



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, PhD.

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 7.8. 2023

Podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce panu Ing. Marianu Hýblovi, PhD., 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 způsoby emulzifikace na stabilitu emulze.

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

V metodické části této práce jsou znázorněny postupy přípravy emulgátorů, rostlinných silic a stanovení jejich minimální inhibiční a baktericidní koncentrace. Tato stanovení byla prováděna v 96 jamkových mikrotitračních 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.

Celkem bylo testováno 5 rostlinných silic a 7 druhů emulgátorů. Samostatné emulgátory neměly výrazný antibakteriální účinek. Z testovacích rostlinných silic byla vůči oběma patogenům nejúčinnější skořice. Naopak nejnižší antimikrobiální efekt vykazovala silice máty peprné.

V případě kombinace silice s emulgátory vykazoval nejvyšší antimikrobiální aktivitu emulgátor DMSO, který antimikrobiální aktivitu rostlinných silic ve většině případů zvyšoval. Ostatní emulgátory antimikrobiální aktivitu silic spíše snižovaly.

Při stanovení stability emulzí bylo zjištěno, že běžně užívané laboratorní metody emulgace jsou nedostačující. Pro tvorbu stabilní a homogenní emulze je nutné vyvinout podstatě vyšší množství energie, než běžně užívané metody umožňují.

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.

A total of 5 plant extracts and 7 types of emulsifiers were tested. Individual emulsifiers did not exhibit a significant antibacterial effect. Among the tested plant extracts, cinnamon was the most effective against both pathogens. On the other hand, peppermint oil showed the lowest antimicrobial effect.

Regarding the combination of plant extracts with emulsifiers, emulsifier DMSO showed the highest antimicrobial activity, which enhanced the antimicrobial effectiveness of the plant extracts in most cases. Other emulsifiers tended to reduce the antimicrobial activity of the extracts.

During the determination of emulsion stability, it was found that commonly used laboratory emulsification methods were insufficient. To create a stable and homogeneous emulsion, it is necessary to apply a significantly higher amount of energy than conventional methods allow.

Key words

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

Obsah

1	Úvod	9
2	Escherichia Coli	10
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	Rozdělení enteropatogenních kmenů	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
3	Staphylococcus aureus	15
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
4	Emulgátory	19
4.1	Dimethylsulfoxid (DMSO).....	19
4.2	Lecitin.....	20

4.3	Tween	20
4.3.1	Tween 20	21
4.3.2	Tween 40	21
4.3.3	Tween 80	21
4.4	Ethanol	21
4.5	Stabilita emulze	22
5	Rostlinné silice	23
5.1	Máta peprná	23
5.2	Skořice	23
5.3	Tymián	24
5.4	Hřebíček	24
6	Cíl práce	26
7	Materiál a metodika	27
7.1	Zkoumané látky	27
7.2	Vybavení a přístroje	28
7.3	Kultivace bakterií	28
7.3.1	Mueller–Hinton agar (MHA)	28
7.3.1.1	Příprava Mueller–Hinton broth (MHB)	29
7.3.1.2	Příprava kultivačních misek obsahující Muller–Hinton agar (MHA)	29
7.3.2	Příprava kultur Staphylococcus aureus a Escherichia coli	30
7.4	Stanovení MIC	31
7.4.1	Stanovení minimální inhibiční koncentrace 10, 5, 2,5 a 1,25 % roztoků emulgátorů	31
7.4.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace 5 % roztoků emulgátorů s přídatkem rostlinných silic a rostlinných silic samotných	32
7.4.3	Měření připravených destiček	33
7.5	Stanovení MBC	34
7.6	Stabilita emulze	35
7.6.1	Stabilita emulze ve skleněných zkumavkách	35
7.6.2	Stabilita emulze ve zkumavkách Eppendorf	36
7.6.3	Stabilita emulze v cukerném roztoku	37
8	Výsledky	38

8.1	Stanovení minimální inhibiční koncentrace 10, 5, 2,5 a 1,25 % roztoků emulgátorů	38
8.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace samostatných rostlinných silic	40
8.3	Stanovení minimální inhibiční koncentrace 5 % emulgátorů s přidavkem rostlinných silic	41
8.4	Stabilita emulze v kultivačním médiu	45
8.4.1	Stabilita emulze ve skleněných zkumavkách	45
8.4.1.1	Tween 20	45
8.4.1.2	Tween 80	47
8.4.1.3	Lecitin	48
8.4.1.4	DMSO	49
8.4.1.5	Ethanol	51
8.4.2	Stabilita emulze ve zkumavkách Eppendorf	52
8.4.3	Stabilita emulze v cukerném roztoku	53
9	Diskuse	56
10	Závěr	60
11	Seznam použité literatury	61
12	Seznam tabulek	67
13	Seznam obrázků	68
14	Seznam zkratk	70

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.

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 u 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 μm a široká 0,6 μm (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. Poslední 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, methylčerveně 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 a díky jejich kombinací vzniká 240 sérotypů. Kapsulární antigeny, 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 i zvířata a způsobují septické infekce a průjmová 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 Rozdělení enteropatogenních kmenů

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 epiteliárních buněk tenkého střeva. Po navázání dochází k endocytóze toxinu a následně 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, močového měchýře či 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 ze životosprávy nebo po pohlavním styku (Schindler, 2014). Onemocnění je ve většina 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).

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 fágem, 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 vysycháním a také vyšším teplotám, například kolem 60 °C. Je odolný vůči některým dezinfekčním prostředkům, zejména fenolu a sloučeninám rtuti. Působením alkoholu, zvláště ve vyšších koncentracích, je bakterie spíše konzervována než hubena. V selektivních médiích se používají lithné, glycinové a telluričitany, 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*. Tvoří součást 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. Významný faktor vedoucí ke vzniku infekce může být chirurgický zákrok, úraz, zavedený katetr, diabetes, maligní onemocnění nebo imunologická nedostatečnost. Nejvíce ohroženou skupinou jsou nedonošení 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 za vznik 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 patří nejčastěji impetigo, folikulitida a furunkl. Dále je nejčastějším původcem hnisání ran, které ke vzniku infekce obvykle potřebuje, aby v ráně zůstalo cizí těleso, jako 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, které 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 se širokou škálou organických rozpouštědel i 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). Nerozpustné látky ve vodě, kupříkladu terapeutické a toxické látky, jsou často rozpustné právě 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 sloučenin, které za normálních podmínek by neprošly (Hassan, 2014).

4.2 Lecitin

Lecitin je směsí tuků, které se přirozeně vyskytují 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 žloutků a různých olejnin jako jsou lněný olej, kukuřičné 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 (-CH₂CH₂O-) skupin nalezených v molekule (Schiweck, 2012).

Tweeny jsou velmi často nepoužívané povrchově aktivní látky. Považují se za netoxické a nedráždivé látky. 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 40

Je biokompatibilní neiontová povrchově aktivní látka. Používá se jako účinný solubilizátor ve farmaceutickém průmyslu (Najar et al., 2017).

4.3.3 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 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 materiálu. 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 důsledku různých fyzikálně-chemických mechanismů a 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 přenáší skrz potraviny včetně gram-pozitivních a gram-negativních patogenům (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 proti průjmové 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 grampozitivních a gramnegativních bakterií (Nabavi et al., 2015).

5.3 Tymián

Tymián je známá léčivá rostlina, která se po celém světě využívá jako koření. Obsahuje éterické oleje se silicemi uloženými v mnoha žlázkách této rostliny. Tyto oleje se uvolňují, když jsou 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, které se používají 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 byla popsána antibakteriální a antifungální aktivita tymiánu proti různým patogenům. Podle několika 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 Ebole. 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 Cíl práce

Cílem práce je ověření vlivu vybraných emulgátorů a způsobů emulzifikace na stabilitu emulze a testování vlivů emulgátorů na růst vybraných bakterií.

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?

7 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.

