

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Suplementy na bázi přírodních látek pro pozitivní ovlivnění lidského
mikrobiomu

Bc. Jitka Vacková

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jitka Vacková**
Osobní číslo: **C17489**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Suplementy na bázi přírodních látek pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část:

Vypracujte literární rešerši na téma lidský mikrobiom zažívacího traktu. Charakterizujte lárky žmen a beta-escin ve vztahu k jejich biologické aktivitě.
Popište mikrobiologické metody hodnocení kosmetických výrobků, zejména ČSN EN ISO 11930 - Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku.

Experimentální část:

U testovaných látek proveďte mikrobiologické hodnocení účinků, dosažené kriticky zhodnoťte v diskusi.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlášení autora

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne: 9. 5. 2019

.....

Jitka Vacková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní doc. Ing. Marcele Pejchalové Ph.D. za cenné rady, připomínky, vstřícný přístup a čas strávený při vedení mé diplomové práce. Dále bych také chtěla poděkovat zaměstnancům mikrobiologické laboratoře a firmě K2 Pharm s. r. o. za poskytnuté vzorky.

Velké poděkování patří i mým blízkým a rodině za jejich podporu během studia.

ANOTACE

Diplomová práce je věnována testování suplementů na bázi přírodních látek pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu. Jedná se o přírodní látky β -aescin a žumen, které jsou extrahovány ze semen stromů a rostlin. V teoretické části diplomové části jsou uvedeny základní znalosti o mikrobiomu lidského těla, přírodních látkách β -aescinu a žumenu, potenciálně patogenních mikroorganismech a o mikrobiálním hodnocení látek podle normy ČSN EN ISO 11930. Praktická část se zabývá výsledky testování antimikrobiální ochrany látek podle normy vůči jednotlivým potenciálně patogenním mikroorganismům a jejich kontaminací.

KLÍČOVÁ SLOVA

mikrobiom lidského těla, norma ČSN EN ISO 11930, β -aescin, žumen, testované potenciálně patogenní mikroorganismy

TITLE

Supplements based on natural substances for positive influence on human microbiom

ANNOTATION

The diploma thesis deals with testing of supplements based on natural substances positively influencing human microbiom. These are natural substances β -aescin and cissus which are extracted from tree and plant seeds. In the theoretical part of the diploma thesis, general knowledge about the microbiom of the human body is introduced together with facts about natural substances of β -aescine and cissus, potential pathogenic microorganisms and about microbial evaluation of substances according to the norm ČSN EN ISO 11930. The practical part deals with the results of antimicrobial testing of substances according to the norm in relation to individual potentially pathogenic microorganisms and their contamination.

KEY WORDS

mikrobiom of the human body, norm ČSN EN ISO 11930, β -aescin, cissus, tested potentially pathogenic microorganisms

OBSAH

ÚVOD.....	14
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	15
1.1 Mikrobiom lidského těla.....	15
1.1.1 Mikrobiom ústní dutiny	16
1.1.2 Mikrobiom žaludku.....	17
1.1.3 Mikrobiom střevního traktu	18
1.2 Mikrobiologické hodnocení - ČSN EN ISO 11930	21
1.3 Přírodní látky β-aescin a žumen	23
1.3.1 β -aescin	23
1.3.2 Žumen	26
1.4 Mikroorganismy používané pro antimikrobiální hodnocení.....	28
1.4.1 Bakterie <i>Escherichia coli</i>	28
1.4.1.1 Onemocnění způsobené bakterií <i>Escherichia coli</i>	30
1.4.2 Bakterie <i>Staphylococcus aureus</i>	34
1.4.2.1 Pyogenní infekce	36
1.4.2.2 Infekce způsobené toxiny	37
1.4.2.3 Intoxikace (otravy jídlem)	38
1.4.3 Bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
1.4.3.1 Onemocnění způsobené bakterií <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
1.4.4 Kvasinka <i>Candida albicans</i>	42
1.4.4.1 Onemocnění způsobené kvasinkou <i>Candida albicans</i>	42
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	44
2.1 Mikrobiologické hodnocení – ČSN EN ISO 11930.....	44
2.1.1 Vzorky	44
2.1.2 Mikroorganismy.....	44

2.1.3	Laboratorní přístroje	45
2.1.4	Laboratorní pomůcky.....	45
2.1.5	Chemikálie a činidla	46
2.1.6	Kultivační média a pracovní roztoky	46
2.1.7	Pracovní postup.....	49
2.1.8	Morfologické a biochemické testy.....	52
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	54
3.1	Kontaminace	66
3.1.1	Identifikace a popis kontaminace - bakterie	66
3.1.2	Identifikace a popis kontaminace - plísně.....	68
4	ZÁVĚR	75
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	76
6	PŘÍLOHY.....	93

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Bakterie střevního mikrobiomu	19
Obrázek 2: Kochova zřed'ovací metoda.....	22
Obrázek 3: Jírovec maďal	23
Obrázek 4: Vzorec β -aescinu.	26
Obrázek 5: Koloběh přenosu <i>Escherichia coli</i>	34
Obrázek 6: Příznaky infekcí způsobené <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Obrázek 7: Průběh stafylokokové intoxikace.....	39
Obrázek 8: Pigmenty produkující <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
Obrázek 9: Kontaminace na TSA s inokulem <i>Staphylococcus aureus</i>	57
Obrázek 10: Kontaminace na SDA s inokulem <i>Candida albicans</i>	60
Obrázek 11: Vyočkováný zásobní roztok 0,1% β -aescinu s inokulem <i>E. coli</i>	61
Obrázek 12: Vyočkováný zásobní roztok 0,1% žumenu s inokulem <i>Staphylococcus aureus</i>	63
Obrázek 13: Živné médium TSA 0,01% vzorku β -aescinu s inokulem <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
Obrázek 14: Živné médium SDA 0,01% vzorku žumenu s inokulem <i>Candida albicans</i>	66
Obrázek 15: Kontaminace rodu <i>Bacillus</i>	67
Obrázek 16: Kontaminace čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	68
Obrázek 17: Kontaminující plísně na SDA.....	69
Obrázek 18: Nativní preparát plísně z rodu <i>Aspergillus</i>	69
Obrázek 19: Plíseň rodu <i>Aspergillus</i> na PDA	70
Obrázek 20: Plíseň rodu <i>Aspergillus</i> na AFPA	70
Obrázek 21: Plíseň rodu <i>Cladosporium</i> na PDA	71
Obrázek 22: Nativní preparát plísně z rodu <i>Fusarium</i>	72
Obrázek 23: Plíseň rodu <i>Fusarium</i> na PDA a SNA	73

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled probiotik, prebiotik, synbiotik	20
Tabulka 2: Kritéria hodnocení antimikrobiální ochrany pro bakterie a kvasinku.....	51
Tabulka 3: Průměrný počet kolonií v 1% vzorku β -aescinu	58
Tabulka 4: Průměrný počet kolonií v 1% vzorku žumenu	59
Tabulka 5: Průměrný počet kolonií v 0,1% vzorku β -aescinu	61
Tabulka 6: Průměrný počet kolonií v 0,1% vzorku žumenu.....	62
Tabulka 7: Průměrný počet kolonií v 0,01% vzorku β -aescinu	64
Tabulka 8: Průměrný počet kolonií v 0,01% vzorku žumenu.....	65

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AFPA	Agar pro stanovení potenciálně toxinogenních plísní <i>Aspergillus</i>
APEC	Aviární <i>Escherichia coli</i>
B-P	Baird-Parker agar
CFU/ml	Kolonie tvořící jednotky na 1 mililitr
CLA	Karafiátový agar
DAEC	Difuzně adherentní <i>Escherichia coli</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EAggEC	Enteroagregativní <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzymová imunisorbentní analýza
EPEC	Enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxinogenní <i>Escherichia coli</i>
HACCP	Systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů
MALT	Sladinový agar
M-H	Mueller Hinton agar
MPA	Masopeptonový agar
MR	Test s methylervení
MUG	β -glukuronidázový test (rychlá identifikace <i>Escherichia coli</i>)
NEPOČ.	Nepočitatelné množství kolonií
NI	Žádné zvýšení počtu logaritmického snížení od předešlého intervalu
NMEC	<i>Escherichia coli</i> novorozenecké meningitidy
NPM	Nejpravděpodobnější počet mikroorganismů
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PDA	Bramboro-glukózový agar
RIA	Radioimunoanalýza
SDA	Sabouragův agar
SNA	Synteticky-nutričně chudý agar
STEC/VTEC	Shigatoxinogenní/Verotoxinogenní <i>Escherichia coli</i>
TSA	Tryptonový sójový agar
TSST-1	Toxin syndromu toxického šoku
UPEC	Uropatogenní <i>Escherichia coli</i>

TERMINOLOGIE

Antioxidant - látka, jejíž molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů v organismech (*Slovník cizích slov*, 2019).

Buňky epitelu - tkáň tvořená buňkami (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Celulitida - degenerativní změny podkožního tukového vaziva (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Crohnova choroba - zánětlivé střevní onemocnění (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Cystická fibróza - dědičné onemocnění žláz postihující dýchací a trávicí ústrojí (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Cystitida - zánět močového měchýře (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Cytoprotektivní protilátky - léky ochraňující buňky a jejich metabolismus (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Diabetes mellitus - cukrovka (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Dysbióza - porušené složení bakteriální flóry ve střevě (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Enterokolitida - zánět tlustého a tenkého střeva (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Folikulitida - zánět vlasových váčků (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Gastritida - zánět žaludeční sliznice (*Slovník cizích slov*, 2019).

Hemolyticko-uremický syndrom - gastrointestinální infekce způsobená enterohemoragickou *Escherichia coli* (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Hemolyziny - látky vyvolávající hemolýzu (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Imunoglobulin - protein s protilátkovou aktivitou (*Slovník cizích slov*, 2019).

Impetigo - infekční kožní onemocnění (*Slovník cizích slov*, 2019).

Kandidová stomatitida - zánět sliznice v dutině ústní vyvolaný kvasinkou *Candida albicans* (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Kariogenní bakterie – bakterie způsobující zubní kaz (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Koliciny - produkty bakterií, které ničí jiné bakterie produkované kmeny *Escherichia coli* (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Komezálismus - soužití dvou nebo více druhů organismů, z nichž jeden žije ve společenstvu hostitele (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Konjugace – spojení, výměna (*Slovník cizích slov*, 2019).

Mastitida - zánět prsní žlázy (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Oportunní bakterie – bakterie, které nejsou za normálních okolností nebezpečné, ale za určitých podmínek mohou škodit (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Osteomyelitida - zánět kostní dřevě (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Osteoporóza - řídnutí kostí (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Plicní embolie - závažné onemocnění srdečně cévního systému, při kterém jsou ucpány tepny (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Pyelonefritida - hnisavý zánět ledvin (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Sacharolytické bakterie – bakterie rozkládající sacharidy (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Saprofyt - organismus, který ke svému životu využívá rozkládajících se částí jiného organismu (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Sérotyp - skupiny organismů odlišitelných od jiných skupin téhož druhu pomocí na základě sérologických testů (*Velký lékařský slovník*, 2019).

Symbiont - organismus žijící v rovnováze s jinými organismy (*Slovník cizích slov*, 2019).

Trombocytopenie - nedostatek krevních destiček v krvi v důsledku jejich malé tvorby (*Velký lékařský slovník*, 2019).

ÚVOD

Na planetě Zemi žije více než 6,7 miliard lidí, z nichž každý má své charakteristické složení mikrobiomu, skládající se převážně z komenzálních a patogenních mikroorganismů. Celkové množství mikrobů se variabilně mění podle věku, fyzického i psychického stavu člověka nebo pohlaví. Mikroorganismy nejčastěji kolonizují povrch kůže, dýchací cesty, trávicí trakt a orgány pohlavní soustavy. Zejména důležitý je mikrobiom střev, který zajišťuje správnou výživu člověka a správný chod imunitního systému. V případě narušení imunitní rovnováhy vnějšími faktory, dochází k vybuzení patogenních mikroorganismů k činnosti za vzniku různých onemocnění tzv. dysbióz. V souvislosti s dysbiózami je uváděn velký počet zdravotních problémů a příčin, které mohou ovlivnit metabolické, imunologické a vývojové poruchy, stejně jako náchylnost k infekčním onemocněním.

Pro léčbu dysbióz se nejčastěji aplikují antibiotika. Za posledních cca 80 let se antibiotikům přiřazuje zásluha mnoha zachráněných lidských životů, dosahující počtu až několik milionů. Velký mezník v historii vzniku antibiotik představuje objev mikrobiologa Alexandra Fleminga, který k tomuto počtu přispěl objevem penicilinu přidávaný do betalaktamových antibiotik. Antibiotika ovlivňují funkci imunitního systému a brání tělo před nežádoucími infekcemi. Ačkoliv nespočetně mnoho onemocnění vyžaduje užití antibiotik, je jejich použití v dnešní době natolik rutinní, jenž díky tomu vzrůstá schopnost rezistence mikroorganismů.

Na druhou stranu mají antibiotika i temnou stránku svého účinku, a to vedlejší účinky v podobě narušení lidské mikroflóry. K obnovení mikroflóry a podpoření imunitního systému napomáhají probiotické přípravky, přípravky určené jako doplňky stravy nebo různé podpůrné přípravky. Právě do této skupiny se řadí rostlinné extrakty β -aescinu a žumenu, které jsou hojně přidávány do doplňků stravy a podpůrných tablet.

Cílem diplomové práce bylo otestování přírodních látek β -aescinu a žumenu. Látky vykazovaly příznivé účinky na fyzický stav člověka, zejména na imunitní a kardiovaskulární systém. Látky jsou používané v kosmetickém, průmyslovém i potravinářském odvětví. Vzhledem k tomu byly vzorky otestovány podle normy ČSN EN ISO 11930 vydané v roce 2014 pro hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetických výrobků, jejichž testování sloužilo k hodnocení účinnosti konzervace, tzv. zátěžovými testy.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Mikrobiom lidského těla

V lidském těle se nachází nepřehledné množství mikroorganismů, nazývaných jako lidský mikrobiom. V mikrobiomu může počet mikroorganismů dosahovat až 100 bilionů, z nichž největší část žije v lidských střevech (Amon, Sanderson, 2017). Velký podíl tohoto množství tvoří zejména bakterie, zbytek pak viry a houby (Scannapieco, 2013). Některé tyto mikroby mohou příznivě ovlivňovat zdraví člověka, naopak jiné (patogenní mikroorganismy) mohou způsobovat různá onemocnění. Bohatý mikrobiom byl objeven nejen uvnitř těla např. v dutině ústní, játrech, žaludku, urogenitálním traktu a střevech, ale i na povrchu těla (Li *et al.*, 2012).

Mikrobiom plní v lidském těle důležitou funkci. Pomáhá k vývoji imunity, ochraňuje proti nežádoucím patogenům, vyrábí mastné kyseliny s krátkým řetězcem pro energetický metabolismus, rozkládá tuky a vitamíny, které jsou nezbytné pro lidské tělo (Amon, Sanderson, 2017). Množství mikroorganismů se proměnlivě mění v průběhu let. Závisí to zejména na věku člověka, tělesné hmotnosti, stravovacích návycích, faktorech prostředí, ale i na užívání léků, zejména antibiotik (Schroeder, Bäckhed, 2016). Mikrobiom člověk získává už při narození. Děti rodící se císařským řezem, mají méně rozmanitý mikrobiom než děti, které se narodily klasickým vaginálním porodem. Důvodem je obsáhlejší mikrobiom porodních cest, který se při porodu „předává“ dítěti, a tím tvoří obranyschopnost organismu. Velkou roli hraje i výživa dítěte (kojení mateřským mlékem či příkrmy), fyzický stav matky či používání různých léků. Tyto faktory jsou velmi důležité pro správný vývoj a funkci imunity, udržování fyziologických hodnot člověka, které ovlivňují celkové zdraví člověka po celý život (Amon, Sanderson, 2017).

V důsledku širokého spektra mikroorganismů můžeme obecně rozdělit mikrobiom do dvou skupin - rezidentní a tranzientní. Rezidentní mikrobiom je tvořen stálými mikroby, naopak tranzientní (přechodný) se skládá z nepatogenních a potenciálně patogenních mikroorganismů, kteří se nenacházejí ve stálé mikroflóře. Příkladem tranzientních mikrobů jsou komenzálové, kteří pocházejí z vnějšího prostředí, avšak jejich přítomnost není nutná ani škodlivá (Erkosar, Leulier, 2014).

1.1.1 Mikrobiom ústní dutiny

Ústní dutina je mikroorganismy jedním z nejhustěji osídlených míst v lidském těle (Takahashi, 2005). Uvádí se, že v ústech by se mohlo nacházet až 700 druhů bakterií (Frias-Lopez, 2015). První zmínka o výskytu bakterií v ústech popsal Antonoi van Leeuwenhoek už v 18. století. Tato zmínka povzbudila mikrobiology více dutinu ústní prozkoumat a bakterie pojmenovat. V mikrobiomu úst se nachází pestrá škála anaerobních, aerobních, sacharolytických a kariogenních mikroorganismů. Dominující jsou mikroorganismy aerobní rodu *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, hemofily (Aas *et al.*, 2005). Anaerobní bakterie mají zástupci v rodu *Actinomyces*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Treponema*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* (Votava, 2005). Není vyloučena ani přítomnost kvasinek *Candida albicans* a některých druhů plísní (Tomášková, 2012).

Bakterie se často shlukují do mikrobiálních komunit, které vytvářejí supragingivální povlak, nazývaných jako potah jazyka či povlak na zubech (Scannapieco, 2013). V potahu jazyka se vyskytuje viridující streptokok *Streptococcus salivariu*, v povlaku zubů zase lze spíše nalézt *Streptococcus sanguis* a *Streptococcus mitis* (Votava, 2005). Sacharolytické mikroorganismy v povlaku na jazyku vytváří sloučeniny síry, které způsobují zápach z úst (Takahashi, 2005).

Standardně se v prostředí úst nachází nepatogenní i patogenní mikroby vytvářející biofilm, který způsobuje vznik zubních kazů a paradentózy. V dnešní době nejsou zubní kazy výjimečné. K jejímu vytvoření musí být přítomny patogenní acidogenní bakterie a bakterie vytvářející kyselinu mléčnou (laktobacily) (Scannapieco, 2013). Významnými faktory ve změně ústního mikrobiomu hraje věk člověka a ústní hygiena.

Studie uvádí, že lidé s výbornou hygienou mají v ústní mikroflóře přítomny grampozitivní koky (*Staphylococcus*, *Streptococcus*). Naopak u jedinců, kteří nedodrží správné hygienické návyky, je ústní mikroflóra pestřejší, v němž dominují anaerobní gramnegativní bakterie (Scannapieco, 2013). K udržení stálosti ústní mikroflóry pomáhají bakterie rodu *Streptococcus* a *Neisserie*, které inhibují potenciální patogeny výrobou toxických produktů (Scannapieco, 2013).

1.1.2 Mikrobiom žaludku

V lidském žaludku se nachází mikroorganismy důležité pro funkci a ochranu žaludečního prostředí (pH, enzymy). Žaludeční prostředí obsahuje značné kvantum laktobacilů a kyselinotvorných mikroorganismů vytvářející kyselinu chlorovodíkovou (Macfarlane, Dillon, 2007). Není vyloučena ani přítomnost bakterií kmene *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Candida albicans*, *Enterococcus* (Bik *et al.*, 2006). Žaludek plní ochrannou funkci jako bariéra proti vstupu škodlivým patogenům do střevního traktu. Prostředí lidského žaludku funguje jako tzv. ekologický filtr (Beasley *et al.*, 2015).

Velkou roli hraje kyselost (acidita) žaludku neboli vylučování kyseliny chlorovodíkové, která může ovlivnit rozmanitost a složení mikrobiomu (Smith, 2003). Kyselost žaludku se může měnit buď přirozeně (s věkem) nebo uměle (při užívání léčiv) (Beasley *et al.*, 2015). Acidita žaludku reguluje kvantitu mikroorganismů, usmrcuje mikrobiální patogeny a zabraňuje postupnému pronikání patogenů až do střev. Hodnota pH žaludku se pohybuje mezi 1-2, což je pro většinu patogenů smrtící (Smith, 2003). Uvádí se, že nadměrné používání léčiv (antibiotik, antacidů) může způsobit neutralizaci žaludeční kyseliny, čímž vzrůstá riziko prostupu nežádoucích mikrobů do střevního traktu (Smith, 2003). Další faktor, který může ovlivnit pH žaludku, jsou chloridové ionty, ztrácející se při velkém pocení nebo zředění žaludeční šťávy po napití (Votava, 2005). Změny v kyselosti žaludku mohou způsobovat i mikroorganismy dostávající se ve velkém množství z potravin nebo z vody. Jakákoliv nerovnováha má zapříčinu nepříjemné zdravotní komplikace (Bik *et al.*, 2006). Nejrozšířenější patogeny *Escherichia coli* a *Salmonella Typhimurium* se dokáží přizpůsobit kyselému pH žaludku. V důsledku jejich přizpůsobení mohou přežít a proniknout do střevního traktu (Smith, 2003).

Nejčastějším onemocněním žaludku jsou peptické vředy a gastritida, za jejichž původce je považována bakterie *Helicobacter pylori* (Polk, Peek, 2010). *Helicobacter pylori* osidluje žaludeční sliznici (Siupsinskiene *et al.*, 2013). Při tomto onemocnění se aplikují léky, které omezují produkci žaludeční kyseliny.

