vonné a vysoce koncentrované sloučeniny, s komplexní směsí sekundárních metabolitů sestávajících z fenypropenů a terpenů. V závislosti na typu a koncentraci vykazují rostlinné silice cytotoxické účinky na živé buňky. Jejich cytotoxická aktivita se využívá proti lidským nebo zvířecím patogenům a parazitům (Christaki et al., 2012).

Emulze typu olej ve vodě jsou důležitou složkou mnoha potravin, doplňků stravy, léčiv, kosmetiky a dalších produktů. Emulze jsou termodynamicky nestabilní a mají tendenci se rozpadat. Z tohoto důvodu se do emulzí přidávají stabilizátory, jako jsou emulgátory. Emulgátory patří mezi nejdůležitější stabilizátory používané v jakékoliv formě emulze (McClements a Jafari, 2018). Jsou to látky, které mají povrchovou aktivitu a hrají při tvorbě emulzí dvě klíčové role: usnadňují samotnou tvorbu emulze a pomáhají udržet její stabilitu (Ozturk a McClements, 2016).

Cílem bakalářské práce je stanovení antimikrobiální aktivity vybraných druhů emulgátoru, ať už samotných, nebo v kombinaci s vybranými silicemi nebo rostlinných silic samotných, na růst vybraných bakterií. Tímto stanovením se zjišťovalo, jaká minimální koncentrace inhibuje růst bakterií. Pro doplnění byla provedena minimální baktericidní koncentrace, která bakterie usmrtí. Vybranými bakteriemi jsou *S. aureus* a *E. coli*. Dalším cílem práce je ověření vlivu vybraných emulgátorů a způsobů emulzifikace na stabilitu emulze.

Výzkumné otázky:

1. Jaký je vliv jednotlivých vybraných emulgátorů na růst testovaných bakterií?
2. Má směs emulgátorů lepší emulgační účinky než jednotlivé emulgátory?
3. Jaký mají jednotlivé emulgátory vliv na stabilitu emulze?

## 2 Escherichia Coli

*Escherichia coli* E., patří do čeledi Enterobacteriaceae. Je zařazena do řádu Enterobacteriales, třídy Gammaproteobacteria, kmene Proteobacteria a domény Bacteria (Sedláček, 2007).

*E. coli* je u člověka i dalších teplokrevných živočichů běžnou součástí střevní mikrobioty. Její přítomnost v pitné vodě je indikátorem fekálního znečištění. *E. coli* je klinicky významná a schopná způsobovat různé infekce člověka a zvířat, a je významným organismem pro genové a klinické studie. Do rodu *Escherichia* náleží vedle *E. coli* dalších pět druhů, které vyvolávají infekce pouze výjimečně: *Escherichia albertii*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris* a nedávno popsany druh *Escherichia mormotae* (Kolářová, 2020).

### 2.1 Morfologické vlastnosti

Dlouhá je 2-3  $\mu\text{m}$  a široká 0,6  $\mu\text{m}$  (Krmečik a Honej, 2007). Je to gramnegativní tyčinka, která se běžně vyskytuje jednotlivě nebo ve dvojicích. Některé kmeny jsou schopné tvořit svá pouzdra z biologického materiálu. Pohybuje se pomocí peritrichálních bičků (Sedláček, 2007).

Na svém povrchu nese různé typy fimbrií. Většina z nich je zastoupena ve velkém počtu a umožňují adhezi na hostitelskou buňku. Dalším typem jsou sex pili, které se vyskytují v menším počtu a jsou schopné vytvořit vazbu mezi donorem a akceptorem při konjugaci (Krmečik a Honej, 2007). Buněčná stěna těchto bakterií se skládá ze tří morfologicky definovaných vrstev. Nejvnitřnější vrstva je cytoplazmatická membrána, která reguluje průchod metabolitů do cytoplazmy i zpět. Vně této membrány obaluje cytoplazmatickou membránu tenká peptidoglykanová vrstva, která zajišťuje mechanickou tuhost. Nejvnější vrstva je tvořena vnější membránou, která je další bariérou složenou z lipidů, polysacharidů a proteinů, podle kterých se snadno odliší gramnegativní od grampozitivních bakterií, které tuto další membránu postrádají (Molly et al.).

### 2.2 Fyziologie

*E. coli* je fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní bakterie, která má respirační, ale i fermentační metabolismus. Optimální růstová teplota je 37 °C (Sedláček, 2007) a může růst na běžných mikrobiologických půdách. Vytváří laktózu – pozitivní kolonie na

Endově nebo MacConkeyho půdě, které mohou být podobné jiným enterobakteriím. (Kolářová, 2020). Na krevním agaru může způsobovat hemolýzu. Její růstová teplota je v rozmezí 15-45 °C (Greenwood et al., 1999).

*E. coli* je oxidáza negativní, kataláza pozitivní, methylčerveň pozitivní a většinou negativní pro citráty (Sedláček, 2007). Fermentuje cukry (např. glukózu, některé pentózy a alkoholické cukry) za intenzivní tvorby kyselin a plynů. Během fermentace *E. coli* tvoří z těchto cukrů hlavně kyselinu mléčnou, pyrohroznovou, octovou a mravenčí, kterou z části rozkládá na oxid uhličitý a vodík (Šilhánková, 2002).

### 2.3 Antigenní charakter

*E. coli* se dělí podle antigenní struktury na sérotypy. Jedná se o Somatické (O) antigeny, kterých je 167, k nimž se váží K a H antigen, kdy díky je jejich kombinací vzniká 240 sérotypů. Kapsulární antigeny, které se dělí podle chemického složení. Buď jsou tvořeny kyselými nebo neutrálními polysacharidy, nebo mohou být složeny z bílkovin a tvořit struktury podobné fimbriím (BEDNÁŘ et al., 1996).

### 2.4 Patogeneze

*E. coli* je významným a často se vyskytujícím střevním patogenem u savců a ptáků. Existují i kmeny které jsou patogenní pro člověka a zvířata a způsobují septické infekce a průjemová onemocnění. (Greenwood et al., 1999).

Dle Bednář et al., (1996) *E. Coli* může vyvolat 2 typy onemocnění:

- Extraintestinální (především močových cest, septická onemocnění, infekce ran, hnisavé procesy)
- V intestinálním traktu infekce provázené průjmy

#### 2.4.1 Extraintestinální formy

*E. coli* může způsobovat různé typy extraintestinálních infekcí. Je nejčastějším původcem infekcí močových cest, komunitní bakteriémie a sepse. Také je jedním z hlavních původců novorozenecké meningitidy a novorozenecké sepse. *E. coli* má významnou roli při vzniku nozokomiálních infekcí a dalších infekcí mimo střeva, jako je osteomyelitida, celulitida a infekce ran (Johnson, 2002).

## 2.5 *Enteropatogenní kmeny rozdělení*

### 2.5.1 *Enteropatogenní (EPEC)*

EPEC využívají adhezivní faktory, jako jsou pili, intimin a translokated intimin receptor (Tir), aby se přichytily ke střevnímu epitelu a způsobily poškození mikrokloků, což vede k průjmu mechanismem označovaným jako přilnutí – zničení. (Georing et al., Julák, 2016).

Vzácně se vyskytuje ve vyspělých zemích. V rozvojových státech je hlavním původcem novorozeneckých průjmů. Onemocnění se projevuje vodnatým průjmem, případně také horečkou a zvracením (Kolářová, 2020).

### 2.5.2 *Enterotoxigenní (ETEC)*

ETEC se váže pomocí svých fimbrií na specifické receptory membrán buněk tenkého střeva (Georing et al., Julák, 2016). Produkují 2 typy enterotoxinů, termolabilní enterotoxin (TL) a termostabilní enterotoxin (TS) (BENDÁŘ et al., 1996).

Strukturou i způsobem účinku je TL podobný cholerovému toxinu produkovanému *Vibrio cholera* (Georing et al., Julák, 2016). Existují dvě skupiny termolabilních enterotoxinů, TL-I a TL-II. Toxin TL-II nepůsobí patogenně na člověka, zatímco TL-I se uplatňuje při rozvoji onemocnění díky své podobné struktuře cholerovému toxinu. Toxin TL-1 se skládá z podjednotky A a z pentamerní podjednotky B. Podjednotka B se váže na receptor cholerového toxinu spolu s jinými povrchovými glykoproteiny epiteliálních buněk tenkého střeva. Po navázání dochází k endocytóze toxinu, následně dochází k produkci cyklického adenosinmonofosfátu, díky přestupu podjednotky A přes cytoplasmatickou membránu a interakci s ADP-rybosylačním faktorem. Tím dochází ke zvýšené sekreci vody a elektrolytu do střeva, což vede k vodnatým průjmům (Kolářová, 2020).

TS produkuje většina kmenů ETEC, a to buď místo nebo současně s TL (Georing et al., Julák, 2016). Termostabilní toxin je neantigenní peptid složený z 18 až 19 aminokyselin. Uvolňuje se v tenkém střevě a váže se na guanylátcyklázu, což zvyšuje hladinu cyklického gangliosidu (GMP). TS se podílí na kontrole buněčné proliferace prostřednictvím zvýšené hladiny intracelulárního vápníku. Podobně jako TL, se TS podílí na vzniku průjmů (Qadri et al., 2005).

### **2.5.3 Enteroinvazivní (EIEC)**

EIEC za použití genů, které jsou kódovány na plazmidech, vstupují do buněk endocytózou. Po vstupu do buňky lyzuje nitrobuněčnou vakuolu, množí se a šíří se do sousedních buněk, což vede k tvorbě vředů, zánětu a nekróze tkáně (Georing et al., Julák, 2016).

U menší části pacientů se může onemocnění projevit horečkou, bolestí břicha a přítomností krve a leukocytů ve stolici, zatímco obvykle se projevuje jako vodnatý průjem (Kolářová, 2020).

### **2.5.4 Enterohemoragické (EHEC)**

Kmeny EHEC adherují mechanismem přilnutí – zničení ke sliznici tlustého střeva a produkují toxin, který přímo působí na střevní epitel (Georing et al., Julák, 2016). Tento patotyp je nejčastější příčinou onemocnění u pacientů vyspělých zemích. Infekce se nejčastěji šíří nedostatečně tepelně upraveným masem, vodou, nepasterizovaným mlékem a kontaminovanou tepelně neupravenou zeleninou (Kolářová, 2020).

Vyvolává hemoragickou kolitidu, z níž se může vyvinout smrtelný hemoragicko-uremický syndrom (HUS). Charakterizuje ho hemolytická anémie, trombocytopenie a akutní selhání ledvin (Schindler, 2014).

## **2.6 Onemocnění**

### **2.6.1 Močové infekce**

*E. coli* je nejčastějším původcem močové infekce v komunitě i v nemocnici. Močové infekce vznikají endogenně, bakterie se z konečníku dostávají po hrázi do uretry, do močového měchýře a výše, případně do pánviček ledvin.

Hlavní forma močových infekcí jsou uretritida, cystitida, pyelonefritida a prostatitida (Schindler, 2014).

Častěji bývají postižené ženy, a to kvůli jejich kratší močové trubici. Původcem bývají nejčastěji bakterie, které osidlují oblasti konečníku a genitálií. Tyto bakterie mohou využívat kratší močovou trubici a snadněji přejít do močového měchýře, nebo i výše. Další ohroženou skupinou jsou neléčení nebo špatně kompenzovaní diabetici, u kterých se v moči nachází cukr, který je využíván bakteriemi jako zdroj potravy (Štefánek, 2010).

### **2.6.2 Pyelonefrida**

Pyelonefritida je zánět ledvin včetně ledvinné pánvičky. Jedná se o nepříjemný a nebezpečný stav, kdy je tkáň ledvin napadena bakteriální infekcí. Zánět může poškodit ledviny a bakterie se mohou dostat do krevního řečiště, kde se můžou snadno rozšířit a způsobit otravu krve.

Klasickými projevy jsou horečka, únava, někdy nevolnost a zvracení. Může se objevit časté močení provázené i bolestmi a pálením. Horečku může doprovázet zimnice s třesavkou a nepříjemné bolesti hlavy (Štefánek, 2010).

### **2.6.3 Prostatitida**

Prostatitida je jedním z nejčastějších zánětlivých onemocnění. Ročně trpí prostatitidou okolo 25 % mužů, kteří vyhledají lékařskou pomoc kvůli potížím z oblasti urogenitálního traktu (Poršová et al., 2006).

### **2.6.4 Cystitida**

Cystitida se nejčastěji vyskytuje u žen ve fertilním věku, kdy vzniká po nachlazení nebo bez jakékoliv zjevné příčiny. Dalším faktorem vzniku může být např. vybočení z životosprávy nebo po pohlavním styku (Schindler, 2014). Onemocnění je ve většině případech doprovázeno bolestmi podbříšku, bolestmi při močení a febriliemi (Štefánek, 2010).

### 3 Staphylococcus aureus

*Staphylococcus aureus* R., neboli zlatý stafylokok (Votava, 2010) patří do čeledi Staphylococcaceae. Je zařazen do řádu Bacillales, třídy Bacilli, kmene Firmicutes a domény Bacteria (Sedláček, 2007).

*S. aureus* je oportunní patogen, vyskytující se běžně v prostředí a je významnou součástí fyziologické mikrobioty na kůži a sliznici (Hurych a Štícha, 2020).

Rod *Staphylococcus* se původně rozděloval jen na dva druhy, *S. aureus* a *Staphylococcus epidermis*. V roce 1974 byl přidán třetí druh *Staphylococcus saprophyticus* a v současnosti (k červnu 2003) existuje 47 různých druhů stafylokoků (Votava, 2003).

*S. aureus* se vyskytuje v okolí člověka a zvířat v zevním prostředí a kolonizuje člověka již od prvních dnů života. Nejčastěji se vyskytuje na kůži rukou, perinea, kštic a na sliznici dýchacích cest a zažívacího traktu. Bakterie lze prokázat běžným vyšetřením v dýchacích cestách u 20 až 50 % osob. Asi třetina této pozitivní populace patří k trvalým nosičům a zbývající dvě třetiny k nosičům občasným. *S. aureus* se vyskytuje také u hospodářských zvířat, nejčastěji u domácích prasat a drůbeže (Krmečík a Kysilka, 2007).

#### 3.1 Morfologické vlastnosti

*S. aureus* je grampozitivní kok o průměru asi 1 μm. Koky jsou uspořádané do shluků, někdy se však vyskytují v párech nebo i ojedinele, a to zejména v patologickém materiálu. *S. aureus* je nesporulující, nepohyblivý a obvykle netvoří pouzdra (Greenwood et al., 1999).

**Peptidoglykan** u *S. aureus* je tlustý přibližně 20-30 nm a slouží jako ochranná bariéra. Peptidoglykan je sestaven z opakující se jednotky skládající se z disacharidů (N-acetylglukosamin, N-acetylmuramová kyselina), stonků a můstků (Sharif et al., 2009). Peptidoglykan stimuluje, podobně jako lipopolysacharidy u gramnegativních bakterií, produkci cytokinů aktivací makrofágů a lymfocytů. Tahle funkce výrazně ovlivňuje nespecifickou odolnost organismu. Má schopnost vyvolat v kůži lokální zánětlivou reakci a projevuje cytotoxické účinky (BEDNÁŘ et al., 1996).

**Pouzdro** je tvořeno polysacharidem, který může obklopovat bakterie jako glykokalkix, pseudopouzdro nebo pouzdro (Bednář et al., 1994). Pouzdro chrání bakterii před interakcí s fágy, komplementem, protilátkami a fagocyty (Bednář et al., 1996).

### 3.2 Fyziologie

Na běžně užívaných kultivačních médiích roste *S. aureus* v širokém rozmezí teplot (7-46 °C) a pH (4,2-9,3) (Votava, 2003). Běžně se *S. aureus* kultivuje 24 hodin při teplotě 37 °C na živém, mléčném nebo krevním agaru. Za těchto podmínek se tvoří okrouhlé kolonie o průměru 2-3 mm s hladkým lesklým povrchem. Kolonie jsou neprůhledné, většinou pigmentované (zlatožlutě, béžově nebo smetanově bílé) (Greenwood et al., 1999).

*S. aureus* patří mezi termofilní bakterie, ale je poměrně rezistentní zevnímu prostředí, odolává vysychání a také vyšším teplotám, například kolem 60 °C. Je odolný vůči některým dezinfekčním prostředkům, zejména fenolu a sloučeninám rtuť. Působením alkoholu, zvláště ve vyšších koncentracích, je bakterie spíše konzervována, než hubena. V selektivních médiích se používají lithné, glycinové a telluricitany, kterým *S. aureus* odolává (Votava, 2003). *S. aureus* je kataláza pozitivní mikroorganismus, který patří do skupiny (plazma) koaguláza pozitivní stafylokok. (Hurych a Štícha, 2020).

### 3.3 Antigenní Charakter

**Stafylokokový protein A (SpA)** je zcela typický pro druh *S. aureus*. Je součástí bakteriální stěny a je částečně uvolňován do okolního prostředí. SpA má schopnost se vázat s Fc částí všech molekul IgG kromě podtřídy IgG3 a částečně se váže i s Fc oblastí IgM a IgA. Takto vzniklé komplexy mohou aktivovat komplement a vyvolávat uvolňování histaminu a leukocytů. Po komplementaci Fc oblasti imunoglobulinové molekuly s Fc receptory na povrchu fagocytů, SpA inhibuje opoziční funkci protilátek (Bednář et al., 1994).