7.1 Zkoumané látky

Celkem bylo testováno 5 rostlinných silic a 7 druhů emulgátorů. Všechny rostlinné oleje a emulgátory byly zakoupeny od firmy 1. Aromaterapeutické KH a.s. Všechny zkoumané látky byly uchovávány v chladícím boxu s teplotou okolo 2 °C.

Byly testovány dva kmeny bakterií, gram negativní *E. coli* CCM 4517 a gram pozitivní *S. aureus* CCM 4516, které byly pořízeny z České sbírky mikroorganismů v Brně. Bakterie byly uchovávány při teplotě -80 °C.

Seznam vybraných emulgátorů:

- Tween 20
- Tween 40
- Tween 80
- DMSO
- Lecitin super – Olejovitá kapalina slabě žluté barvy
- Lecitin – 75 - Jedná se o lecitin ve formě bílého prášku
- Ethanol

Seznam vybraných rostlinných silic:

- Skořice
- Máta
- Tymián
- Hřebíček
- Heřmánek modrý
- Pomeranč

7.2 *Vybavení a přístroje*

Vybavení:

- Plastové Petriho misky
- Laboratorní sklo (odměrný válec, malé i velké kádinky, Erlenmeyerovy baňky)
- Očkovací kličky
- 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem
- Skleněné zkumavky s kovovým víkem
- Eppendorfovy zkumavky
- Zkumavky Falcon
- Automatické pipety
- Multikanálové pipety
- Špičky na pipety

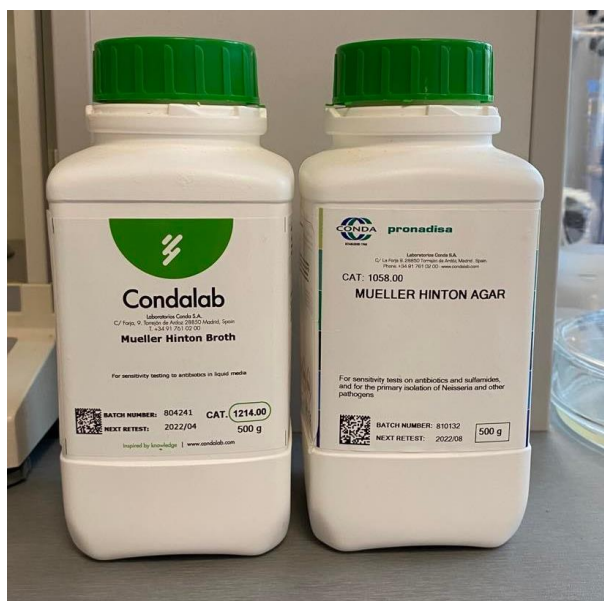
Přístroje:

- Analytické váhy Boeco Germany BBI-41
- Velp scietifica Vortex
- Ultrazvukový sonikátor Tesla
- Spektrofotometr
- Flowbox Telstat
- Termostat Scholler
- Denzitometr McFarland typ DEN-1

7.3 *Kultivace bakterií*

7.3.1 *Mueller–Hinton medium (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

7.3.1.1 Příprava Mueller–Hinton broth (MHB)

MHB se používal jako medium, na kterém se testovaly MIC bakterií a rostlinných silic.

Příprava:

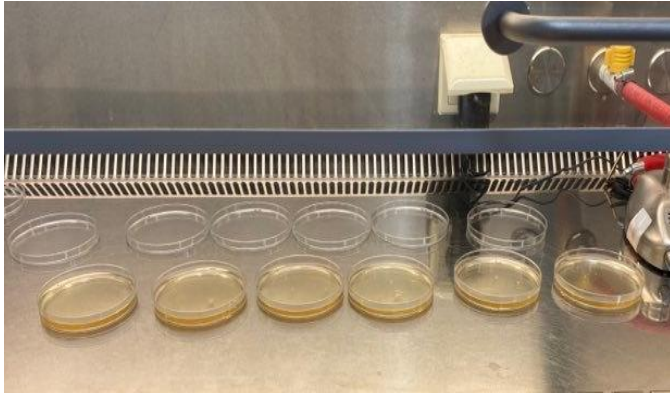
Na analytických vahách se na navažovací lodičku navážilo 4,2 g MHB. Poté se převedla navážka do 200 ml skleněné láhve se šroubovacím uzávěrem. K navážce se přidalo odměrným válcem 200 ml destilované vody a roztok se poté důkladně promíchal. Takto připravený MHB byl následně vysterilizován pomocí tlakového hrnce po dobu 45 minut.

Takto vysterilizovaný roztok MHB se poté mohl použít v laboratoři.

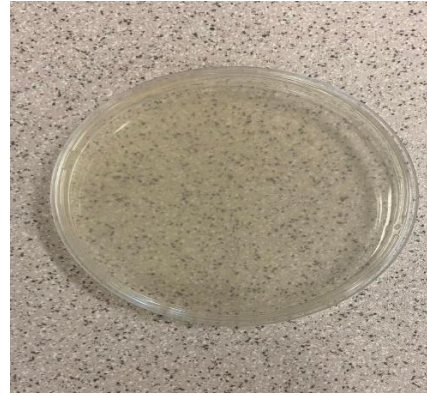
7.3.1.2 Příprava kultivačních misek obsahující Muller–Hinton agar (MHA)

MHA se používal ke kultivaci bakterií a byla na něm testována MHB bakterií a rostlinných silic.

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.



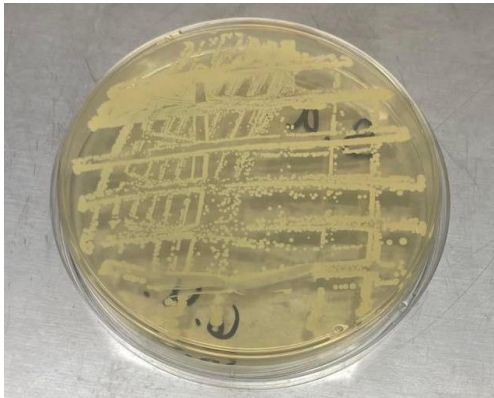
Obr. 2 Chladnutí MHA ve Flowboxu



Obr. 3 Připravená Petriho miskách MHA

7.3.2 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*

7.4 Stanovení MIC

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.

Test pro MIC byl prováděn na mikrotitračních 96 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.

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.

7.4.1 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

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

Stanovení MIC:

Byly připraveny mikrotitrační 96 jamkové destičky, které se rozdělily do dvanácti sloupců a do osmi řádků označených písmeny od A do H. Do všech řad, kromě první,

bylo napipetováno 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 čtyřech 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 a H byly použity jako negativní a pozitivní kontrola, kde nebyla přítomna žádná koncentrace emulgátorů.

7.4.2 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 doplněny 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 jamkové destičky. Destičky byly rozděleny do dvanácti sloupců a do osmi řádků označených písmeny od A do H. Do všech řad, kromě první, se napipetovalo 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 promíchalo. Tento postup se opakoval až do řady F. Řady 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 a H byly použity jako negativní a pozitivní kontrola, kde nebyla přítomna žádná koncentrace emulgátorů.

7.4.3 Měření připravených destiček

Destičky byly poté změřeny na spektrofotometru o vlnové délce 405 nm. Destičky se nechaly 24 hodin inkubovat při teplotě 37 °C. Po 24 hodinách byly destičky opět změřeny ve spektrofotometru. Ze změřených hodnot optické denzity (OD) byla vypočítána procentuální inhibice bakterií a rostlinných silic.