V případě onemocnění gastritidou vědci poukazují na účinnou léčbu probiotiky (Lesbros-Pantoflicková *et al.*, 2007). Probiotika jsou levnější alternativa antibiotik bez vedlejších účinků. Vědecké studie popisují zlepšení průběhu gastritidy a úbytek množství *H. pylori* po podání probiotik u sedmi z devíti pacientů (Lesbros-Pantoflickova *et al.*, 2007).

1.1.3 Mikrobiom střevního traktu

Na prvním místě v četnosti a rozmanitosti mikrobiomu zaujímá střevní trakt. Sídli v nich až biliony mikroorganismů představující stovky druhů bakterií, kvasinek, virů a hub (Xu *et al.*, 2007). Více než z 90 % jsou to mikroby anaerobní vyskytující se v tlustém střevě. Bakterie ve střevech z metabolického hlediska zaujímají významnou pozici. Mnohé bakterie jsou sacharolytické. Rozkládají sacharidy a využívají škrob jako hlavní zdroj uhlíku a energie. Tímto bakterie pomáhají potlačovat produkci toxických metabolitů (fenolů, indolů, aminů) vzniklé rozkladem bílkovin a aminokyselin (Macfarlane *et al.*, 2016). Také přispívají k syntéze vitamínů, zejména biotinu, riboflavinu nebo pyridoxinu.

Střevní mikroflóra zajišťuje výživu, správný chod imunity, fyziologii člověka a ovlivňuje náchylnost k různým onemocněním (Lozupone *et al.*, 2012). Ta však může být ovlivněna věkem, genetickou dědičností, stravováním, či fyzickou námahou (Votnerová, 2018).

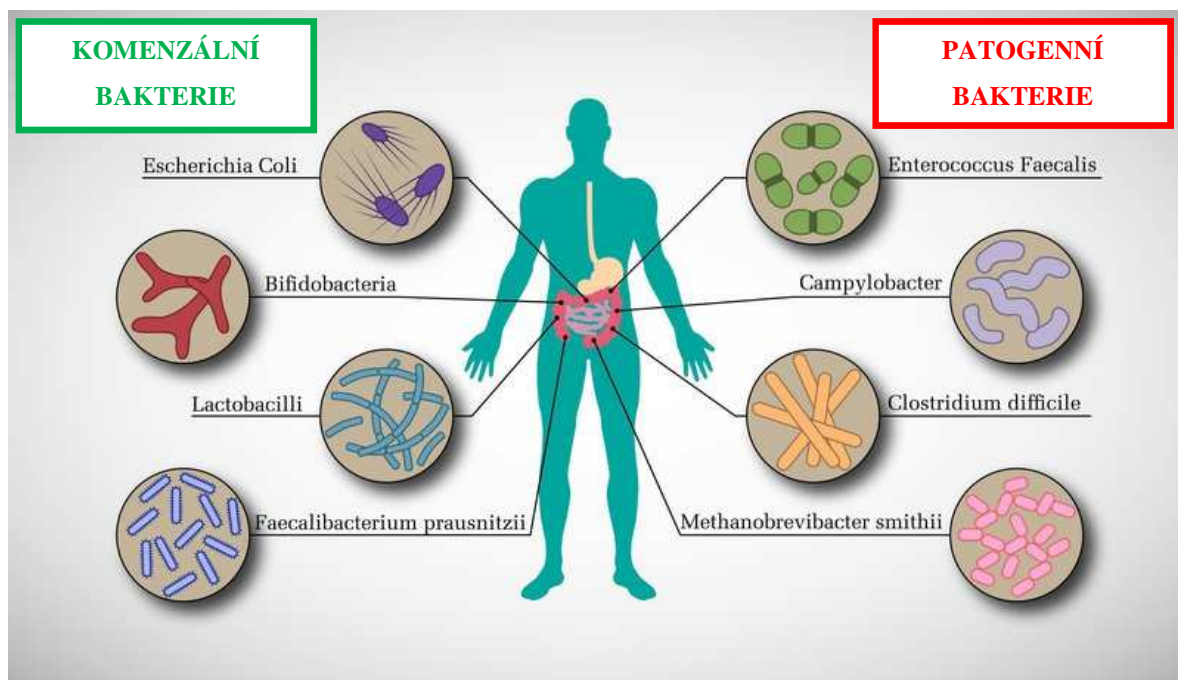
Hlubší průzkum mikroflóry střev poukázal na dominující kmeny *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, rody *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, enterokoky a kvasinku *Candida albicans* (Rajilić-Stojanović *et al.*, 2007). Kmen *Proteobacteria*, zejména *Escherichia coli*, je součástí střevního mikrobiomu, avšak její nadměrná koncentrace může být původce např. vodnatých průjmů nebo tzv. letních cestovatelských průjmů. *Escherichia coli* byla na konci 80. let 19. století první vyizolovanou a identifikovanou bakterií (Rajilić-Stojanović *et al.*, 2007).

Bližší popis střevního mikrobiomu probíhal v průběhu dalších let, kdy byly identifikovány střevům prospěšné rody laktobacilů, enterokoků, bifidobakterií a potenciální patogenní rody *Campylobacter* a *Clostridium* (viz **Obrázek 1**). Kuriózní je, anaerobní toxiny produkující, bakterie *Clostridium difficile*, která se kolonizuje na střeva člověka, jehož normální střevní mikroflóra byla narušena antimikrobiální léčbou (Karen, John, 2011). Vzniklé toxiny narušují buněčnou membránu a vytváří zánětlivé místa a sraženiny.

Studie poukazují na skutečnost nižšího počtu bifidobakterií a bakterií kmene *Bacteroides* a naopak vyššího počtu zmiňované anaerobní bakterie *Clostridium difficile* a bakterie *Escherichia coli* ve střevním traktu dětí narozených císařským řezem. Bakteriální složení vlivem některých faktorů se může v průběhu let měnit. Zásadní roli hrají užívání antibiotik, které narušují střevní mikroflóru a snižují počty prospěšných bakterií (Penders *et*

al., 2006). Tím dojde k mikrobiální nerovnováze spojené s onemocněním a gastrointestinálními poruchami, tzv. dysbiózy (Mazmanian *et al.*, 2008). Nejčastěji se vyskytují dysbiózy typu zánětlivých onemocnění střev (IBD), nekrotizujících enterokolitid, Crohnovy choroby, ekzémů, astma, diabetes mellitus typu 1 nebo poruchy autistického spektra (Amon, Sanderson, 2017). U pacientů s onemocněním IBD je prokázána snížená mikrobiální rozmanitost, zejména snížený počet mikroorganismů kmene *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a zvýšený počet proteobakterií zejména *E. coli*. Velký vliv na toto onemocnění má kouření, stres a nezdravý způsob života (Amon, Sanderson, 2017).

Bakterie *Bacteroides fragilis* je považována za původce změny střevního mikrobiomu, která v souladu s životním prostředím a přítomností domácích zvířat, může spustit alergickou reakci (Amon, Sanderson, 2017). Nachází-li se ve střevech naopak větší množství této bakterie, nastává tzv. malý střevní bakteriální vzrůst (SIBO) projevující se nadýmáním, plynatostí, bolestí břicha nebo průjmem (Bohm *et al.*, 2013).



Obrázek 1: Bakterie střevního mikrobiomu (převzato a upraveno z: <http://danielakrcova.cz/2017/05/28/strevni-mikrobiom-budoucnost-optimalizovane-vyzyvy/>).

K obnovení střevní mikrobiální rovnováhy (např. po užívání antibiotik) pomáhají probiotika, prebiotika a synbiotika. Probiotika jsou definována jako živý mikrobiální doplněk stravy, který příznivě ovlivňuje intestinální mikrobiální rovnováhu (Morelli *et al.*, 2013). Při pravidelném užívání dochází ke zlepšení trávení, inhibici růstu patogenů, obnovení střevní rovnováhy a přispění k výrobě trávicích enzymů, úlevujících od zácpy a snižujících

pravděpodobnost infekcí a alergických příznaků (Schrezenmeir, de Vrese, 2001). Před uvedením na trh musí probiotika vykazovat netoxicitu, nepatogenost, schopnost metabolizovat se ve střevě a mít určené senzorycké vlastnosti.

Pro zvýšení účinku probiotik se doporučuje užívat prebiotika. Prebiotika jsou nestravitelné složky, které příznivě ovlivňují hostitele stimulací růstu nebo aktivitu jednoho nebo omezeného počtu bakterií v tlustém střevě (Sánchez *et al.*, 2017). Kombinace obou doplňků se nazývají synbiotika založené na vztahu probiotik (živé mikrobiální přísady) a prebiotik (substrátu, nestravitelné složky) (Scholz-Ahrens *et al.*, 2007). Nejpoužívanější kmeny bakterií pro výrobu probiotik, prebiotik a synbiotik jsou uvedeny viz **Tabulka 1**.

V dnešní době se spíše než léčba antibiotiky prosazuje léčebná metoda tzv. transplantace fekální mikroflóry. Transplantace spočívá v přenosu fekální mikroflóry zdravého člověka do střev člověka trpící gastrointestinální poruchou (Langdon *et al.*, 2016).

Tabulka 1: Přehled probiotik, prebiotik, synbiotik (převzato a upraveno z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/69/5/1052s/4714932>).

PROBIOTIKA			PREBIOTIKA	SYNBIOTIKA
<u>Laktobacily</u>	<u>Gram-pozitivní koky</u>	<u>Bifidobakterie</u>	<u>FOS (Oligofruktósa a Neosugar)</u>	<u>Bifidobakterie + FOS</u>
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>	<i>B. bifidum</i>	Inulin	Laktobacily + laktitol
<i>L. casei</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>Thermophilus</i>	<i>B. adolescenti</i>	GOS	Bifidobakterie + GOS
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>B. animalis</i>	Laktulóza	
<i>L. reuteri</i>	<i>S. diaacetylactis</i>	<i>B. infantis</i>	Laktitol	
<i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. cellobiosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> ,		<i>B. thermophilum</i>		

1.2 Mikrobiologické hodnocení - ČSN EN ISO 11930

Norma ČSN EN ISO 11930 vydaná v únoru 2014 stanovuje mikrobiologické hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku. Norma popisuje jednotlivé kroky, po jejichž splnění se vyhodnotí, zda daný kosmetický výrobek vyhovuje kritériím antimikrobiální ochrany. Norma definuje dvě antimikrobiální zkoušky - zkouška účinnosti konzervace a zkouška hodnocení a posouzení celkové mikrobiální ochrany kosmetického výrobku, který není považován za málo rizikový při posouzení rizika popsáném v ISO 29621 (ČSN EN ISO 11930, 2014).

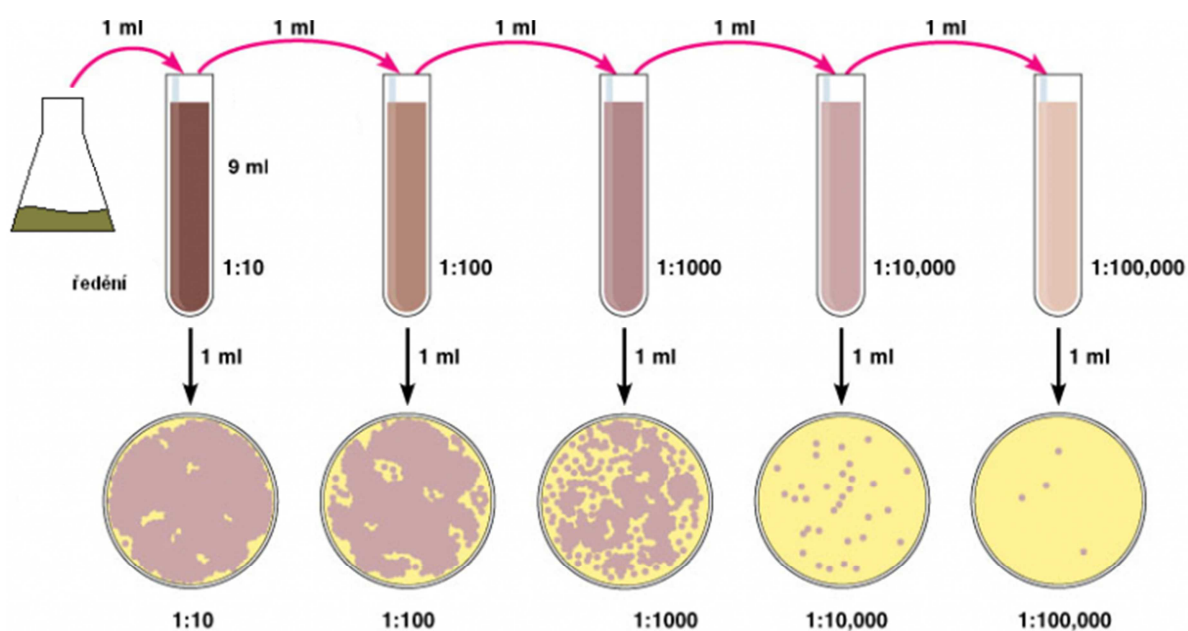
Konzervace představuje prostředky, které po použití zabrání mikrobiálního množení v kosmetickém přípravku. Zkouška účinnosti konzervace je tzv. referenční metoda, což znamená, že podle této zkoušky se výsledky z ostatních zkoušek posuzují nebo k ní vztahují (ČSN EN ISO 11930, 2014). Zkouška se prvotně používá u kosmetických výrobků rozpustných ve vodě nebo mísitelné s vodou. U kosmetických výrobků, u nichž není pravděpodobné vysoké mikrobiologické riziko, není tato zkouška nutná provádět.

Principem této zkoušky je inokulace daného množství testovaných mikroorganismů do určených vzorků a po inkubaci při daných podmínkách se zjišťuje počet a změny v počtu mikroorganismů ve stanovených časových intervalech. Mikroorganismy určené pro testování jsou bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, kvasinka *Candida albicans* a plíseň *Aspergillus brasiliensis* (ČSN EN ISO 11930, 2014).

Prvotním krokem je příprava bakterií, kvasinky a plísně pro přípravu suspenzí. Bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* se naočkují na plotny s TSA agarem, kvasinka *Candida albicans* na SDA agar a nechají se inkubovat při $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ po dobu 18-24 hodin. Plíseň *Aspergillus brasiliensis* se naočkuje třemi vpichy do PDA agaru a nechá inkubovat při $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ po dobu 7-11 dní (ČSN EN ISO 11930, 2014).

Po uplynutí inkubační doby se připraví suspenze podle MacFarlandovy stupnice. Následně se určené množství asepticky zaočkuje do naředěných vzorků ve sterilních nádobkách. Naočkované vzorky se uchovávají ve tmě o laboratorní teplotě a v předepsaných dnech (tj. 7., 14. a 28. den) se provádí odečty (ČSN EN ISO 11930, 2014).

V těchto stanovených dnech se odečty provádí odpipetováním 1 ml/ 1g naočkovaného vzorku do 9 ml neutralizéru a následně do 9 ml fyziologických roztoků, čímž se vytvoří koncentrační řada (viz **Obrázek 2**). Z každé zkumavky se poté duplicitně vyočkuje dané množství na Petriho misky s arbitrážní půdou a následně se provede roztěr L-hokejkou. Lze použít i metodu membránové filtrace. Plotny se nechají inkubovat v termostatu při $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ po dobu 48-72 hodin (bakterie, *C. albicans*) a při $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ po dobu 3-5 dnů (*A. brasiliensis*). Misky se po inkubační době vyhodnotí pomocí metody počítání kolonií. Pro stanovení počtu bakterií a *C. albicans* se vyberou misky obsahující 30-300 kolonií a mezi 15-150 kolonií *Aspergillus brasiliensis*.



Obrázek 2: Kochova zřed'ovací metoda (převzato z: <http://umtk.vscht.cz/miniatlas-vad/metody/plotnove-metody/>).

Počet kolonií ve vybraných miskách se dosadí do stanoveného vzorce pro logaritmičké snížení a výsledky se porovnávají s výsledky normou určenými. Výsledky jsou pak sepsány do tabulky, která vyhodnotí účinnosti zkoušky konzervace.

Zkouška antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku se provádí buď podle složení výrobku, nebo podle výsledků zkoušky účinnosti konzervace (ČSN EN ISO 29621, 2017). Některé kosmetické výrobky tuto zkoušku nevyžadují. Antimikrobiální ochrana je založena na vlastnostech a složení přípravku, podmínkách výroby, vlastnostech a materiálu obalu, doporučení pro užívání výrobku (ČSN EN ISO 29621, 2017).

1.3 Přírodní látky β -aescin a žumen

1.3.1 β -aescin

Aescin představuje hlavní složku extraktu vyizolovaného ze semen stromu jírovce maďalu (kaštan koňský). Tento strom dosahuje výšky až 30 m. Charakteristická je pro něj široká koruna. První výskyt tohoto stromu byl zaznamenán v Řecku, Albánii a ve východním Bulharsku (Green *et al.*, 2009). Do střední Evropy byl dovezen až v 16. století (Cukanovic *et al.*, 2011). Plodem stromu jsou velké kapsule obsahující až čtyři semena, ze kterých se provádí extrakce (viz **Obrázek 3**).



Obrázek 3: *Jírovec maďal*: nahoře- květy, dole vlevo - list, vpravo dole-plod
(převzato z: <https://www.garten.cz/a/cz/6233-aesculus-hippocastanum-jirovec-madal/>).

Proces extrakce aescinu ze semen probíhá tím způsobem, že se semeno nejprve omyje, pak oloupe a rozmělní. Nepotřebný tuk ze semen se odstraní louhováním pomocí okyselené vody po dobu 1-2 hodin. Následně ve zbytku se provede první extrakce za použití extrakčního činidla roztoku zředěné 2% kyseliny octové, kdy dojde k oddělení extrakční kapaliny (Gastaldo *et al.*, 1994). Extrakční zbytek se nechá vysušit. Po vysušení se provede druhá extrakce a to už za pomoci vodných alkoholických roztoků, nejlépe 80% roztokem metanolu nebo 70% isopropanolem při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. Po uplynutí extrakční doby následuje opět vysušení a zahuštění získaného extraktu ve vakuu. Tímto procesem se dosáhne

toho, že extrakt obsahuje až 50 % aescinu. Pro největší výtěžnost aescinu je doporučeno provádět extrakci v lednu, kdy nejsou semena tolik vyschlá (Gastaldo *et al.*, 1994). Čistota extraktu se hodnotí spektrálními metodami (NMR, UV, IR, MS) nebo potenciometricky v porovnání se standardem (Khan, Mahmood, 2006).

Aescin spadá do skupiny chemických sloučenin sekundárních metabolitů rostlin, tzv. saponinů (viz **Obrázek 4**). Saponiny obsahují ve své struktuře triterpen, steroidní glykon a více cukerných řetězců (Güçlü-Üstündağ, Mazza, 2007). Nejčastěji se aescin vyskytuje ve formě β -aescin, který po extrakci a vysušení má charakter jemné krystalické látky rozpustné ve vodě (Khan, Mahmood, 2006). Ostatní formy aescinu se spíše používají do směsí terapeutických látek.

Aescin má taky velmi výhodnou schopnost vázat aktivní kyslík (eliminace druhů kyslíku), čímž se stává významným antioxidantem (Wilkinson, Brown, 2001). Uvádí se, že aescin je dokonce považován za silnější antioxidant než vitamín E. Spolu s aescinem je v extraktu i značné množství flavonoidů, zejména deriváty kvercetinu a kaempferolu, které mají vliv na pružnost a propustnost cévní stěny (Wilkinson, Brown, 2001).

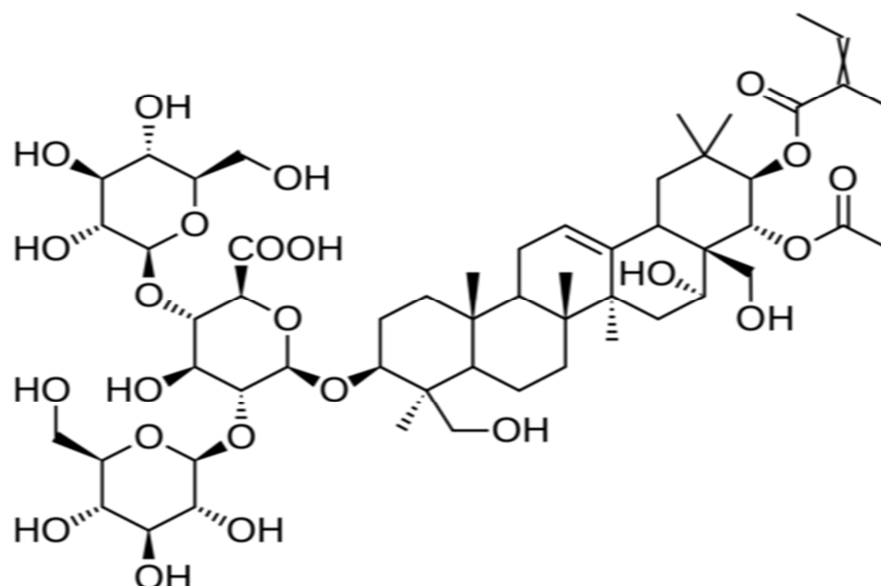
Nejvyskytovanější forma β -aescin se využívá ve farmaceutickém průmyslu, jako přísada do tablet léčiva Aescin-Teva, která pomáhá proti otokům při chronickém onemocnění žil. Často se používá i při potlačení vyprazdňování žaludku, proti alergiím, astmatům, eliminaci zánětu dýchacích cest, proti rýmě, proti hemeroidům a pro lepší vstřebávání podlitin (Ezberci, Ünal, 2018). β -aescin je dobře snášen pro své mírné účinky v gastrointestinálním traktu, avšak dlouhodobé užívání může způsobit vedlejší účinky např. průjemy, bolesti hlavy nebo závratě (Khan, Mahmood, 2006).