**Stafylokokové enterotoxiny (SE)** patří do velké rodiny stafylokokových a streptokokových pyrogenní exotoxinů a jsou dobře rozpustné ve vodě a solných roztocích. Tyto toxiny způsobují toxické šokové syndromy, včetně několika alergických a autoimunitních onemocnění. SE jsou vysoce stabilní a odolné vůči většině proteolytických enzymů. Díky této odolnosti si zachovávají po požití svou aktivitu v zažívacím traktu (Ortega et al., 2010).



### 3.4 Patogeneze

*S. aureus* je patogenní pro člověka a prakticky pro všechny teplokrevné živočichy. Lidský organismus je schopen odolat infekcím, ale může onemocnět v případě oslabení imunitního systému nebo vystavení velké dávce virulentního kmene. Významným faktorem vedoucí ke vzniku infekce může být chirurgický zákrok, úraz, zavedený katetr, diabetes, maligní onemocnění nebo imunologická nedostatečnost. Nejvíce ohroženou skupinou jsou nedonošené novorozenci, kojenci a starší lidé (Krmečík a Kysilka, 2007). Dříve než *S. aureus* vyvolá infekci, musí překonat ochranné bariéry našeho organismu, v době, kdy je lidské tělo oslabené.

Dle Hurycha a Šticha (2020) mohou následující způsoby vzniku onemocnění:

- Infekce s průnikem a pomnožení bakterií v makroorganismu a s jeho následným poškozením.
- Onemocnění v důsledku účinku toxinu bez invazivní infekce bakterií.
- Kombinace pronikání bakterií a působení toxinu

Nejběžnějšími stafylokokovými infekcemi jsou hnisavá (purulentní) onemocnění kůže, nazývaná také pyodermie. Mezi stafylokokové pyodermie nejčastěji impetigo, folikulitida a furunkl. Dále je nejčastějším původcem hnisání ran, kdy ke vzniku infekce obvykle potřebuje, aby v ráně zůstalo cizí těleso například tříska, špína nebo stehy (Votava, 2003).

Ze zánětlivých lézí je bakterie schopna projít do krevního řečiště, kde může buď způsobit dočasnou bakteriemii, nebo se stát původcem masivnějšího a intermitentního průniku s celkovými symptomy sepse (BEDNÁŘ et al., 1996).

### 3.5 Onemocnění

#### 3.5.1 Syndrom toxického šoku

Syndrom toxického šoku je odpověď imunitního systému na pyogenní superantigeny, jejímž výsledkem je závažné hořčnaté onemocnění. Tyto enterotoxiny produkují hlavně *S. aureus*, který navíc produkuje toxin TSST-1, jehož přítomnost se uplatňuje zejména u menstruačních případů.

Syndrom toxického šoku může mít mírný průběh, ale nejzávažnější komplikací je multiorgánové selhání způsobující selhání ledvin, šoková plíce, diseminovanou intravaskulární koagulaci. Toto onemocnění se léčí okamžitým podáním antibiotik a likvidací ložiska, kde se produkují toxiny (například odstranění vaginálních tampónů) (Táborská, 2009).

### **3.5.2 *Stafylokokový syndrom opařené kůže***

SSS syndrom je onemocnění způsobené exotoxiny produkovanými *S. aureus*. Hlavními příznaky jsou podrážděnost, horečka a malátnost. Po 24 až 48 hodinách se na kůži vytvoří velmi citlivá vyrážka, která se nejprve objeví na obličeji a v ohybech (třísla, krk, podpaždí) a postupně se rozšíří. Vyrážka se projevuje ve formě tenkých puchýřků.

Nejvíce ohroženy jsou děti, kteří nemají vyvinutý renální systém a dostatečnou imunitu (Ross a Shoff, 2000).

### **3.5.3 *Stafylokoková otrava jídlem***

Mnoho různých potravin může být dobrým růstovým médiem pro *S. aureus* produkující enterotoxin, který se podílí na otravě člověka jídlem. Mezi nejčastější potraviny patří mléko a smetana, máslo, šunka, sýry, klobásy a další. Nejčastější příznaky stafylokokové otravy jídlem jsou křeče v břiše, nevolnost, zvracení a průjemy. Při akutní intoxikaci způsobí SE gastrointestinální poškození s regionálním edémem a podrážděním svalů (Ortega et al., 2010).

## 4 Emulgátory

Emulgátory jsou látky s povrchovou aktivitou, které hrají při tvorbě emulzí dvě klíčové role. Za prvé, usnadňují samotnou tvorbu emulze a za druhé, pomáhají udržet stabilitu emulze. V potravinářském průmyslu se běžně používají různé druhy syntetických a přírodních emulgátorů, včetně proteinů, polysacharidů, fosfolipidů a povrchově aktivních látek (Ozturk a McClements, 2016). Při tvorbě emulzí v roztocích mají zásadní roli při zajištění emulzifikace a stability. Emulgátor je amfipatická molekula, která obsahuje hydrofilní i lipofilní část.

Mezi hlavní účinky emulgátorů patří snížení napětí mezi dvěma fázemi, například vodou a olejem, a tvorba tenké vrstvy, která chrání kapky v emulzi. Tento efekt vzniká díky interakcím mezi molekulami emulgátoru a kapkami v emulzi. Emulgátory dále snižují množství energie při rozkladu hrubých částic a tím zajišťují vznik menších kapek (Serdaroğlu et al., 2015).

Účinný emulgátor musí mít při tvorbě malých kapiček během homogenizace řadu fyzikálně-chemických vlastností. Musí být schopen adsorbovat se na rozhraní olej-voda, a proto musí mít na svém povrchu vhodný poměr polárních a nepolárních skupin. Během homogenizace musí rychle adsorbovat na povrchu kapiček, aby mohl rychle snížit mezifázové napětí (Ozturk a McClements, 2016).

### 4.1 *Dimethylsulfoxid (DMSO)*

DMSO je bezbarvé organosulfoxidové rozpouštědlo. Je dobře mísitelné s širokou škálou organických rozpouštědel i s vodou. Dobře rozpouští polární i nepolární sloučeniny (Choulis, 2012). Používá se jako rozpouštědlo pro přípravu chemických roztoků. Má protizánětlivé, antioxidační a antimikrobiální vlastnosti (Yolanda et al., 2022). Ve vodě nerozpustné látky jako jsou terapeutické a toxické látky jsou často rozpustné v DMSO. Má velkou afinitu k vodě, a když je vystaven vzduchu, čisté DMSO se rychle zředí. U DMSO nejsou zcela dobře popsány fyziologické a farmakologické vlastnosti a účinky (Brayton, 1986).

V biologických studiích se DMSO používá nejen jako rozpouštědlo, ale i jako nosič pro léčbu. Používá se k léčbě dermatologických, plicních, revmatoidních a renálních projevů amyloidózy. Dále k léčbě onemocnění pohybového aparátu, revmatologických onemocnění a schizofrenie (Ruiz-Delgado et al., 2009).

DMSO je schopné pronikat kůží a jinými membránami, aniž by je poškodil, a do biologického systému přenáší i další sloučeniny. Díky schopnosti pronikat kůží se DMSO využívá jako nosič pro podporu perkutánní absorpce jiných sloučeniny, které za normálních podmínek by neprošly (Hassan, 2014).

## 4.2 *Lecitin*

Lecitin je směs tuků, které se přirozeně vyskytuje v organismech a nacházejí se v několika potravinách. Obsahuje tuky jako jsou kyselina stearová, palmitová a olejová, a jsou vázané na cholinester kyseliny fosforečné. Tato látka se obvykle nazývá fosfatidylcholin. Procesem zvaným hydrogenace se získá hydrogenovaný lecitin. Při tvorbě kosmetických přípravků se používá lecitin i hydrogenovaný lecitin jako činidlo pro úpravu pokožky. Hydrogenovaný lecitin se také používá jako suspenzační činidlo, tedy jako nepovrchově aktivní látka (Fiume, 2001).

V potravinářství má lecitin mnoho funkcí. Využívá se jako emulgátor, smáčedlo, snižuje viskozitu a další (List, 2015). Lecitin se často používá jako přírodní emulgátor ke stabilizaci rostlinných silic v roztocích s vodou, aby se vytvořil stabilní produkt (Zhang et al., 2017). Lecitin se získává technickým zpracováním z vaječných žloutku a různých olejnin jako jsou lněný olej, kukuřičný klíčky, slunečnicová semínka, řepkový olej a sójové boby (Van Nieuwenhuyzen, 1976).

## 4.3 *Tween*

Tweeny neboli polysorbáty jsou třídou emulgátorů používaných v některých léčivech a přípravě potravin. Běžně se používají v perorálních a topických farmaceutických dávkových formách. Často se také používá v kosmetice k solubilizaci rostlinných silic do produktů na vodní bázi. Polysorbáty jsou olejové kapaliny odvozené od ethoxylovaného sorbitanu (derivát sorbitolu) esterifikovaného mastnými kyselinami. Mezi běžné obchodní značky pro polysorbáty patří Kolliphor, Scattics, Alkest, Canarcel a Tween. Číslo následující za částí „polysorbát (tween)“ souvisí s typem hlavní mastné kyseliny spojené s molekulou. Monolaurát je označen 20, monopalmitát je označen 40, monostearát 60 a monooleát 80. Číslo 20 za částí „polyoxyethylen“ označuje celkový počet oxyethylenových (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) skupin nalezených v molekule (Schiweck, 2012).

Tweeny jsou velmi často nepoužívané povrchově aktivní látky. Jsou považovány za netoxické a nedráždivé lýtky. U novorozenců s nízkou porodní hmotností byl Tween, který se podával společně s vitamínem E, spojen s vedlejšími účinky. V potravinářství se

podává jako potravinová přídatná látka ve formě PEGového tenzidu. Mezi nejznámější Tweeny patří Tween 20, 40, 60 a 80 (Kaur a Mehta, 2017).

#### **4.3.1 Tween 20**

Tween 20 je neiontový polyoxyethylenový surfaktant, který se nejčastěji používá jako rozpouštědlo a emulgátor v potravinářství, kosmetice a farmaceutických přípravcích. V radioimunologických testech, jako je například ELISA, se Tween 20 přidává do mycích pufrů, aby zabránil nespecifickému vázání (Eskandani et al., 2013).

#### **4.3.2 Tween 80**

Tween 80 je povrchově aktivní látka, která nevytváří ionty (Nielsen et al., 2016). Skládá se z hydrofobní a hydrofilní části. Rozhraní vzduch-voda nebo pevná látka-voda je řízená hydrofobní částí. Roztoky Tween 80 se s časem oxidují samy od sebe. Tento proces se urychluje vlivem světla, zvýšené teploty a přítomnosti měďnatých sulfátů (Schwartzberg a Navari, 2018).

Široce se používá jako emulgátor v kosmetice, léčivech a potravinářských výrobcích (Nielsen et al., 2016). V mikrobiologii se nejčastěji přidává do kultivačního média, nejčastěji v koncentraci 0,1 %, kde zvyšuje rychlost růstu bakterií a může vykazovat i baktericidní aktivitu, při koncentrací do 0,5 % a snižuje minimální baktericidní koncentraci řady antibiotik (George et al., 2022).

Tween 80 se často přidává do farmaceutických přípravků. Studie naznačují, že se chová jako farmakologická a biologická sloučenina, která je schopna ovlivňovat farmakologické vlastnosti léčivé látky. Podle studií, prováděné in vitro, Tween 80 potlačuje účinky antibiotik u rezistentních buněčných linií (Schwartzberg a Navari, 2018).

### **4.4 Ethanol**

Ethanol je malá molekula a má schopnost volně pronikat přes bakteriální membrány. Můžeme ho požadovat za chemický analog vody, protože obsahuje hydroxylové skupiny, které se účastní vodíkových vazeb, zodpovědných za vysoký bod varu. Ethanol je méně polární než voda a lépe se rozpouští v hydrofobní membránové vrstvě (Ingram, 2008). Ethanol má baktericidní účinky a používá se k dezinfekci kůže, orálních a rektálních teploměru a dalších zdravotnických materiálů. Bakterie tvořící biofilm jsou obvykle

citlivé na antimikrobiální látky a jsou rychle usmrceny roztoky ethanol/voda (Chambers et al., 2006).

#### **4.5 *Stabilita emulze***

Emulze typu olej ve vodě jsou hlavní složkou mnoha produktů, včetně potravin, doplňků léčiv, kosmetiky a produktů pro osobní péči. Emulze jsou termodynamicky nestabilní a mají tendenci se rozpadat v důsledků různých fyzikálně-chemických mechanismů, proto se do nich přidávají stabilizátory, jako jsou emulgátory.

Emulgátory patří mezi nejdůležitější stabilizátory, protože mají schopnost nejen stabilizovat emulze, ale podle jejich povahy i ovlivnit snadnost tvorby emulze.

Emulze lze vytvářet pomocí vysokoenergetických nebo nízkoenergetických metod. Mezi vysokoenergetické metody patří např. vysokorychlostní mixéry, vysokotlaké homogenizátory, koloidní mlýny a sonikátory. Mezi nízkoenergetické metody patří např. fázová inverze za tepla, změna složení fází a spontánní emulgace (McClements a Jafari, 2018).

## 5 Rostlinné silice

Rostlinné silice jsou těkavé s charakteristickou vůní a hustotou. V anorganických rozpouštědlech (voda) nejsou rozpustné, ale jsou rozpustné v organických rozpouštědlech (ether, alkohol). Nejčastěji se využívají v kosmetickém průmyslu, aromaterapii a parfumerii. Rostliny tyto oleje využívají jako chemické signály, které odpuzují predátory (Hanif et al., 2019). Jsou známé pro své schopnosti inhibovat bakterie, viry a houby a také pro své léčivé vlastnosti a vůni. Používají se k balzamování, konzervaci potravin a jako léčiva s různými účinky, jako například protizánětlivé, protikřečové, proti bolesti, sedativní a jako lokální anestetika (Bakkali et al., 2008). Rostlinné silice vykazují antimikrobiální aktivitu proti mnoha patogenům, které se nejčastěji přenášejí skrz potraviny včetně gram-pozitivních a gram-negativních patogenů (Rao et al., 2019).

### 5.1 *Máta peprná*

Máta peprná je známá rostlina, která se používá v různých podobách, jako například v podobě oleje, listů, extraktu z listů a vody z listů. Získaný olej z máty peprné se využívá v kosmetice, osobní hygieně, potravinářství a přidává se do farmaceutických produktů. Silice má mnoha léčebných vlastností například snížení bolesti a podráždění, čistí a dezinfikuje, povzbuzuje mysl, zužuje krevní cévy a uvolňuje dýchací cesty (Herro a Jacob, 2010).

Silice a extrakt z máty peprné jsou schopny usmrtit některé druhy hub, ale máta peprná namočená do vody (infuze) tuto schopnost ztrácí. Působí antimikrobiálně vůči široké škále patogenů např. *Candida albicans*, *E. coli* a *S. aureus*. Ve farmakologii se dále využívá antivirotická aktivita proti chřipce, herpesu a jiným virům (Mahboubi a Kazempour, 20014).

### 5.2 *Skořice*

Skořice patří mezi nejstarší léčivé rostliny, které se široce využívají po celém světě (El-Hack et al., 2020). Skořice obsahuje dvě hlavní biologické látky: cinnamaldehyd a eugenol (Baker a Grant, 2008). Skořicová silice má výrazné antimikrobiální účinky proti mnoha bakteriím. Dále má silné antioxidační a analgetické účinky (El-Hack et al., 2020). Skořice má pesticidní účinky proti hmyzu, proto se může využívat jako repelent, ale při vyšších dávkách má biocidní účinky (Baker a Grant, 2008).

Skořice patří mezi nejběžnější koření a potravinářské aromatické přísady. Má příznivé účinky na zdraví ústní dutiny a využívá se při bolesti zubů, ústních infekcích a k odstranění zápachu z úst. Dále se využívá i k léčbě akné a gastrointestinálního traktu a tlustého střeva. Skořice má výrazné protiprůjmové a stimulační účinky. Díky svému koagulačnímu účinku lze použít k zastavení krvácení. Mezi ověřené vlastnosti skořicových extraktů a rostlinných silic je jejich antimikrobiální aktivita proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím (Nabavi et al., 2015).

### **5.3 Tymián**

Tymián je známá léčivá rostlina, která se po celém světě využívá jako koření. Obsahuje éterické oleje s silicemi uloženými v mnoha žlázkách této rostliny. Tyto oleje se uvolňují, když jsou tyto žlázy narušeny, a vytvářejí silně aromatické esence, které obklopují rostlinu. Lidé byli k této rostlině přitahováni díky jejímu silnému zápachu. Její oleje se využívaly k průmyslovému využití (Attia et al., 2017).

Patří mezi nejdůležitější byliny, která se používá pro konzervaci potravin. Do jídel se přidává jako koření a dochucovadlo pro zlepšení chuti jídel. Díky svým protizánětlivým a protikřečovým účinkům se již od starověku používá jako léčivá rostlina. Dále jsou rostlinné silice z tymiánu často používané v hygienických výrobcích a výrobcích pro péči o pleť, jako je kolínská voda, mýdla, koupelové esence, sprchové gely a šampóny (Soleimani et al., 2022).