Vypočet procentuální inhibice:

$$\text{Inhibice v \%} = \frac{100 - [A1 - A0] - \text{neg.c.}}{(\text{poz.c.} - \text{neg.c.})} * 100$$

A1 hodnota absorbance po 24h

A0 hodnota absorbance před kultivací

Neg.c. hodnota absorbance u negativní kontroly

Poz.c. hodnota absorbance u pozitivní kontroly

Pro lepší interpretaci byly výsledky rozděleny do 3 kategorií:

<50 % nemá inhibiční účinek

50–75 % dobrý inhibiční účinek

75-100 % výrazný inhibiční účinek

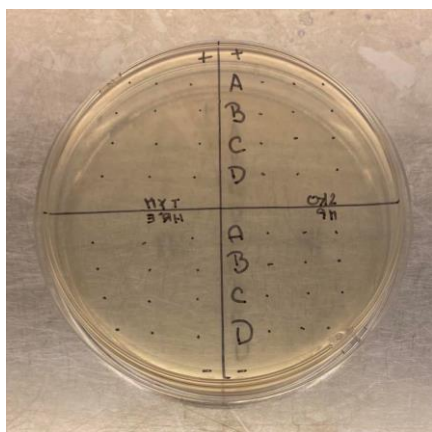
7.5 Stanovení MBC

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

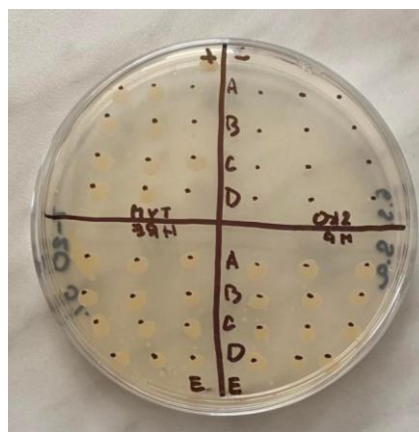
Test pro MBC byl prováděn na Petriho miskách obsahující MHA. MBC se testovalo u vybraných emulgátorů a rostlinných silic.

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 fixy 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 byly ke každé koncentraci, vyznačené na destičce, předkresleny tři tečky.

Pomocí očkovací kličky byl přibližně 1 μ 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 24hodinové inkubaci

Vyhodnocení:

MBC se hodnotilo na Petriho miskách pouhým okem. U emulgátoru nebo rostlinné silice, která vykazovala baktericidní účinek, neměla na Petriho misce nárůst bakterií. Naopak u emulgátorů a silice, která nebyla odolná vůči bakteriím, byl nalezen nárůst na Petriho misce.

7.6 Stabilita emulze

Stabilita emulze byla testována na tekutém médiu MHB. Test pro stanovení emulze jsme prováděli ve třech různých nádobách: skleněné zkumavky, Eppendorfové zkumavky a Zkumavky Falcon.

Pro první test stability emulze byly použity zkumavky Eppendorf. Po vyhodnocení bylo zjištěno, že k tvorbě stabilní emulze musí být použito větší množství vzorku. K většímu objemu byly použity skleněné zkumavky s uzávěrem.

Pro doplnění byla provedena stabilita emulze v cukerném roztoku. Tato emulze byla po sléze využita jako krmivo pro včely.

Tab. 2 Přehled použitých emulgátorů u různých metod

Emulgátory	Provedení		
	Skleněné zkumavky	Zkumavky Eppendorf	Zkumavky Falcon
Tween – 20	x	x	x
Tween – 40		x	x
Tween – 80	x	x	x
Lecitin Super	x		x
Lecitin – 75			x
DMSO	x	x	x
Ethanol	x		x

7.6.1 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. Vortexování a 15 min sonifikace

Tab. 3 Příprava emulgátorů

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

7.6.2 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 doplněny 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 zdokumentována vzniklá emulze. Po 24 hodinách byly emulze vyhodnoceny znovu.

Tab. 4 Příprava emulgátorů

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

7.6.3 *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 vzniklé roztoky byly přelity zpět do zkumavek a byly vyhodnoceny. Tento postup byl použit pro všechny vzorky. Po 24 hodinách byly zkumavky opětovně zhodnoceny.

Tab. 5 Příprava emulgátorů

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

8 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 emulgátorů a rostlinných silic
- Samostatné rostlinné silice

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

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

Tab. 6 Inhibiční procento *E. coli* v 10 % roztoku emulgátorů

Koncentrace	T-20		T-80		LS		DMSO	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	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 %.

Tab. 7 Inhibiční procento *S. aureus* v 10 % roztoku emulgátorů

Koncentrace	T20		T80		LS		DMSO	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	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 nezabíjí. 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 % (viz Tab. 6). Dále vykazovaly inhibiční účinek T-80 a DMSO vůči *E. coli*. Oba emulgátory inhibovaly v rozmezí 50-75 % (viz Tab. 5). Dle výsledků MBC bakterií neusmrcuje žádný z emulgátorů ani při koncentraci 10 %.

8.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace samostatných rostlinných silic

Tab. 8 Míra inhibice vybraných rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči *E. coli*

Koncentrace	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. 9 Míra inhibice vybraných rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči *S. aureus*

Koncentrace	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 skořice 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).

8.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace 5 % emulgátorů s přidavkem rostlinných silic

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

Koncentrace	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. 11 Míra inhibice 5 % roztoku T-20 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii *E. coli*

Koncentrace	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 ani baktericidní účinky. 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 měl MIC a MBC 2000 ppm. Určitá inhibiční koncentrace byla pozorována o řád níže u 1000 ppm, nicméně pouze v rozmezí 50-75 %. (viz Tab. 9).

U *E. coli* nevykazovala tymiánová, mátová ani hřebíčková silice v kombinaci s T-20 inhibiční ani baktericidní účinky. Skořice měla MIC 125 ppm a MBC 500 ppm (viz Tab. 10).

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

Koncentrace	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. 13 Míra inhibice 5 % roztoku T-80 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii *E. coli*

Koncentrace	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 mátová ani hřebíčková silice v kombinaci T-80 inhibiční ani baktericidní účinky. 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 vyvážal a vzniklo zakalení, který spektrofotometr vyhodnotil špatně (viz Tab. 11).

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

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

Koncentrace	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. 15 Míra inhibice 5 % roztoku DMSO s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii *E. coli*

Koncentrace	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 ani 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 měl MIC a MBC 2000 ppm. Určitá inhibiční koncentrace byla pozorována o řád níže u 1000 ppm, nicméně pouze v rozmezí 50-75 %. (viz Tab. 13).

U *E. coli* nevykazovala máťová silice v kombinaci s DMSO inhibiční ani 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 (viz Tab. 14).

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

Koncentrace	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. 17 Míra inhibice 5 % roztoku Ethanol s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii *E. coli*

Koncentrace	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:

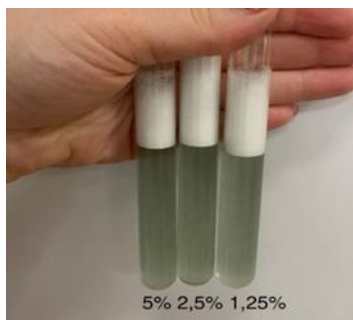
U *S. aureus* nevykazovala máťová silice v kombinaci s ethanolem inhibiční ani baktericidní účinky. Skořice měla MIC a MBC 1000 ppm. Nicméně byl pozorován inhibiční efekt v rozmezí 50–75 % i u koncentrace 500 ppm. Tymián vykazoval MIC a MBC 1000 ppm, Hřebíček měl MIC a MBC 2000 ppm. Určitá inhibiční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

U *E. coli* nevykazovala máťová a tymiánová silice v kombinaci s DMSO inhibiční ani 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 (viz Tab. 16).