Extrakty aescinu jsou běžně používané jako výživové doplňky stravy (Baibado, Cheung, 2010). Doplňky stravy jsou definovány jako potraviny se zvýšeným obsahem vitamínů, minerálních látek, přírodních látek a extraktů za účelem zvýšit příznivý účinek na zdravotní stav (Tondl, 2016). Příkladem jsou přírodní látky obsahující aescin jako Aescin Vulm, Mobivenal micro, Hemoval extra, Bivenol, které příznivě ovlivňují pružnost cév, snižují pocit těžkých nohou, zvyšují odolnost imunity, dodává živiny, napomáhá dobré cirkulaci krve v nohách, posiluje žilní a cévní systém a příznivě působí na srdce (Kędzierski *et al.*, 2016).

V posledních době se často diskutuje o β -aescinu jako o alternativě léků proti alergickým onemocněním (Ezberci, Ünal, 2018). Alergické onemocnění je charakterizováno jako nadměrná reakce imunitního systému proti neškodným látkám v neškodném prostředí (Gurrieri *et al.*, 2011). Způsobena je především nesprávnou aktivací protilátek ze skupiny imunoglobulinu E (IgE) vlivem daného alergenu (Kimata *et al.*, 2000). Vědečtí pracovníci detekovali ve svých výzkumech inhibiční účinky β -aescinu proti danému alergenu, bez ohledu na to, zda se jedná o alergii z prostředí, domácích zvířat nebo o potravinovou alergii. Po aplikaci β -aescinu byly znatelně potlačeny příznaky alergické reakce (Lindner *et al.*, 2010).

Prokázané jsou i protizánětlivé a vyhlazovací účinky β -aescinu. Pro tyto blahodárné vlastnosti se využívá nejen pro farmaceutické výrobky, ale i v kosmetickém průmyslu. Kosmetické výrobky s aescinem pomáhají v léčbě celulitidy, vypadávání vlasů, proti vráskám ochraňují kůži před UV zářením nebo potlačuje vyrážky na kůži. Společně s kyselinou hyaluronovou jsou přidávány jako ingredience do masek na obličej nebo do očních krémů. Tyto přípravky vyhlazují nevzhledné oční vaky, tmavé kruhy pod očima, snižují známky únavy a dodává pokožce kolem očí lepší pevnost a pružnost. Pomáhá i proti zánětům oční sítnice, duhovky, krvácení sklivce a poruchám optického nervu (Gauri, 2005).

Velký a nevzhledný problém, se kterými se v dnešní době setkávají především ženy, představuje celulitida. Celulitida je změna kůže především v oblastech hýždí a stehen, kdy má kůže charakter pomerančové slupky v důsledku zvýšení počtu tukových buněk (Raff, Kroshinsky, 2016). Ve vzniku celulitidy hraje roli nadváha, stres, hormonální změny, sedavé zaměstnání, kouření nebo nedostatečný pitný režim (Sparavigna *et al.*, 2011). Při celulitidě dochází k omezení koloběhu krve a lymfy. Kosmetické výrobky, zejména krémy a gely, obsahující aescin zlepšují cirkulaci krve, čímž napomáhají potlačení nevzhledné celulitidy (vyhlazování).



Obrázek 4: Vzorec β -aescinu (převzato z: <https://www.indiamart.com/proddetail/beta-escin-beta-aescin-15730386812.html>).

1.3.2 Žumen

Žumen neboli *Cissus* je rozmanitá skupina rostlin obsahující kolem 320 druhů rostlin z řádu *Vitales* (Navrátilová, 2011). *Cissus* představuje dřevnaté liány s jednoduchými nebo složenými listy, které v létě květou zelenými nebo červenými květy (Hui, Wen, 2007). Jejich zeměpisná poloha se nachází v tropických oblastech, především v Chile a Indonésii (Smith *et al.*, 2003). Některé druhy jsou pěstovány jako pokojové rostliny, avšak větší a důležitější význam mají v medicíně, farmakochémii nebo v potravinářství (Oliveira, 2006).

Od starověku rostliny sloužily lidem jako přirozený zdroj léčby a terapií. Významnosti dosáhli pro jejich mírné vedlejší účinky. Části rostliny *Cissus* (žumenu), které se zpracovávají, jsou semena, stonky, kořeny a výhonky (Mishra *et al.*, 2010). Průmyslové zpracování spočívá v extrakci a sušení.

Žumen je považován za bohatý zdroj karotenoidů, anabolických steroidních látek (resveratrol, piceatanol, fytosteroly), triterpenoidů, kyseliny askorbové a flavanoidů (Mishra *et al.*, 2010). Obsahuje velké množství minerálů a vitamínů, především vápníku a vitamínu C. Flavonoidy, zejména diosmin, hesperidin vykazují velmi příznivé účinky na kardiovaskulární systém (Stohs, Ray, 2012).

Žumen je vzácný pro své protizánětlivé, protinádorové, antiosteoporotické, gastroochranné, antioxidační a antimikrobiální vlastnosti. Inhibuje v lidském těle některé lipidy a volné radikály, čímž zvyšuje aktivitu antioxidačních enzymů, a díky tomu je považován za

silný antioxidant (Chidambaram, Venkatraman, 2010). Výrazný protizánětlivý účinek se srovnává s účinkem např. aspirinu nebo ibuprofenu (Mishra *et al.*, 2010).

Nejširší uplatnění má druh *Cissus quadrangularis*. Tento druh tvoří jeden z přísad přípravků určených proti parazitům, pro zmírnění bolesti, snížení otoku a podpory procesu hojení jednoduchých zlomenin (Mishra *et al.*, 2010). Je používán jako přísada do léčiv a doplňků stravy.

Stonek rostliny *Cissus quadrangularis* obsahuje dva asymetrické tetracyklické triterpenoidy a ve vodě rozpustný glykosid, který napomáhá ke snížení krevního tlaku (Oliveira *et al.*, 2012). Extrakt ze stonku má široké uplatnění. Jeho používání představuje prevenci proti kurdějím, napomáhá v nepravidelné menstruaci, ale i zmírňuje průběh astmatu. Tradičně se používá k léčbě gastritidy, infekcí kůže, očních chorob, anémie, krvácení popálenin a zlomenin kostí (Mishra *et al.*, 2010).

Extrakt vykazuje antimikrobiální aktivitu proti grampozitivním bakteriím *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a některé druhy *Streptococcus* (Murthy *et al.*, 2003). Jeho baktericidní účinky potvrzují studie zkoumající účinek žumenu proti bakterii *Helicobacter pylori* ve střevním traktu (Jainu *et al.*, 2006). Napomáhá tomu přítomnost cytoprotektivní protilátky (Mishra *et al.*, 2010).

Extrakt ze žumenu je také bohatý na obsah minerálních látek jako draslík, vápník, zinek, sodík, železo, olovo, kadmium, měď a hořčík (Mishra *et al.*, 2010). Analýza prokázala přítomnost látek oxalátů, tríslovin, solí nebo saponinů (Jainu *et al.*, 2006). Přidává se do léčiv při léčbě hemoroidů nebo žaludečních vředů (Oben *et al.*, 2006).

Cissus quadrangularis reguluje úbytek hmotnosti, tělesného tuku, zlepšení celkové hodnoty cholesterolu, LDL-cholesterolu, triglyceridů a hladiny glukózy v krvi (Oben *et al.*, 2007). Extrakty z *Cissus quadrangularis* v kombinaci s jinými účinnými látkami se používají pro léčbu nadváhy a obezity (Greenway, Bray, 2010).

Žumen má specifický účinek při léčbě zlomenin kostí, osteoporózy a při léčení šlach a vazů (Potu *et al.*, 2009). Osteoporóza definuje kostní chorobu postihující více než 2000 miliony lidí po celém světě. Je to chronický zánět kloubního preparátu spojený s řídnutí kostní tkáně (Banu *et al.*, 2012). V důsledku toho ubývá kostní hmotnosti. Hlavní příčinou osteoporózy se uvádí nedostatek hormonů, zejména u žen, podvýživa, nedostatek pohybu,

vyšší věk nebo menopauza (Banu *et al.*, 2012). Ze statistiky vyplývá až 80 % úspěšně vyléčených případů.

Pro průmyslové zpracování se pěstují i další druhy, např. *Cissus verticilla*, *Cissus erosa* nebo *Cissus populnea*. Rostlina *Cissus verticilla* je významná svými antidiabetickými účinky. Z tohoto důvodu se průmyslově zpracovává pro výrobu inzulínu (Oliveira, 2006). Z plodů rostliny *Cissus erosa* se průmyslově vyrábí srážedla (Duke, Ottesen, 2009). Potravinářská guma, která se využívá k zahušťování potravin, léčiv nebo k výrobě nátěrových hmot se získává ze stonků rostliny *Cissus populnea* (Adeleye *et al.*, 2010).

1.4 Mikroorganismy používané pro antimikrobiální hodnocení

1.4.1 Bakterie *Escherichia coli*

První zmínka o *Escherichia coli* pochází z roku 1885, kdy rakouský mikrobiolog Theodor van Escherich vyizoloval a identifikoval tuto bakterii z dětských fekálií (Croxen *et al.*, 2013). Morfologicky se řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*, skupiny gramnegativních, převážně aerobních bakterií, které netvoří spory (Croxen *et al.*, 2013). Theodor van Escherich definoval *Escherichia coli* jako pohyblivou tyčinku vyskytující se běžně ve střevní mikroflóře lidí (v tlustém střevě), v centrálním nervovém systému, horních dýchacích cestách, v krevním oběhu nebo v urogenitálním traktu, avšak ve větší míře může působit jako patogen (Tenaillon *et al.*, 2010).

Escherichia coli představuje v dnešní době jednu z nejznámějších bakterií sloužící jako modelový mikroorganismus pro vědce z biochemického, genetického a fyziologického odvětví. S tím souvisí fakt, že na této bakterii byla otestována a prozkoumána první konjugace buněk a výměna genetického materiálu (Tenaillon *et al.*, 2010).

Velkou roli hraje její přítomnost v potravinářském průmyslu, zejména při výrobě potravinářských doplňků, a to z hlediska hygieny a sanitace. Přítomnost *E. coli* v pitných vodách je považována za ukazatel kontaminace (Odonkor, Ampofo, 2013). Tento indikátor poukazuje nejen na kontaminaci, ale i na slabou ochranu vodního zdroje, nedostatky v úpravě vod, špatné zdravotní zabezpečení a distribuci. Do potravin se *E. coli* může dostat nejen kontaminovanou vodou, ale také přes kontakt s různými hnojivy nebo fekáliemi (Edberg *et al.*, 2000) (viz **Obrázek 5**).

Pro stanovení této bakterie ve vodách a v potravinách se využívá její schopnosti zkvašovat cukry (laktózu, glukózu, alkoholické cukry) za vzniku kyselin (resp. kyseliny mravenčí, mléčné, pyrohroznové) a plynů (An *et al.*, 2002). Používá se k tomu diagnostický agar obsahující laktózu, pH indikátor, který v přítomnosti *E.coli* (zkvašování laktózy) změní barvu. Pro inhibici doprovodné mikroflóry je vyžadována přítomnost tenzidu. Předpokládá-li se v potravinách nízký počet kolonií *E coli*, využívá se metoda NPM, která se vyhodnocuje podle kódu v de Mannových tabulkách.

Escherichia coli spadá do skupiny koliformních mikroorganismů (An *et al.*, 2002). Pro odlišení koliformních bakterií a *E. coli* ve vodě se využívá membránová filtrace. Ta spočívá ve filtraci přes membránový filtr a přenesení filtru na arbitrážní půdu, kde po inkubaci vyrostou koliformní kolonie v jiné barvě než kolonie *E. coli*.

Biochemicky je *Escherichia* velmi aktivní. Kromě fermentování glukózy (MR test), přítomnost enzymu katalázy, tvorby hemolyzinu obsahuje i enzymy β -D-galaktosidázu a β -D-glukoronidázu (Molina *et al.*, 2015). Detekce těchto enzymů se využívá v systémech chromocult (fluorocult). Potvrzující test pro přítomnost *Escherichia coli* je flurocult, nazývaný MUG test (Adams, Moss, 2000). Principem tohoto testu je štěpení substrátu (4-methyl-umbelliferyl- β -D-glukoronidu) enzymem β -D-glukoronidázou, který *E. coli* obsahuje (Wildeboer *et al.*, 2010). Vzniká 4-methyl-umbelliferon, který pod UV zářením (365 nm) intenzivně září (Adams, Moss, 2000). Pro stanovení lze použít i konduktometrické metody (Wildeboer *et al.*, 2010).

Escherichia coli je velmi odolná bakterie, jejíž optimální teplota pro růst je 37 °C. Ve větším množství může způsobovat onemocnění, avšak může být člověku i prospěšná. Plní funkci komenzála v tlustém střevě, saprofyta nebo symbiota (Kaper *et al.*, 2004). Produkuje tzv. koliciny, které jsou toxické pro některé patogeny (Votava *et al.*, 2003). Velmi prospěšnou funkci plní tvorbou a syntézou vitamínů.

V opačném případě může bakterie způsobit různá onemocnění a střevní potíže (Abe *at al.*, 2008). Dělíme je podle způsobených onemocnění na dvě skupiny - extraintestinální (močové cesty, infekce ran, hnisavá onemocnění, septická onemocnění, krve, dýchacího ústrojí) a intestinální (průjmy) (Köhler, Dobrindt, 2011).

Onemocnění se dá léčit různými léky, především antibiotiky. Na konci 90. let byla zaznamenáno zvýšení rezistence *E. coli* proti antibiotikům. Za příčinu zvýšení rezistence

může pravděpodobně mutace stávající DNA nebo konjugace DNA z jiných bakterií (Finley *et al.*, 2013). Příkladem lze uvést rezistenci na antibiotika založené na bázi β -laktamátu. *E. coli* produkuje bakteriální enzymy β -laktamázy hydrolyzující β -laktamový kruh, které obsahují β -laktamová antibiotika (Pitout, 2012). Tímto způsobem potlačují účinek těchto antibiotik. Typickým příkladem je rezistence na cefalosporiny nebo aminopeniciliny. V opačném případě naštěstí existují antibiotika, na která je *E. coli* citlivá (Pitout, 2012). Jedná se zejména o fluorochinolony a aminoglykosidy.

Escherichia může přežít i v kosmetických výrobcích jako jsou zásypy, olejíčky. Norma ČSN ISO pro stanovení *Escherichia coli* přikazuje negativní přítomnost *E. coli* v kosmetice. Její přítomnost může způsobit záněty spojivek a infekcí očí a kůže.

1.4.1.1 Onemocnění způsobené bakterií *Escherichia coli*

V průběhu let byly identifikovány podle mechanismu, faktorů virulence a tvorbě toxinů různé kmeny *E. coli* způsobující extraintestinální či intestinální (střevní) onemocnění. Kmeny zodpovědné za střevní onemocnění jsou rozřazeny do 6 skupin: enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), difúzně adherentní *E. coli* (DAEC), enteroagregativní *E. coli* (EAaggEC), shigatoxigenní/verotoxigenní *E. coli* (STEC/VTEC) z nichž část se nazývá jako enterohemoragická *E. coli* (EHEC) (Curtis, Lawley, 2003).

Za původce extraintestinálních potíží jsou považovány *E. coli* uropatogenní (UPEC), *E. coli* novorozenecké meningitidy (NMEC) a aviární *E. coli* (APEC) (Antão *et al.*, 2009).

Enteropatogenní *E. coli* (EPEC) způsobuje vodnaté průjmy, které mohou být doprovázeny horečkou nebo zvracením. Závažný průběh může být zejména u kojenců, kdy dochází k velmi rychlé dehydrataci (Hu, Torres, 2015). Infekce je spojena se změnami ve struktuře v buňkách epitelu tenkého střeva (Wang *et al.*, 2012). Na rozdíl od jiných kmenů, tento kmen nevytváří enterotoxiny ST, LT nebo VT (Kjaergaard *et al.*, 2016).

Enterotoxinogenní *E. coli* (ETEC) jsou příčinou cestovatelských průjmů (Fleckenstein *et al.*, 2010). Vyskytuje se endemicky většinou v zemích třetího světa, v teplých oblastech jako např. Mexiko, Bangladéš nebo Egypt (Ahmed *et al.*, 2013). Do střední Evropy se šíří při návratech cestovatelů ze zahraničních cest z těchto zemí. V těchto oblastech je hygiena na špatné úrovni, což urychluje šíření nákazy. Geneticky je tento kmen podobný cholerám (Svennerholm, 2011). Infekce se projevuje průjmem trvajícím po krátkou dobu, křeče v břiše,

četné stolice bez horečky. Problémy přicházejí po 12-36 hodinách po požití kontaminované vody nebo potraviny (Adams, Moss, 2000). Nebezpečí hrozí zejména dětem.

Infekce tímto kmenem je způsobena 2 toxiny, a to termolabilním enterotoxinem LT a termostabilním enterotoxinem ST (Spernadio, 2018). LT je velmi příbuzný toxinu *Vibrio cholerae* (Svennerholm, 2011). K projevu onemocnění nestačí jen přítomnost enterotoxinu, ale i přichycení samotného mikroba na epitelové buňky sliznice tenkého střeva (Spernadio, 2018).

Příkladem enterotoxigenní epidemie lze uvést případ z roku 1985 z Anglie. Návštěvníkům v hotelu byla, jako součást rautu, nabídnuta majonézová omáčka. Do 36 hodin po konzumaci omáčky se u návštěvníků projevíly střevní potíže. Následkem bylo 27 nakažených návštěvníků. Po vyšetření se zjistilo, že majonéza byla nechána po přípravě 8 hodin při pokojové teplotě, čím se zvýšilo množství termostabilního enterotoxinu v majonéze, který způsobil střevní potíže.

K detekci ETEC jsou používány imunologické metody PCR, RIA a ELISA (Sjöling *et al.*, 2015). Pro detekci z vody nebo potravin lze použít precipitační test nebo detekovat pomocí radioaktivně značené sondy.

Kmen difuzně adherentní *E. coli* (DAEC) se považuje za původce známých tzv. cestovatelských průjmů s příměsí hlenu a krve doprovázené zvracením. První zmínka o střevních potížích způsobené tímto kmenem pochází z Mexika (Adams, Moss, 2000).

Dalším kmenem, který v důsledku své přítomnosti způsobuje střevní potíže je enteroagregativní *E. coli* (EAggEC). Charakterizována je dlouhotrvajícími průjmy, avšak bez zvracení pouze se zvýšenou teplotou. Rozšířena je zejména v zemích třetího světa (Andrade *et al.*, 2011). Zdrojem nákazy je pravděpodobně člověk. Přenos nákazy se šíří orálně-fekálním způsobem.

Enteroinvazivní kmen *Escherichia coli* (EIEC) se přenáší kontaktním způsobem. Z toho důvodu je nákaza často nazývána jako nemoc špinavých rukou. Dominujícím sérotypem v tomto kmenu je považován sérotyp O124:H30 (Andrade *et al.*, 2011). Infekční mechanismus je podobný jako u šigel, kdy *E. coli*, pomocí svého lipopolysacharidového pouzdra překonává kyselé prostředí žaludku a proniká do buněk tlustého střeva, kde se množí (Pasqua *et al.*, 2017). Díky tomu má onemocnění těžký průběh za doprovodu vysokých

horeček s vodnatými průjmy s příměsí krve. Vysoké množství výskytu tímto kmenem bylo zaznamenáno ve školkách a v sociálních ústavech s nižšími hygienickými nároky.

Zdrojem EIEC může být nejen voda, ale i potraviny např. mléko nebo sýr. Jeden z případů nákazy pochází z USA, kam byl dovezen sýr z Francie. Po požití tohoto sýru se u 387 lidí projevil střevní potíže (Patel, 1994). Ve výsledku byla chyba v zaměstnancích továrny, kteří nedodrželi správné hygienické podmínky při přípravě sýru. Tento případ je považován za jeden z největších případů nákazy tohoto kmene v USA.

Poslední a největší skupinou jsou shigatoxigenní/verotoxigenní *E. coli* (STEC/VTEC). Část této skupiny se nazývá jako enterohemoragická (EHEC) (Curtis, Lawley, 2003). Nejčastěji je nákaza spojována se sérotypy O157:H7 a O104:H4 (Tarr *et al.*, 2005). Skupina je charakterizována produkcí verotoxinů VT1 a VT2 (Luna-Gierke *et al.*, 2014). Verotoxin VT1 je geneticky, biologicky a antigenitou podobný shiga toxinu, který produkuje *Shigella dysenteriae*, proto někteří odborníci nazývají tuto skupinu jako shiga-like toxinogenní (Thorpe, 2004). Onemocnění může mít lehčí formu (mírný vodový průjem) až po formu závažnější (silný průjem s krví a horečkou).

EHEC se váže na buňky v tlustém střevě (Thorpe, 2004). Způsobit může hemoragickou kolitidu, postižení cévní soustavy, záchvaty nebo hemolyticko-uremický syndrom (Bugarel *et al.*, 2011). Hemoragická kolitida je charakterizována krvavým průjmem bez horečky. Předchází bolesti břicha, křeče a vodnatý průjem. Pro hemolyticko-uremický syndrom je typické selhání ledvin, hemolytická anémie, trombocytopenie (Loirat, Frémeaux-Bacchi, 2011). Nebezpečná je pro všechny věkové kategorie především v letním období.