V současné době byly popsány antibakteriální a antifungální aktivita tymiánu proti různým patogenům. Podle několik studií má tymián výraznou antimikrobiální aktivitu proti grampozitivním bakteriím. Dále bylo zjištěno že tymián vykazuje antimikrobiální aktivitu, kterou lze využít jako prevence tvorby biofilmů a tím se snižuje použití syntetických antimikrobiálních látek se stejným účinkem (Coimbra et al., 2022).

### **5.4 Hřebíček**

Hřebíček je složen z mnoha látek, které mu dávají jeho léčivé vlastnosti a výraznou vůni. Nejdůležitější léčivou složkou je eugenol. V tradiční čínské medicíně byl hřebíček popsán jako látka, která vykazuje účinky na zlepšení trávení a inhibuje růst mikroorganismů (Hu et al., 2018).

Nejčastěji se používá v zubním lékařství jako antiseptikum a analgetikum, díky svým léčivým vlastnostem účinně léčit zubní bolesti. Je velice účinný proti ústním



bakteriím, které způsobují zubní kaz a parodontální onemocnění (Chaieb et al., 2007). V potravinářství se používá jako přírodní konzervant, barvivo a koření.

Hřebíček je znám pro svou antivirovou aktivitu, díky složce eugenol. Prokázal antivirový účinek proti herpes simplex typu 1 a 2, viru chřipky A a Ebola. Eugenol může působit jako potenciální inhibitor v raných fázích infekce HIV-1 díky své schopnosti snižovat replikaci virů (Kumar Pandey et al., 2022). Má také antimikrobiální a antioxidační účinky. Vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči bakteriím způsobujícím kažení potravin (Radünz et al., 2019)

## 6 Materiál a metodika

Metodická část mé práce byla prováděná v laboratořích na Zemědělské a Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity. Zabývala jsem se vlivem vybraných emulgátorů a způsoby emulzifikace na růst bakterií *S. aureus* a *E. coli*. Byly testované emulgátory DMSO, Lecitin, Tween a Ethanol.

Hlavní metoda pro stanovení antimikrobiálního vlivu emulgátorů byla použita Broth microdilution assay. Stanovení minimální baktericidní koncentrace bylo provedeno pomocí kultivace a přetažení bakterií *E. coli* a *S. aureus* na Mueller – Hinton agar. Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena spektrofotometricky. Všechny vzorky byly testovány v tripletech. Dále jsem testovala stabilitu emulze.

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je definována jako nejnižší koncentrace antimikrobiální složky, která inhibuje viditelný růst. MIC se používá k hodnocení antimikrobiální účinnosti různých sloučenin měřením účinku klesajících koncentrací.

Minimální baktericidní koncentrace (MBC) je nejnižší koncentrace antibakteriální látky potřebná k usmrcení bakterie.

Test pro MIC byl prováděn na mikrotitračních 96-ti jamkových destičkách. Testování proběhlo na vybraných emulgátorech na růst bakterií. Poté se k emulgátorům, které vykazovaly slabší inhibiční účinky, přidaly rostlinné silice a porovnávalo se, jaký vliv měly tyto emulgátory na inhibiční účinky přidaných rostlinných silic.

Pro zjištění minimální koncentrace inhibující růst bakterií bylo provedeno MIC v mikrotitračních destičkách a zároveň pomocí MBC bylo zjištěno minimální koncentrace, která bakterie usmrcuje.

Hodnota MIC i MBC u bakterie *E. coli* a *S. aureus* byla stanovena po 24 hodinách.

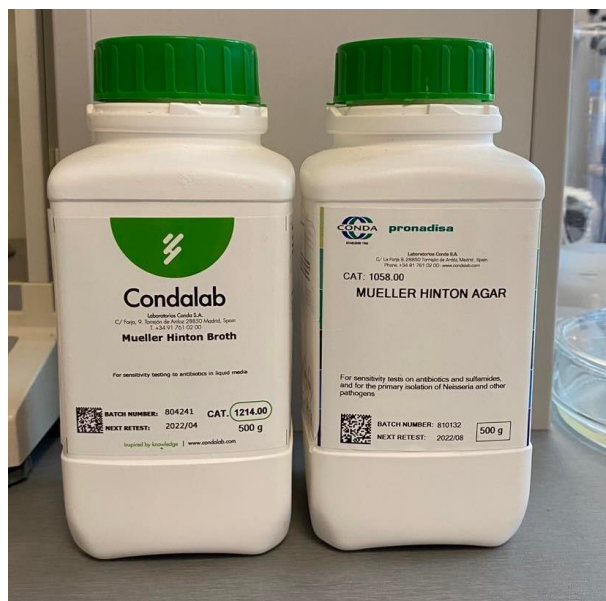
Stabilita emulze byla testována na tekutém médiu MHB. Stanovení se provedlo ve třech různých opakováních. Stabilita emulze se měřila ve skleněných a centrifugačních zkumavkách a zkumavkách Eppendorf. Pro testování stability emulze byly zvoleny 3 koncentrace emulgátorů (5 %, 2,5 % a 1,25 %). Cílem je zjištění, jaký vliv mají vybrané emulgátory a jejich způsoby emulzifikace na stabilitu emulze. Testování proběhlo 3-mi různými způsoby emulzifikace. Při prvním způsobu se emulzifikace prováděla ručním protřepáním. Druhý způsob byl proveden pomocí vortexu a třetí způsob pomocí sonikátoru, kde byla testována stabilita emulzí kultivačního média MHB. Při testování stability emulze v cukerném roztoku byl pro emulzifikaci použit tyčový mixér. Tato emulze byla po sléze využita jako krmivo pro včely.

### Seznam vybraných emulgátorů:

- Tween 20
- Tween 80
- DMSO
- Ethanol

### **6.1 Mueller – Hinton agar (MHA)**

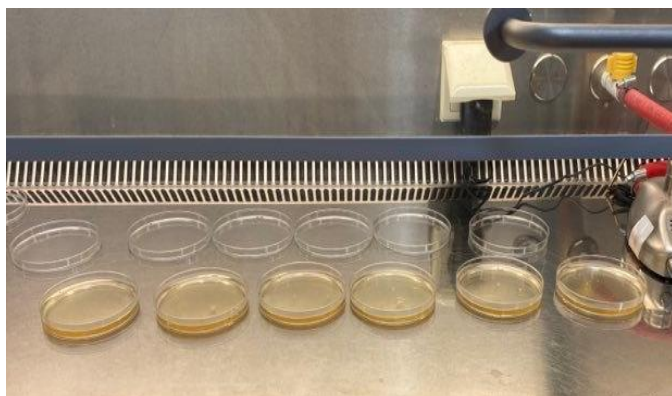
Mueller Hinton agar je vhodné medium pro testování citlivosti mikroorganismů. Hlavními složkami je hovězí extrakt, kyselý hydrolyzát kaseinu, škrob a agar. Hovězí extrakt a kyselý hydrolyzát kaseinu poskytují dusík, vitamíny, uhlík, aminokyseliny, síru a další základní živiny. Škrob má schopnost absorbovat produkované toxické metabolity a agar se používá jako ztužovací prostředek (Aryal, 2015).



Obr. 1: Použitá média

## 6.2 Příprava kultivačních misek

Na analytických vahách bylo odváženo 3,7 g Mueller – Hinton agar. Navážka byla kvantitativně převedena do uzavíratelné lahvičky spolu se 100 ml destilované vody. Agar byl ve vodě důkladně promíchán. Poté se nechal vyvařit po dobu 45 min v tlakovém hrnci, aby byl sterilizován. Po vyvaření se připravený agar přelil do Petriho misek a nechal ztuhnout. Tyto misky byly následně použity ke kultivaci bakterií a ke stanovení hodnoty MBC.



Obr. 2 Chladnutí MHA ve Flowboxu



Obr. 3 Připravená Petriho miskách MHA

## 6.3 Příprava kultur *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*

Ze staré kultury byla připravená nová kultura pro měření MIC a MBC. Prostřednictvím očkovací kličky se odebralo malé množství bakterie ze staré kultury, a naočkovala se s ní nově připravená miska s MHB. Takto připravená miska se nechala inkubovat, aby bakterie narostla.



Obr. 4 Kultura *S. aureus*



Obr. 5 Kultura *E. coli*

## 6.4 Stanovení antimikrobiální aktivity

### 6.4.1 Příprava inokula

Inokulum bylo připraveno z kultury *S. aureus* a *E. coli*. Sterilní očkovací kličkou se odebralo malé množství kultury a přidalo se do zkumavky se sterilní destilovanou vodou. Zkumavky byly protřepány ve vortexu a změřeny v denzitometru do výsledné hodnoty 0,5 McFarland.

### 6.4.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace 10, 5, 2,5 a 1,25 % roztoků emulgátorů

#### Příprava emulgátorů:

Pro měření MIC byly použity vybrané emulgátory: Tween-20, Tween-80, DMSO a Lecitin. Vzorky emulgátorů byly připraveny ve 2 ml zkumavkách Eppendorf. Nejprve byly do zkumavek zváženy emulgátory (viz Tab. 1). DMSO bylo připraveno ve flowboxu. Následně byly všechny zkumavky doplněny do objemu 2 ml médiem MHB. Zkumavky byly poté promíchány ve vortexu

Tab. 1 Příprava emulgátorů

	<b>Tween - 20</b>	<b>Tween - 80</b>	<b>Lecitin</b>	<b>DMSO</b>
<b>10 %</b>	200 mg	200 mg	200 mg	200µl
<b>5 %</b>	100 mg	100 mg	100 mg	100µl
<b>2,5 %</b>	50 mg	50 mg	50 mg	50µl
<b>1,25 %</b>	25 mg	25 mg	25 mg	25µl

#### Stanovení MIC:

Byly připraveny mikrotitrační 96-ti jamkové destičky. Destičky byly rozděleny do dvanácti sloupců a do osmi řádků označených písmeny od A do H. Do všech řad, kromě první bylo nepipetováno automatickou pipetou 100 µl media MHB. Do první řady byly napipetovány vzorky emulgátorů (200 µl) po třech opakováních. Z řady A byla multikanálovou pipetou odpipetována 100 µl vzorků a přidána do řady B a poté se promíchaly. Z řady B se opět napipetovalo 100 µl a přidalo do řady C a promíchalo. Tento postup se opakoval až do řady F, přičemž G a H byla vynechána.

Všechny jamky v prvních čtyř připravených destiček kromě poslední řady H, byly napipetovány 10 µl připraveným inokulem z *E. coli*. Do zbylých destiček bylo inokulum

*S. aureus* napipetováno stejným způsobem. Řada G byla využita jako pozitivní kontrola a řada H jako negativní kontrola. Připravené destičky byly spektrofotometricky změřeny a výsledné hodnoty zaznamenány. Po 24 hodinách se destičky přeměřily a získané hodnoty byly použity k výpočtu inhibičního procenta.

#### **6.4.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace 5 % roztoků emulgátorů s přidavkem rostlinných silic a rostlinných silic samotných**

##### Příprava vzorků:

Pro měření MIC byly použity vybrané emulgátory: Tween-20, Tween-80. DMSO a Ethanol. Vzorky emulgátoru byly připraveny ve 2 ml zkumavkách Eppendorf. T-20 a T-80 byly zváženy do zkumavek po 200 mg. Poté se odpipetovalo 100 µl DMSO a Ethanol, které byly přidány do zkumavek ve flowboxu. Do všech zkumavek byly napipetovány rostlinné silice po 8 µl. Jako rostlinné silice byly použity tymián červený, máta peprná, skořice a hřebíček. Všechny zkumavky byly doplnily do 2 ml mediem MHB.

Poté se připravily roztoky samotných vybraných rostlinných silic. Rostlinné silice byly připravovány o koncentraci 4000 ppm, kdy zkumavky Eppendorf byly doplněny do 2 ml MHB, ke kterému se přidaly rostlinné silice po 8 µl. Všechny zkumavky byly promíchány ve vortexu.

##### Stanovení MIC:

Připravily se mikrotitrační 96-ti jamkové destičky. Destičky byly rozděleny do dvanácti sloupců a do osmi řádků označených písmeny od A do H. Do všech řad, kromě první, se nepipetovalo automatickou pipetou 100 µl media MHB. Do první řady se napipetovaly vzorky emulgátorů (200 µl), ve kterých byly přimíchány rostlinné silice, po třech opakování. Další destičky byly naplněny stejným způsobem připravenými roztoky rostlinných silic. Z řady A byla multikanálovou pipetou odpipetována 100 µl vzorků a přidána do řady B. Poté se směs promíchala. Z řady B se opět odpipetovalo 100 µl a přidalo do řady C a poté a promíchalo. Tento postup opakoval až do F. Řadu G a H byly vynechány.

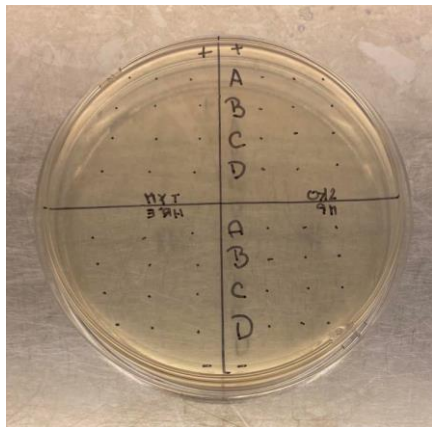
Všechny jamky destiček kromě poslední řady H, byly napipetovány 10 µl připraveným inokulem z *E. coli*. Do zbylých destiček se napipetovalo inokulum *S. aureus* stejným způsobem. Řada G byla použita jako pozitivní kontrola a řada H jako negativní kontrola. Připravené destičky byly spektrofotometricky změřeny a výsledné hodnoty

zaznamenány. Po 24 hodinách se destičky přeměřily a na základě získaných výsledků bylo vypočítáno inhibiční procento.

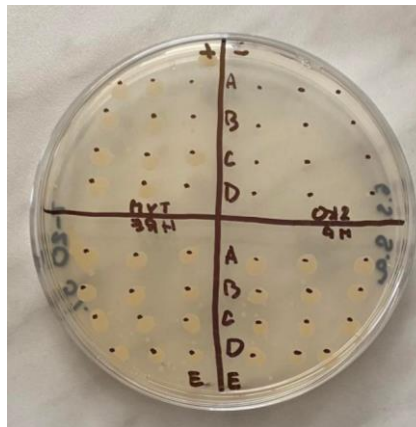
### 6.5 Stanovení MBC

MBC byla prováděna po druhém změření mikrotitračních destiček, tedy po odečtení hodnot MIC. Nejprve byly připraveny Petriho misky obsahující MHA. Zadní strana každé misky byla rozdělena pomocí fixou na čtyři stejně velké části. Každá část byla popsána podle toho, jaký vzorek bude aplikován a poté byly vyznačeny koncentracemi, které se přenesly z jamek destiček na misku (např. A, B, C, D). V mikrotitrační destičce byly vzorky dány po třech opakování, proto bylo ke každé koncentraci, vyznačené na destičce, předkresleny tři tečky.

Pomocí očkovací kličky byl přibližně 1  $\mu$ l média z jamky destičky přenesen na misku. Po přenosu byly Petriho misky uloženy do uzavíratelných sáčků a nechaly se inkubovat po dobu 24 hodin. Po inkubaci se odečetla nejnižší koncentrace, která bakterie usmrtila.



Obr. 6 Připravená destička k MBC



Obr. 7 Ukázka, jak vypadá hotové MBC po 24 hodinové inkubaci

## 6.6 Stabilita emulze v kultivačním médiu

### 6.6.1 Stabilita emulze ve skleněných zkumavkách

Vybrané emulgátory:

- Tween – 20
- Tween – 80
- Lecitin Super
- DMSO
- Ethanol

Rostlinná silice:

- Heřmánek modrý

Postup:

Emulgátory byly testovány v koncentraci 5; 2,5 a 1,25 % w/v. Do zkumavek byly zváženy emulgátory. DMSO s ethanolem byly do zkumavek přidány pipetou (hmotnost viz. Tab. 1). Po zvážení emulgátorů bylo do zkumavek přidáno 10 ml kultivačního média (MHB). Obsah zkumavek byl homogenizován pomocí vortexu. Do každé zkumavky bylo poté přidáno 40 µl heřmánkové silice, čímž vznikla koncentrace 4000 ppm.

V rámci pokusu byly testovány různé způsoby emulzifikace:

1. Protřepáním v ruce
2. Vortexování
3. Vortexovala a 15 min sonifikace

Tab. 2 Příprava emulgátorů

<b>EMULGÁTORY KONCENTRACE</b>	<b>Tween – 20</b>	<b>Tween – 80</b>	<b>Lecitin</b>	<b>DMSO</b>	<b>Ethanol</b>
<b>5 %</b>	500 mg	500 mg	500 mg	500 µl	500 µl
<b>2,5 %</b>	250 mg	250 mg	250 mg	250 µl	250 µl
<b>1,25 %</b>	125 mg	125 mg	125 mg	125 µl	125 µl

### 6.6.2 Stabilita emulze ve zkumavkách Eppendorf

Vybrané emulgátory:

- Tween – 20
- Tween - 40
- Tween – 80
- DMSO



### Rostlinná silice:

- Heřmánek modrý

### Postup:

Emulgátory byly testovány v koncentracích 5 % 2,5 % a 1,25 % w/v. Do zkumavek Eppendorf byly zváženy emulgátory. DMSO s ethanolem byly do zkumavek přidány pipetou (viz Tab. 3). Poté byly zkumavky doplnily tekutým médiem (MHB) do celkového objemu 2 ml a obsah zkumavek byl homogenizován pomocí vortexu. Ke každé zkumavce bylo následně přidáno 8 µl heřmánkové silice, čímž vznikla koncentrace 4000 ppm. Poté byly zkumavky opětovně vortexovány a zdokumentovaná vzniklá emulze. Po 24 hodinách byly emulze vyhodnoceny znovu.