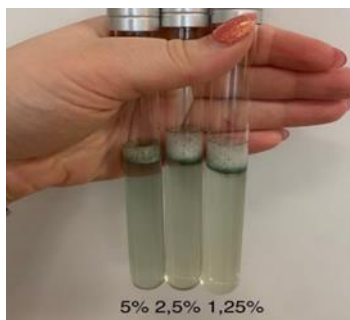
8.4 Stabilita emulze v kultivačním médiu

8.4.1 Stabilita emulze ve skleněných zkumavkách

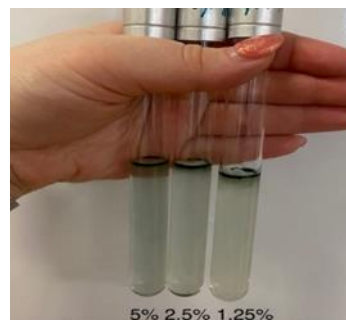
8.4.1.1 Tween 20



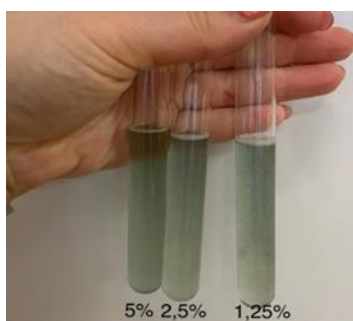
Obr. 8 Ruční protřepání



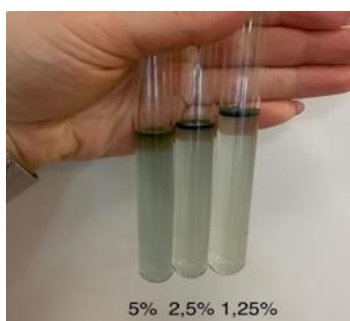
Obr. 9 Ruční protřepání po 15 min



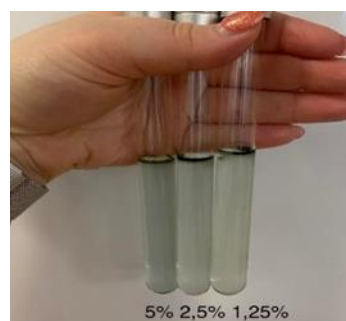
Obr. 10 Ruční protřepání po 24 h



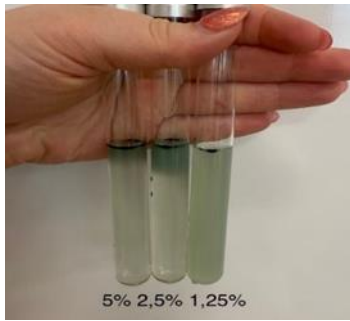
Obr. 11 Promíchání ve vortexu



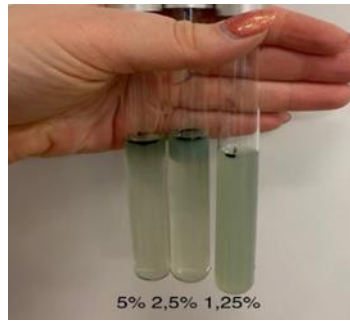
Obr. 12 Promíchání ve vortexu po 15 min



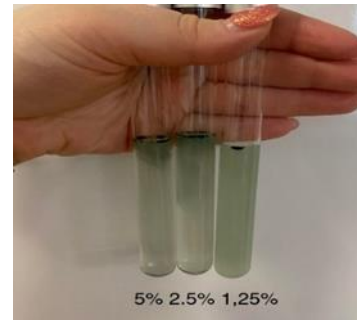
Obr. 13 Promíchání ve vortexu po 24 h



Obr. 14 Sonikace



Obr. 15 Sonikace po 15 min



Obr. 16 Sonikace po 24 h

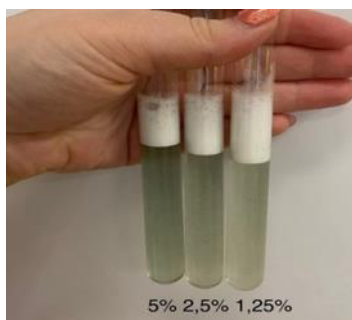
Vyhodnocení:

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

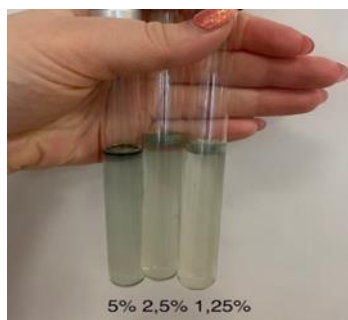
Emulze u T-20, která vznikla pomocí vortexu, nebyla stabilní. Přidaný heřmánek se v koncentraci 2,5 % a 1,25 % začal postupně vyvazovat (viz Obr 11). Po 15 minutách se heřmánek zcela vyvázal ve všech koncentracích emulgátoru a vytvořil na hladině prstencovitý útvar (viz Obr. 12). Po 24 hodinách vypadaly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

Emulze vzniklá pomocí sonikace byla nejvíce stabilní při koncentraci 1,25 %. U koncentrace 5 % a 2,5 % se heřmánek vyvázal pod hladinu (viz Obr. 14). Po 15 minutách vypadaly emulze stejně jako na Obr. 8 (viz 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 (viz Obr. 16).

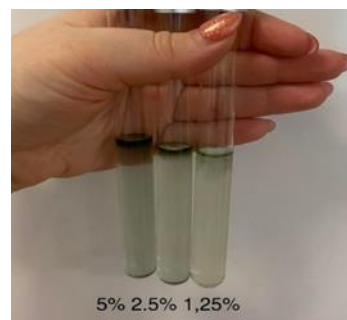
8.4.1.2 Tween 80



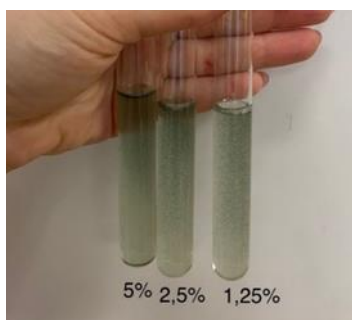
Obr. 17 Ruční protřepání



Obr. 18 Ruční protřepání po 15 min



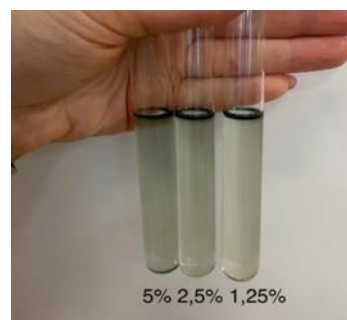
Obr. 19 Ruční protřepání po 24 h



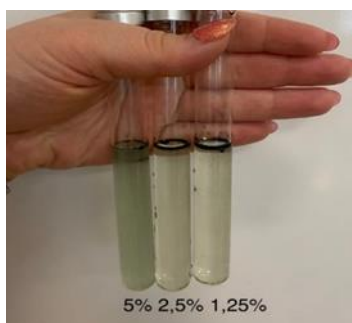
Obr. 20 Promíchání ve vortexu



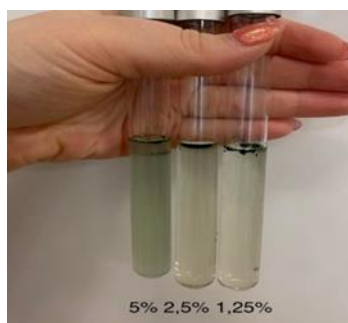
Obr. 21 Promíchání ve vortexu po 15 min



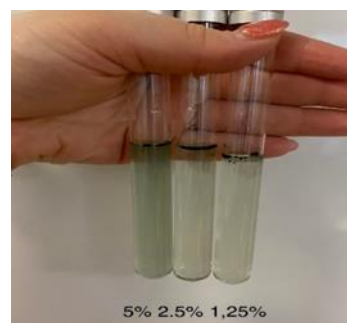
Obr. 22 Promíchání ve vortexu po 24 h



Obr. 23 Sonikace



Obr. 24 Sonikace po 15 min



Obr. 25 Sonikace po 24 h

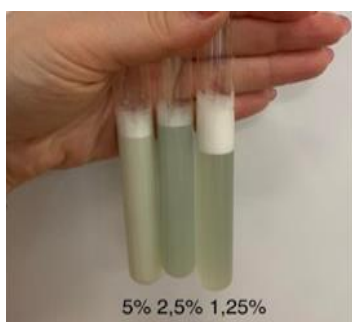
Vyhodnocení:

Ručním protřepáním nám vznikla stabilní emulze a nad hladinou se vytvořila pěna (viz 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. (viz Obr. 18). Po 24 hodinách se heřmánek zcela vyvázal u všech koncentrací (viz Obr. 19)

Emulze u T-80, která vznikla pomocí vortexu nebyla stabilní. Přidaný heřmánek se ve všech koncentracích začal postupně vyvazovat (viz Obr. 20). Po 15 minutách se heřmánek zcela vyvázal a vytvořil na hladině prstenčitý útvar (viz Obr. 21). Po 24 hodinách vypadaly emulze stejně jako na Obr. 21 (viz 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 (viz Obr. 23). Po 15 minutách se heřmánek více vyvázal u koncentrace 5 % (viz Obr. 24). Po 24 hodinách vypadaly emulze stejně jak na Obr. 18 (viz Obr. 25).