Zdrojem nákazy jsou potraviny, konkrétně maso, mléko, ovoce nebo sýry. Sérotyp O157:H7 byl vyizolován z hovězího masa v hamburgrech, po kterých po požití nastaly střevní potíže (Jabur *et al.*, 2016). Z toho vyplývá, že za zdroj tohoto sérotypu se považuje hovězí dobytek (Adams, Moss, 2000). Fakt podkládá případ ze Skotska, kdy bylo kontaminované hovězí maso od řezníka, což mělo za příčinu 280 nakažených osob, z toho 20 úmrtí. Na základě těchto případů byl vyvinut lepší systém HACCP.

Zvláštní skupinou jsou kmeny *E. coli*, které způsobují extra-intestinální infekce (ExPEC) (Antão *et al.*, 2009). Uropatogenní *E. coli* se přichytává v oblasti mezi konečníkem a pohlavním orgánem, odkud se může přesídlit do močového traktu a způsobit zánět močových cest (Abe *et al.*, 2008). Výskyt uropatogenní infekce může být v důsledku

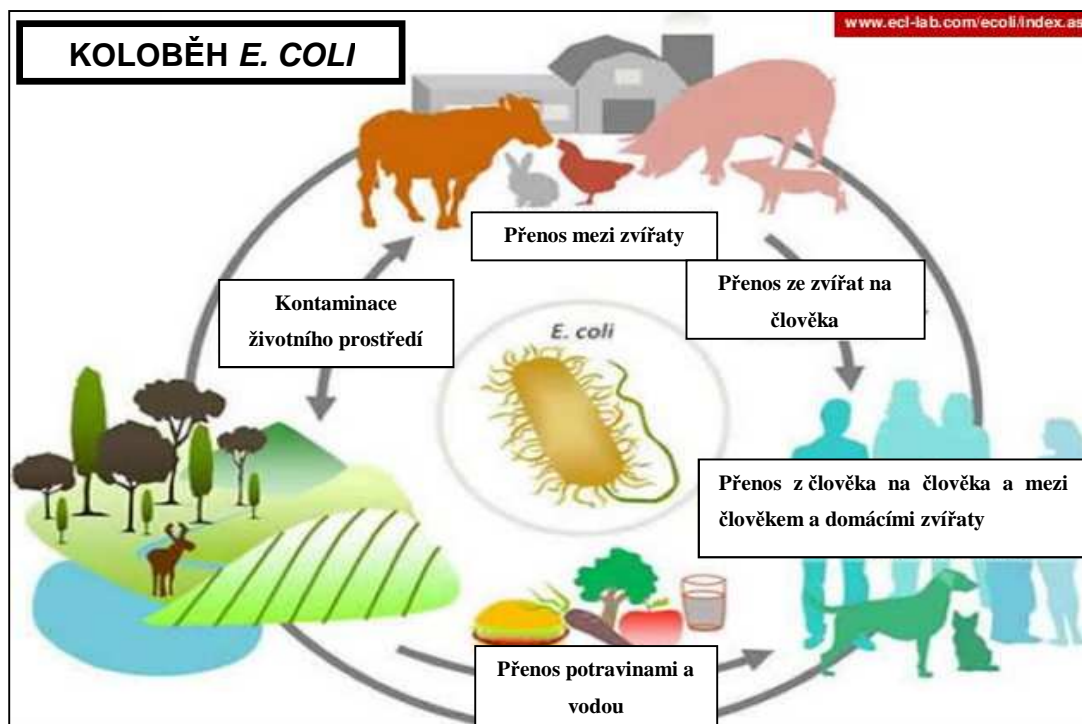
přechodné přítomnosti tohoto kmene *E. coli* ve fekálním mikrobiomu. Uropatogenní *E. coli* se přiřazuje až 90 % propuknutých infekcí močových cest. Zánět močových cest postihuje zejména ženy. Statisticky asi 60 % žen mělo infekci močových cest do svého 20. roku života (Marrs *et al.*, 2005). Zánět močových cest se projevuje častým bolestivým vylučováním. Ojediněle je infekce spojena se závažnějšími problémy jako s bolestmi v boku, nevolností, zvracením, horečkou, pocením, malátností tzv. cystitidou (Mulvey, 2002). Napadne-li infekce i ledviny, jedná se o pyelonefritidu.

Jako prevence se doporučuje užívat extrakty z brusinek v jakékoliv formě. Plody brusinek obsahují fenolické glykosidy, flavonoidy, triterpeny, organické kyseliny, barviva (proanthokyanidiny, anthokyanidiny) a vitaminy (A, C), které blokují uchycení bakterií, a tím předchází vzniku zánětu ledvin, onemocnění močového měchýře a močových cest (Nováčková, Chmel, 2012).

Další alternativou se uvádí probiotika na bázi laktobacilů. Ty produkují značné množství peroxidu vodíku, které působí baktericidně na patogenní mikroorganismy. Brusinky ani probiotika nevykazují vedlejší účinky. Jedná se však o doplňky stravy, které jsou doporučovány v kombinaci s antibiotiky (Marrs *et al.*, 2005).

Za původce meningitid u novorozenců jsou zodpovědné kmeny *E. coli*, tzv. NMEC (Abe *et al.*, 2008). Buňky pronikají přes sliznici a napadají centrální nervový systém (Antão *et al.*, 2009).

APEC (aviárně patogenní *E. coli*) má za důsledek infekci dýchacích cest zejména u drůbeže (Antão *et al.*, 2009). U lidí nebyla přítomnost toho kmene detekována.



Obrázek 5: Koloběh přenosu *Escherichia coli*
(převzato a upraveno z: <http://www.ecl-lab.com/fr/ecoli/index.asp>).

1.4.2 Bakterie *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus se z morfologického hlediska řadí do skupiny grampozitivních koků. Jako jeden z mála mikroorganismů má aerobní i anaerobní metabolismus, pomocí kterého může zkvašovat cukry za tvorbu kyselin. *Staphylococcus aureus*, nazývaný jako zlatý stafylokok, objevil v roce 1880 skotský chirurg Alexander Ogston, který pod mikroskopem prozkoumal hnis z rány malého chlapce (Licitra, 2013). Popsal stafylokoka jako v hroznech či párech se vyskytující nepohyblivé a nesporující koky (Myles, Datta, 2012).

Stafylokok je považován za lidský patogen, avšak je prokázáno, že u 30 % zdravých lidí symbioticky přežívá na kůži, sliznici nebo nosních dutinách (Gordon, Lowy, 2008). Jeho patogenese se rozvíjí až v případě, kdy má jedinec oslabenou obranyschopnost nebo je více náchylný k infekci např. po operaci. Předpokladem vypuknutí patogenese jsou i drobná poranění, cizí tělesa v těle (implantáty) nebo nástup virové infekce.

Staphylococcus aureus má dva poddruhy – *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* (Votava *et al.*, 2003). U *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* není zaznamenán výskyt u lidí, za to však nadměrný výskyt u malých přežvýkavců (De la Fuente *et al.*, 2011).

Biochemicky je stafylokok velmi odolná bakterie. Rozkládá peroxid vodíku, roste ve velkém rozmezí pH (4-10), je tolerantní k vyššímu obsahu soli a alkoholu. Překážkou není ani vysoká vodní aktivita.

Schopnost patogeneze vyjadřují povrchové a extracelulární faktory virulence. Do povrchových řadíme peptidoglykan, protein A, kolagen, elastin a koaguláza (Jenkins *et al.*, 2015). Do extracelulárních spadají důležitější složky jako enzymy (hyaluronidáza, koaguláza, lipáza, kataláza, nukleáza, penicilináza) a toxiny (cytolyziny, enterotoxiny, toxin syndromu toxického šoku, exfoliativní toxin) (Otto, 2014).

Enzymy hrají důležitou roli pro pronikání stafylokoků do tkání. Hyaluronidáza deformuje mazové žlázy a podkožní tkáň. Enzym penicilináza rozkládá β -laktamový kruh, který obsahují β -laktamová antibiotika (penicilin). Důsledkem toho vznikla rezistence na penicilin (Tong *et al.*, 2015).

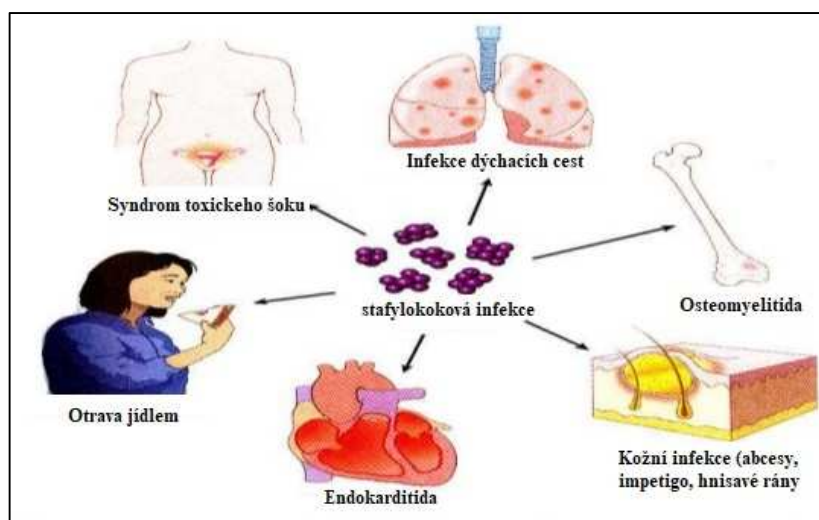
Poškození povrchu membrány napomáhají toxiny cytolyziny (Vandenesch *et al.*, 2012). Mezi ně patří 4 hemolyziny a leukocidin. První hemolyzin α produkuje většina kmenů *Staphylococcus aureus*. Svým působením poškozuje tkáň. Druhý hemolyzin β (sfingomyelináza C) podporuje tvorbu hnisavých ložisek. Zajímavostí u tohoto toxinu je jeho teplotní optimum, které se pohybuje při chladničkových teplotách, kdy vzniká tzv. chladová hemolýza (hot-cold hemolysis) (Votava *et al.*, 2003). Dále se využívá pro identifikaci v testu CAMP společně se *Streptococcus agalactiae* (Chuzeville *et al.*, 2012).

Enterotoxiny, produkující až 50 % kmenů stafylokoků, mohou způsobit otravy neboli intoxikace (Otto, 2014). Nejčastějším případem je intoxikace jídlem, kdy se enterotoxiny do jídla dostávají při nevhodných skladovacích podmínkách, špatné úpravě jídla nebo kontaminaci z vnějšího prostředí. Počet enterotoxinů čítá více než 20 skupin enterotoxinů rozdělených podle abecedního pořadí (Šťástková *et al.*, 2012). Enterotoxiny si lze představit jako malé proteinové molekuly složené z aminokyselin (Wu *et al.*, 2016). Ve většině případů otrava probíhá pomocí enterotoxinu A nebo B (Wu *et al.*, 2016).

Přítomnost *Staphylococcus aureus* se dokazuje na arbitrážní půdě Baird-Parker s následným potvrzením testu na koagulázu. Pro průkaz toxinů je určen krevní agar pro tvorbu hemolýzy. Pro detekci toxinů lze použít starší, avšak stále účinné sérologické testy založené na vazbě antigen-protilátka jako je např. latexová aglutinace nebo gelová difúze (Šťástková *et al.*, 2012). V současné době je však rutinnější použití molekulárních biologických metod,

jejichž základem je polymerázová řetězová reakce (PCR). Ačkoliv je tato metoda spolehlivá, detekce se zaměřuje spíše na analýzu DNA, nikoliv na samotné enterotoxiny (Wu *et al.*, 2016). Nejlepším řešením detekce představuje elektrochemická, fluorescenční imunoanalýza nebo ELISA. Z chromatografických metod je nejvíce vhodná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (Štávková *et al.*, 2012). Chromatografie je velmi citlivá, ale její použití je omezeno vysokou cenou přístrojů a časovou náročností při úpravě vzorků.

Onemocnění, které *St. aureus* způsobuje, můžeme rozdělit podle mechanismu působení do 3 skupin: pyogenní hnisavé infekce, infekce způsobené toxiny a intoxikace (viz **Obrázek 6**).



Obrázek 6: Příznaky infekcí způsobené *Staphylococcus aureus*

(převzato a upraveno z: <https://image.slidesharecdn.com/bacterialanimationandmanagement-150326094732-conversion-gate01/95/bacterial-animation-and-management-34-638.jpg?cb=1427363307>).

1.4.2.1 Pyogenní infekce

Při pyogenních infekcích vytváří bakterie ložiska plná žlutého hnisu. Typickým příkladem je nemoc zvaná impetigo. Trpí jí většinou děti v předškolním věku (Canton *et al.*, 2018). Dětem se objevují puchýře na obličeji, ústech a rukách. Při vypuknutí je doporučeno izolovat nakaženého z důvodu velmi rychlého rozšíření v dětských kolektivech (školky, školy). Za původce je považován *Staphylococcus aureus*, není však výjimkou ani působení *Streptococcus pyogenes* (Canton *et al.*, 2018). Léčba probíhá mastmi a antibiotiky, nejlépe cefalosporiny (Votava *et al.*, 2003).

Velmi nepříjemná infekce folikulitida napadá přes póry vlasové folikuly a mazové žlázy a vytváří zánětlivé místa (Ranjan *et al.*, 2012). Zánět se pozná podle svědivých červených fleků na hlavě u vlasů, vousů nebo na obličeji (Ranjan *et al.*, 2012). Vzniku zánětu

může přispět špatné oholení nebo nesprávné odličování obličeje. V tomto případě se doporučuje alternativní medicína, představující léčivé krémy a šampony. Proti svědění pomáhají obklady z octa.

Zdrojem výskytu *Staphylococcus aureus* jsou uváděny i kosmetické výrobky jako jsou řasenky a líčidla. Podle stanovených norem není přítomnost této bakterie v kosmetických výrobcích tolerována. *Staphylococcus aureus* může být příčinou zánětu mazových žlázek na okraji víčka nebo zánětu spojivek. Projevuje se vytvořením ječného zrna, zarudnutím, pálením a svěděním očí nebo citlivostí na světlo, tzv. světloplachostí. Přenáší se přímým kontaktem s infikovanou osobou, rukami, vodou nebo z předmětů osobní hygieny.

Mastitida představuje nebezpečnou nemoc postihující hlavně kojící ženy (Sun *et al.*, 2014). Při kojení se v mléčných žlázách žen vytvoří zánět, který musí být zastaven antibiotiky (Oliveira *et al.*, 2012).

Bakterie postihuje i kloubní aparát jako klouby, kosti (osteomyelitida) a kostní dřev. (Mal *et al.*, 2002). Osteomyelitida pochází primárně z poúrazové a pooperační infekce nebo sekundárně ze zánětlivých změn v kostech. Nemoc je doprovázena vysokou teplotou, při které se ucpávají cévy a odumírají kostní tkáň. U dětí napadá dlouhé kosti, u dospělých obratle (Votava *et al.*, 2003).

Prvenství z nejzávažnějších onemocnění stafylokokem drží zánět srdce neboli endokarditida. Dochází k zasažení srdeční chlopně, která se spojuje s plicní embolií. Uvádí se, že v 50 % případů je tato nemoc smrtelná (Tong *et al.*, 2015). Nejlepší léčbou je výměna srdeční chlopně a užívání antibiotik.

Další velmi závažnou nemocí představuje infekční onemocnění pneumonie. Jedná se o poškození dýchacích cest a plic hnisavými ložisky (Lee *et al.*, 2010). Trpí na ni především osoby s oslabenou imunitou. Typické jsou vysoké teploty, zimnice a kašel.

1.4.2.2 Infekce způsobené toxiny

Druhou skupinou jsou onemocnění způsobené vyprodukovanými toxiny. Působení toxinu exfoliatinu, kterou bakterie *Staphylococcus aureus* produkuje, stojí za vznikem exfoliativní dermatitidy neboli syndromu opažené kůže (Bunikowski *et al.*, 2000). Na kůži se vytváří puchýřky, které se poté olupují společně s kůží a vytváří červené, lesklé fleky (Salami

et al., 2012). Po oloupání dostává kůže vzhled opařené kůže nebo také popálenin druhého stupně.

Velmi specifický je toxin syndromu toxického šoku (TSST-1), který byl objeven u menstruuujících žen používající tampony (King *et al.*, 2014). Tampon představuje příznivé prostředí pro pomnožení bakterie a zvýšenou produkci enterotoxinu (Votava *et al.*, 2003). Pro syndrom jsou typické vysoké teploty, skvrnitá kůže, kolapsy, střevní potíže, bolesti svalů, hlavy, poruchy vědomí, dezorientace, lomivost nehtů, vypadávání vlasů, poškození centrální nervové soustavy.

Toxiny jsou natolik odolné, že pro ně nejsou překážkou ani trávicí kyseliny a enzymy. Díky tomu se mohou hromadit v gastrointestinálním traktu (Pinchuk *et al.*, 2010). Stává se tak v případě léčení širokospektrálními antibiotiky, kdy dochází k potlačení střevní mikroflóry, a tím je napomáháno k přemnožení buněk stafylokoka, produkující enterotoxin B. Výsledkem je zánět - enterokolitida (Thakkar, Agrawal, 2010). Nebezpečnost spočívá v poškození sliznice, silné dehydratace v důsledku silných průjmů s krví. U starších lidí a dětí hrozí protržení střev (Berman, Moss, 2011).

1.4.2.3 Intoxikace (otravy jídlem)

Třetí skupina charakterizuje nemoc zvaná jako stafylokoková enterotoxikóza neboli otrava z potravin. Potraviny jsou kontaminovány enterotoxiny produkované bakterií *Staphylococcus aureus* (Argudín *et al.*, 2010) (viz **Obrázek 7**). Je třeba mít na paměti, že enterotoxiny jsou termostabilní molekuly odolné proti varu (Argudín *et al.*, 2010). V důsledku toho mohou být přítomny v potravinách a způsobit intoxikaci, i přes to, že není v potravině prokázána přítomnost samotné bakterie *Staphylococcus aureus*.

Za pravděpodobné zdroje nebezpečných toxinů jsou považovány potraviny, které se neopracovávají: majonézy, saláty, krémy, zmrzliny, cukrovinky, smetana, mletá masa, ryby, sýry, drůbeží produkty (Votava *et al.*, 2003). Primárně mohou zdroje být kontaminovány už např. vodou nebo hnojivy. Přenášet se můžou do potravin kašláním, kýčáním či nedodrženou hygienou (Hennekinne *et al.*, 2012).

Potíže přicházejí za krátkou dobu, odhadem do 6 hodin po užití. Poté přichází nevolnost, vodnatý průjem, bolest břicha, bolest hlavy, zvracení, křeče, dehydratace, pocení (Argudín *et al.*, 2010). Toxiny dokáží povzbudit funkci trávicího mechanismu, což způsobí

rychlejší nástup zvracení a průjmů (Pinchuk *et al.*, 2010). Nákaza by měla sama odeznít do 24 hodin, pokud neodezní, je nutné vyhledat lékaře. Infekce může mít fatální následky u starých osob a dětí, u kterých dochází k rychlé dehydrataci.

Jako prevence se doporučuje správná teplota při chlazení potravin, dodržování hygieny a sanitace a používání dezinfekčních přípravků. Nejjednodušší, nejlevnější a neúčinnější prevencí je dodržování správného mytí rukou. Málo účinné jsou desinfekční přípravky na bázi fenolu s přídavkem rtuti nebo alkoholu, které více bakterie konzervují než usmrcují (Votava *et al.*, 2003).

Pro příklad lze uvést případ intoxikace stafylokokovými enterotoxiny z dubna roku 2013 z německého Freiburgu. V místním hotelu byla na večeři podávána zmrzlina. Zmrzlinu ochutnalo na tři destičky návštěvníků, z toho u poloviny se objevily střevní potíže a zvracení. Za pravděpodobný zdroj kontaminace se považuje zpracování již kontaminované přísady zmrzliny či kontaminované zařízení používané k výrobě zmrzliny (Fetsch *et al.*, 2014).

Obdobný příklad se stal též roku na jedné internátní škole ve Švýcarsku. 10 studentů a 4 zaměstnanci požili chléb s měkkým sýrem. Během následujících 7 hodin u všech nastaly typické potíže pro intoxikaci tj. bolesti břicha, vodnatý průjem, zvracení a horečka. Po laboratorním průzkumu byla v sýru detekována přítomnost koaguláza pozitivního stafylokoka, který stál za zvýšení hladiny enterotoxinu D. Za primární zdroj bylo považováno syrové mléko, ze kterého byl sýr vyroben. Mléko pocházelo od krav, u kterých byl zaznamenán dlouhodobý problém s mastitidou (Johler *et al.*, 2015).



Obrázek 7: Průběh stafylokokové intoxikace
(převzato a upraveno z: <https://slideplayer.com/slide/4939770/>).

1.4.3 Bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa představuje potenciální patogenní gramnegativní bakterii z rodu *Pseudomonas*. Jedná se o striktně aerobní nesporulující bakterii (Gellatly, Hancock, 2013). Na rozdíl od ostatních bakterií získává energii pomocí oxidačního metabolismu. Lze ji najít ve vodách, půdě, kanalizaci, vzduchu i ve střevním traktu (Mena, Gerba, 2009). U zdravých lidí osidluje trávicí ústrojí.

Pseudomonas se pyšní velkou odolností a tolerantností k teplotám, vlhkostí a k solím. Díky tomu se ráda pomnožuje a přežívá ve vlhkých prostředích např. v kuchyních, koupelnách a na vlhkých předmětech (Gellatly, Hancock, 2013). S oblibou zamořuje nemocniční prostředí, nejvíce resuscitační oddělení, jednotky intenzivní péče nebo novorozenecké oddělení (Lee, Zhang 2015). Jejich výskyt je zaznamenán na katetrách a dýchacích přístrojích, do kterých se dostávají ve špatně připravených dezinfekčních přípravcích. Zdroj přenosu bakterie mohou být ruce, rukavice nebo nepřímou cestou přes instrumentální nástroje (Khan *et al.*, 2015).