Tab. 3 Příprava emulgátorů

<b>Emulgátory</b>	<b>Tween – 20</b>	<b>Tween – 40</b>	<b>Tween - 80</b>	<b>DMSO</b>
<b>Koncentrace</b>				
<b>5 %</b>	0,1 g	0,1 g	0,1 g	90,9 µl
<b>2,5 %</b>	0,05 g	0,05 g	0,05 g	45.5 µl
<b>1 %</b>	0,02 g	0,02 g	0,02 g	18.1 µl

### **6.6.3 Stabilita emulze v cukerném roztoku**

#### Vybrané emulgátory:

- Tween – 20
- Tween – 40
- Tween – 80
- Lecitin Super
- Lecitin – S75
- DMSO
- Ethanol

### Rostlinná silice:

- Pomeranč

### Postup:

Při stanovení byl připraven 50 % cukerný roztok (w/v). Do centrifugačních zkumavek Falcon byly zváženy emulgátory (hmotnost viz Tab. 4) a následně byly doplněny do objemu 50 ml cukerným roztokem. Takto připravené roztoky byly homogenizovány ručním protřepáním. Každý ze vzorků byl přelit do kádinky a bylo přidáno 500 µl pomerančové silice. V kádince se směs se silicí emulzifikovala pomocí

tyčového mixéru po dobu 30 vteřin. Takto vzniklý roztoky byly přelity zpět do zkumavek a byly vyhodnoceny. Tento postup byl použit pro všechny vzorky. Po 24 hodinách byly zkumavky opětovně zhodnoceny.

Tab. 4 Příprava emulgátorů

<b>Emulgátory</b>	<b>Tween –</b>	<b>Tween –</b>	<b>Tween –</b>	<b>Lecitin</b>	<b>Lecitin –</b>	<b>DMSO</b>	<b>Ethanol</b>
<b>Koncentrace</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>80</b>	<b>Super</b>	<b>S75</b>		
<b>5 %</b>	2,5 g	2,5 g	2,5 g	2,5 g	2,5 g	2500 µl	2500 µl
<b>2,5 %</b>	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1250 µl	1250 µl
<b>1,25 %</b>	0,625 g	0,625 g	0,625 g	0,625 g	0,625 g	625 µl	625 µl

## 7 Výsledky

Pro svou práci jsem využila laboratoře na Zemědělské fakultě a Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity, kde jsem všechny výše uvedené metody prakticky prováděla.

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení antimikrobiální aktivity emulgátorů a rostlinných silic na růst bakterií. MIC bylo prováděno u připravených vzorků:

- Samostatné emulgátory
- Kombinace emulgátory a rostlinných silic
- Samostatný rostlinný silice

Dále bylo ověřováno, jaký mají vliv vybraný emulgátory a jejich způsob emulzifikace na stabilitu emulze.

### 7.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace 10, 5, 2,5 a 1,25 % roztoků emulgátorů

Stanovení MIC vybraných emulgátorů bylo prováděno v 96-ti jamkových mikrotitračních destičkách. Pro toto měření byly připraveny 10, 5, 2,5 a 1,25 % emulgátory. Pomocí multikanálové pipety se připravily v destičkách ředící řady těchto koncentrací. Následně do připravených destiček byly přidány vybrané bakterie po 10  $\mu$ l. Po inkubaci destiček byla provedena MBC, kde se zjišťovala nejnižší koncentrace emulgátorů, která usmrcuje bakterie.

Tab. 5 Inhibiční procento *E. coli* v 10 % roztoku emulgátorů

	T-20		T-80		LS		DMSO	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
10,00	+	+	-	+	-	+	-	+
5,0000	+	+	+	+	-	+	+	+
2,5000	+	+	+	+	-	+	+	+
1,2500	+	+	+	+	+	+	+	+
0,6250	+		+		+		+	
0,3125	+		+		+		+	
C+	0		0		0		0	
C-	100		100		100		100	

Legenda: + (zelená barva) neinhibuje → procento inhibice je <50 %,

- (žlutá barva) inhibuje → procento inhibice je 50-75 %

- (červená barva) úplná inhibice → procento inhibice je 100 %.

Tab. 6 Inhibiční procento *S. aureus* v 10 % roztoku emulgátorů

	T20	MBC	T80	MBC	LS	MBC	DMSO	MBC
10,00	+	+	+	+	-	+	-	+
5,00	+	+	+	+	-	+	+	+
2,50	+	+	+	+	-	+	+	+
1,25	+	+	+	+	-	+	+	+
0,63	+		+		-		+	
0,31	+		+		-		+	
C+	0		0		0		0	
C-	100		100		100		100	

Legenda: + (zelená barva) neinhibuje → procento inhibice je <50 %,  
 - (žlutá barva) inhibuje → procento inhibice je 50-75 %  
 - (červená barva) úplná inhibice → procento inhibice je 100 %.

### Vyhodnocení:

Při všech měření vykazovala vzniklá emulze na bázi lecitinu velkou míru zakalení. Podle výsledků má LS výrazný inhibiční účinek, ale bakterie nezabijí. A proto byl vyhodnocen jako nevhodný pro tuto metodu a v dalších měření byl nahrazen ethanolem. Podle výsledky vyšla u LS výrazná MIC.

U roztoků emulgátorů o koncentraci 10 % vykazoval DMSO inhibiční účinek vůči *S. aureus* v rozmezí 50-75 % (vis Tab. 6). Dále vykazovaly inhibiční účinek T-80 a DMSO vůči *E. coli*. Oba emulgátory inhibovaly v rozmezí 50-75 % (vis. Tab. 5). Dle výsledků MBC bakterii neusmrcuje žádný z emulgátorů ani při koncentraci 10 %.

### **7.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace samostatnýchrostlinných silic**

Stanovení MIC vybraných rostlinných silic, o koncentraci 4000 ppm, bylo prováděno v 96-ti jamkových mikrotitračních destičkách. Pomocí multikanálové pipety se připravily v destičkách ředící řady těchto koncentrací. Do připravených destiček se poté přidalo inokulum s vybranou bakterií o objemu 10 µl. Poté byla u vzorků provedena MBC, kde se zjišťovalo, jaká koncentrace bakterie usmrcuje.

Tab. 7 Míra inhibice vybraných rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči *E. coli*

	Skořice		Tymián		Máta		Hřebíček	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
4000ppm	-	-	-	-	+	+	-	-
2000ppm	-	-	-	-	+	+	-	-
1000ppm	-	-	-	-	+	+	-	+
500ppm	-	-	+	+	+	+	+	+
250ppm	-		+		+		+	
125ppm	+		+		+		+	
C+	0		0		0		0	
C-	100		100		100		100	

Legenda: + (zelená barva) neinhibuje → procento inhibice je <50 %,

- (žlutá barva) inhibuje → procento inhibice je 50-75 %

- (červená barva) úplná inhibice → procento inhibice je 100 %.

Tab. 8 Míra inhibice vybraných rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči *S. aureus*

	Skořice		Tymián		Máta		Hřebíček	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
4000ppm	-	-	-	-	-	-	-	-
2000ppm	-	-	-	-	-	-	-	-
1000ppm	-	-	-	-	-	+	-	-
500ppm	-	-	-	-	+	+	+	+
250ppm	-		-		+		+	
125ppm	+		-		+		+	
C+	0		0		0		0	
C-	100		100		100		100	

Legenda: + (zelená barva) neinhibuje → procento inhibice je <50 %,

- (žlutá barva) inhibuje → procento inhibice je 50-75 %

- (červená barva) úplná inhibice → procento inhibice je 100 %.

### Vyhodnocení:

*E. coli* byla odolná vůči inhibičnímu účinku mátové silice. Skořice měla MIC 250 ppm a MBC 500 ppm. Tymián vykazoval MIC a MBC 1000 ppm. A hřebíček měl MIC 2000 ppm a MBC 2000 ppm. Nicméně byl pozorován inhibiční efekt v rozmezí 50–75 % i u koncentrace 1000 ppm (viz Tab. 7).

Inhibiční účinek vůči bakterii *S. aureus* vykazovaly všechny použité emulgátory. U skořici vyšla MIC 250 ppm a MBC 500 ppm. Tymián zase měl MIC 125 ppm a MBC 500 ppm. U máty byla MIC i MBC 2000 ppm. Určitá inhibiční koncentrace byla pozorována o řád níže u 1000 ppm, nicméně pouze v rozmezí 50-75 %.

A hřebíček vykazoval MIC i MBC 1000 ppm (viz Tab. 8).

### **7.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace 5 % emulgátorů s přidavkem rostlinných silic**

Stanovení MIC vybraných emulgátorů bylo prováděno v 96-ti jamkových mikrotitračních destičkách. Pro toto měření se připravily 5% emulgátory, ke kterým se přidaly rostlinné silice (skořice, tymián, máta a hřebíček) o koncentraci 4000 ppm. Pomocí multikanálové pipety se připravily v destičkách ředící řady a poté se přidaly vybrané bakterie po 10 µl. Během této metody se stanovovalo, jaký mají vliv vybrané emulgátory na rostlinné silice. Poté byla u vzorků provedena MBC, kde se zjišťovalo, jaká koncentrace bakterie usmrcuje

Tab. 9 Míra inhibice 5 % roztoku T-20 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii *S. aureus*

	Skořice		Tymián		Máta		Hřebíček	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
4000ppm	-	-	-	-	+	+	-	-
2000ppm	-	-	-	-	+	+	-	-
1000ppm	-	-	-	-	+	+	-	+
500ppm	-	-	-	-	+	+	+	+
250ppm	-	+	-		+		+	
125ppm	+		+		+		+	
C+	0		0		0		0	
C-	100		100		100		100	

Legenda: + (zelená barva) neinhibuje → procento inhibice je <50 %,

- (žlutá barva) inhibuje → procento inhibice je 50-75 %

- (červená barva) úplná inhibice → procento inhibice je 100 %.

Tab. 10 Míra inhibice 5 % roztoku T-20 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii *E. coli*

	Skořice		Tymián		Máta		Hřebíček	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
4000ppm	-	-	+	+	+	+	+	+
2000ppm	-	-	+	+	+	+	+	+
1000ppm	-	-	+	+	+	+	+	+
500ppm	-	-	+	+	+	+	+	+
250ppm	-		+		+		+	
125ppm	-		+		+		+	
C+	0		0		0		0	
C-	100		100		100		100	

Legenda: + (zelená barva) neinhibuje → procento inhibice je <50 %,

- (červená barva) úplná inhibice → procento inhibice je 100 %.

### Vyhodnocení:

U *S. aureus* nevykazovala máťová silice v kombinaci s T-20 inhibiční i baktericidní účinku. Skořice vyšla MIC 250 ppm a MBC 500 ppm, Tymián vykazoval MIC 500 ppm a MBC 500 ppm. Nicméně byl pozorován inhibiční efekt v rozmezí 50–75 % i u koncentrace 250 ppm. A hřebíček měla MIC a MBC 2000 ppm. Určitá inhibiční koncentrace byla pozorována o řád níže u 1000 ppm, nicméně pouze v rozmezí 50-75 %. (vis Tab. 9).

U *E. coli* nevykazovala tymiánová, máťová a hřebíčková silice v kombinaci s T-20 inhibiční i baktericidní účinku. Skořice měla MIC 125 ppm a MBC 500 ppm (vis Tab. 10).

Tab. 11 Míra inhibice 5 % roztoku T-80 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii *S. aureus*

	Skořice		Tymián		Máta		Hřebíček	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
4000ppm	-	-	-	+	+	+	+	+
2000ppm	-	-	-	+	+	+	+	+
1000ppm	-	-	-	+	+	+	+	+
500ppm	-	-	-	+	+	+	+	+
250ppm	-	+	+		+		+	
125ppm	+		+		+		+	
C+	0		0		0		0	
C-	100		100		100		100	

Legenda: + (zelená barva) neinhibuje → procento inhibice je <50 %,

- (červená barva) úplná inhibice → procento inhibice je 100 %.

Tab. 12 Míra inhibice 5 % roztoku T-80 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii *E. coli*

	Skořice		Tymián		Máta		Hřebíček	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
4000ppm	-	-	+	+	+	+	+	+
2000ppm	-	-	+	+	+	+	+	+
1000ppm	-	-	+	+	+	+	+	+
500ppm	-	-	+	+	+	+	+	+
250ppm	-		+		+		+	
125ppm	-		+		+		+	
C+	0		0		0		0	
C-	100		100		100		100	

Legenda: + (zelená barva) neinhibuje → procento inhibice je <50 %,

- (červená barva) úplná inhibice → procento inhibice je 100 %.

Vyhodnocení:

U *S. aureus* nevykazovala máťová a hřebíčková silice v kombinaci T-80 inhibiční i baktericidní účinku. Skořice měla MIC 250 ppm a MBC 500 ppm. Tymián vykazoval MIC 500 ppm, ale bakterii neusmrcoval. Důvodem mohlo být, že se tymián v mikrotitrační destičce vyvázal a vzniklo zakalení, který spektrofotometr vyhodnotil špatně (vis Tab. 11).

U *E. coli* nevykazovala tymiánová, máťová a hřebíčková silice v kombinaci s T-80 inhibiční i baktericidní účinky. Skořice měla MIC 125 ppm a MBC 500 ppm. (vis Tab. 12).



Tab. 13 Míra inhibice 5 % roztoku DMSO s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii *S. aureus*

	Skořice		Tymián		Máta		Hřebíček	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
4000ppm	-	-	-	-	+	+	-	-
2000ppm	-	-	-	-	+	+	-	-
1000ppm	-	-	-	-	+	+	-	+
500ppm	-	-	-	-	+	+	+	+
250ppm	-	+	-		+		+	
125ppm	+		+		+		+	
C+	0		0		0		0	
C-	100		100		100		100	

Legenda: + (zelená barva) neinhibuje → procento inhibice je <50 %,  
 - (žlutá barva) inhibuje procento inhibice je 50-75 %  
 - (červená barva) úplná inhibice → procento inhibice je 100 %.

Tab. 14 Míra inhibice 5 % roztoku DMSO s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii *E. coli*

	Skořice		Tymián		Máta		Hřebíček	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
4000ppm	-	-	-	-	+	+	-	-
2000ppm	-	-	-	-	+	+	-	-
1000ppm	-	+	+	+	+	+	+	+
500ppm	+	+	+	+	+	+	+	+
250ppm	+		+		+		+	
125ppm	+		+		+		+	
C+	0		0		0		0	
C-	100		100		100		100	

Legenda: + (zelená barva) neinhibuje → procento inhibice je <50 %,  
 - (žlutá barva) inhibuje → procento inhibice je 50-75 %  
 - (červená barva) úplná inhibice → procento inhibice je 100 %.

### Vyhodnocení

U *S. aureus* nevykazovala máťová silice v kombinaci s DMSO inhibiční i baktericidní účinky. Skořice měla MIC 250 ppm a MBC 500 ppm. Tymián vykazoval MIC 500 ppm a MBC 500 ppm. Nicméně byl pozorován inhibiční efekt v rozmezí 50–75 % i u koncentrace 250 ppm. A hřebíček zas měla MIC a MBC 2000 ppm. Určitá inhibiční koncentrace byla pozorována o řád níže u 1000 ppm, nicméně pouze v rozmezí 50-75 %. (vis Tab. 13).

U *E. coli* nevykazovala máťová silice v kombinaci s DMSO inhibiční i baktericidní účinky. Skořice měla MIC a MBC 2000 ppm. Nicméně byl pozorován inhibiční efekt

v rozmezí 50–75 % i u koncentrace 1000 ppm. Tymián vykazoval MIC a MBC 2000 ppm, A hřebíček měl MIC a MBC 2000 ppm (vis Tab. 14).

Tab. 15 Míra inhibice 5 % roztoku Ethanol s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii *S. aureus*

	Skořice		Tymián		Máta		Hřebíček	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
4000ppm	-	-	-	-	+	+	-	-
2000ppm	-	-	-	-	+	+	-	-
1000ppm	-	-	-	-	+	+	-	+
500ppm	-	+	+	+	+	+	+	+
250ppm	+		+		+		+	
125ppm	+		+		+		+	
C+	0		0		0		0	
C-	100		100		100		100	

Legenda: + (zelená barva) neinhibuje → procento inhibice je <50 %,  
 - (žlutá barva) inhibuje → procento inhibice je 50-75 %  
 - (červená barva) úplná inhibice → procento inhibice je 100 %.

Tab. 16 Míra inhibice 5 % roztoku Ethanol s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii *E. coli*

	Skořice		Tymián		Máta		Hřebíček	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
4000ppm	-	-	+	+	+	+	-	-
2000ppm	-	-	+	+	+	+	+	+
1000ppm	-	-	+	+	+	+	+	+
500ppm	-	+	+	+	+	+	+	+
250ppm	+		+		+		+	
125ppm	+		+		+		+	
C+	0		0		0		0	
C-	100		100		100		100	

Legenda: + (zelená barva) neinhibuje → procento inhibice je <50 %,  
 - (žlutá barva) inhibuje → procento inhibice je 50-75 %  
 - (červená barva) úplná inhibice → procento inhibice je 100 %.