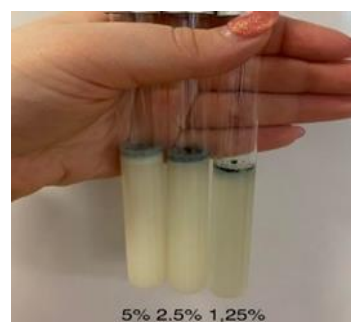
8.4.1.3 Lecitin



Obr. 26 Ruční protřepání



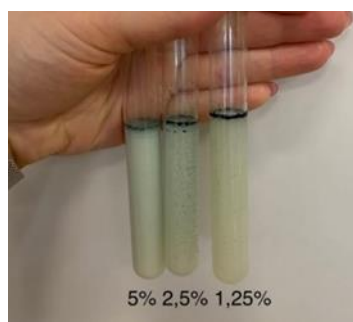
Obr. 27 Ruční protřepání po 15 min



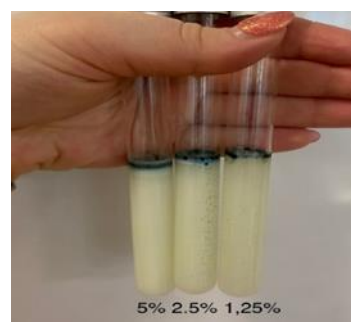
Obr. 28 Ruční protřepání po 24 h



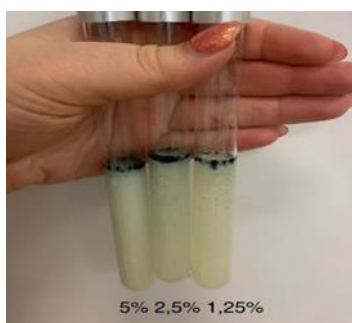
Obr. 29 Promíchání ve vortexu



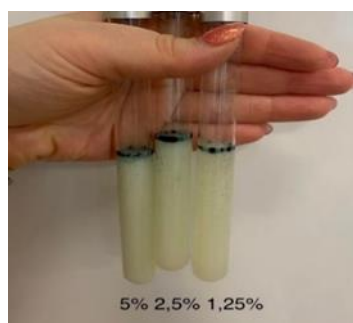
Obr. 30 Promíchání ve vortexu po 15 min



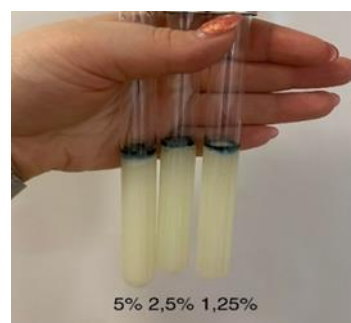
Obr. 31 Promíchání ve vortexu po 24 h



Obr. 32 Sonikace



Obr. 33 Sonikace po 15 min



Obr. 34 Sonikace po 24 h

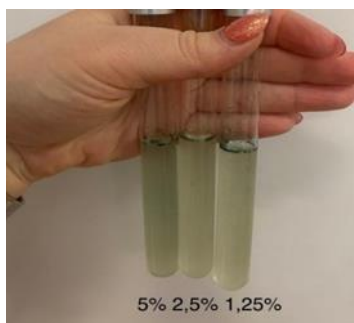
Vyhodnocení:

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

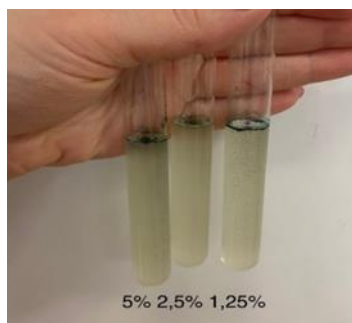
Emulze vzniklá pomocí vortexu byla částečně stabilní (viz Obr. 29). Po 15 minutách se heřmánek částečně vyvázal a vytvořil na hladině prstencovitý útvar (viz Obr. 30). Po 24 hodinách se heřmánek zcela vyvázal (viz Obr. 31).

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

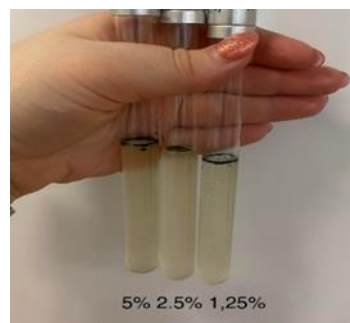
8.4.1.4 DMSO



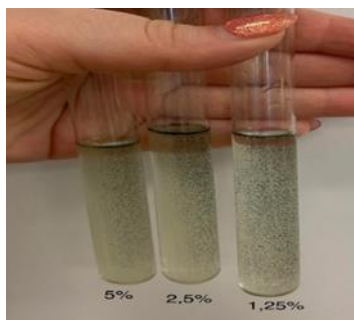
Obr.35 Ruční protřepání



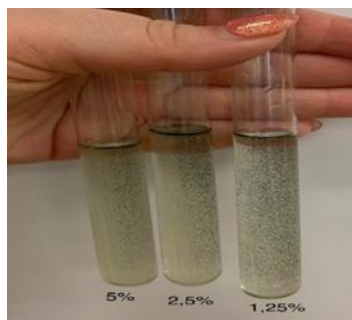
Obr. 36 Ruční protřepání po 15 min



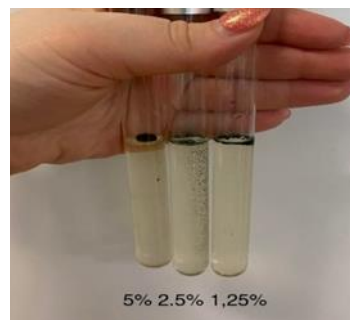
Obr. 37 Ruční protřepání po 24 h



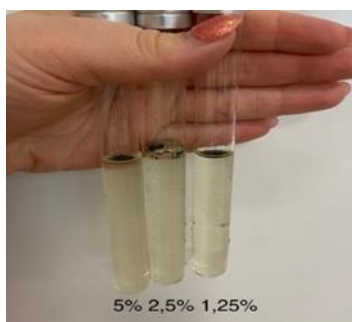
Obr. 38 Promíchání ve vortexu



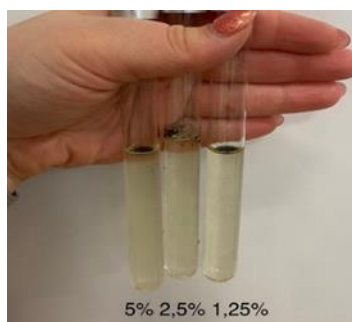
Obr. 39 Promíchání ve vortexu po 15 min



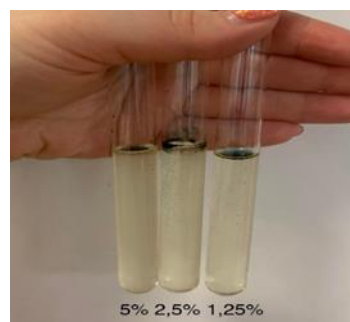
Obr. 40 Promíchání ve vortexu po 24 h



Obr. 41 Sonikace



Obr. 42 Sonikace po 15 min



Obr. 43 Sonikace po 24 h

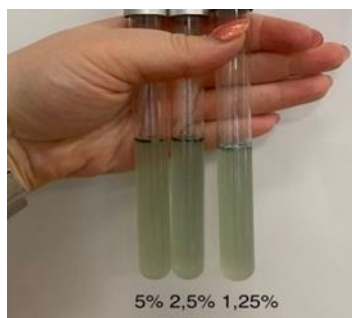
Vyhodnocení:

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

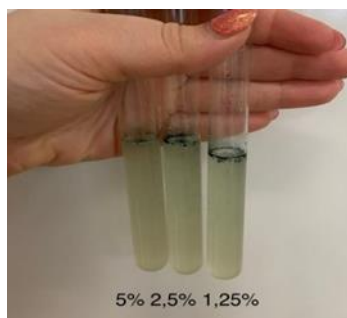
Emulze vzniklá pomocí vortexu byla částečně stabilní, kde se heřmánek částečně vyvázal (viz Obr. 39). Po 15 minutách je emulze stále částečně vyvázaná (viz Obr. 40). Po 24 hodinách se heřmánek zcela vyváže a vytvoří na hladině prstencovitý útvar (viz Obr. 41).

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

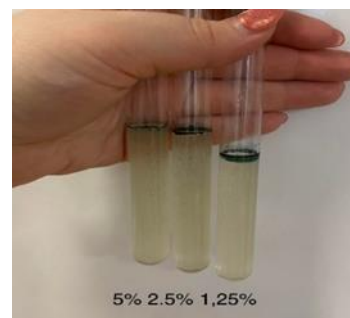
8.4.1.5 Ethanol



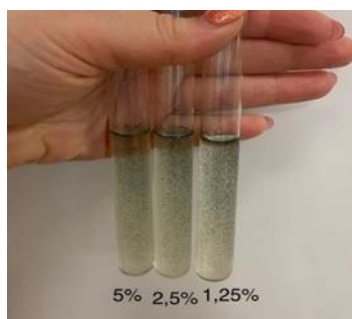
Obr. 44 Ruční protřepání



Obr. 45 Ruční protřepání po 15 min



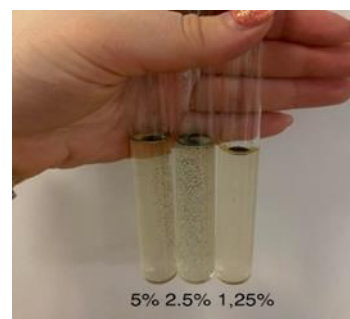
Obr. 46 Ruční protřepání po 24 h



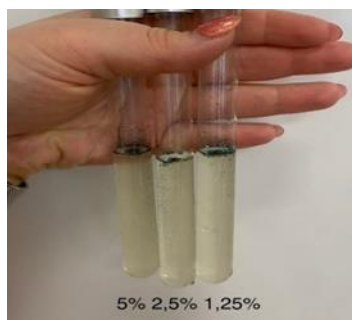
Obr. 47 Promíchání ve vortexu Ruční protřepání



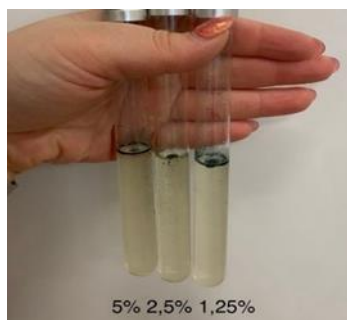
Obr. 48 Promíchání ve vortexu po 15 min



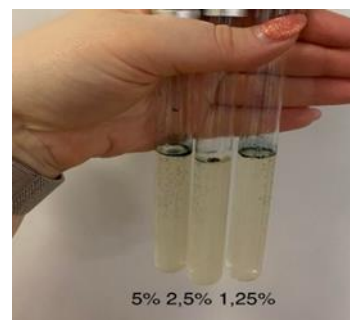
Obr. 49 Promíchání ve vortexu po 24 h



Obr. 50 Sonikace



Obr. 51 Sonikace po 15 min



Obr. 52 Sonikace po 24 h

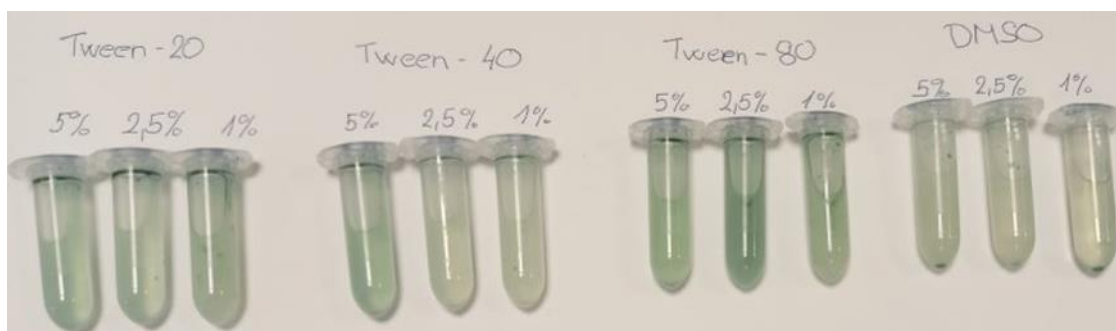
Vyhodnocení:

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

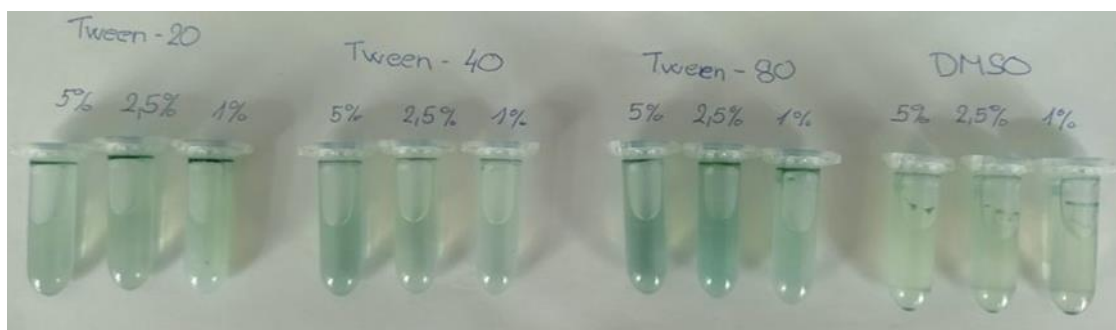
Emulze vzniklá pomocí vortexu byla částečně stabilní. Heřmánek se částečně vyvázal a vytvořil a hladí slabý prstencitý útvar na hladině (viz Obr. 48). Po 15 min zůstal heřmánek částečně vyvázaný u koncentrace 5 % a 2,5 %. U koncentrace 1,25 % se heřmánek zcela vyvázal (viz Obr. 49). Po 24 hod zůstala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

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

8.4.2 Stabilita emulze ve zkumavkách Eppendorf



Obr. 53 Emulze vzniklá pomocí vortexu



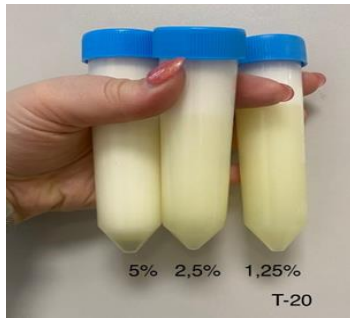
Obr. 54 Emulze vzniklá pomocí vortexu po 24 h

Vyhodnocení:

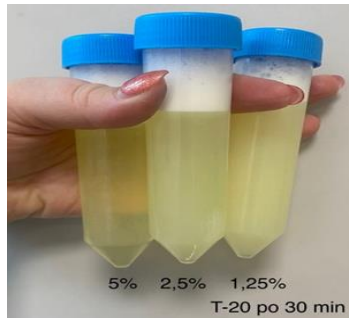
Dle těchto výsledků můžeme vidět, že nejlepší emulze vznikla u 5 % a 2,5 % DMSO. Dále pěkná emulze vyšla u 5 % T-20 a T-40. U T-20 můžeme vidět, že ihned po sonikaci se heřmánek vyvázal a vytvořil prstencovitý útvar na hladině.