V dnešní době je vyhubení této bakterie velkým problémem, protože moderní zařízení se špatně sterilizuje a infekce se rychle šíří. Bohužel v dnešní době se stala *Pseudomonas* natolik odolná, že přežívá i v dezinfekcích s vysokými koncentracemi chlóru. Naštěstí vědci objevili alternativu, a to v podobě dezinfekce založené na ozařování vlnovými délkami, zejména při 296 nm (Popp *et al.*, 2016). Tato vlnová délka existuje při denním světle, jeví se jako velmi účinná, a tím dává naději nemocničním zařízením v rámci hygienických a sanitačních požadavků.

Výskyt *Pseudomonas aeruginosa* je uváděn i v balených vodách nebo v kosmetických výrobcích. V obou případech je stanovena nulová tolerance přítomnosti. Na základě své vydatné odolnosti je velmi rezistentní k antibiotikům (Gellatly, Hancock, 2013). Stejně jako u čeledi *Enterobacteriaceae*, obsahuje β -laktamázu, pomocí které získává rezistentnost např. k ampicilinu nebo celafotinu (Livermore, 2002). Pro izolaci bakterie je určen agar s acetamidem nebo cetrimidový agar. Předností této bakterie je tvorba pigmentu, pomocí které je dobře identifikovatelná (viz **Obrázek 8**). *Pseudomonas* tvoří modrý pigment pyocyanin, žlutý fluorescein, červený pyruubin a hnědý melanin (Caldera *et al.*, 2016). Odlišením od ostatních se jako základní znak, provádí test na oxidázu, u které vykazuje pozitivní reakci do 30 s. Výrazným znakem je vůně kolonií po trimethylaminu, který se mění v zápach připomínající amoniak (Martins *et al.*, 2017).



Obrázek 8: Pigmenty produkující *Pseudomonas aeruginosa*
(převzato z: <https://jb.asm.org/content/183/21/6454>).

1.4.3.1 Onemocnění způsobené bakterií *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas je považována za původce tz. nozokomiálních nebo také nemocničních nákaz (Popp *et al.*, 2016). Za normálních okolností není nebezpečná, avšak za určitých podmínek může působit jako oportunní patogen (Juan *et al.*, 2017). Určitými podmínkami jsou myšleny např. snížená imunita v důsledku dlouhodobého užívání antibiotik, věk nebo závažné nemoci (Juan *et al.*, 2017). Nejvíce náchylní jsou lidé léčící se s leukémií, s popáleninami nebo AIDS (Mena, Gerba, 2009).

Ačkoliv bakterie neobsahuje první příčky v četnosti způsobených onemocnění, i přesto je důležitá prevence. V případě jejího působení v nemocnicích přežívá v prostředí i několik let. Vzhledem ke své odolnosti je obtížné ji vyhubit, a proto musí nemocnice a nemocniční zařízení dodržovat přísná pravidla, např. pacient nesmí být přijat do infikovaného prostředí, musí se zkontrolovat všechny léky, masti, krémy, oční kapky podávané pacientům.

Pseudomonas se pyšní rozmanitými faktory virulence. Faktory představují 2 exotoxiny (exotoxin A, exoenzym S), proteiny (fibrin, elastin, kasein), pyocyanin a různé cytotoxické látky (hemolysiny, proteázy, ramnolipidy, fosfolipázy (Gellatly, Hancock, 2013). Exotoxiny narušují buněčnou membránu, zvyšují její propustnost a urychlují průnik bakterie do tkáňových vláken (Moradali *et al.*, 2017). Napomáhají jim proteiny, které v důsledku svého štěpení poškozují stěny cév (hemoragie, nekrózy).

Pro *Pseudomonas* není problém zasáhnout jakýkoliv orgán nebo část těla. Při postižení kůže, srdce a kloubů vznikají nepříjemné záněty. Velký podíl na tom mají proteolytické enzymy štěpící kolagen, elastin, fibrin (Votava *et al.*, 2003).

Závažný průběh je zejména u nemocných s geneticky dědičnou nemocí dýchacího systému (cystickou fibrózou) (Dhand, 2018). Bakterie zasahuje dolní cesty dýchací, kde poškodí funkci plic vytvořením zánětu (pneumonii) (Cantin *et al.*, 2015). Bohužel se s touto infekcí spojuje vysoký počet mortality.

Vhodné prostředí pro výskyt *Pseudomonas aeruginosa* jsou kosmetické výrobky, především přípravky určené k aplikaci kolem očí a na ošetření pleti. Při postižení oka napomáhají enzymy proteázy, které napadají centrální nervový systém očí a vznikají zánětlivá ložiska (Gellatly, Hancock, 2013). Výsledkem jsou záněty spojivek, zákaly, hnisání až slepota (Sharma *et al.*, 2018). Bakterie se může do oka dostat i přes kontaminované kontaktní čočky (Kugadas *et al.*, 2016).

1.4.4 Kvasinka *Candida albicans*

Mezi nejběžnější lidské patogeny z říše hub patří kvasinka *Candida albicans*. Výskyt kvasinky není pro člověka nikterak ohrožující. Ze 40-60 % je součástí mikroflóry u zdravých dospělých lidí (Erdogan, Rao, 2015). Komenzálně přežívá u zdravých osob na kůži, sliznici nebo ústní dutině (Da Silva Dantas *et al.*, 2016). *Candida albicans* se používá jako model k rozpoznávání mikrobiálních patogenů přirozeným imunitním systémem (Netea *et al.*, 2008).

C. albicans se řadí mezi tzv. bílé kvasinky, tvoří bíle zbarvené kolonie. Nejvhodnější půda pro jejich růst je Sabouragův agar. Typická pro kvasinku je vůně kolonií připomínající kvasnice nebo droždí (Votava *et al.*, 2003). Významným znakem je zkvašování cukrů (glukózy, maltózy, sacharózy), které se využívá pro biochemickou identifikaci (Souza *et al.*, 2015).

1.4.4.1 Onemocnění způsobené kvasinkou *Candida albicans*

Je-li obranný imunitní systém nějakým způsobem oslaben, jindy neškodná kvasinka se přemnoží a stává se z ní agresivní a nebezpečná houba (Martins *et al.*, 2014). Infikuje nejen povrch kůže, ale i vnitřní orgány. Často se vyskytuje u lidí se sníženou rezistencí imunitního systému v důsledku hormonálních změn nebo při poškození bariér v rámci léčby dlouhodobé nemoci (Tsui *et al.*, 2016). Ohroženi jsou nedonošení novorozenci, těhotné ženy nebo osoby staršího věku.

Kvasinka je považována za nejčastějšího původce mykotických onemocnění tzv. kandidózy (Martins *et al.*, 2014). Kandidózy drží prvenství mezi infekcemi získané v nemocnicích. Nebezpečné jsou pro pacienty, kteří podstoupili chirurgický zákrok,

transplantaci nebo leží na jednotkách intenzivní péče (Sydnor, Perl, 2011). Infekce postihuje povrch těla kůže, nehty, ústa, jazyk, nebo vnější část pochvy (Tsui *et al.*, 2016). Na kůži se jeví jako vlhká zapáčka, nejvíce v tříselech, pod prsty i prsy, u dětí pak jako nepříjemná vyrážka pod plenkou. Při zasažení nehtového ložiska zvyšuje jejich lomivost a kůže pod nehty svědí a pálí.

Moučnivka představuje akutní formu kandidózy postihující dutinu ústní (Sobel, 2007). Charakteristické jsou pro ni bílé splývající povlaky na sliznici, patře a jazyka (Lewis, Williams, 2017). Moučnivka nejvíce trápí děti v raném věku. Častý výskyt moučnivky se uvádí u pacientů léčících se s AIDS (Votava *et al.*, 2003). U starších osob se může kvasinka kolonizovat pod zubními protézami a způsobovat kandidové stomatitidy (Gendreau, Loewy, 2011).

Kvasinka se běžně vyskytuje v mikroflóře ženských genitálií (Cassone, 2015). Při poklesu pH vaginálního prostředí se kvasinka ráda množí, což napomáhá vzniku nepříjemných vaginálních kandidóz (Zhu, Filler, 2010). Projevuje se bílými skvrnami, svěděním, pálením, bílými výtoky. Často postihují ženy při hormonální změně nebo v těhotenství (Gonçalves *et al.*, 2016). Vaginální kandidózou může být ohrožen i muž, který má nechráněný pohlavní styk s nakaženou ženou. V tomto případě je potřeba dbát na opatrnost, ochranu a hlavně hygienu.

Ačkoliv *C. albicans* je uváděna jako součást mikroflóry, během posledních let byl pozorován abnormální růst v gastrointestinálním, močovém a respiračním traktu (Martins *et al.*, 2014). Přemnožení uvnitř orgánů může potlačit fyziologickou přirozenou bariéru a způsobit dysmikrobie (Erdogan, Rao, 2015). Nekontrolovatelné rozšíření do plic, ledvin, močového měchýře, mozku nebo srdce může mít za následek fatální dopad na lidské zdraví (Lohse *et al.*, 2017).

V potravinářském průmyslu nemá *Candida albicans* nikterak důležitý význam. Svou přítomností spíše přispívá ke zhoršení organoleptických vlastností potravin např. ke kažení kompotů, omáček, ovocných moštů nebo kontaminuje droždí a zhoršuje kynutí těsta (Rajkowska, Kunicka-Styczyńska, 2018).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Mikrobiologické hodnocení – ČSN EN ISO 11930

Mikrobiologické hodnocení podle normy ČSN EN ISO 11930 popisuje hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku. Jednotlivé kroky testování byly prováděny podle přesně definovaného postupu nacházející se v normě ČSN EN ISO 11930 vydané v únoru 2014.

2.1.1 Vzorky

Vzorky, určené k testování, byly poskytnuty firmou K2 Farm s.r.o. se sídlem v Opavě v rámci projektu TAČR - Suplementy pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu (TH02010762). Jednalo se o rostlinné extrakty žumen (*Cissus quadrangularis* extrakt č. š.NSIN02069-CQP) a β -aescin (amorfní látka č. š. 011118 PK 18091).

Oba vzorky byly testovány ve třech koncentracích, tj. v 0,01%; 0,1% a 1%. Vzorky vykazovaly práškovitý charakter. Pro jejich naředění do příslušných koncentrací byla za aseptických podmínek použita sterilní destilovaná voda.

Vzorky byly testovány podle normy mikroorganismy *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*. Nebylo provedeno testování s plísní *Aspergillus brasiliensis*.

2.1.2 Mikroorganismy

Mikroorganismy uvedené níže, byly poskytnuty k testování antimikrobiální ochrany kosmetických výrobků z České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně.

- *Escherichia coli* CCM 4517
- *Staphylococcus aureus* CCM 2022
- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955
- *Candida albicans* CCM 8186

2.1.3 Laboratorní přístroje

- Autokláv PS 20 A BMT, ČR
- BACMED 6iG2 Aspiag, s.r.o. ČR
- Termostat BT 120M Praha, ČR
- Denzitometr DEM-1 Biosan, Litva
- Chladnička HS 3966 Gorenje, Slovinsko
- Chladnička ZRB 36 ND Zanussi, ČR
- Laboratorní váhy KERN 440-4 Kern, Německo
- Laboratorní mikroskop Nikon ECLIPSE E200 Nikon, Japonsko
- Počítadlo kolonií POL-EKO, Polsko
- Sterilizátor STERILAB BMT, ČR
- UV lampa MD 118 Biosan, Litva
- Vortex V-1 plus Biosan, Litva

2.1.4 Laboratorní pomůcky

- Automatické pipety Eppendorf Eppendorf, Německo
- Automatické pipety WITOPET Witeg, Německo
- Jednorázové sterilní plastové kličky VWR International, USA
- Jednorázové sterilní plastové L-hokejky BIOLOGIX, Čína
- Podložní, krycí sklíčka VWR International, USA
- Plastové stojany na zkumavky VWR International, USA
- Plastové špičky Eppendorf, Německo
- Plastové špičky FINNTIP 10 ml Thermo Scientific, USA
- Skleněné zkumavky 15 ml VWR International, USA
- Sterilní plastové zkumavky 15 ml VWR International, USA
- Sterilní plastové Petriho misky VERKON, ČR
- Špachtle VWR International, USA

2.1.5 Chemikálie a činidla

- Destilovaná voda
- Ethanol 95 %
- Chlorid sodný
- Polysorbát 80
- Krystalová violet
- Lugolův roztok
- Safranin
- Karbofuchsin

2.1.6 Kultivační média a pracovní roztoky

- **Fyziologický roztok**

Příklady: Chlorid sodný, destilovaná voda

Postup: V Erlenmeyerově baňce bylo rozpuštěno 4,25 g chloridu sodného v 500 ml destilované vody. Baňka byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Následně byla baňka uchována v chladničce.

- **MALT agar, HiMedia (Mumbai, Indie)**

Příklady: Sladinový extrakt (30 g/l), agar (15 g/l)

Postup: Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 22,5 g prášku a rozmícháno v 500 ml destilované vody a necháno autoklávováno při 121°C po dobu 15 minut. Následně byla vysterilizovaná půda ochlazená na laboratorní teplotu rozlita do Petriho misek. Po utužení byly půdy uchovávány při chladničkové teplotě.

- **Masopeptonový agar, HiMedia (Mumbai, Indie)**

Příklady: Peptická trávenina živočišné tkáně (10 g/l), masový extrakt (10 g/l), chlorid sodný (5 g/l), agar (15 g/l)

Postup: 20 g prášku bylo rozmícháno v Erlenmeyerově baňce spolu s 500 ml destilované vody a následně ponecháno sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Vysterilizovaná půda byla ochlazena a rozlita do plastových Petriho misek. Po utužení byly půdy skladovány při chladničkové teplotě.

- **Mueller Hinton agar, HiMedia (Mumbai, Indie)**

Přísady: Masová infúze (2 g/l), kaseinový hydrolyzát (17,5 g/l), škrob (1,5 g/l), agar (17 g/l)

Postup: V 500 ml destilované vody bylo rozpuštěno 19 g prášku a necháno sterilizovat v autoklávu po dobu 15 minut při 121 °C. Po ochlazení a rozlití do Petriho misek, byly půdy uchovány v ledničce.

- **Neutralizátor (Eugon LT 100 Broth Base w/o Tween 80), HiMedia (Mumbai, Indie)**

Přísady: Enzymatický hydrolyzát kaseinu (15 g/l), sójový pepton (5 g/l), chlorid sodný (4 g/l), L-cystin (0,7 g/l), siřičitan sodný (0,2 g/l), glukóza (5,5 g/l), vaječný lecitin (1 g/l), triton X-100 (1 g/l)

Postup: V Erlenmeyerově baňce bylo smícháno 16,2 g prášku s 500 ml destilované vody obsahující 2,5 g polysorbátu 80 (Tween 80). Směs byla ponechána sterilizovat v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Po ochlazení byl roztok ponechán v ledničce.

- **Sabouraud Dextrose agar (Sabouragův agar), HiMedia (Mumbai, Indie)**

Přísady: Enzymatický hydrolyzát kaseinu (5 g/l), masový pepton (5 g/l), glukóza (40 g/l), agar (15 g/l)

Postup: 32,5 g prášku bylo rozmícháno s 500 ml destilované vody v Erlenmeyerově baňce a vloženo do autoklávu a necháno sterilizovat při 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci byl roztok ochlazen, dobře promíchán a rozlit do Petriho misek. Kultivační půdy byly uchovány při ledničkových teplotách.

- **Soyabean Casein Digest agar (Tryptonový sójový agar), HiMedia (Mumbai, Indie)**

Přířady: Pankreaticky natrávený kasein (15 g/l), chlorid sodný (5 g/l), sójový pepton (5 g/l), agar (15 g/l)

Postup: V 500 ml destilované vodě bylo rozmícháno 20 g prášku a autoklávováno při 121 °C po dobu 15 minut. Následně byla směs ochlazena a poté rozlita do Petriho misek. Po utužení byly půdy skladovány v ledničce.

- **Aspergillus Differentiation Medium Base (AFPA), HiMedia (Mumbai, Indie)**

Přířady: Kvasničný extrakt (20 g/l), pepton (10 g/l), citran železito-amonný (0,5 g/l), dichloran (0,002 g/l), chloramfenikol (0,1 g/l), agar (15 g/l)

Suplement: chloramfenikol (SR78)

Postup: Do 500 ml destilované vody bylo naváženo 22,75 g prášku. Směs byla promíchána a nechána po dobu 15 minut při 121 °C sterilizovat. Směs byla ochlazena na cca 50 °C a následně byl asepticky přidán suplement (Chloramfenikol selektivní suplement – SR78). Roztok byl důkladně promíchán a rozlit do Petriho misek. Po utužení v Petriho miskách byly půdy uchovány při chladničkové teplotě.

- **Potato Dextrose agar (Bramboro-glukózový agar), HiMedia (Mumbai, Indie)**

Přířady: Bramborová infuze (4 g/l), D-glukóza (20 g/l), agar (15 g/l)

Postup: Do 500 ml destilované vody bylo rozpuštěno 19,5 g prášku a necháno sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Směs po ochlazení byla rozlita do Petriho misek a po utužení skladována při chladnější teplotě.

- **Synthetic Nutrient Poor agar (Synteticky-nutričně chudý agar), HiMedia (Mumbai, Indie)**

Přísady: KH_2PO_4 (0,5 g/500ml), KNO_3 (0,5 g/500ml), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,25 g/500ml), KCl (0,25 g/500ml), D-glukóza (0,1 g/500ml), sacharóza (0,1 g/500ml), agar (10 g/500ml)

Postup: Výše uvedené přísady byly naváženy do 500 ml destilované vody v Erlenmeyerově baňce a nechány autoklávovat po dobu 15 minut při 121 °C. Následně byla směs ochlazená na cca 50 °C a rozlita do Petriho misek. Před utužením agarů byly do misek vloženy sterilní 3 - 4 kusy filtračního papíru nastříhaného na čtverce o velikosti 2x2cm.

- **Carnation leaf-piece agar (Karafiátový agar), HiMedia (Mumbai, Indie)**

Přísady: Karafiát (3-4 kusy), agar (20 g/l)

Postup: Nastříhané listy karafiátu (*Dianthus caryophyllus*) byly ve skleněné Petriho misce sušeny při 70 °C po dobu 2 hod. a sterilizovány při 121 °C, 15 min. Po sterilizaci byly listy rozděleny do Petriho misek v počtu 2-3 kusů na jednu misku a zality předem vysterylizovaným 2% agarem ochlazeným na cca 50 °C.

2.1.7 Pracovní postup

Nejprve byl na analytických vahách odvážen 1 g ze vzorků a asepticky přenesen do 15 ml sterilních plastových zkumavek. Do téže zkumavek bylo odpipetováno 9 ml sterilní destilované vody, z čehož vznikl 10% roztok. Podle zadání byla koncentrace stanovena na 0,01 %; 0,1 % a 1 %, čehož se docílilo naředěním původního (10 %) vzorku.

Z jednotlivých kmenů mikroorganismů byly připraveny pracovní kultury. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* byly přeočkovány sterilní očkovací kličkou pomocí izolací čárkováním na živnou půdu Mueller Hinton. *Candida albicans* byla stejným způsobem přeočkována na MALT agar. Bakterie byly vloženy do termostatu a ponechány inkubovat při 37 °C po dobu 24 hodin. Kvasinka byla nechána inkubovat při 30 °C po dobu 48 hodin. Po inkubační době byly z jednotlivých pracovních kultur pomocí denzitometru vytvořeny zákaly dle stupnice McFarlanda. Do skleněné zkumavky bylo

odpipetováno 10 ml fyziologického roztoku a asepticky očkovací kličkou zaočkováno potřebné množství kolonií bakterií a kvasinky. Třením kličky o stěnu zkumavky byl vytvořen zákal, který u bakterií byl roven 1. stupni a u kvasinky 2. stupni MacFarlandovy stupnice.

Zaočkování zkumavek se vzorky probíhalo tak, že z každé skleněné zkumavky se zákalem bylo odpipetováno 0,1 ml roztoku do připravených 15 ml plastových zkumavek s příslušným naředěným roztokem vzorku o určité koncentraci. Pro každý mikroorganismus byla určena jedna zkumavka s naředěným roztokem vzorku. Důležitá byla následná homogenizace zaočkovaných zkumavek se vzorky. Zaočkované zkumavky byly skladovány na tmavém místě při laboratorní teplotě.

Odečty a hodnocení účinnosti antimikrobiální ochrany byly prováděny 7., 14. a 28. den po vyočkování ze vzorků na živné půdy. Ačkoliv norma stanovuje odečty ve výše uvedené dny, odečty byly prováděny i 1. den po vyočkování. Důvodem toho bylo ověření přítomnosti nežádoucí kontaminace a mikrobiální čistoty vzorků.

V těchto stanovených dnech byly odečty prováděny tak, že ze zaočkovaných zkumavek se vzorky byl odpipetován 1 ml do sterilní plastové zkumavky obsahující 9 ml neutralizéru. Následně bylo provedeno pečlivé promísení. Ve zkumavce se nyní nacházelo $3 \cdot 10^5$ CFU/ml bakterií a $6 \cdot 10^5$ CFU/ml. Z první zkumavky s neutralizérem byl následně odpipetován 1 ml do dalších 4 zkumavek s 9 ml fyziologického roztoku. Tímto byla vytvořena ředící řada o koncentracích 10^{-1} až 10^{-5} . Z poslední paté zkumavky, byl 1 ml odpipetován do biologického odpadu. Všechny zkumavky byly pečlivě promíchány. Výsledný počet bakterií v poslední zkumavce činil $3 \cdot 10^1$ CFU/ml, u kvasinky $6 \cdot 10^1$ CFU/ml.