### Vyhodnocení:

U *S. aureus* nevykazovala máťová silice v kombinaci s ethanolem inhibiční i baktericidní účinky. Skořice měla MIC a MBC 1000 ppm. Nicméně byl pozorován inhibiční efekt v rozmezí 50–75 % i u koncentrace 500 ppm. Tymián vykazoval MIC a MBC 1000 ppm, Hřebíček měla MIC a MBC 2000 ppm. Určitá inhibiční koncentrace byla pozorována o řád níže u 1000 ppm, nicméně pouze v rozmezí 50-75 %. (vis Tab. 15).

U *E. coli* nevykazovala máťová a tymiánová silice v kombinaci s DMSO inhibiční i baktericidní účinky. Skořice měla MIC a MBC 1000 ppm. Nicméně byl pozorován inhibiční efekt v rozmezí 50–75 % i u koncentrace 500 ppm. Hřebíček vykazoval MIC a MBC 4000 ppm (vis Tab. 16).

#### 7.4 *Stabilita emulze v kultivačním médiu*

Cílem bylo zjistit, jaký mají vliv vybrané emulgátory a jejich způsoby emulzifikace na vznik stabilní emulze. Heřmánek modrý byl vybrán do emulze pro svou sytě modrou barvu a kvůli viditelnosti v případě vyvázání z emulze. Tři různé způsoby emulzifikace byly použity: ruční promíchání, pomocí vortexu a sonikátoru. Následně byla vyzkoušena stabilita v cukerném roztoku, kde emulze byla vytvořena pomocí tyčového mixéru. Pro tuto metodu byly vybrány 3 koncentrace: 5 % 2,5 % a 1,25 %

##### 7.4.1 *Stabilita emulze ve skleněných zkumavkách*

###### 7.4.1.1 *Tween 20*



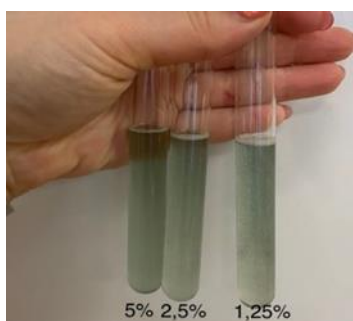
Obr. 8 Ruční protřepání



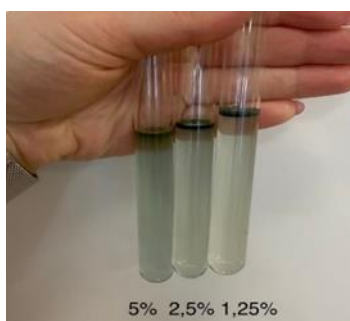
Obr. 9 Ruční protřepání po 15 min



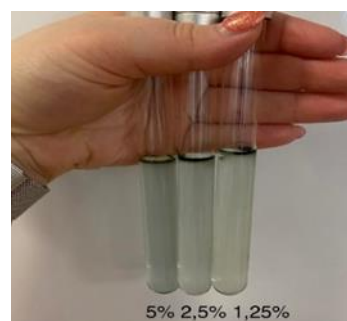
Obr. 10 Ruční protřepání po 24 h



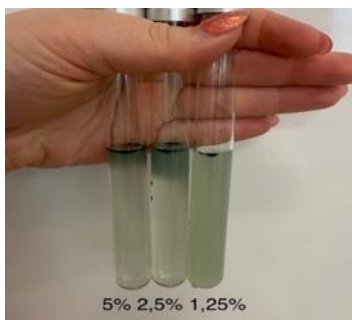
Obr. 11 Promíchání ve vortexu



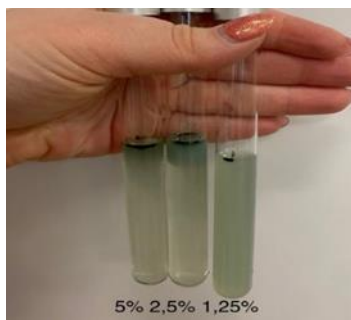
Obr. 12 Promíchání ve vortexu po 15 min



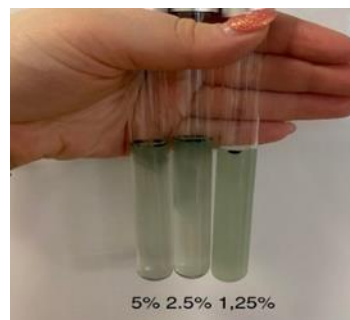
Obr. 13 Promíchání ve vortexu po 24 hod



Obr. 14 Sonikace



Obr. 15 Sonikace po 15 min



Obr. 16 Sonikace po 24 h

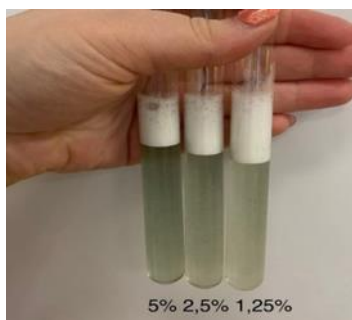
### Vyhodnocení:

Ručním protřepáním nám vznikla stabilní emulze a nad hladinou se vytvořila pěna (vis Obr. 8). Po 15 minutách se heřmánek ve všech koncentracích emulgátoru částečně vyvázal a vytvořil na hladině slabý prstencovitý útvar (vis Obr. 9). Po 24 hodinách se heřmánek zcela vyvázal a vniklý prstencovitý útvar byl výraznější (vis Obr. 10).

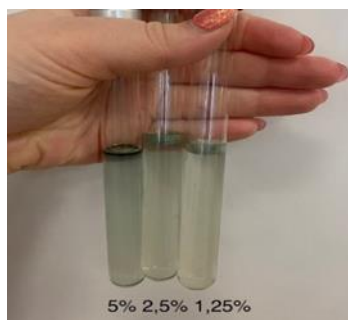
Emulze u T-20, která vznikla pomocí vortexu nebyla stabilní. Přidaný heřmánek se v koncentraci 2,5 % a 1,25 % začal postupně vyvazovat (vis Obr 11). Po 15 minutách se heřmánek zcela vyvázal ve všech koncentracích emulgátoru a vytvořil na hladině prstencovitý útvar (vis Obr. 12). Po 24 hodinách vypadaly emulze stejně jako na Obr. 12 (vis. Obr. 13).

Emulze vzniklá pomocí sonikace byla nejvíce stabilní při koncentraci 1,25 %. U koncentrace 5 % a 2,5 % se heřmánek vyvázal pod hladinu (vis Obr. 14). Po 15 minutách vypadaly emulze stejně jako na Obr. 8 (vis Obr. 15). Po 24 hodinách byla emulze při 1,25 % koncentraci emulgátoru stále stabilní. Při koncentraci 5 % a 2,5 % zůstal heřmánek vyvázaný pod hladinou (vis Obr. 16).

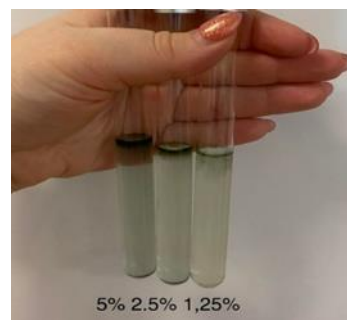
### 7.4.1.2 Tween 80



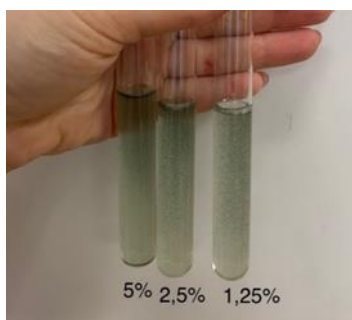
Obr. 17 Ruční protřepání



Obr. 18 Ruční protřepání po 15 min



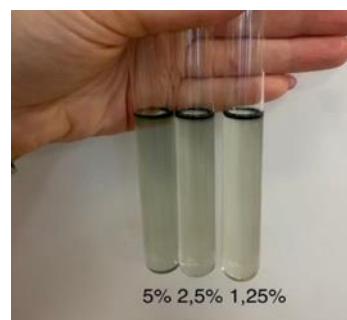
Obr. 19 Ruční protřepání po 24 h



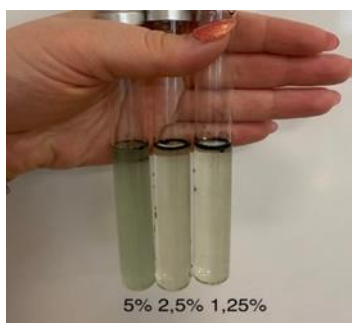
Obr. 20 Promíchání ve vortexu



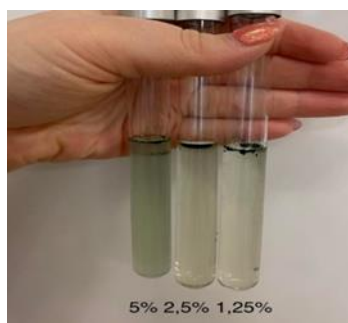
Obr. 21 Promíchání ve vortexu po 15 min



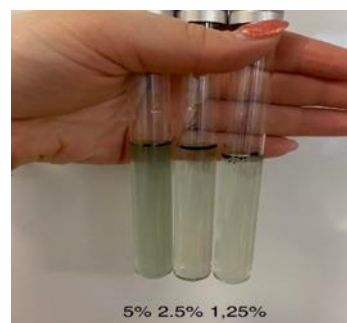
Obr. 22 Promíchání ve vortexu po 24 h



Obr. 23 Sonikace



Obr. 24 Sonikace po 15 min



Obr. 25 Sonikace po 24 h

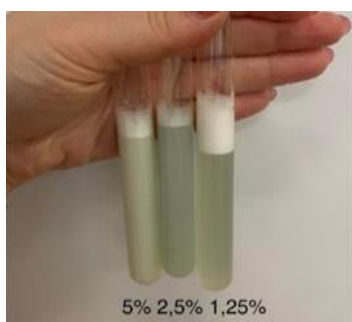
#### Vyhodnocení:

Ručním protřepáním nám vznikla stabilní emulze a nad hladinou se vytvořila pěna (vis Obr. 17). Po 15 minutách se heřmánek v koncentraci 5 % vyvázal a vytvořil na hladině prstenčitý útvar. V koncentraci 2,5 % a 1,25 % vypadala emulze stále stabilní. (vis Obr. 18). Po 24 hodinách se heřmánek zcela vyvázal u všech koncentrací (vis. Obr. 19)

Emulze u T-80, která vznikla pomocí vortexu nebyla stabilní. Přidaný heřmánek se ve všech koncentracích začal postupně vyvazovat (vis Obr 20). Po 15 minutách se heřmánek zcela vyvázal a vytvořil na hladině prstenčitý útvar (vis Obr. 21). Po 24 hodinách vypadaly emulze stejně jak na Obr. 21 (vis. Obr.22).

Emulze vzniklá pomocí sonikace byla částečně stabilní u koncentrace 5 %, kde se heřmánek částečně vyvázal. U koncentrace 2,5 % a 1,25 % se heřmánek zcela vyvázal a vytvořil na hladině prstenčitý útvar (vis Obr. 23). Po 15 minutách se hřebíček více vyvázal u koncentrace 5 % (vis Obr. 24). Po 24 hodinách vypadaly emulze stejně jak na Obr. 18 (vis Obr. 25).

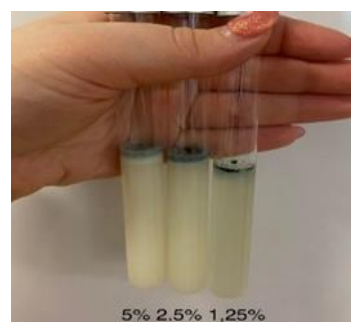
### 7.4.1.3 Lecitin



Obr. 26 Ruční protřepání



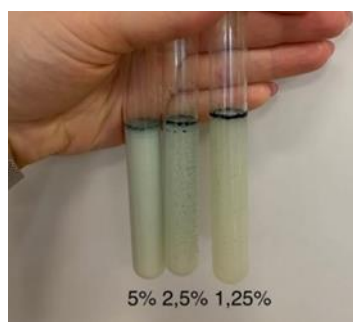
Obr. 27 Ruční protřepání po 15 min



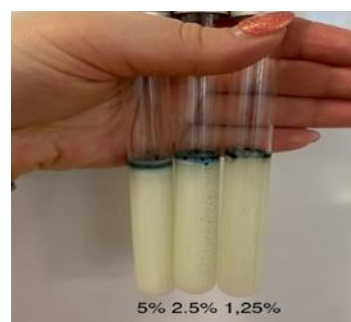
Obr. 28 Ruční protřepání po 24 h



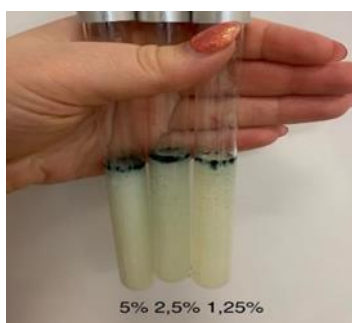
Obr. 29 Promíchání ve vortexu



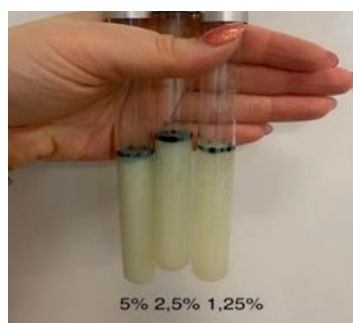
Obr. 30 Promíchání ve vortexu po 15 min



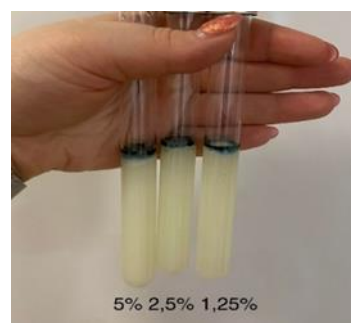
Obr. 31 Promíchání ve vortexu po 24 h



Obr. 32 Sonikace



Obr. 33 Sonikace po 15 min



Obr. 34 Sonikace po 24 h



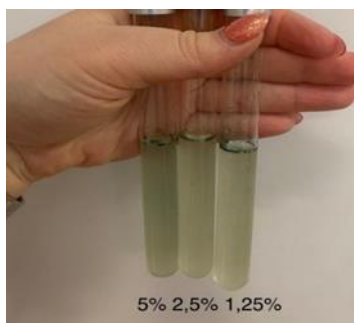
### Vyhodnocení:

Emulze u lecitinu vzniklá pomocí ručního protřepání byla stabilní a nad hladinou vznikla pěna (vis Obr. 26). Po 15 minutách byla emulze částečně stabilní a heřmánek se částečně vyvázal a vytvořil na hladině slabý prstencovitý útvar (vis Obr. 27). Po 24 hodinách se heřmánek zcela vyvázal (vis Obr. 28).

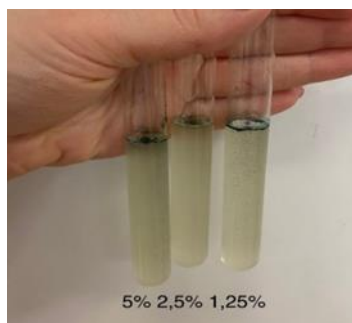
Emulze vzniklá pomocí vortexu byla částečně stabilní (vis Obr. 29). Po 15 minutách se heřmánek částečně vyvázal a vytvořil na hladině prstencovitý útvar (vis Obr. 30). Po 24 hodinách se heřmánek zcela vyvázal (vis Obr. 31).

Emulze vzniklá pomocí sonikace nebyla stabilní a heřmánek se ihned vyvázal (vis Obr. 32). Po 15 minutách (vis Obr. 33) a po 24 hodinách (vis Obr. 34) byla emulze nestabilní.