Po 24 hodinách se ve všech zkumavkách Eppendorf heřmánková silice vyvázala a vytvořila na hladině prsteneček. Kromě DMSO. U DMSO se vyvázala nahodile i na stěnách a dně zkumavky.

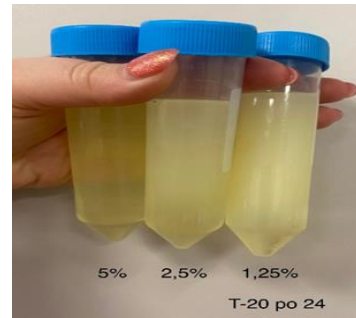
8.4.3 Stabilita emulze v cukerném roztoku



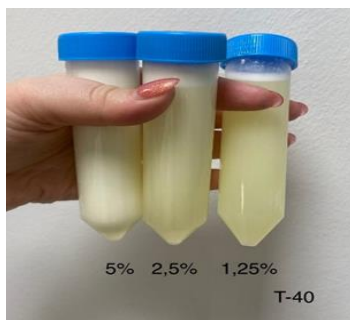
Obr. 56 T-20 v cukerném roztoku
→ emulzifikace pomocí tyčového mixéru



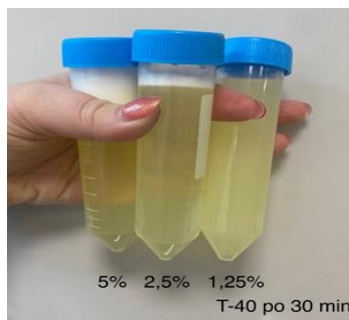
Obr. 55 T-20 v cukerném roztoku
→ emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min



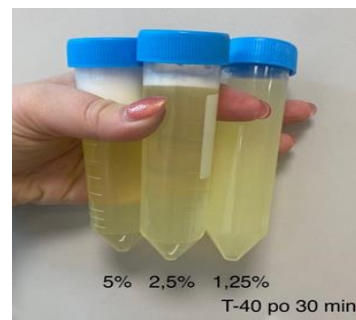
Obr. 56 T-20 v cukerném roztoku
→ emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h



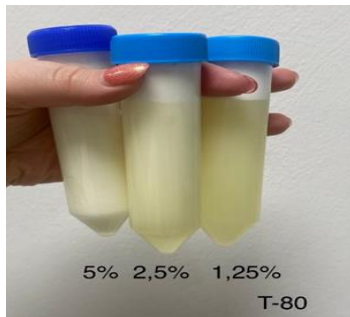
Obr. 57 T-40 v cukerném roztoku
→ emulzifikace pomocí tyčového mixéru



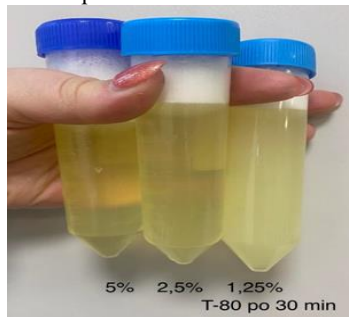
Obr. 58 T-20 v cukerném roztoku
→ emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min



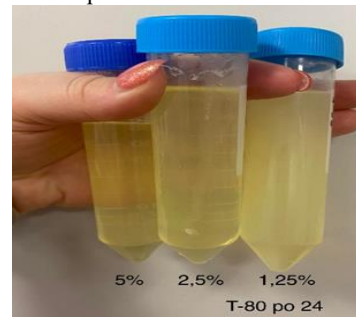
Obr. 59 T-20 v cukerném roztoku
→ emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h



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



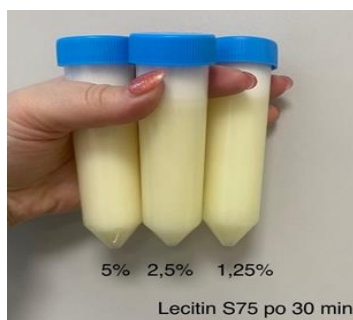
Obr. 64 LS v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min



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



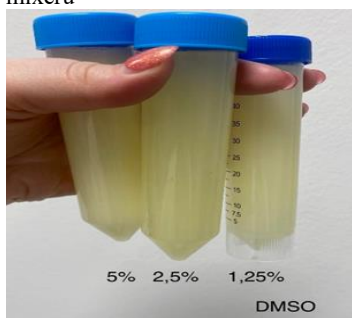
Obr. 66 L-75 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru



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



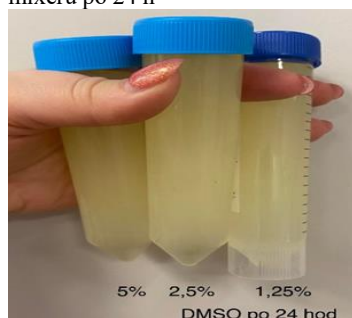
Obr. 68 L-75 v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h



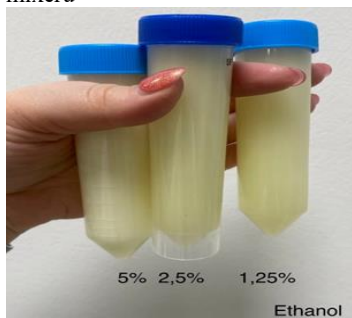
Obr. 69 DMSO v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru



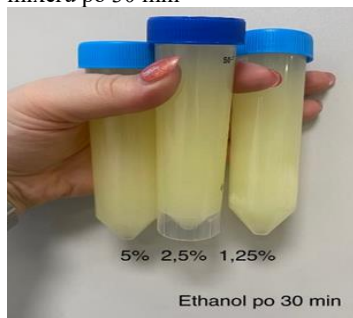
Obr. 70 DMSO v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 30 min



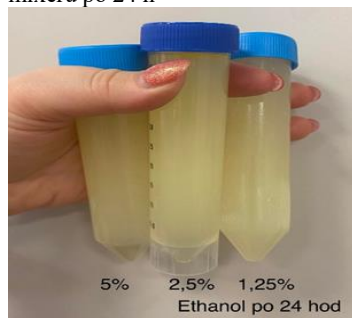
Obr. 71 DMSO v cukerném roztoku → emulzifikace pomocí tyčového mixéru po 24 h



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 vyvázala. 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.

9 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 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) popsali, 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) popsali, 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 roztoku T-20 na žádnou bakterii. Ostatní emulgátory nevykazovaly antimikrobiální aktivitu proti *E. coli* ani *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 bakterii *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 byl pozorován inhibiční efekt v rozmezí 50-75 % u koncentrace 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. U roztoku T-80 se silicemi měl emulgátor vliv na účinky mátové a hřebíčkové silice, které poté nevykazovaly žádný inhibiční ani baktericidní účinek. Tymián v tomto případě vykazoval inhibiční účinky, ale bakterii neusmrcoval. Důvodem mohlo být, že se tymián vyvázal z emulze, a to mohlo ovlivnit výsledky MIC. U roztoku DMSO se silicemi měl emulgátor vliv na mátovou silici, která

poté nevykazovala inhibiční ani 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 heřmánek zcela vyvázal kromě zkumavky s DMSO, kde se na stěnách vytvořily skvrny.

Poslední metodou bylo zjišťováno, jaký 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 stabilně 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 vniku 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.

10 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 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 byl 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 malém množství (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.