Následně byl z každé zkumavky vytvořené ředící řady odpipetován 0,1 ml roztoku na dané živné půdy. Vyočkování na plotny s půdami bylo vždy prováděno v dubletech. Ze zkumavek obsahujících bakterie bylo vyočkováno na TSA, ze zkumavek s kvasinkou bylo provedeno vyočkování na Sabouragův agar (SDA). Odpipetované množství bylo rozetřeno sterilními plastovými L-hokejkami. Nakonec se půdy obsahující bakterie nechaly inkubovat v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Plotny obsahující kvasinku byly ponechány v termostatu na 30 °C po dobu 48 hodin.

Po uplynutí inkubační doby se misky vyhodnotily metodou počítání kolonií na počítadle. Pro stanovení a vyhodnocení se vybraly misky obsahující 30-300 kolonií bakterií a

C. albicans. U těchto ploten byl počet dosazen do definované rovnice logaritmického snížení a výsledné hodnoty byly srovnány s referenčními hodnotami popsané v normě.

- **Rovnice pro výpočet logaritmického snížení:**

$$Rx = \log N_0 - \log N_x$$

N_0 - počet mikroorganismů zaočkovaných v čase t_0

N_x - počet mikroorganismů v časech odběru vzorku

Nakonec bylo podle definovaných hodnotících kritérií v normě ČSN EN ISO 11930 rozhodnuto, zda testované vzorky splňovaly požadavky antimikrobiální ochrany vůči jednotlivým mikroorganismům (viz **Tabulka 2**)

Tabulka 2: Kritéria hodnocení antimikrobiální ochrany pro bakterie a kvasinku (převzato z: ČSN EN ISO 11930)

Požadované hodnoty snížení v log ($Rx = \log N_0 - \log N_x$)						
Mikroorganismy	Bakterie			Kvasinka		
Interval	T7	T14	T28	T7	T14	T28
Kritérium	≥ 3	≥ 3 a NI	≥ 3 a NI	≥ 1	≥ 1 a NI	≥ 1 a NI
*NI: žádné zvýšení počtu logaritmického snížení od předešlého intervalu T7, T14, T28 – časový interval zahájení kultivace inokulovaného vzorku po 7, 14 a 28 dnech						
Kritérium A – požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení podle přílohy B v ČSN EN ISO 11930						

2.1.8 Morfologické a biochemické testy

Po výše uvedeném testování obou vzorků ve 3 koncentracích byla nalezena nežádoucí kontaminace. Z tohoto důvodu bylo nutné kontaminaci vyizolovat a určit bližší morfologické vlastnosti, popř. je identifikovat. V tomto případě byly jednotlivé odlišné kolonie vyizolovány na předem připravené živné půdy. Nejčastěji používané půdy pro bakterie byly MPA a TSA, které byly následně po zaočkování ponechány inkubovat při 37 °C po dobu 24 hodin. Dále pro kontaminaci kvasinkami a plísněmi byla použita živná média MALT a SDA, která se nechala inkubovat po dobu 24-48 hodin (kvasinka) a 3-5 dní (plísně) při 25-30 °C. Po uplynutí inkubační doby byly u narostlých kolonií vyhodnoceny mikroskopické i makroskopické znaky a provedeny identifikační biochemické testy. Pro potvrzení některých mikroorganismů bylo potřeba přeočkování na speciální živná média např. CLA nebo AFPA.

- Gramovo barvení

Nejčastěji používaný test, který rozdělí bakterie do dvou skupin – gramnegativní a grampozitivní. Tímto testem nelze bakterie identifikovat. Na sterilní podložní sklíčko byla napipetována kapka fyziologického roztoku, do ní se očkovací kličkou rozetřela kolonie daného kontaminantu. Tato směs se ponechala na sklíčku uschnout. Po uschnutí se sklíčko jedním tahem protáhlo plamenem, tzv. sklíčko bylo zafixováno. Následně byla na sklíčko nanесena krystalová violet' a nechána působit 30 sekund. Poté bylo barvivo slito a na sklíčko bylo nanесeno pár kapek Lugolového roztoku. Ten byl, stejně jako krystalová violet', slit po 30 sekundách. Po uplynutí této doby byl roztok opět slit, sklíčko opláchnuto alkoholem a destilovanou vodou. Posledním krokem bylo nanесení na podložní sklíčko karbolfuchsinu, který se nechal cca 30 sekund působit. Opět bylo sklíčko opláchnuto destilovanou vodou. Sklíčko se nechalo oschnout a poté byl preparát pozorován s přidáním imerzním olejem pod objektivem 15x100. Do gramnegativní skupiny byly vyhodnoceny kolonie červeného zbarvení, do grampozitivní skupiny spadaly kolonie barvy modré.

- Nativní preparát

Základním testem, zejména pro pozorování pohybu, je nativní preparát. Při jeho zhotovení byla na sterilní podložní sklíčko nanесena kapka fyziologického roztoku. V něm očkovací kličkou byla rozetřena kolonie neznámého kontaminantu. Na povrch bylo přiloženo krycí sklíčko. Preparát byl pozorován pod mikroskopem při objektivu 40x50. V případě

pozorování neznámého kontaminantu plísní byla místo fyziologického roztoku přidána kapka bavlníkové nebo bromthymolové modři, která zabránila vysychání.

- Test na tvorbu katalázy

Zejména aerobní bakterie tvoří enzym katalázu. Pomocí enzymu bakterie rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík. Ke zjištění, zda daná bakterie rozkládá peroxid vodíku, slouží test na tvorbu katalázy. Test spočívá v nanesení několika kapek peroxidu vodíku na podložní sklíčko. Do peroxidu vodíku byla očkovací kličkou rozetřena kultura. Rozkládá-li bakterie peroxid, lze do 30 s vidět pozitivní reakci v podobě úniku bublinek na povrchu podložního sklíčka.

- ENTEROtest 24

Enterotest 24 představuje sadu 24 biochemických testů určené pro identifikaci různých druhů bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Testy jsou situované ve třech řádcích po osmi jamkách mikrotitrační destičky. Podle příloženého návodu byly jamky zaočkovány a nechány inkubovat. Na základě vzniklých barevných změn byla u jamek vyhodnocena pozitivní či negativní reakce. Výsledky byly zaznamenány do formuláře a následně zadány do počítače, který mikroorganismus identifikuje a zařadí do čeledi, popř. kmene.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Využití látek β -aescinu a žumenu jako přísady do doplňků stravy, různých tablet a podpůrných léčiv nebo do kosmetických přípravků představuje novou alternativu éry aplikací přírodních léčiv, zejména pro své příznivé účinky na lidský mikroorganismus. Jejich cílem je co nejlépe a nejkvalitněji ovlivnit lidské zdraví.

β -aescin je popsán jako hydrokopický bílý prášek ve vodě dobře rozpustný, který tvoří čirý roztok (Carrasco, Vidrio, 2007). Podle dostupných informací se jedná o látku rostlinného původu, konkrétně hlavní účinnou látku získanou ze stromu kaštanu konského (Pittler, Ernst, 2012). V současnosti je β -aescin velmi prozkoumáván pro své velmi širokospektrální příznivě pozitivní účinky na nervový, kardiovaskulární a lymfatický systém.

Velkou naději představuje aplikace extraktu u pacientů léčící se s hemoroidy, křečovými žilami a poúrazovými otoky. β -aescin se podává jako samostatné venotonikum léků zlepšujících pevnost a odolnost cévní stěny, zlepšování cirkulace krve v žilách a lymfách nebo v kombinaci s hesperidinem a diosminem. Nadějně vyhlídky má použití β -aescinu u lidí používající kompresní punčochy (Sirtori, 2001). Perspektivně se dostává v léčbě otoků vyvolaných ozáření tkání při léčbě zhoubných nádorů (např. při rakovině prsu). Dále napomáhá rychlejší vstřebávání krevních podlitin, pomáhá jako podpůrná léčba zvětšené prostaty a rovněž tlumí svědivost některých ekzémů. V posledních letech jsou diskutovány i její antialergické účinky (Ezberci, Ünal, 2018).

Důvodem proč je poslední dobou β -aescin tak prozkoumáván je především jeho bezpečnost při aplikaci. Nežádoucí účinky β -aescinu jsou celkem vzácné a nikterak závažné. V ojedinělých případech se mohou objevit závratě, bolesti hlavy, žaludeční nevolnost a svědění kůže. I přes významnou bezpečnost by se neměly přípravky se složkou β -aescinu podávat ženám v prvním trimestru gravidity.

Druhou přírodní látku představuje žumen, který je vyextrahovaný z rostliny *Cissus quadrangularis*. *Cissus quadrangularis* je réva, která roste v Africe a částech Asie (Ogori, 2013). Žumen je považován za nejvíce používané léčivé rostliny v Thajsku. Běžně je součástí v tradiční africké a ajurvédské medicíně.

Podle dostupných informací se jedná o hnědý sypký prášek 100 % přírodní sušený bez jakýkoliv konzervantů. Jediná závada spočívá v její částečné rozpustnosti, kterou se vědci snaží postupně vylepšovat.

Všechny části rostliny *Cissus quadrangularis* se používají v lékařském odvětví. Nejčastěji se zpracované části aplikují v léčbě obezity, cukrovky, rizikových srdečních onemocnění a proti vysokému cholesterolu (Oben *et al.*, 2007). Širší užití pak zejména pro léčbu kostí (osteoporóza), dny, alergie, anorexie, kurdějím, žaludečních nevolností, hemoroidů, bolestivé menstruaci nebo astma (Tasadduq *et al.*, 2017). Některé studie uvádí použití extraktu žumenu do léčebných prášků proti malárii (Kumar *et al.*, 2010). *Cissus quadrangularis* také představuje složku na rostlinné bázi obsahující doplňky stravy považovány za alternativu k anabolickým steroidům. Při běžných dávkách vykazuje extrakt dobrou snášenlivost a nepravděpodobnost vyvolání nežádoucích vedlejších účinků.

Další význačným znakem, pro který je látka zkoumána, je antimikrobiální a antivirová schopnost. Dle dostupných údajů z testování mikrobiologického testování byly celkové počty bakterií stanoveny na 10,000 CFU/g, celkový počet kvasinek a plísní na 1000 CFU/g a vyloučena přítomnost bakterií *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*. K těmto výsledkům se přikládá důležitost obzvláště pro vzrůstající odolnost bakterií k infekcím.

Pro zachování organoleptických a sensorických vlastností je vzorek balen do zapečetěných hliníkových sáčků potažených plastovým těsněním. Od firmy je doporučeno uchovávat vzorek v uzavřené nádobě max. po dobu 2 let mimo přímé sluneční světlo a vlhké prostředí, které může být potencionální zdrojem kontaminace mikroby a plísněmi.

Diplomová práce tvoří část projektu TAČR „Suplementy pro pozitivní ovlivnění mikrobiomu“ jehož cílem je vývoj samoemulgujících kapslí s aktivními látkami na bázi monolaurinu v kombinaci s přírodními látkami. Účelem testování bylo hodnocení antimikrobiální ochrany rostlinných látek β -aescinu a žumenu podle normy ČSN EN ISO 11930.

Vzorok poskytl firma K2 Pharm s.r.o. se sídlem v Opavě. Látka β -aescin (č. š. 011118 PK 18091) je dodávána firmou z Polska, kde je aplikace také povolena. Žumen (č. š. NSIN02069-CQP) pochází od dodavatele z Číny. β -aescin je vzorek bílé barvy, žumen vzorek barvy hnědé. Dle pokynů byly vzorky naředěny sterilní destilovanou vodou, která byla použita jako rozpouštědlo, na koncentrace 0,01 %, 0,1 %, 1 %.

Testování žumenu a β -aescinu o 1% koncentraci bylo provedeno paralelně v rozmezí od 17. 9. 2018 – 9. 10. 2018, koncentrace 0,1% bylo provedeno 15. 10. – 6. 11. 2018 a koncentrace 0,01% 12. 11. 2018 – 4. 12. 2018. Vzorky byly testovány podle normy ČSN EN ISO 11930 pro kosmetické výrobky na mikroorganismy *Escherichia coli* (CCM 4517), *Staphylococcus aureus* (CCM 2022), *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955), *Candida albicans* (CCM 8186). Kvůli delší inkubační době byly testy na *Candidu albicans* provedeny v rozmezí od 17. 9. 2018 – 10. 10. 2018 pro koncentraci 1%, 15. 10. 2018 – 7. 11. 2018 pro 0,1% koncentraci, od 12. 11. 2018 – 5. 12. 2018 pro koncentraci 0,01%.

Z důvodu prověření možné kontaminace byly vzorky vyočkovány a vyhodnoceny bezprostředně první den po zaočkování. Vyočkování bylo provedeno ve dnech 17. 9. 2018, 15. 10. 2018 a 12. 11. 2018. Počty kolonií nebyly započítány do konečných výsledků logaritmičeského snížení.

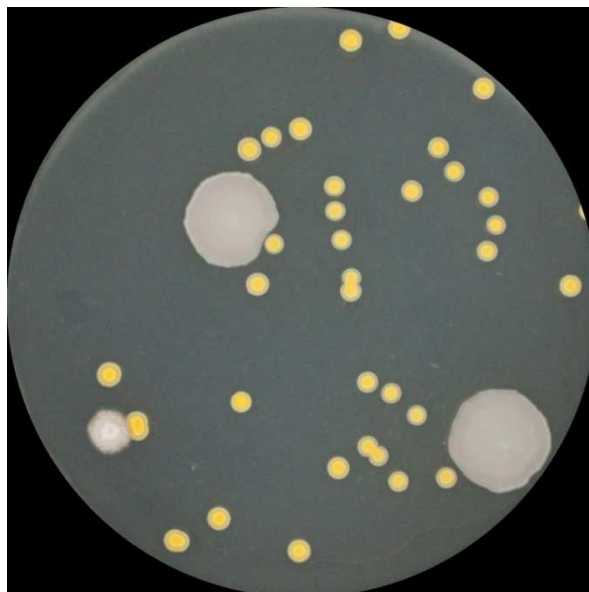
U první testované koncentrace 1% žumenu a β -aescinu byla první den viditelná kontaminace, která se objevovala napříč všemi testovanými půdami s testovanými bakteriemi v nepravidelných testovaných intervalech. Ipřes kontaminaci byly odečty provedeny a vizuálně vyhodnoceny. Kontaminaci představovaly 2 typy bakterií a 3 typy plísní, u kterých byly následně provedeny morfologické testy a vyočkovány na jiné dané půdy pro bližší určení a identifikaci.

Z důvodu dalšího postupu bylo potřeba zajistit kontaminaci a zjistit jejich původ. Zásobní vzorky s 1% koncentrací naředěné sterilní destilovanou vodou byly vyočkovány na živné půdy, na kterých se ihned po inkubaci objevila zmiňovaná kontaminace. Kontaminace byla objevena i v zásobních roztocích s inokulem (**Příloha 49 - Příloha 52**). Z toho důvodu byla provedena opětovná izolace kolonií na jednotlivé typy půd a následná identifikace pomocí testů. **Příloha 25 - Příloha 48** poukazuje na kontaminaci v zásobních roztocích i při vyočkování v intervalech 7., 14. a 28. den odečtu.

V daných dnech odečtu byly vybrány misky, které obsahovaly 30 – 300 kolonií. Jelikož bylo každé ředění v každém vzorku a koncentraci vyočkováno v dubletech, byly kolonie zprůměrovány a zaznamenány do tabulky. Z tohoto počtu bylo následně vypočítáno logaritmičeské snížení, které bylo porovnáno s kritérii normy ČSN EN ISO 11930 uvedené v **Příloha 1 - Příloha 24**.

Prvním hodnoceným zásobním roztokem byl vzorek 1% β -aescinu. Jak je možné vidět v **Příloha 25 - Příloha 27** byla od prvního okamžiku znatelná přítomnost nežádoucích mikroorganismů. V **Tabulka 3** je zaznamenán první den vyočkování, kdy nepočítatelný nárůst přesahující stanovené počítatelné rozmezí kolonií, se nacházel v ředění 10^{-1} u *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. U *Candida albicans* nebyl v tomto ředění vyhodnocen nárůst. Vyhovující ředění, 10^{-2} , bylo vyhodnoceno u *E. coli* (88 kolonií), *St. aureus* (174 kolonií) a *Ps. aeruginosa* (78 kolonií). Počítatelné množství bylo také možno postřehnout v ředění 10^{-3} u testování bakterie *Staphylococcus aureus*. V ostatních očkovacích intervalech ani v jiných koncentracích nesplňovala vyočkováná živná média počet kolonií danému rozmezí 30-300 kolonií.

Dále tabulka poukazuje na výsledky testování β -aescinu ve stejné koncentraci provedené 7. den odečtu. Zde byla okamžitě po vyočkování stejná znatelná kontaminace jako u předchozích odečtů (viz **Obrázek 9**). Počítatelné ředění bylo ředění 10^{-1} u živných médií s inokulem *Pseudomonas aeruginosa*, kde se počet z původního nepočítatelného množství snížil na 290 kolonií. U ostatních mikroorganismů nebyl v prvním ředění nalezen nárůst. V 10^{-2} byl počet kolonií akceptován u agarů se zaočkovaným *Staphylococcus aureus* 275 kolonií a 48 kolonií u misek s *Pseudomonas aeruginosa*. V ostatních ředěních nedosahoval počet kolonií vymezenému rozmezí.



Obrázek 9: Kontaminace na TSA u vyočkovaného inokula *Staphylococcus aureus* (37 °C, 24 hod.)
(Foto: J. Vacková, Bacmed)

Po 14 dnech byla u všech testovacích mikroorganismů možnost vidět inhibici. Pár ojedinělých kolonií bylo shledáno v 10^{-1} u *E. coli* a *St. aureus*, které však nesplňovalo limit do logaritmického snížení. U zbylých dvou mikroorganismů byl počet kolonií nulový. Minimální nárůst byl shledán i u zbylých testovaných ředění. U všech testovaných půd TSA byl neustále neovladatelný nárůst nežádoucích mikroorganismů.

Poslední, 28. den odečtu, byl u všech bakterií nárůst minimální, krom nejnižšího ředění u Petriho misek s inokulem *Pseudomonas aeruginosa*. Celkový počet u těchto misek byl roven 32 kolonií. Dle tabulky níže uvedené byla od prvního ředění inhibována i *Candida albicans*. Dokazují to počty, které nebyly zaznamenány z důvodu nízkého nárůstu, a tím nesplňující rozmezí stanovené normou. Stejně jako na TSA byl i na SDA vyhodnocen bezprostředně po zaočkování abnormální nárůst kontaminace, tentokrát v podobě nežádoucích plísní.

Tabulka 3: Průměrný počet kolonií v 1% vzorku β-aescinu v jednotlivých dnech odečtu, v jednotlivých ředěních u každého testovacího mikroorganismu

Vzorek	<u>1% β-aescin</u>	Ředění (průměr počtu kolonií v ředění)				
Mikroorganismy	Datum	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
<i>E. coli</i>	T1 18. 09. 2018	nepoč.	88	-	-	-
<i>St. aureus</i>		nepoč.	174	39	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	78	-	-	-
<i>C. albicans</i>	19. 09. 2018	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	T7 25. 09. 2018	-	-	-	-	-
<i>St. aureus</i>		-	275	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		290	48	-	-	-
<i>C. albicans</i>	26. 09. 2018	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	T14 02. 10. 2018	-	-	-	-	-
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	03. 10. 2018	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	T28 09. 10. 2018	-	-	-	-	-
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		32	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	10. 10. 2018	-	-	-	-	-

Souběžně s tímto testováním bylo provedeno testování 1% žumenu na stejné testovací bakterie a kvasinku. Jak uvádí **Tabulka 4**, od prvního dne odečtu byl u všech testovaných bakterií v první a druhé nejvyšší koncentraci přetrvávající nárůst nepočítatelného kvanta kolonií. Naopak u kvasinky byl zaznamenán ve stejných koncentracích nárůst nejnižší. První ředění, u kterého bylo možné kolonie počítat, bylo ředění 10^{-3} , které obsahovalo 43 kolonií bakterie *E. coli*, 134 kolonií bakterie *St. aureus* a 217 kolonií bakterie *Ps. aeruginosa*. U

Staphylococcus aureus bylo v následujícím čtvrtém ředění viditelné snížení na 30 kolonií. V poslední nejnižší koncentraci byly spočítány ojedinelé kolonie. Zejména ve vyšších ředěních bylo vyhodnoceno mnoho nepočítatelných kolonií se znatelnou známkou kontaminací plísněmi.

Sedmý den vyočkování přetrával na všech půdách abnormální nepočítatelný nárůst. Zvláštností byly počty u *Candida albicans*, u které došlo ke zvýšení z pár ojedinelých kolonií na nepočítatelný nárůst. Naopak úbytek kolonií byl shledán u kvasinky ve druhém ředění, v němž počet činil 122 kolonií. Ve čtvrtém ředění přetrával u *E. coli* a *Ps. aeruginosa* nepočítatelný nárůst, za to u *St. aureus* a *C. albicans* nebyl shledán nárůst. V posledním nejvyšším ředění s inokulem *E. coli* bylo zprůměrováno 172 kolonií a s *Ps. aeruginosa* 124 kolonií. V tabulce lze vidět znatelnou inhibici u hodnot v dalších dnech odečtu, kde dochází k silnému snížení počtu narostlých kolonií (**Příloha 29 - Příloha 32**). Za následek snížení může být odpovědná přítomnost kontaminujících plísní.