#### **7.4.1.4 DMSO**



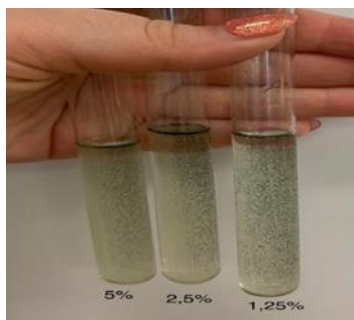
Obr.35 Ruční protřepání



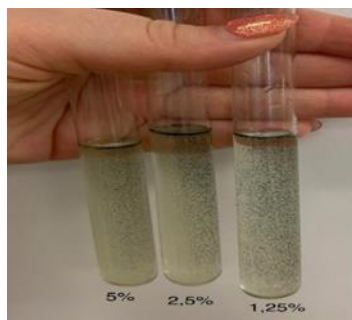
Obr. 36 Ruční protřepání po 15 min



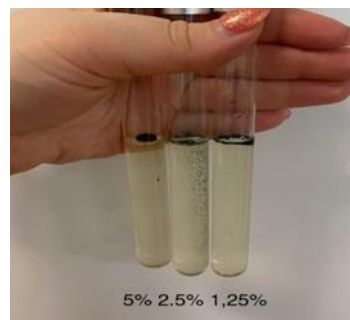
Obr. 37 Ruční protřepání po 24 h



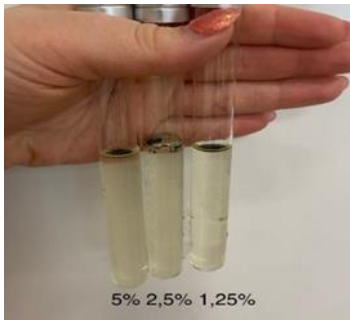
Obr. 38 Promíchání ve vortexu



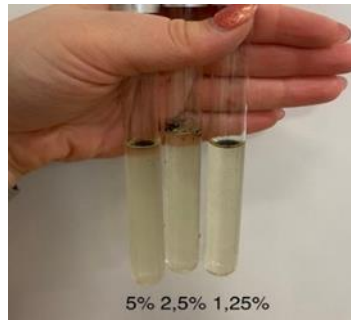
Obr. 39 Promíchání ve vortexu po 15 min



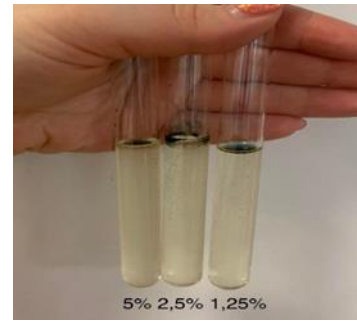
Obr. 40 Promíchání ve vortexu po 24 h



Obr. 41 Sonikace



Obr. 42 Sonikace po 15 min



Obr. 43 Sonikace po 24 h

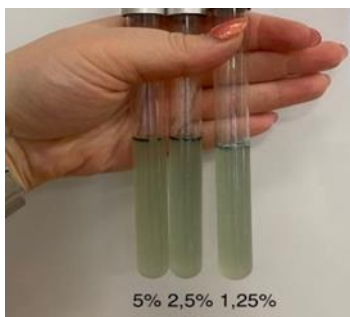
### Vyhodnocení:

Emulze u DMSO vzniklá pomocí ručního promíchání byla stabilní, ale heřmánek se částečně vyvázal a vytvořil na hladině slabý prstencovitý útvar (vis Obr. 36). Po 15 minutách vypadala emulze stejně jak na Obr. 36 (vis Obr. 37). Po 24 hodinách se heřmánek zcela vyvázal (vis Obr. 38).

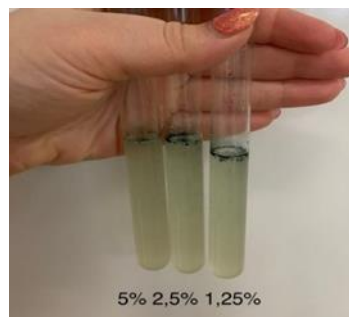
Emulze vzniklá pomocí vortexu byla částečně stabilní, kde se heřmánek částečně vyvázal (vis. Obr. 39). Po 15 minutách je emulze stále částečně vyvázaná (vis Obr. 40). Po 24 hodinách se heřmánek zcela vyváže a vytvoří na hladině prstencovitý útvar (vis Obr. 41).

Emulze vzniklá pomocí sonikace byla nestabilní a heřmánek se ihned po sonikaci vyvázal (vis. Obr 42). Po 15 minutách (vis Obr. 43) a po 24 hodinách (vis Obr 44) byla emulze nestabilní.

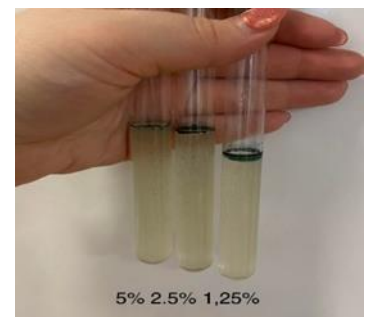
### **7.4.1.5 Ethanol**



Obr. 44 Ruční protřepání

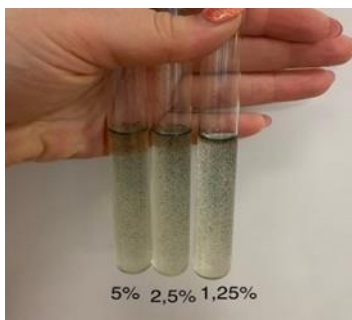


Obr. 45 Ruční protřepání po 15 min

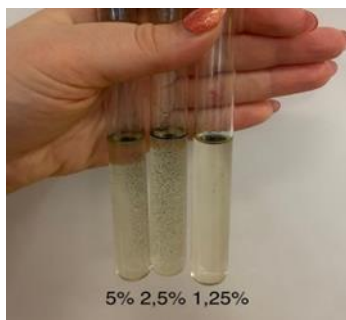


Obr. 46 Ruční protřepání po 24 h

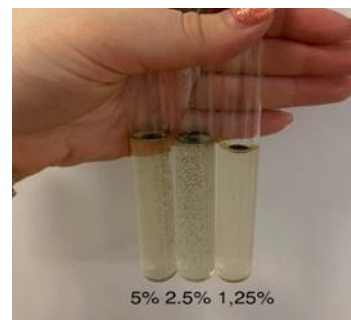




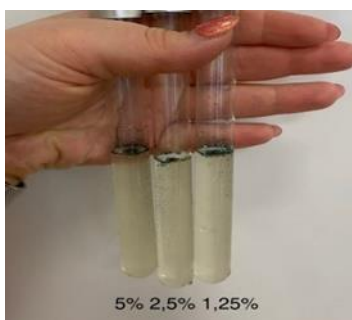
Obr. 47 Promíchání ve vortexu Ruční protřepání



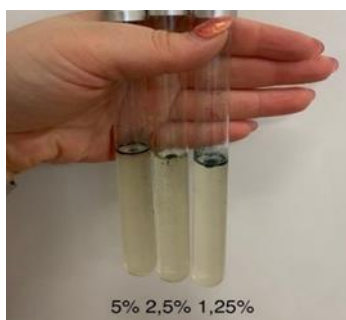
Obr. 48 Promíchání ve vortexu po 15 min



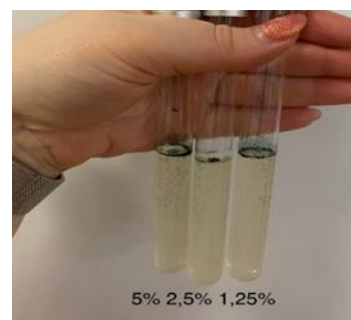
Obr. 49 Promíchání ve vortexu po 24 h



Obr. 50 Sonikace



Obr. 51 Sonikace po 15 min



Obr. 52 Sonikace po 24 h

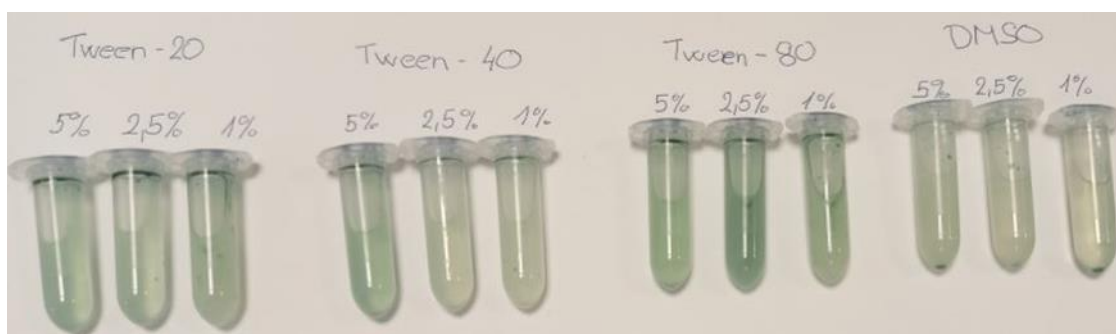
### Vyhodnocení:

Emulze u ethanolu vzniklá pomocí ručního promíchání byla stabilní. Hřebíček se částečně vyvázal a vytvořil na hladině prstenčitý útvar (vis Obr. 45). Po 15 min byla emulze částečně stabilní a hřebíček byl více vyvázaný (vis Obr. 46). Po 24 hod byla emulze nestabilní a hřebíček byl zcela vyvázaný (vis Obr. 47).

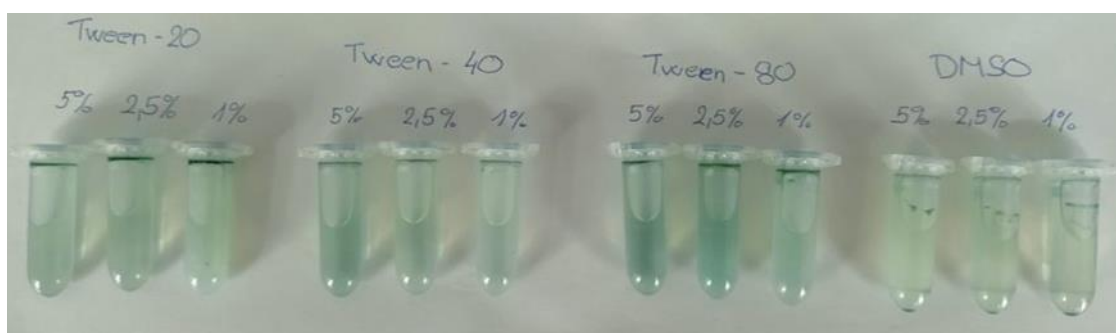
Emulze vzniklá pomocí vortexu byla částečně stabilní. Hřebíček se částečně vyvázal a vytvořil a hladí slabý prstenčitý útvar na hladině (vis Obr. 48). Po 15 min zůstal heřmáněk částečně vyvázaný u koncentrace 5 % a 2,5 %. U koncentrace 1,25 % se hřebíček zcela vyvázal (vis Obr. 49). Po 24 hod zůstala emulze stejná jako na Obr. 49 (vis Obr.50).

Emulze vzniklá pomocí sonikace byla nestabilní. Hřebíček byl zcela vyvázaný (vis Obr. 51). Stejně emulze vypadala po 15 min (vis Obr. 52) a po 24 hod (vis Obr. 53).

#### 7.4.2 Stabilita emulze ve zkumavkách Eppendorf



Obr. 53 Emulze vzniklá pomocí vortexu



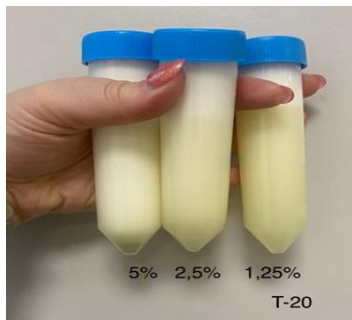
Obr. 54 Emulze vzniklá pomocí vortexu po 24 h

#### Vyhodnocení:

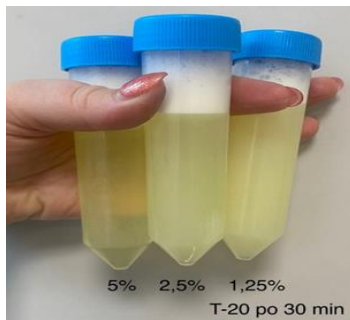
Dle těchto výsledků můžeme vidět, že nejlepší emulze vznikla u 5 % a 2,5 % DMSO. Dále pěkná emulze vyšla u 5 % T-20 a T-40. U T-20 můžeme vidět, že ihned po sonikaci e heřmánek vyvázal a vytvořil prsténkovitý útvar na hladině.

Po 24 hodinách se ve všech zkumavek Eppendorf heřmánková silice vyvázal a vytvořila na hladině prsteneček, kromě DMSO. U DMSO se vyvázala nahodile na stěnách a dně zkumavky.

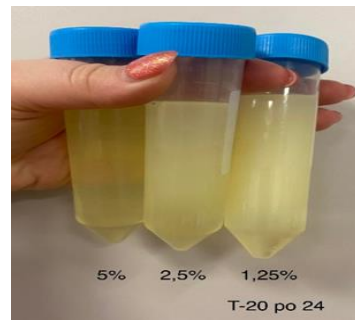
### 7.4.3 Stabilita emulze v cukerném roztoku



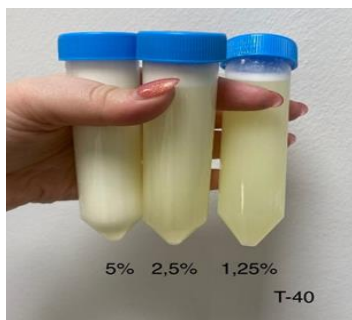
Obr. 56 T-20 v cukerném roztoku  
→ emulzifikace pomocí tyčového  
mixéru



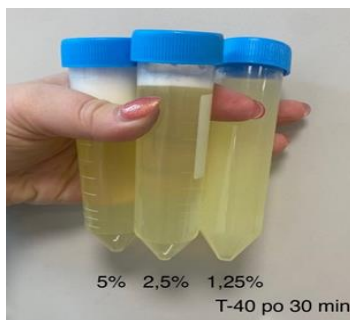
Obr. 55 T-20 v cukerném roztoku  
→ emulzifikace pomocí tyčového  
mixéru po 30 min



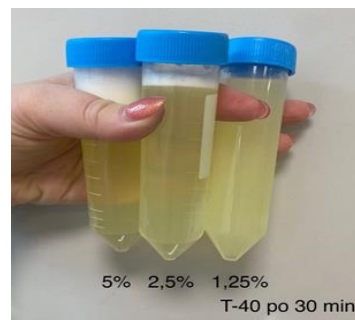
Obr. 56 T-20 v cukerném roztoku  
→ emulzifikace pomocí tyčového  
mixéru po 24 h



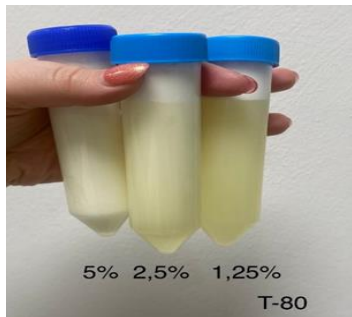
Obr. 57 T-40 v cukerném roztoku  
→ emulzifikace pomocí tyčového  
mixéru



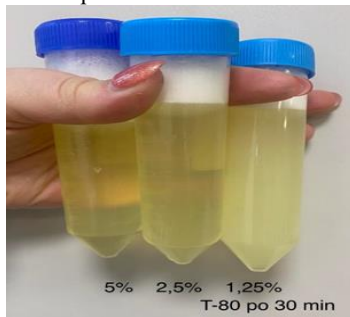
Obr. 58 T-20 v cukerném roztoku  
→ emulzifikace pomocí tyčového  
mixéru po 30 min



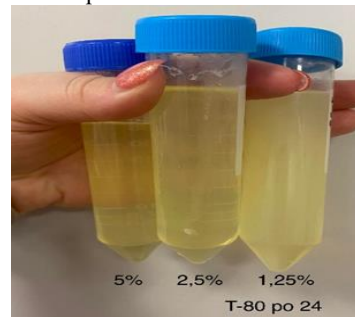
Obr. 59 T-20 v cukerném roztoku  
→ emulzifikace pomocí tyčového  
mixéru po 24 h



Obr. 60 T-80 v cukerném roztoku  
→ emulzifikace pomocí tyčového  
mixéru



Obr. 61 T-80 v cukerném roztoku  
→ emulzifikace pomocí tyčového  
mixéru po 30 min



Obr. 62 T-80 v cukerném roztoku  
→ emulzifikace pomocí tyčového  
mixéru po 24 h



Obr. 63 LS v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru



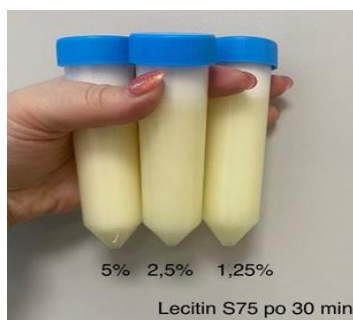
Obr. 64 LS v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min



Obr. 65 LS v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h



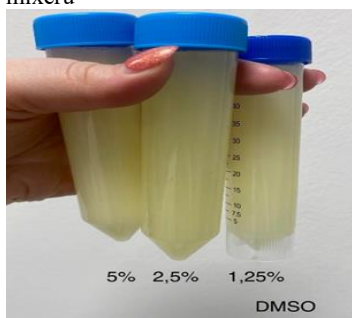
Obr. 66 L-75 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru



Obr. 67 L-75 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min



Obr. 68 L-75 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h



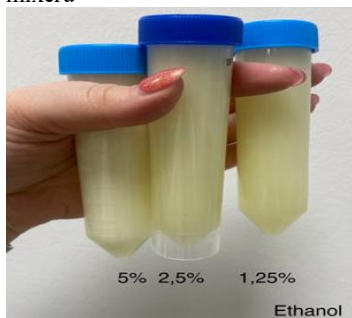
Obr. 69 DMSO v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru



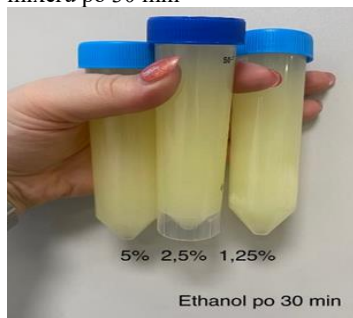
Obr. 70 DMSO v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min



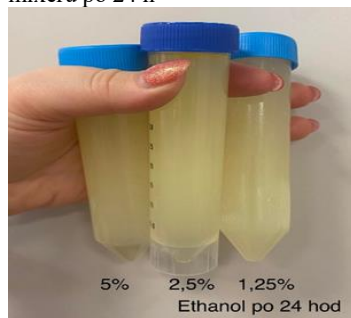
Obr. 71 DMSO v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h



Obr. 72 Ethanol v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru



Obr. 73 Ethanol v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min



Obr. 74 Ethanol v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h

### Vyhodnocení:

Po promísení emulze s pomerančovou silicí vznikla u všech vzorků homogenní emulze. Po 30 minutách se emulze zachovala u ethanolu, DMSO, Lecitinu S75 a Lecitinu super. U všech testovaných Tweenů je vidět vyvazování silice z emulze již po 30 minutách, paradoxně více u vyšších koncentrací emulgátoru.