11 Seznam použité literatury

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*. 76(1), 61-90. 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*. 9(4). DOI: 10.3390/antibiotics9040147.
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*. 393. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133370.
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*. 9(5), 210. 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*. 20(1_suppl), 21-45. 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*. 23(16). DOI: 10.3390/ijms23169207. ISSN 1422-0067.
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*. 2(3), 228-243. DOI: 10.3390/agriculture2030228
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*. 7(2). DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_35_18. ISSN 2212-5531.
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
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
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*. 9. DOI: 10.3389/fnut.2022.987674.
34. LIST, G.R., 2015. 1 - Soybean Lecithin: Food, Industrial Uses, and Other Applications. In: AHMAD, M.U., XU, X. *Polar Lipids: Biology, Chemistry, and Technology*. 1. AOCS, s. 1-33. ISBN 978-1630670443.
35. MAHBOUBI, M., KAZEMPOUR, N., 2014. Chemical composition and antimicrobial activity of peppermint (Mentha piperita L.) *Essential oil*. Songklanakarin J. Sci. Technol. 36(1), 83-87. 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*. 7(9), 7729-7748. DOI: 10.3390/nu7095359.
39. NAJAR, M.H., CHAT, O.A., BHAT, P.A., RATHER, G.M., DAR, A.A., 2017. An investigation of microscopic precipitation and micellization of sodium deoxycholate in presence of Tween 40. *Journal of Molecular Liquids*. 229, 599-608. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.12.086.
40. 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*. 7. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01878.
41. ORTEGA, E., ABRIOUEL, H., LUCAS, R., GÁLVEZ, A., 2010. Multiple Roles of Staphylococcus aureus Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. *Toxins*. 2(8), 2117-2131. DOI: 10.3390/toxins2082117. ISSN 2072-6651
42. 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.
43. PORŠOVÁ, M., PORŠ, J., KOLOMBO, I., PABIŠTA, R.P., 2006. Prostatický syndrom. *Urolog pro praxi*. (1), 24-27. Dostupné z: https://www.urologiepropraxi.cz/artkey/uro-200601-0006_Prostaticky_syndrom.php
44. PRABUSEENIVASAN, S. et al, 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC complementary and alternative medicine*. 6, 1–8. Dostupné z: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-6-39>
45. 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.
46. RADÜNZ, M. et al., 2019. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food Chemistry*. 276, 180-186. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.09.173
47. 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.
48. 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/>

49. 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.
50. SEDLÁČEK, I., 2007. *Toxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita. 271 s. ISBN 80-210-4207-9.
51. 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
52. 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.
53. SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2. Praha: Grada Publishing. 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2.
54. 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.a25_413.pub3. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a25_413.pub3
55. 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.
56. ŠILHÁNKOVÁ, L., 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 3. Praha: Academia. 364 s. ISBN 80-200-10124-6.
57. SOLEIMANI, M., ARZANI, A., ARZANI, V., ROBERTS, T.H., 2022. Phenolic compounds and antimicrobial properties of mint and thyme. *Journal of Herbal Medicine*. 36. DOI: 10.1016/j.hermed.2022.100604.
58. ŠTEFÁNEK, J., 2010. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. Praha: UK [cit. 2022-8-30]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/>
59. TÁBORSKÁ, J., 2009. Syndrom toxického šoku. *Interní medicína pro praxi*. 11(9), 405-409. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200909-0009_Syndrom_toxickeho_soku.php
60. 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*. 5(6). DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01860.
61. VAN NIEUWENHUYZEN, W., 1976. Lecithin production and properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 53(6Part2), 425-427. DOI: 10.1007/BF02605737.
62. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

63. VOTAVA, M., 2010. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 978-80-86850-04-8.
64. 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*. 8(11). DOI: 10.3390/jof8111116.
- 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*. 83(21), e01583-17. DOI: 10.1128/AEM.01583-17.

12 Seznam tabulek

Tab. 1 Příprava emulgátorů.....	31
Tab. 2 Přehled použitých emulgátorů u různých metod	35
Tab. 3 Příprava emulgátorů.....	36
Tab. 4 Příprava emulgátorů.....	36
Tab. 5 Příprava emulgátorů.....	37
Tab. 6 Inhibiční procento <i>E. coli</i> v 10 % roztoku emulgátorů	38
Tab. 7 Inhibiční procento <i>S. aureus</i> v 10 % roztoku emulgátorů.....	39
Tab. 8 Míra inhibice vybraných rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči <i>E. coli</i>	40
Tab. 9 Míra inhibice vybraných rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči <i>S. aureus</i>	40
Tab. 10 Míra inhibice 5 % roztoku T-20 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>S. aureus</i>	41
Tab. 11 Míra inhibice 5 % roztoku T-20 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>E. coli</i>	41
Tab. 12 Míra inhibice 5 % roztoku T-80 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>S. aureus</i>	42
Tab. 13 Míra inhibice 5 % roztoku T-80 s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>E. coli</i>	42
Tab. 14 Míra inhibice 5 % roztoku DMSO s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>S. aureus</i>	43
Tab. 15 Míra inhibice 5 % roztoku DMSO s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>E. coli</i>	43
Tab. 16 Míra inhibice 5 % roztoku Ethanol s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>S. aureus</i>	44
Tab. 17 Míra inhibice 5 % roztoku Ethanol s přidavkem rostlinných silic o koncentraci 4000 ppm vůči bakterii <i>E. coli</i>	44

13 Seznam obrázků

Obr. 1: Použitá média.....	29
Obr. 2 Chladnutí MHA ve Flowboxu.....	30
Obr. 3 Připravená Petriho miskách MHA	30
Obr. 4 Kultura <i>S. aureus</i>	30
Obr. 5 Kultura <i>E. coli</i>	30
Obr. 6 Připravená destička k MBC	34
Obr. 7 Ukázka, jak vypadá hotové MBC po 24hodinové inkubaci	34
Obr. 8 Ruční protřepání.....	45
Obr. 9 Ruční protřepání po 15 min	45
Obr. 10 Ruční protřepání po 24 h	45
Obr. 11 Promíchání ve vortexu.....	45
Obr. 12 Promíchání ve vortexu po 15 min	45
Obr. 13 Promíchání ve vortexu po 24 h	45
Obr. 14 Sonikace	46
Obr. 15 Sonikace po 15 min	46
Obr. 16 Sonikace po 24 h	46
Obr. 17 Ruční protřepání.....	47
Obr. 18 Ruční protřepání po 15 min	47
Obr. 19 Ruční protřepání po 24 h	47
Obr. 20 Promíchání ve vortexu.....	47
Obr. 21 Promíchání ve vortexu po 15 min	47
Obr. 22 Promíchání ve vortexu po 24 h	47
Obr. 23 Sonikace	47
Obr. 24 Sonikace po 15 min	47
Obr. 25 Sonikace po 24 h	47
Obr. 26 Ruční protřepání.....	48
Obr. 27 Ruční protřepání po 15 min	48
Obr. 28 Ruční protřepání po 24 h	48
Obr. 29 Promíchání ve vortexu.....	48
Obr. 30 Promíchání ve vortexu po 15 min	48
Obr. 31 Promíchání ve vortexu po 24 h	48
Obr. 32 Sonikace	48
Obr. 33 Sonikace po 15 min	48
Obr. 34 Sonikace po 24 h	48
Obr.36 Ruční protřepání	49
Obr. 37 Ruční protřepání po 15 min	49
Obr. 38 Ruční protřepání po 24 h	49
Obr. 39 Promíchání ve vortexu.....	49
Obr. 40 Promíchání ve vortexu po 15 min	49
Obr. 41 Promíchání ve vortexu po 24 h	49
Obr. 42 Sonikace	50
Obr. 43 Sonikace po 15 min	50
Obr. 44 Sonikace po 24 h	50
Obr. 45 Ruční protřepání.....	51
Obr. 46 Ruční protřepání po 15 min	51
Obr. 47 Ruční protřepání po 24 h	51

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

14 Seznam zkratek

DMSO	dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIHC	enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropatogéní <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
OD	optická denzita
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	stafylokokové enterotoxiny
T-20	tween 20
T-40	tween 40
T-80	tween 80
TL	termolabilní enterotoxin
TS	termostabilní enterotoxin