Dále jsou v tabulce popsány živná média ve 14. den odečtu převážně nepočítatelného množství. Výjimkou byly všechny misky se *Staphylococcus aureus*, který byl silně inhibován a počet již nespĺňoval rozmezí. U *Candida albicans* došlo od prvotního nepočítatelného množství k redukci na 197 kolonií, a to v 10^{-2} a dále na 61 kolonií ve třetím ředění. V posledních dvou nejnižší koncentrace nebyl počet možno počítán. Stejně tak byl u 10^{-4} pokles u *E. coli* na 62 kolonií a v posledním nejvyšším ředění u *Ps. aeruginosa* na 126 kolonií.

Tabulka 4: Průměrný počet kolonií v 1% vzorku žumenu v jednotlivých dnech odečtu, v jednotlivých ředěních u každého testovacího mikroorganismu

Vzorek	1% žumen	Ředění (průměr počtu kolonií v ředění)				
Mikroorganismy	Datum	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
<i>E. coli</i>	T1 18. 09. 2018	nepoč.	nepoč.	43	-	-
<i>St. aureus</i>		nepoč.	nepoč.	134	30	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	217	-	-
<i>C. albicans</i>	19. 09. 2018	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	T7 25. 09. 2018	nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.	172
<i>St. aureus</i>		nepoč.	nepoč.	122	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.	124
<i>C. albicans</i>	26. 09. 2018	nepoč.	122	47	-	-
<i>E. coli</i>	T14 02. 10. 2018	nepoč.	nepoč.	nepoč.	62	-
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.	126
<i>C. albicans</i>	03. 10. 2018	nepoč.	197	61	-	-
<i>E. coli</i>	T28 09. 10. 2018	nepoč.	nepoč.	nepoč.	163	42
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	nepoč.	nepoč.	159
<i>C. albicans</i>	10. 10. 2018	nepoč.	nepoč.	170	34	-

Obrázek 10 ukazuje na vyočkování zásobního roztoku *Candida albicans* poslední 28. den odečtu již s přítomnou kontaminující plísní. V tomto intervalu odečtu byla u kvasinky první dvě ředění nepočítatelná, v dalších došlo ke snížení počtu na polovinu. U bakterie *E. coli* a *Ps. aeruginosa* došlo k poklesu počtu až v nejnižších koncentracích 10^{-4} a 10^{-5} .



Obrázek 10: Kontaminace na SDA s inokulem *Candida albicans* (30 °C, 48 hod.)
(Foto: J. Vacková, Bacmed)

Od 15. 10. 2018 bylo zahájeno testování stejných látek, tj. β -aescinu a žumenu, tentokrát v koncentraci 0,1%. Důvodem byl požadavek od firmy na ověření nežádoucí kontaminace v nižších koncentracích látek.

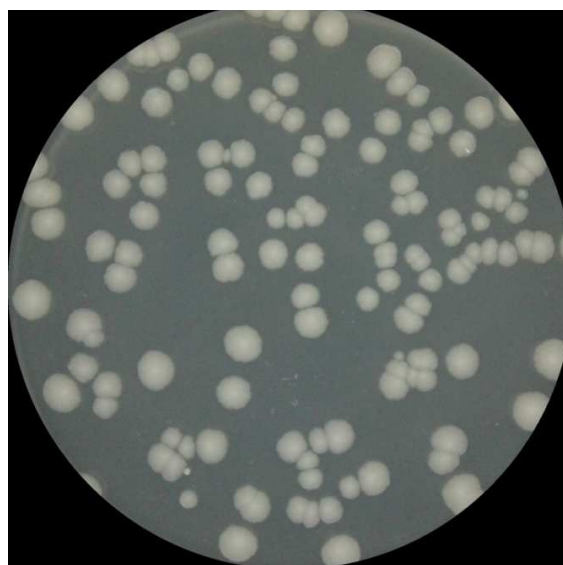
V **Tabulka 5** je zobrazeno množství kolonií vyhodnocených 1. nepovinný den odečtu při testování zásobního roztoku 0,1% β -aescinu. Živné půdy s testovaným inokulem *Escherichia coli* byly možné počítat až v ředění 10^{-3} . Celkový počet kolonií v tomto ředění byl spočten na 106 kolonií (**Obrázek 11**). U bakterie *Staphylococcus aureus* bylo vyhovující první nejnižší ředění, jež obsahovalo 103 kolonií. V případě *Ps. aeruginosa* byl nárůst od prvního ředění potlačován. Počet kolonií kvasinky byl 253 kolonií, který se ve druhém ředění snížil na 49 kolonií. Nadále nebyl vykazován nárůst. To dokazuje velký inhibiční účinek látky. Ipřes menší koncentraci vzorku nebylo zabráněno nárůstu nežádoucí kontaminace.

Tabulka 5: Průměrný počet kolonií v 0,1% vzorku β -aescinu v jednotlivých dnech odečtu, v jednotlivých ředěních u každého testovacího mikroorganismu

Vzorek Mikroorganismy	0,1% β -aescin Datum	Ředění (průměr počtu kolonií v ředění)				
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
<i>E. coli</i>	T1 16. 10. 2018	nepoč.	nepoč.	106	-	-
<i>St. aureus</i>		103	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	17. 10. 2018	253	49	-	-	-
<i>E. coli</i>	T7 23. 10. 2018	-	-	-	-	-
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	24. 10. 2018	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	T14 30. 10. 2018	-	-	-	-	-
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	31. 10. 2018	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	T28 06. 11. 2018	-	-	-	-	-
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	07. 11. 2018	-	-	-	-	-

Z tabulky dále vyplývají údaje o výsledcích vyhodnocení 7. den intervalu. Nárůst byl u všech okamžitě potlačován, ojediněle se objevilo pár drobných kolonií, které stejně nemohly být započítány do logaritmického snížení. Nepřetržitě se vyskytovala nežádoucí kontaminace.

V intervalech 14. a 28. den odečtu byly bakterie i kvasinka inhibovány natolik, že byl počet kolonií po uplynutí inkubační doby nulový.



Obrázek 11: Vyočkovaný roztok 10^{-3} (T1) 0,1% β -aescinu s inokulem *Escherichia coli* (TSA, 37 °C, 24 hod.), (Foto: J. Vacková, Bacmed)

Paralelně byl testován vedle β -aescinu i rostlinná látka žumen v identické koncentraci tj. 0,1%. **Tabulka 6** obsahuje údaje o počtech kolonií, které jasně dokazují, že na rozdíl od β -aescinu, žumen nepotlačoval testované bakterie ani kvasinku. Názorným příkladem jsou kvanta kolonií bezprostředně ihned první den vyočkování všech 4 testovaných mikroorganismů v prvním ředění. U druhého ředění došlo u pūd s *Candida albicans* ke snížení na 51 kolonií a následně na počet nevyhovující rozmezí. Ve třetím ředění byly počty rovny 90 koloniím bakterií *E. coli*, 121 koloniím *St. aureus* a 88 koloniím *Ps. aeruginosa*.

Tabulka 6: Průměrný počet kolonií v 0,1% vzorku žumenu v jednotlivých dnech odečtu, v jednotlivých ředěních u každého testovacího mikroorganismu

Vzorek	<u>0,1% žumen</u>	Ředění (průměr počtu kolonií v ředění)				
Mikroorganismy	Datum	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
<i>E. coli</i>	T1 16. 10. 2018	nepoč.	nepoč.	90	-	-
<i>St. aureus</i>		nepoč.	nepoč.	121	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	88	-	-
<i>C. albicans</i>	17. 10. 2018	nepoč.	51	-	-	-
<i>E. coli</i>	T7 23. 10. 2018	nepoč.	nepoč.	nepoč.	133	-
<i>St. aureus</i>		nepoč.	nepoč.	nepoč.	55	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	nepoč.	-	-
<i>C. albicans</i>	24. 10. 2018	nepoč.	nepoč.	169	-	-
<i>E. coli</i>	T14 30. 10. 2018	nepoč.	nepoč.	nepoč.	89	-
<i>St. aureus</i>		nepoč.	nepoč.	186	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	125	-	-
<i>C. albicans</i>	31. 10. 2018	nepoč.	nepoč.	171	-	-
<i>E. coli</i>	T28 06. 11. 2018	nepoč.	nepoč.	206	46	-
<i>St. aureus</i>		nepoč.	181	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	187	50	-
<i>C. albicans</i>	07. 11. 2018	nepoč.	nepoč.	128	-	-

Z tabulky je dále patrné, že počty kolonií 7. den vyhodnocení u prvního a druhého ředění u všech bakterií obsahovalo kvantum kolonií. Počet 169 kolonií byl spočten u testování *C. albicans* v ředění 10^{-3} . U testování *E. coli* byl počet kolonií redukován na 133 a u *St. aureus* na 55 kolonií. V poslední, pátém, ředění byl nárůst inhibován.

Prakticky stejné počty vykazovalo testování u všech bakterií a kvasinky v 10^{-1} a v 10^{-2} ředění, provedené 14. den odečtu. První a taky jediné počitatelné množství kolonií *E. coli* se nacházelo ve čtvrtém ředění, v němž byl počet roven 89 koloniím. U pūd se *St. aureus*, *Ps. aeruginosa* a *C. albicans* bylo množství počitatelné o jednu koncentraci vyšší, tj. v 10^{-3} . Jednalo se o 186 kolonií *Staphylococcus aureus* (viz **Obrázek 12**), 125 kolonií *Pseudomonas aeruginosa* a 171 kolonií *Candida albicans*.

Poslední interval odečtu, 28. den, bylo v prvním ředění množství kolonií přesahující dané rozmezí. Počet *Staphylococcus aureus* v druhé koncentraci byl snížen na 181 kolonií, což představovalo poslední počítatelné množství v tomto ředění. V případě bakterie *E. coli* byl počet zredukován na 206 v koncentraci 10^{-3} a v 10^{-4} na 46 kolonií. Živná média s inokulem *Pseudomonas aeruginosa* byla počítatelná ve třetí koncentraci, kde bylo napočítáno 187 kolonií a v koncentraci čtvrté 50 kolonií. Celkový počet kolonií u půd se zaočkovanou *Candida albicans* byl roven 128 koloniím.



Obrázek 12: Vyočkovaný zásobní roztok 10^{-3} (T14) 0,1% žumenu s inokulem *Staphylococcus aureus* (TSA, 37 °C, 24 hod.), (Foto: J. Vacková, Bacmed)

Poslední testovanou koncentrací byla koncentrace 0,01%. Testování bylo provedeno souběžně pro β -aescin a žumen od 12. 11. 2018 – 5. 12. 2018. Zásobní roztoky bez i s inokulem obou látek nevykazovaly v této koncentraci výrazné známky nežádoucí kontaminace.

V porovnání s ostatními výsledky β -aescinu v předešlých testovaných koncentracích i β -aescin 0,01% potlačoval nárůst. Viditelné to bylo bezprostředně první vyočkovací nepovinný den. Zatímco u prvních dvou ředění bakterie *E. coli* byly počty nemožné vyhodnotit, jediné počítatelné množství, které však sloužilo jen k ověření správného zaočkování, bylo ředění 10^{-3} s 121 koloniemi. Obdobné výsledky byly u médií s *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Ve stejném ředění bylo zprůměrováno 142 kolonií *St. aureus* a 101 kolonií *Ps. aeruginosa*. Trochu odlišné počty měla kvasinka, která v prvním ředění vykazovala 206 kolonií, v druhém už pouze jen 41 kolonií. V nižších koncentracích nebyly počty zaznamenány.

Tabulka 7: Průměrný počet kolonií v 0,01% vzorku β -aescinu v jednotlivých dnech odečtu, v jednotlivých ředěních u každého testovacího mikroorganismu

Vzorek	0,01% β -aescin	Ředění (průměr počtu kolonií v ředění)				
		Datum	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
<i>E. coli</i>	T1 13. 11. 2018	nepoč.	nepoč.	121	-	-
<i>St. aureus</i>		nepoč.	nepoč.	142	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	101	-	-
<i>C. albicans</i>	14. 11. 2018	206	41	-	-	-
<i>E. coli</i>	T7 20. 11. 2018	-	-	-	-	-
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	73	-	-	-
<i>C. albicans</i>	21. 11. 2018	100	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	T14 27. 11. 2018	-	-	-	-	-
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	139	-	-
<i>C. albicans</i>	28. 11. 2018	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	T28 04. 12. 2018	-	-	-	-	-
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	160	-	-
<i>C. albicans</i>	05. 12. 2018	-	-	-	-	-

Tabulka 7, obsahující výsledky testování 0,01 % β -aescinu, uvádí též počty kolonií sedmý den vyhodnocení. Dle tabulky byly bakterie *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* silně potlačovány a jejich počty kolonií nebyly akceptovatelné do výpočtu logaritmičského snížení. *Pseudomonas aeruginosa* vykazoval v prvním ředění mnoho kolonií (viz **Obrázek 13**), ve druhém pouze 73 kolonií. U kvasinky bylo možno počítat jen v nejvyšší koncentraci, konkrétně 100 kolonií.



Obrázek 13: Živné médium 0,01% vzorku β -aescinu s inokulem *Pseudomonas aeruginosa* (TSA, 37 °C, 24 hod.) (Foto: J. Vacková, Bacmed)

Ve 14. a 28. den odečtu bylo možné naočkované Petriho misky počítat jen v případě inokulace *Pseudomonas aeruginosa*. Ty vykazovaly v prvních dvou ředění nepočitatelné kvantum kolonií V 10^{-3} dosahoval počet kolonií 139, který se paradoxně poslední den odečtu zvýšil na 160.

Z údajů v **Tabulka 8** je patrné, že výsledky posledního testovacího vzorku 0,01% žumenu se shodovaly s testováním β -aescinu. U *E. coli* bylo zaznamenáno první vyočkovací den 161 kolonií pouze v třetím ředění. V totožném ředění byly stanoveny počty kolonií i u *St. aureus* (193 kolonií) a *Ps. aeruginosa* (204 kolonií). O den později byly vyhodnoceny půdy s inokulem kvasinkou, která na rozdíl od bakterií vykazovala v nejvyšší koncentraci počítatelných 193 kolonií.

Následující týden docházelo u bakterií k celkovému snižování. Množství na miskách s inokulem *E. coli* byl zredukován na 110 kolonií a se *Ps. aeruginosa* na 96. K abnormální inhibici došlo u půd se *Staphylococcus aureus*. Nestabilně došlo ke zvýšení počtu kolonií u půd se zaočkovanou *Candida albicans*.

Dále je v tabulce zobrazeno počet živných médií s naočkovanými inokuly 14. den odečtu. Počty vykazovaly podobné hodnoty jako u předešlých odečtů. Pouze kolonie *E. coli* ve třetím ředění se snížily na polovinu. Mírný úbytek byl zaznamenán i u *Ps. aeruginosa* a *Candida albicans*, konkrétně ve druhém a třetí ředění (viz **Obrázek 14**).

Tabulka 8: Průměrný počet kolonií v 0,01% vzorku žumenu v jednotlivých dnech odečtu, v jednotlivých ředěních u každého testovacího mikroorganismu

Vzorek	0,01% žumen	Ředění (průměr počtu kolonií v ředění)				
		Datum	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
<i>E. coli</i>	T1 13. 11. 2018	nepoč.	nepoč.	161	-	-
<i>St. aureus</i>		nepoč.	nepoč.	193	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	204	-	-
<i>C. albicans</i>	14. 11. 2018	193	40	-	-	-
<i>E. coli</i>	T7 20. 11. 2018	nepoč.	nepoč.	110	-	-
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	nepoč.	96	-	-
<i>C. albicans</i>	21. 11. 2018	nepoč.	266	40	-	-
<i>E. coli</i>	T14 27. 11. 2018	nepoč.	nepoč.	56	-	-
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	163	54	-	-
<i>C. albicans</i>	28. 11. 2018	nepoč.	200	40	-	-
<i>E. coli</i>	T28 04. 12. 2018	nepoč.	nepoč.	64	-	-
<i>St. aureus</i>		-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		nepoč.	162	-	-	-
<i>C. albicans</i>	05. 12. 2018	nepoč.	198	33	-	-

Nikterak odlišné výsledky počtů nebyly shledány ani poslední 28. vyočkovací den. Oproti odečtům z předchozího týdne se počet *E. coli* mírně navýšil na 64 kolonií. Bakterie *St. aureus* a *Ps. aeruginosa* byly neustále inhibovány. Kvasinka vykazovala analogické počty jako z předchozího týdne vyočkování.



Obrázek 14: Živné médium 0,01% vzorku žumenu s inokulem *Candida albicans* (SDA, 30 °C, 48 hod), (Foto: J. Vacková, Bacmed)

3.1 Kontaminace

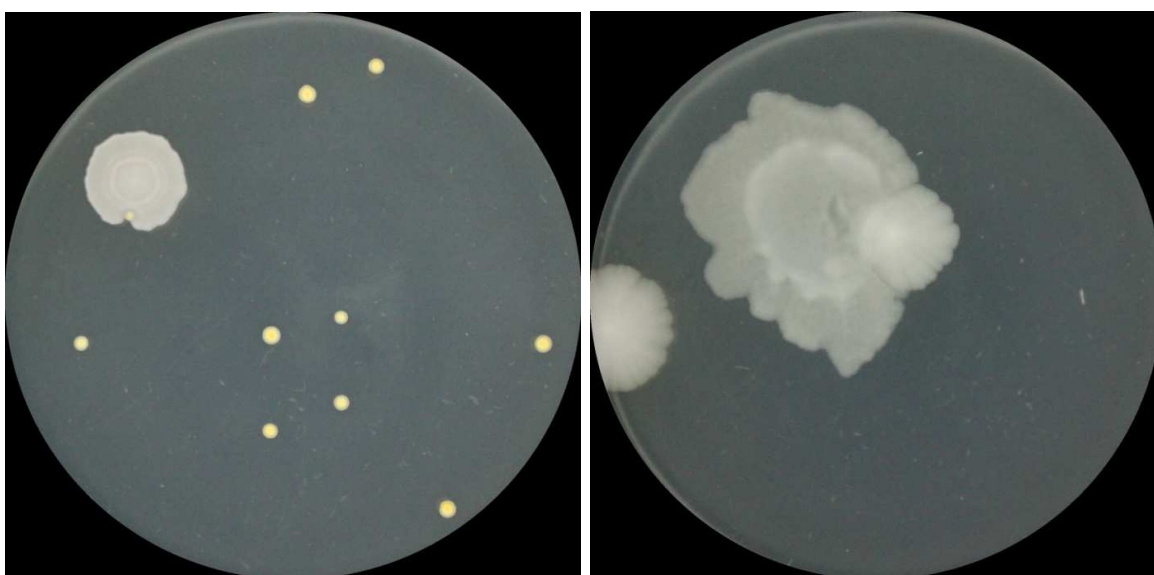
Na základě zásobních roztoků naředěných vodou, byla v obou případech β -aescinu i žumenu nalezen nežádoucí nárůst 2 typů bakterií a 3 typů plísní, které jsou zodpovědné za nežádoucí kontaminaci vzorků. Kontaminace byla zřetelná zejména u nejvyšší koncentrace, a to u 1 % zásobních roztoků se vzorky ředěnými vodou, ale i v zásobních roztocích vzorků s daným zaočkováním inokulem. Přestože byly striktně dodrženy aseptické podmínky při práci, kontaminující bakterie a plísně se vyskytovaly průběžně napříč všemi intervaly odečtu (T7, T14, T28) ve všech zásobních roztocích.

3.1.1 Identifikace a popis kontaminace - bakterie

První bakterie byla narostlá na M-H agaru a po izolaci i na TSA agaru, který byl inkubován 24 hodin při 37 °C. Kolonie bakterií měly bílou barvu, na povrchu drsného charakteru, svraštělého tvaru s drsnými okraji. Kolonie nevykazovaly žádný zápach. Jak je možné vidět na **Obrázek 15** při přeočkování na TSA agaru vykazovala bakterie stejný vzhled. Při přeočkování a inkubaci na MALT agaru (30 °C, 48 hodin) bakterie nevykazovala žádný

nárůst. Bylo provedeno Gramovo barvení, kde pod mikroskopem se vzorek jevil jako grampozitivní (modré) tyčinky. V nativním preparátu byl pozorován pohyb. Z biochemických testů se provedl test na katalázu, který byl pozitivní. Nárůst této bakterie byl zaznamenán v zásobních roztocích s přítomností i bez přítomnosti inokula nepravidelně, za to v každém dnu odečtu napříč všemi koncentracemi a ředěními.

Neznámý kmen bakterie byl podle provedených testů zařazen do rodu *Bacillus*. Tento poznatek je srovnatelným s článkem publikovaný od Celandroni *et al.* z roku 2016. Článek popisuje rod *Bacillus* jako pohyblivé grampozitivní tyčinky uspořádané v řetízkách, které se mohou nacházet ve vodě, v půdě i ve vzduchu a potravě.