Po 24 hod se u některých vzorků silice z emulze zcela vyvázal. U Tweenů zůstalo nějaké množství silice v emulzi u koncentrace 1,25 %. U zbylých koncentrací se patrně vyvázala z emulze veškerá silice. U ethanolu a DMSO zůstaly emulzifikovány všechny vzorky, ale u 2,5 % a 5 % ethanolu jen částečně (vytvořil se oranžový prstencový útvar na hladině). Tento útvar se objevil i u všech koncentrací DMSO. U DMSO byl pozorován trend, kdy se u vyšší koncentrace vyvazovalo více silice.

## 8 Diskuse

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení antimikrobiální aktivity vybraných druhů emulgátorů na růst bakterií, ať už emulgátorů samotných nebo v kombinaci s vybranými silicemi i silic samotných. Touto metodou byla zjišťována MIC neboli minimální inhibiční koncentrace, která inhibuje růst bakterií. Doplněním MIC byla provedena metoda pro MBC, kde se zjišťovalo, jaká minimální koncentrace bakterie usmrcuje. Vybrané bakterie pro tyto metody byly *S. aureus* a *E. coli*. Dále byl ověřen vliv vybraných emulgátorů a způsobů emulzifikace na stabilitu emulze.

MIC byla stanovena v 96-ti jamkových destičkách, které byly měřeny spektrofotometricky. V prvním měření byla měřena MIC u samostatných emulgátorů. Pro měření se použily koncentrace roztoků emulgátorů: 10 %, 5 %, 2,5 % a 1,25 %.

Kirkwood et al., (2018) popsaly, že DMSO silně inhibuje růst bakterie *E. coli*. DMSO má antioxidační a antimikrobiální vlastnosti (Yolanda et al., 2022). Z výsledků měření bylo zjištěno, že DMSO inhibuje růst bakterií *E. coli* a *S. aureus* pouze v 10 % koncentraci, kde míra inhibice byla 50-75 %.

George et al., (2022) popsaly že T-80 při koncentraci 0,5 % může vykazovat baktericidní aktivitu. Z výsledků měření antimikrobiální aktivity 10 % roztoku T-80 vyplývá, že inhibuje růst *E. coli*, kde jeho účinnost je 50-75 % Baktericidní účinky nebyly prokázány u roztok T-20 na žádnou bakterii. Ostatní emulgátory nevykazovaly antimikrobiální aktivitu proti *E. coli* a *S. aureus*.

Rostlinné silice jsou známé pro své antimikrobiální účinky. Zkoumání antimikrobiální aktivity rostlinných silic se v posledních desetiletí týkalo mnoha studií. Tato studie byla provedena za účelem rozšíření dostupných informací o antimikrobiálních účinků silic (Thielmann et al., 2019). V bakalářské práci byla zjišťována MIC a MBC vybraných rostlinných silic (skořice, tymián, máta a hřebíček) vůči bakteriím *E. coli* a *S. aureus*.

Skořice vykazovala MIC 250 ppm vůči *S. aureus*. Vyšší antimikrobiální aktivitu vykazovala proti *E. coli*, kdy skořice měla MIC 125 ppm. Thielmann et al., (2019) stanovovali MIC u rostlinných silic od 3 různých výrobců. Podle jejich výsledků vykazovala skořice MIC proti *S. aureu* v rozmezí 50-800 ppm a proti *E. coli* v rozmezí 50-200 ppm. Do tohoto rozmezí spadají i naše získané výsledky.

Tymián vůči bakterii *E. coli* vykazoval MIC 1000 ppm. V jiné studii, kterou provedli Caceres et al., (2020) byla zjištěna nižší MIC tymiánu, a to při koncentraci 750 ppm.



Důvodem může být, že porovnávaná studie použila tymián od jiného dodavatele a tím se může lišit složením od námi použitého tymiánu.

Máta peprná nevykazovala antimikrobiální účinky proti *E. coli*, ale měla inhibiční účinky vůči *S. aureus*, kde její MIC byla 2000 ppm. Nicméně byl pozorován inhibiční efekt v rozmezí 50-75 % při koncentraci 1000 ppm. Ve studii Thielmann et al., (2019) měla máta vyšší inhibiční účinky proti *E. coli*. Tyto výsledky se výrazně liší od našich získaných hodnot. Důvodem rozdílných výsledků může být, že námi použitá mátová silice byla od jiného výrobce a díky tomu pravděpodobně měla jiné složení účinných látek, než silice použita ve studiu Thielmann et al., (2019).

Hřebíčková silice vykazovala MIC 1000 ppm proti *S. aureus*. Dále měla MIC 2000 ppm proti *E. coli*, ale určitá inhibiční koncentrace byla pozorována o řád níže u 1000 ppm, nicméně pouze v rozmezí 50-75 %. Ve studii Prabuseenivasan et al., (2006) došli k závěru, že hřebíček vykazuje určitou aktivitu proti vybraným patogenům. Jejich hodnota MIC vyšla v rozmezí 1600-6400 ppm.

Pro antimikrobiální účinky rostlinných silic byla použita další metoda pro zjištění, jaký mají vliv vybrané emulgátory na antimikrobiální účinky vybraných silic. Pro toto měření byly použity 5 % roztoky emulgátorů a rostlinné silice o koncentraci 4000 ppm. Roztoky emulgátorů výrazně ovlivnily inhibiční účinky silic vůči bakterie *E. coli*. Když byly použity silice samotné, pouze jediná mátová silice neměla inhibiční účinek. Když se smíchal T-20 se silicemi vykazovala inhibiční i baktericidní účinek pouze skořice. To samé vykazoval i roztok T-80. U roztoků DMSO se silicemi se změnila inhibiční i baktericidní účinky silic proti *E. coli*. Skořice měla MIC a MBC 2000 ppm. Nicméně byla pozorován inhibiční efekt v rozmezí 50-75 % u koncentraci 1000 ppm. Tymián a hřebíček vykazovaly MIC i MBC 2000 ppm. U roztoku ethanolu se silicemi vykazovaly inhibiční účinky pouze skořice a hřebíček, kde skořice měla MIC 500 ppm a MBC 1000 ppm, a hřebíček vykazoval MIC i MBC 4000 ppm.

U bakterie *S. aureus* neměly emulgátory tak výrazný vliv na rostlinné silice jako u bakterie *E. coli*. U roztoku T-20 se silicemi měl emulgátor vliv hlavně na mátovou silici, která nevykazovala vůči *S. aureus* žádné inhibiční ani baktericidní účinky. U ostatních silic neměl T-20 výrazný vliv na jejich účinky. Roztok T-80 se silicemi měl emulgátor vliv na účinky mátové a hřebíčkové silice, které poté nevykazovaly žádný inhibiční i baktericidní účinek. Tymián v tomto případě vykazoval inhibiční účinky, ale bakterii neusmrcoval. Důvodem mohlo být, že tymián se vyvázal z emulze, a to mohlo ovlivnit výsledky MIC. U roztoku DMSO se silicemi měl emulgátor vliv na mátovou silici, která

poté nevykazovala inhibiční i baktericidní účinky. Ostatní silice DMSO výrazně neovlivňoval. Roztok ethanolu se silicemi měl vliv na účinky mátové silice, která poté nevykazovala žádné inhibiční ani baktericidní účinky. U ostatních silic nebyla změna tak výrazná.

Pro doplnění bylo u všech vzorků provedeno stanovení minimální baktericidní koncentrace. Samostatné emulgátory bakterie neusmrcovaly, ale po přidavku rostlinných silic se tato vlastnost zlepšila. Nejlepší baktericidní účinky vykazovala skořice. Dále baktericidní účinky měl tymián s výjimkou, kdy byly použity emulgátory T-80 a T-20 vůči bakterii *E. coli*, kde emulgátory baktericidní účinek tymiánu spíše potlačovaly. Nejhorší baktericidní účinek měla máta.

Další provedenou metodou bylo ověřování vlivu vybraných emulgátorů a způsobů emulzifikace na stabilitu emulze. Na funkční vlastnosti emulze má výrazný dopad různá rozpustnost emulgátorů. Například ve vodě rozpustné emulgátory mohou být rozpuštěny ve vodné fázi a emulgátory rozpustné v oleji mohou být dispergovány v olejové fázi (např. lecitin) před homogenizací (McClements a Jafari, 2018). Podle této studie má vliv na stabilitu emulze i fázové rozhraní. Fyzikálně-chemické vlastnosti mezifázové vrstvy vytvořené, když se molekuly emulgátorů adsorbují na rozhraní olej-voda, do značné míry určují stabilitu a funkčnost emulze. Rozdílné mezifázové vlastnosti mají výrazný vliv na fyzikální stabilitu emulzí.

Při použití skleněných zkumavek se zjistilo, že u vzorků, které byly ručně protřepány a zvortexovány, vznikla lepší emulze než u vzorků, které byly sonikovány. Lecitin super a T-20, měly lepší výsledky než ostatní emulgátory, ale po 15 minutách se heřmánek ve všech zkumavkách vyvázal a na hladině vytvořil prstencovitý útvar. Drapala et al., (2015) popisuje, že lecitin zvyšuje stabilitu emulzí při zahřívání.

U testu stability prováděného ve zkumavkách Eppendorf bylo zjištěno, že nejlepší emulze vznikla u 5 % a 2,5 % DMSO. Dále homogenní emulze vyšla u 5 % T-20 a T-40. Nevýhoda těchto zkumavek byla, že heřmánek vytvořil hned po vzniku emulze prstencovitý útvar na hladině. Po 24 hodinách se ve všech zkumavkách hřebíček zcela vyvázal kromě zkumavky s DMSO, kde se na stěnách vytvořily skvrny.

Poslední metodou bylo zjišťováno, jaká je vliv cukerného roztoku na stabilitu emulze, kde po promísení emulze s pomerančovou silicí vznikla u všech vzorků homogenní emulze. Po 30 minutách se emulze zachovala stabilní u ethanolu, DMSO, Lecitinu S75 a Lecitinu super. Po 24 hod se u některých vzorků emulze vyvázala. Tento způsob vzniku emulze byl stabilnější než v předchozích metodách. Důvodem mohlo být, že při vzniku



emulze v cukerném roztoku byl použit tyčový mixer, který vynaložil vyšší energii k tvorbě emulze, než použití vortexu a sonikátoru. Ani pomocí ručního promíchání nevznikla tak stabilní emulze.

Výsledky této práce naznačují, že standardní metody emulzifikace při testech antimikrobiální aktivity za použití metody microdilution assay se zdají být nedostatečné pro zachování stability emulzí po dobu pokusu (zpravidla 24 hodin). Krom toho se ukázalo, že různé emulgátory mají velmi významný vliv na výsledky MIC i MBC antimikrobiálních látek lipofilní povahy, jako jsou silice. To je potřeba brát v potaz při modelování metodik pokusů, interpretaci i porovnávání výsledků.

## 9 Závěr

Z výsledku, které vyšly během této práce, lze zodpovědět na zadané výzkumné otázky. Samostatné emulgátory nemají výrazný vliv na růst testovaných bakterií. Po přidání rostlinných silic se testovalo, jaký vliv mají emulgátory na antimikrobiální aktivitu těchto silic. Z výsledků bylo zřejmé, že nejlepší inhibiční a baktericidní účinek vůči vybraným bakteriím vykazovala samotná skořice. Tymián vykazoval inhibiční a baktericidní účinek hlavně vůči bakterii *S. aureus*. *E. coli* byla částečně odolná vůči účinkům tymiánu. Hřebíček vykazoval částečné inhibiční i baktericidní účinky proti vybraným bakteriím a máta působila svými inhibičními i baktericidními účinky pouze na *S. aureus*. *E. coli* byla odolná vůči účinkům máty. Nejlepší inhibiční účinek i baktericidní účinek vykazovala skořice. Po přidání rostlinných silic ke vzorkům emulgátorů bylo vidět, jak byla antimikrobiální aktivita silic ovlivněna. U skořice měly emulgátory pozitivní vliv, a podporovaly její inhibiční i baktericidní účinnost. Ale u máty po smíchání s emulgátory, byla spíše její inhibiční i baktericidní účinek potlačen.

Dalším testováním bylo zjišťováno, jaký vliv mají vybrané emulgátory a jejich různé způsoby emulzifikace na stabilitu emulze. Metoda byla prováděna v tekutém médiu MHB a v cukerném roztoku. Z výsledků je patrné, že pro stabilitu a homogenitu emulze je nutné velké množství energie, které je možno použít ve větších objemech např. díky mixéru, ale v laboratorních testech v malých množstvích (zkumavky Eppendorf) je to problém.

V rámci metodiky microdilution assay jsou klasické metody emulzifikace neúčinné a může docházet k vyvazování emulze. Proto by byla potřeba metodiku modifikovat tak, aby se do tvorby emulze dalo více energie, a tím byla emulze stabilnější. Z toho vyplývá že by se emulze dělaly ve větším objemu nebo za použití nástrojů, které jsou schopné do malého množství emulze dodat velké množství energie.

Výsledky studie by mohly být využity k přípravě látek, které by se mohly podávat společně s antibiotiky. Díky inhibiční účinnosti rostlinných silic a některých emulgátorů, by mohly tyto látky více inhibovat růst a částečně reagovat na rezistenci bakterií vůči antibiotikům, která je stále aktuálnějším fenoménem. Dále by se emulgátory a rostlinné silice mohly využívat ve včelařství proti různým patogenům včel a celkově i ve veterinární medicíně.

## 10 Seznam použitelných zdrojů

1. ATTIA, Y.A., BAKHASHWAIN, A.A., BERTU, N.K., 2017. Thyme oil (Thyme vulgaris L.) as a natural growth promoter for broiler chickens reared under hot climate. *Italian Journal of Animal Science* 16(2), 275-282. DOI: 10.1080/1828051X.2016.1245594.
2. AUR, G., MEHTA, S.K., 2017. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. *International Journal of Pharmaceutics* 529(1-2), 134-160. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.06.059.
3. ARYAL, S., 2017. Mikrobiology info: Mueller-hinton agar MCHA composition, principle, uses and preparation. Microbiology.info [online]. 6. 10. 2017 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: <https://microbiologyinfo.com/mueller-hinton-agar-mha-compositionprinciple-uses-and-preparation/>.
4. BAKER, B.P., GRANT, J.A., 2008. *Cinnamon & Cinnamon Oil Profile. Active Ingredient Eligible for Minimum Risk Pesticide Use* [online]. [cit. 2023-2-22]. Dostupné z: <https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/56117/cinnamon-MRP-NYSIPM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
5. BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46(2), 446-475. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
6. BEDNÁŘ, M., SOUČEK, A., VÁVRA, J., 1994. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Triton. 226 s. ISBN 80-901521-4-7.
7. BEDNÁŘ, M. et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. 560 s. ISBN 80-238-0297-6.
8. BRAYTON, C.F., 1986. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet* [online]. 76(1), 61-90 [cit. 2023-4-24]. Dostupné z: <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=coo.31924053530501&view=1up&seq=79>
9. CÁCERES, M., HIDALGO, W., STASHENKO, E., TORRES, R., ORTIZ, C., 2020. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics* [online]. 9(4) [cit. 2023-4-26]. DOI: 10.3390/antibiotics9040147. ISSN 2079-6382. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/4/147>
10. COIMBRA, A., FERREIRA, S., DUARTE, A.P., 2022. Biological properties of Thymus zygis essential oil with emphasis on antimicrobial activity and food application. *Food Chemistry* [online]. 393 [cit. 2023-3-30]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133370. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814622013322>.

11. DRAPALA, K.P., AUTY, M.A.E., MULVIHILL, D.M., O'MAHONY, J.A., 2015. Influence of lecithin on the processing stability of model whey protein hydrolysate-based infant formula emulsions. *International Journal of Dairy Technology*. 68(3), 322-333. DOI: 10.1111/1471-0307.12256.
12. EL-HACK, M.E.A. et al., 2020. Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Oil as a Potential Alternative to Antibiotics in Poultry. *Plant-Derived Antibiotics* [online]. 9(5), 210 [cit. 2023-2-22]. Dostupné z: Antibiotics | Free Full-Text | Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Oil as a Potential Alternative to Antibiotics in Poultry (mdpi.com).
13. ESKANDANI, M., HAMISHEHKAR, H., EZZATI NAZHAD DOLATABADI, J., 2013. Cyto/Genotoxicity Study of Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween 20). *DNA and Cell Biology*. 32(9), 498-503. DOI: 10.1089/dna.2013.2059.
14. FIUME, Z., 2001. Final Report on the Safety Assessment of Lecithin and Hydrogenated Lecithin. *International Journal of Toxicology* [online]. 20(1\_suppl), 21-45 [cit. 2023-2-15]. DOI: 10.1080/109158101750300937. ISSN 1091-5818. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/109158101750300937>
15. GEORGE, F. et al., 2022. A Unique Enhancement of *Propionibacterium freudenreichii*'s Ability to Remove Pb(II) from Aqueous Solution by Tween 80 Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 23(16) [cit. 2023-2-16]. DOI: 10.3390/ijms23169207. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/16/9207>
16. GEORING, R.V., DOCKRELL, H.M., ZUCKERMAN, M., ROITT, I.M., CHIODINI, P.L., JULÁK, J., ed., 2016. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. Praha: TRITON. 568 s. ISBN 978-80-7387-928-0.
17. GREENWOOD, D., SLACK, R.C.B., PEUTHERE, J.F., , a kolektiv, 1999. *Lékařská Mikrobiologie*. Avicenum, Grada. 686 s. ISBN 80-7169-365-0.
18. HANIF, M.A., NISAR, S., KHAN, G.S., MUSHTAQ, Z., ZUBAIR, M., 2019. Essential Oils. *Essential Oil Research*. Cham: Springer International Publishing, 2019-06-08, 3-17. DOI: 10.1007/978-3-030-16546-8\_1.
19. HASSAN, A.S., 2014. The Antibacterial Activity of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) with and without of Some Ligand Complexes of the Transitional Metal Ions of Ethyl Coumarin against Bacteria Isolate from Burn and Wound Infection. *Journal of Natural Sciences Research*. 19(4), 426-435. DOI: 10.13140/RG.2.2.36692.40321
20. HERRO, E., JACOB, S.E., 2010. *Mentha piperita* (Peppermint). *Dermatitis*. 21(6), 327-329. DOI: 10.2310/6620.2011.10080.
21. HU, Q., ZHOU, M., WEI, S., 2018. Progress on the Antimicrobial Activity Research of Clove Oil and Eugenol in the Food Antisepsis Field. *Journal of Food Science*. 83(6), 1476-1483. DOI: 10.1111/1750-3841.14180

22. HURYCH, J., ŠTÍCHA, R., 2020. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Triton. 622 s. ISBN 978-80-7553-844-4.
23. CHAIEB, K. et al., 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*. 21(6), 501-506. DOI: 10.1002/ptr.2124.
24. CHAMBERS, S.T., PEDDIE, B., PITHIE, A., 2006. Ethanol disinfection of plastic-adherent micro-organisms. *Journal of Hospital Infection* 63(2), 193-196. DOI: 10.1016/j.jhin.2006.01.009.
25. CHOULIS, N.H., 2012. Miscellaneous drugs, materials, medical devices, and techniques. *A worldwide yearly survey of new data in adverse drug reactions and interactions*. Elsevier, 2012, 785-800. *Side Effects of Drugs Annual*. DOI: 10.1016/B978-0-444-59499-0.00049-0.
26. CHRISTAKI, E., BONOS, E., GIANNENAS, I., FLOROU-PANERI, P., 2012. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture* [online]. 2(3), 228-243 [cit. 2023-4-22]. DOI: 10.3390/agriculture2030228. ISSN 2077-0472. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2077-0472/2/3/228>.
27. INGRAM, L.O., 2008. Ethanol Tolerance in Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 9(4), 305-319. DOI: 10.3109/07388558909036741.
28. JOHNSON, J.R., RUSSO, T.A., 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad E coli". *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 139(3), 155-162. DOI: 10.1067/mlc.2002.121550.
29. KIRKWOOD, Z.I., MILLAR, B.C., DOWNEY, D.G., MOORE, J.E., 2018. Antimicrobial effect of dimethyl sulfoxide and N, N-Dimethylformamide on *Mycobacterium abscessus*: Implications for antimicrobial susceptibility testing. *International Journal of Mycobacteriology* [online]. 7(2) [cit. 2023-4-27]. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy\_35\_18. ISSN 2212-5531. Dostupné z: <http://www.ijmyco.org/text.asp?2018/7/2/134/234323>
30. KOLÁŘOVÁ, L., et al., 2020. *Obecná a klinická mikrobiologie*. Praha: Galén. 441 s. ISBN 978-80-7492-477-4.
31. KRMEČÍK, P., HONEJ, P., 2007. *Escherichia Coli*. *Biotox.cz* [online]. [cit. 2022-8-25]. Dostupné z: [http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/escherichia\\_coli.php](http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/escherichia_coli.php)
32. KRMEČÍK, P., KYSILKA, J., 2007. *Staphylococcus aureus*. *Biotox.cz* [online]. [cit. 2022-9-7]. Dostupné z: [http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/staphylococcus\\_aureus.php](http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/staphylococcus_aureus.php)
33. KUMAR PANDEY, V. et al., 2022. A comprehensive review on clove (*Caryophyllus aromaticus* L.) essential oil and its significance in the formulation of edible coatings for potential food applications. *Frontiers in Nutrition* [online]. 9 [cit. 2023-3-6]. DOI: 10.3389/fnut.2022.987674. ISSN 2296-861X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.987674/full>

34. LIST, G.R., 2015. Soybean Lecithin: Food, Industrial Uses, and Other Applications. *Polar Lipids*. Elsevier, 2015, 1-33 [cit. 2023-2-15]. DOI: 10.1016/B978-1-63067-044-3.50005-4.
35. MAHBOUBI, M., KAZEMPOUR, N., 20014. Chemical composition and antimicrobial activity of peppermint (*Mentha piperita* L.) *Essential oil*. Songklanakarin J. Sci. Technol [online]. 36(1), 83-87 [cit. 2023-2-19]. Dostupné z: <https://www.thaiscience.info/Journals/Article/SONG/10968285.pdf>
36. MCCLEMENTS, D.J., JAFARI, S.M., 2018. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 251, 55-79. DOI: 10.1016/j.cis.2017.12.001.
37. MOLLOY, M.P. et al., 2000. Proteomic analysis of the Escherichia coli outer membrane. *European Journal of Biochemistry*. 267(10), 2871-2881. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01296.x.
38. NABAVI, S. et al., 2015. Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients* [online]. 7(9), 7729-7748 [cit. 2023-3-30]. DOI: 10.3390/nu7095359. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/7/9/5359>
39. NIELSEN, C.K., KJEMS, J., MYGIND, T., SNABE, T., MEYER, R.L., 2016. Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media. *Frontiers in Microbiology* [online]. 7 [cit. 2023-2-17]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01878. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01878/full>
40. ORTEGA, E., ABRIOUEL, H., LUCAS, R., GÁLVEZ, A., 2010. Multiple Roles of Staphylococcus aureus Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. *Toxins* [online]. 2(8), 2117-2131 [cit. 2022-9-13]. DOI: 10.3390/toxins2082117. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/2/8/2117>
41. OZTURK, B., MCCLEMENTS, D.J., 2016. Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science* . 7, 1-6 DOI: 10.1016/j.cofs.2015.07.008.
42. PORŠOVÁ, M., PORŠ, J., KOLOMBO, I., PABIŠTA, R.P., 2006. Prostatický syndrom. *Urolog pro praxi* [online]. (1), 24-27 [cit. 2022-8-30]. Dostupné z: [https://www.urologiepropraxi.cz/artkey/uro-200601-0006\\_Prostaticky\\_syndrom.php](https://www.urologiepropraxi.cz/artkey/uro-200601-0006_Prostaticky_syndrom.php)
43. PRABUSEENIVASAN, S. et al, 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC complementary and alternative medicine* [online]. 6, 1–8. [cit. 2023-4-26]. Dostupné z: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-6-39>
44. QADRI, F., SVENNERHOLM, A.-M., FARUQUE, A.S.G., SACK, R.B., 2005. Enterotoxigenic Escherichia coli in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*. 18(3), 465-483. DOI: 10.1128/CMR.18.3.465-483.2005.

45. RADÜNZ, M. et al., 2019. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food Chemistry*. 276, 180-186 [cit. 2023-3-6]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.09.173
46. RAO, J., CHEN, B., MCCLEMENTS, D.J., 2019. Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods: Mechanisms of Action. *Annual Review of Food Science and Technology*. 10(1), 365-387. DOI: 10.1146/annurev-food-032818-121727.
47. ROSS, A., SHOFF, H.W., 2000. Staphylococcal Scalded Skin Syndrome. *StatPearls* [online]. [cit. 2023-4-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448135/>
48. RUIZ-DELGADO, G.J. et al., 2009. Dimethyl Sulfoxide-Induced Toxicity in Cord Blood Stem Cell Transplantation: Report of Three Cases and Review of the Literature. *Acta Haematologica*. 122(1), 1-5. DOI: 10.1159/000227267.
49. SEDLÁČEK, I., 2007. *Toxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita. 271 s. ISBN 80-210-4207-9.
50. SERDAROĞLU, M., ÖZTÜRK, B., KARA, A., 2015. An Overview of Food Emulsions: Description, Classification and Recent Potential Applications. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*. 3(6), 430-438. DOI: 10.24925/turjaf.v3i6.430-438.336
51. SHARIF, S., SINGH, M., KIM, S.J., SCHAEFER, J., 2009. Staphylococcus aureus Peptidoglycan Tertiary Structure from Carbon-13 Spin Diffusion. *Journal of the American Chemical Society*. 131(20), 7023-7030. DOI: 10.1021/ja808971c.
52. SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2. Praha: Grada Publishing. 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2.
53. SCHIWECK, H. et al., 2012. Sugar Alcohols. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. 2000-06-15 [cit. 2023-4-27]. DOI: 10.1002/14356007.o17\_o02. Dostupné z: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a25\\_413.pub3](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a25_413.pub3)
54. SCHWARTZBERG, L.S., NAVARI, R.M., 2018. Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting. *Advances in Therapy*. 35(6), 754-767. DOI: 10.1007/s12325-018-0707-z.
55. ŠILHÁNKOVÁ, L., 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 3. Praha: Academia. 364 s. ISBN 80-200-10124-6.
56. SOLEIMANI, M., ARZANI, A., ARZANI, V., ROBERTS, T.H., 2022. Phenolic compounds and antimicrobial properties of mint and thyme. *Journal of Herbal Medicine* [online]. 36 [cit. 2023-3-30]. DOI: 10.1016/j.hermed.2022.100604. ISSN 22108033. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210803322000732>
57. ŠTEFÁNEK, J., 2010. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. Praha: UK [cit. 2022-8-30]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/>

58. TÁBORSKÁ, J., 2009. Syndrom toxického šoku. *Interní medicína pro praxi* [online]. 11(9), 405-409 [cit. 2023-2-3]. Dostupné z: [https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200909-0009\\_Syndrom\\_toxickeho\\_soku.php](https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200909-0009_Syndrom_toxickeho_soku.php).
59. THIELMANN, J., MURANYI, P., KAZMAN, P., 2019. Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon* [online]. 5(6) [cit. 2023-4-26]. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01860. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844019314203>
60. VAN NIEUWENHUYZEN, W., 1976. Lecithin production and properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 53(6Part2), 425-427. DOI: 10.1007/BF02605737.
61. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
62. VOTAVA, M., 2010. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 978-80-86850-04-8.
63. YOLANDA, H. et al., 2022. Selection of an Appropriate In Vitro Susceptibility Test for Assessing Anti-*Pythium insidiosum* Activity of Potassium Iodide, Triamcinolone Acetonide, Dimethyl Sulfoxide, and Ethanol. *Journal of Fungi* [online]. 8(11) [cit. 2023-2-13]. DOI: 10.3390/jof8111116. ISSN 2309-608X. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2309-608X/8/11/1116>
64. ZHANG, H., DUDLEY, E.G., HARTE, F., SCHAFFNER, D.W., 2017. Critical Synergistic Concentration of Lecithin Phospholipids Improves the Antimicrobial Activity of Eugenol against *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 83(21), e01583-17 [cit. 2023-2-15]. DOI: 10.1128/AEM.01583-17. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01583-17>



## 11 Seznam tabulek

Tab. 1 Příprava emulgátorů.....	29
Tab. 2 Příprava emulgátorů.....	32
Tab. 3 Příprava emulgátorů.....	33
Tab. 4 Příprava emulgátorů.....	34
Tab. 5 Inhibiční procento <i>E. coli</i> v 10 % roztoku emulgátorů .....	35
Tab. 6 Inhibiční procento <i>S. aureus</i> v 10 % roztoku emulgátorů .....	36
Tab. 7 Míra inhibice vybraných rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči <i>E. coli</i> .....	37
Tab. 8 Míra inhibice vybraných rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči <i>S. aureus</i> .....	37
Tab. 9 Míra inhibice 5 % roztoku T-20 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>S. aureus</i> .....	39
Tab. 10 Míra inhibice 5 % roztoku T-20 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>E. coli</i> .....	39
Tab. 11 Míra inhibice 5 % roztoku T-80 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>S. aureus</i> .....	40
Tab. 12 Míra inhibice 5 % roztoku T-80 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>E. coli</i> .....	40
Tab. 13 Míra inhibice 5 % roztoku DMSO s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>S. aureus</i> .....	41
Tab. 14 Míra inhibice 5 % roztoku DMSO s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>E. coli</i> .....	41
Tab. 15 Míra inhibice 5 % roztoku Ethanol s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>S. aureus</i> .....	42
Tab. 16 Míra inhibice 5 % roztoku Ethanol s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>E. coli</i> .....	42

## 12 Seznam obrázků

Obr. 1: Použitá média.....	27
Obr. 2 Chladnutí MHA ve Flowboxu.....	28
Obr. 3 Připravená Petriho miskách MHA .....	28
Obr. 4 Kultura <i>S. aureus</i> .....	28
Obr. 5 Kultura <i>E. coli</i> .....	28
Obr. 6 Připravená destička k MBC .....	31
Obr. 7 Ukázka, jak vypadá hotové MBC po 24 hodinové inkubaci .....	31
Obr. 8 Ruční protřepání.....	43
Obr. 9 Ruční protřepání po 15 min .....	43
Obr. 10 Ruční protřepání po 24 h .....	43
Obr. 11 Promíchání ve vortexu.....	43
Obr. 12 Promíchání ve vortexu po 15 min .....	43
Obr. 13 Promíchání ve vortexu po 24 hod .....	43
Obr. 14 Sonikace .....	44
Obr. 15 Sonikace po 15 min .....	44
Obr. 16 Sonikace po 24 h .....	44
Obr. 17 Ruční protřepání.....	45
Obr. 18 Ruční protřepání po 15 min .....	45
Obr. 19 Ruční protřepání po 24 h .....	45
Obr. 20 Promíchání ve vortexu.....	45
Obr. 21 Promíchání ve vortexu po 15 min .....	45
Obr. 22 Promíchání ve vortexu po 24 h .....	45
Obr. 23 Sonikace .....	45
Obr. 24 Sonikace po 15 min .....	45
Obr. 25 Sonikace po 24 h .....	45
Obr. 26 Ruční protřepání.....	46
Obr. 27 Ruční protřepání po 15 min .....	46
Obr. 28 Ruční protřepání po 24 h .....	46
Obr. 29 Promíchání ve vortexu.....	46
Obr. 30 Promíchání ve vortexu po 15 min .....	46
Obr. 31 Promíchání ve vortexu po 24 h .....	46
Obr. 32 Sonikace .....	46
Obr. 33 Sonikace po 15 min .....	46
Obr. 34 Sonikace po 24 h .....	46
Obr.36 Ruční protřepání .....	47
Obr. 37 Ruční protřepání po 15 min .....	47
Obr. 38 Ruční protřepání po 24 h .....	47
Obr. 39 Promíchání ve vortexu.....	47
Obr. 40 Promíchání ve vortexu po 15 min .....	47
Obr. 41 Promíchání ve vortexu po 24 h .....	47
Obr. 42 Sonikace .....	48
Obr. 43 Sonikace po 15 min .....	48
Obr. 44 Sonikace po 24 h .....	48
Obr. 45 Ruční protřepání.....	48
Obr. 46 Ruční protřepání po 15 min .....	48
Obr. 47 Ruční protřepání po 24 h .....	48

Obr. 48 Promíchání ve vortexu Ruční protřepání .....	49
Obr. 49 Promíchání ve vortexu po 15 min .....	49
Obr. 50 Promíchání ve vortexu po 24 h .....	49
Obr. 51 Sonikace .....	49
Obr. 52 Sonikace po 15 min .....	49
Obr. 53 Sonikace po 24 h .....	49
Obr. 54 Emulze vzniklá pomocí vortexu.....	50
Obr. 55 Emulze vzniklá pomocí vortexu po 24 h .....	50
Obr. 57 T-20 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min.....	51
Obr. 58 T-20 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h.....	51
Obr. 59 T-40 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru .....	51
Obr. 60 T-20 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min.....	51
Obr. 61 T-20 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h.....	51
Obr. 62 T-80 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru .....	51
Obr. 63 T-80 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min.....	51
Obr. 64 T-80 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h.....	51
Obr. 65 LS v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru.....	52
Obr. 66 LS v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min .....	52
Obr. 67 LS v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h .....	52
Obr. 68 L-75 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru .....	52
Obr. 69 L-75 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min .....	52
Obr. 70 L-75 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h.....	52
Obr. 71 DMSO v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru .....	52
Obr. 72 DMSO v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min.....	52
Obr. 73 DMSO v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h.....	52
Obr. 74 Ethanol v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru .....	52
Obr. 75 Ethanol v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min.....	52
Obr. 76 Ethanol v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h.....	52

### 13 Seznam zkratek

DMSO	dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIHC	enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ETEC	enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
LS	lecitin super
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MHA	Mueller – Hinton agar
MHB	Mueller – Hinton broth
MIC	minimální inhibiční koncentrace
SE	stafylokokové enterotoxiny
T-20	tween 20
T-40	tween 40
T-80	tween 80
TL	termolabilní enterotoxin
TS	termostabilní enterotoxin