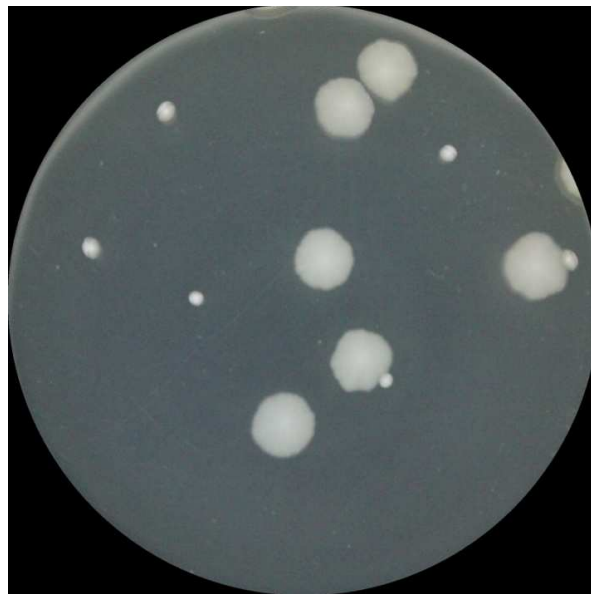


Obrázek 15: Kontaminace rodu *Bacillus* (TSA, 37 °C, 24 hod.), (Foto: J. Vacková, Bacmed)

Druhá neznámá bakterie, stejně jako první, byla narostlá na M-H agaru. Následně byla vyočkována na TSA agar a ponechána inkubaci při 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí inkubační doby tvořila bakterie na agaru poměrně větší bílé kolonie, zvýšeného profilu, vroubkovaném tvaru (viz **Obrázek 16**). Kolonie měly velmi charakteristický zápach. Při zkoušce nárůstu na MALT při 30 °C po dobu 48 hodin byl shledán nárůst. Mikroorganismus byl nalézán nepravidelně zejména na živných půdách ve vyšším ředění v nepravidelných intervalech odečtů. Pomocí Gramova barvení byla bakterie přiřazena do gramnegativní skupiny. Preparát pod mikroskopem byl viděn jako červené krátké zaoblené tyčinky. Z biochemických testů by proveden test na katalázu, kde byl shledán únik bublinek

Po provedení testů byla neznámá bakterie vyhodnocena jako bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Pro identifikaci bakterie do rodu byl použit ENTEROtest 24. Na základě

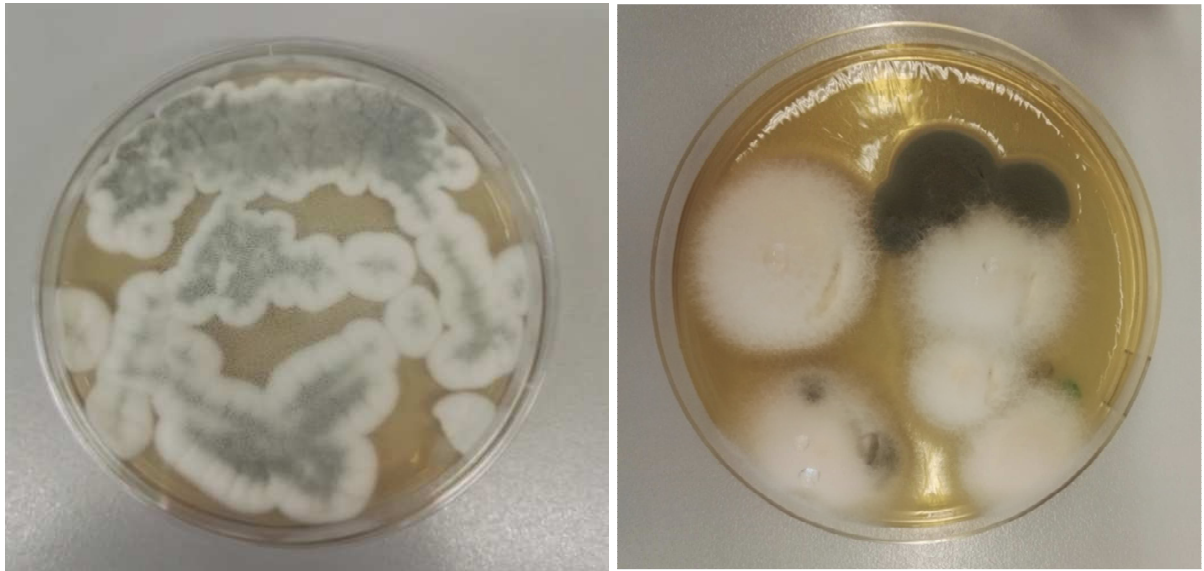
výsledků test identifikoval mikroorganismus do rodu *Escherichia*, resp. jako *Escherichia coli*. Popis a identifikace *E. coli* je podporováno článkem od Tenailon *et al.* publikované v roce 2010, kde je tato bakterie charakterizována jako gramnegativní (červené) tyčinky běžně se nacházející ve střevním traktu člověka, ale i ve vzduchu nebo vodě. Její přítomnost v pitné vodě se považuje za ukazatele znečištění vody. Následně se zde popisuje, že *E. coli* je považován za patogenního původce různých intrainestinálních, ale i extraintestinálních onemocnění. Článek též uvádí, že *E. coli* je velmi enzymaticky vybavená, což podkládá pozitivní reakci testu na tvorbu katalázy a další pozitivní výsledky biochemických testů.



Obrázek 16: Kontaminace čeledi *Enterobacteriaceae* (TSA, 37 °C, 24 hod.), (Foto: J. Vacková, Bacmed)

3.1.2 Identifikace a popis kontaminace - plísně

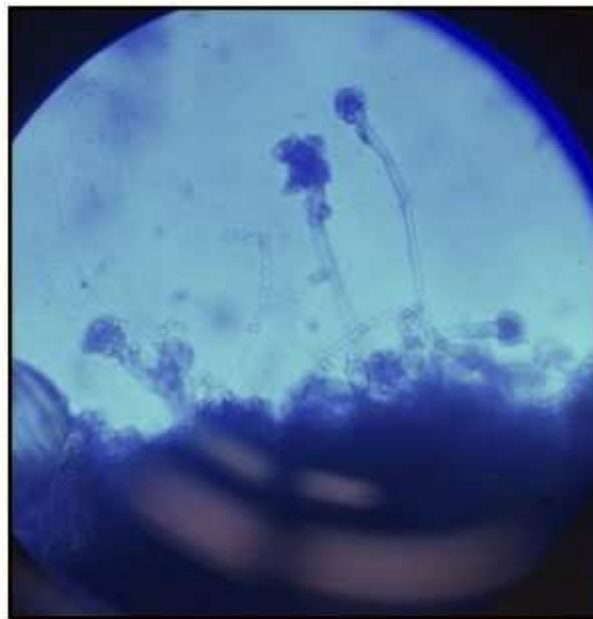
Vedle bakterií, jakožto kontaminantů vzorku, se jako nežádoucí nárůst objevily plísně. Kontaminace se jevila jako směs několika plísní, kterou bylo potřeba rozizolovat a identifikovat (viz **Obrázek 17**). Plísně figurovaly jak v zásobních roztocích bez inokula, tak i v zaočkovaných zásobních roztocích, v obou látkách, výrazně při koncentraci 1%, méně pak v koncentraci 0,1% a 0,01%. Plísně se projevíly primárně na SDA (30 °C, 48 hodin), odkud byly přeočkovány na MALT (30 °C, 48 hodin). Pro zhodnocení makroskopických znaků byl použit agar na bázi bramborové D-glukózy (PDA). Pro bližší identifikaci a ověření byly plísně dále přeočkovány na různé druhy půd využívané ke kultivaci plísní, např. AFPA, CLA, SNA.



Obrázek 17: Kontaminující plísně na SDA (30 °C, 3 dny), (Foto: J. Vacková)

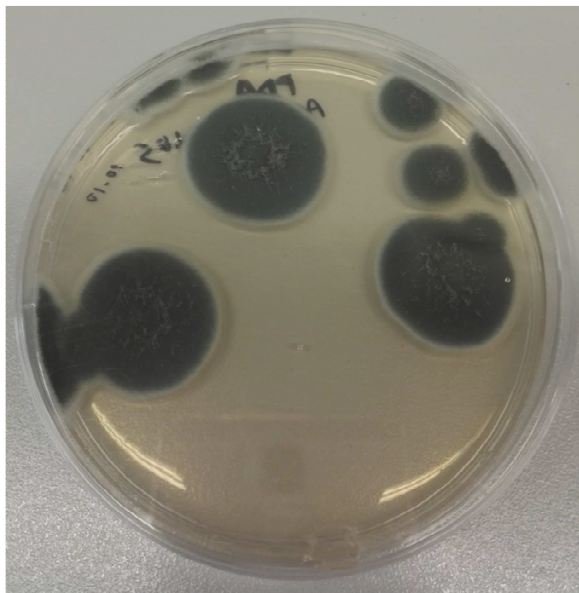
První plíseň byla ze Sabouragova agaru (SDA) přeočkována na MALT, kde byly popsány její makroskopické znaky. Povrch kolonií byl sametový, barva mycelia bělozelená, rub a vzhled nažloutlý a hladký. Vedle bylo možno vidět několik spor. Na SDA se makroskopické znaky jevily podobně.

Z MALT byl proveden nativní preparát do laktofenolu s bavlníkovou modří (viz **Obrázek 18**). V preparátu bylo možno vidět septované mycelium, kulovité konidie, které se v řetízkách odškrcovaly od lahvicovitých fialid. Konidiofory byly neseptované, nevětvené a na konci byly pokryty povětšinou 1 fialidou, která je typická pro rod plísní *Aspergillus*.



Obrázek 18: Nativní preparát plísně rodu *Aspergillus* (zvětšení 40x50, Foto: J. Vacková)

Plíseň byla přeočkována pro bližší popis makroskopických znaků na bramboroglukózový agar (PDA) pomocí metody 3 obrovských kolonií a necháno inkubovat při 25 °C, 5 dní. Po inkubační době se kolonie jeví jako obrovské sametové kolonie s šedozeleným zbarvením. Jak lze vidět na **Obrázek 19** rub kolonií byl bílošedý a hladký.



Obrázek 19: Plíseň rodu *Aspergillus* na PDA (25 °C, 5 dní)
(Foto: J. Vacková)

Podle všech znaků byla plíseň zařazena do rodu *Aspergillus*. Pro zjištění, jestli je kmen schopný produkce aflatoxinů byla přeočkována na speciální půdu - AFPA (viz **Obrázek 20**). Po kultivaci (25 °C, 3 dny) byl pozorován nárůst s hnědým zbarvením rubem kolonií. Nejedná se tedy o kmeny *Aspergillus flavus* nebo o *Aspergillus parasiticus* produkující aflatoxiny, které na rubu živného média AFPA vytváří oranžovo-žlutý komplex. Ačkoliv plíseň nevytváří aflatoxiny, není zcela vyloučená produkce jiných toxinů.



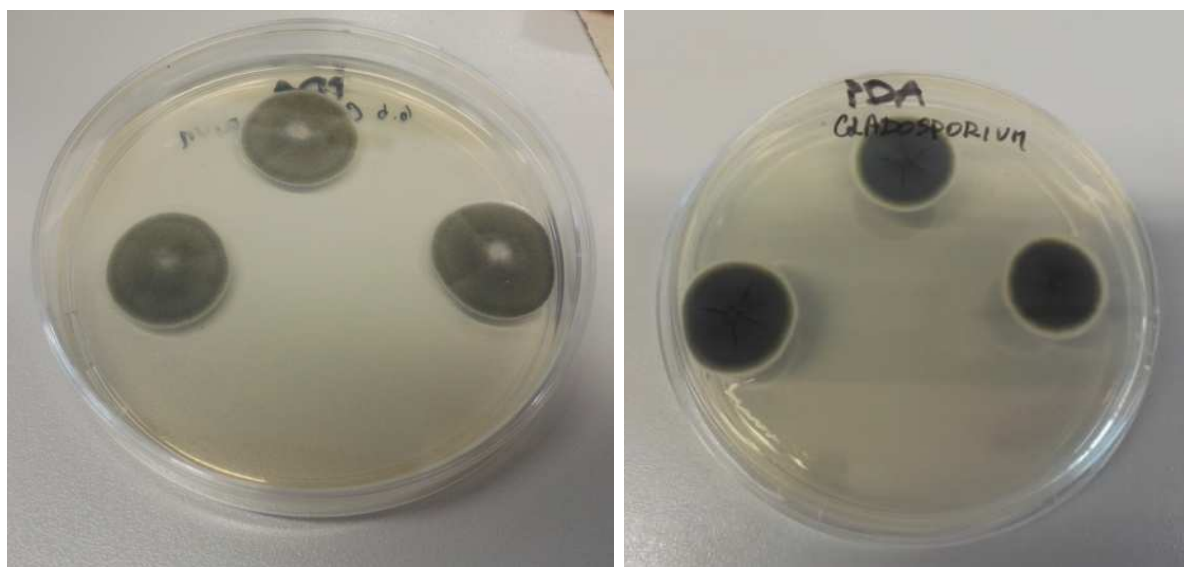
Obrázek 20: Plíseň rodu *Aspergillus* na AFPA (25 °C, 3 dny), (Foto: J. Vacková)

V souladu s publikací od Schäpe *et al.* (2019) je rod *Aspergillus* velmi nebezpečný pro člověka právě z důvodu tvorby toxinů. Plíseň je považována za všudypřítomnou, takže její spory je prakticky možné nalézt kdekoliv. S tímto tvrzením se nalézají i možnost příčiny kontaminace, která se může nacházet už v prvotní výrobě těchto dvou rostlinných látek.

Druhá plíseň byla pomocí obrovských kolonií z SDA přeočkována na MALT a nechána inkubovat po dobu 5 dní při 25 °C. Po makroskopické stránce se plíseň jevila jako obrovské tmavé kolonie se zvrásněným povrchem. Rub kolonií byl tmavý s charakteristickým zvrásněním. Z MALT agaru byla odebrána kolonie, ze které byl proveden nativní preparát. V preparátu byly vidět oválné konidie navázané na neseptovaný nerozvětvený konidiofor.

Pro bližší identifikace podle makroskopických znaků byl využit opět bramboro-glukózový agar. Po přeočkování byla půda ponechána inkubovat při 25 °C, 5 dní. **Obrázek 21** poukazuje na vzhled kolonií, které byly na povrchu sametově zelené s bílým středem, na rubu zvrásněně tmavého vzhledu.

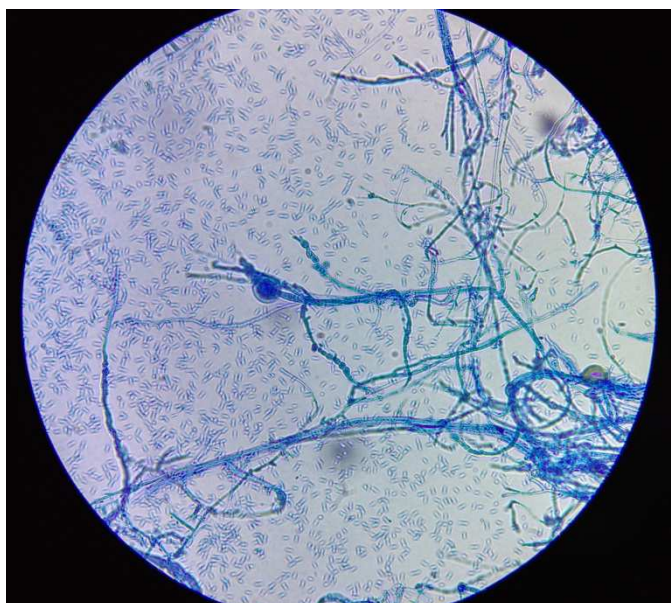
S pomocí atlasu a poznatků z makroskopických a mikroskopických znaků byla plíseň zařazena do rodu *Cladosporium*. Rod *Cladosporium* patří podle článku od Bensch *et al.* (2018) mezi nejvíce hojné houby venkovního, ale i vnitřního prostředí. To částečně podporuje myšlenku o kontaminaci z prvotní výroby, např. o špatném skladování vzorků v nevhodných podmínkách.



Obrázek 21: Plíseň rodu *Cladosporium* na PDA (25 °C, 5 dní), (Foto: J. Vacková)

Poslední plíseň tvořila na SDA při 25 °C po dobu 5 dnů mechovitě bílé kolonie a bílé mycelium. Barva rubu kolonií byla oranžové barvy. Bylo možno zaznamenat přítomnost výpotku.

Následně byla plíseň přeočkována na MALT agar (30 °C 48 hod.), ze kterého byl proveden nativní preparát. V preparátu, který zobrazuje **Obrázek 22**, bylo možno vidět septované mycelium se spousty malých mikrokonidií oválného tvaru. Částečně bylo možno nalézt interkalární chlamydozspory.

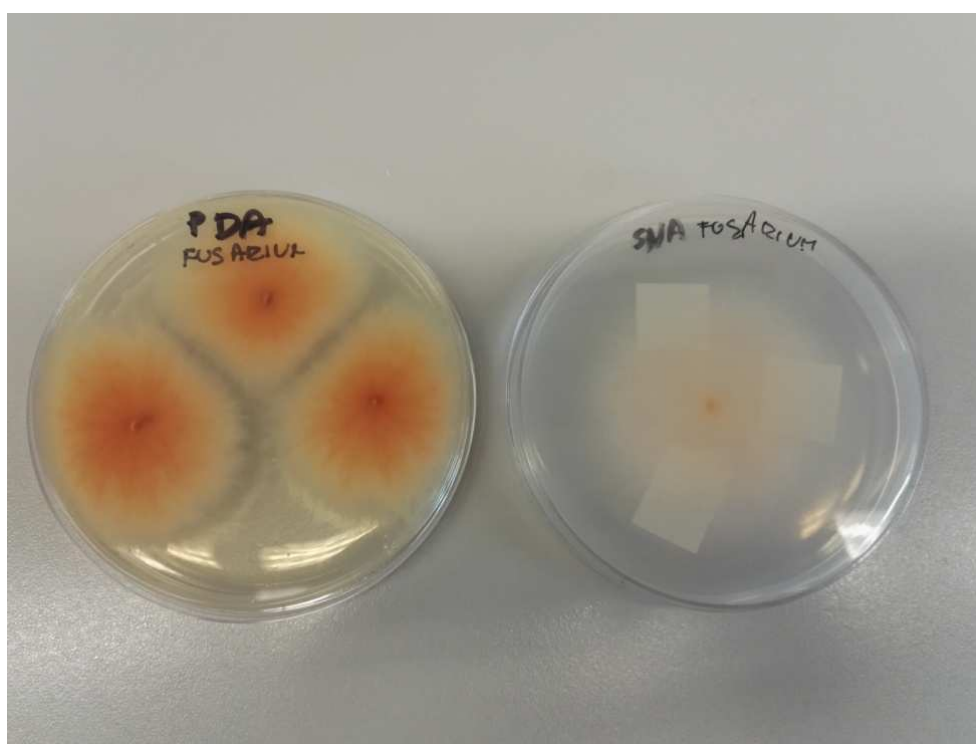


Obrázek 22: Nativní preparát plísně rodu *Fusarium*
(zvětšení 40x50, Foto: J. Vacková)

Stejně jako ostatní plísně byla i tato pro bližší pozorování makroskopických znaků přeočkována na bramboro-glukózový agar. Po 5 dnech inkubace při 25 °C byly narostlé tři obrovské chumáčkovité bílé kolonie s kapkou transpirované kapaliny. Rub kolonií vykazoval bílooranžový paprskovitý sametový vzhled (viz **Obrázek 23**).

Tyto znaky poukazovaly na plíseň z rodu *Fusarium*. Z tohoto důvodu byla přeočkována na živné médium určené pro kultivaci plísní z rodu *Fusarium* na karafiátový agar (CLA) a synteticky-nutričně chudý agar (SNA). Na CLA neboli na karafiátovém agaru byl po 5 dnech při laboratorní teplotě bílý nárůst v okolí karafiátového listu. Na agaru SNA byl znatelný bílý mechovitý nárůst přes filtrační papírky. Rub byl bílé barvy, v místě vpichu zaočkování byl nárůst mechovitě oranžové barvy, mycelium barvy bílé.

Na základě těchto makroskopických znaků a zejména nativního preparátu byla plíseň potvrzena z rodu *Fusarium*. Tento rod zahrnuje více než 70 druhů, které mohou vytvářet toxiny. Plíseň *Fusarium* je schopna rychle a v široké škále kolonizovat se na různá prostředí a předměty. Publikace Munkvold (2017) uvádí rod *Fusarium* s významnou patogenní aktivitou, pomocí které by mohla vznikat mykotoxinová kontaminace. Tato kontaminace se může dostat z různých předmětů i do složek potravin nebo přísad léčiv, které jsou následně uváděny na trh. V důsledku toho mohou nastat u uživatelů zdravotní problémy, a tím i zároveň ekonomická ztráta prodejců stahováním výrobků z trhu kvůli její zdravotní závadnosti.



Obrázek 23: Plíseň rodu *Fusarium* na PDA a SNA (25 °C, 5 dní), (Foto: J. Vacková)

Testovaný amorfní vzorek β -aescinu č. š. 011118 PK 18091 ve všech třech koncentracích (1%, 0,1%, 0,01%) splňoval kritéria požadavků normy ČSN EN ISO 11930, kritériu A ohledně testování na bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a kvasince *Candida albicans*. Ipřes nežádoucí kontaminaci v zásobním roztoku, všechny tři koncentrace inhibovaly a mohou být použity jako přísady do léčiv a podpůrných látek. Druhá testovaná látka žumenu č. š. NSIN02069-CQP vyhověla kritériím normy jen v nejnižší 0,01% koncentraci. V ostatních koncentracích se projevila nežádoucí kontaminace a minimální inhibice.

Bezprostředně od počátku byla prokázána kontaminace v obou zásobních vzorcích naředěné sterilní destilovanou vodou. Větší množství kontaminantů bylo možné vidět u druhé testovací látky žumenu. V souladu s tímto faktem nastávají úvahy o mikrobiologické nezávadnosti, které mohlo být ovlivněno nárůstem nežadoucích mikroorganismů.

V případě kontaminace bakteriemi by se lépe měly dodržet podmínky při výrobě, transportu, klást důraz na sterilitu prostředí, nástrojů a také vodních zdrojů, popř. samotné vody. Jedině tímto postupem se dá docílit minimalizaci budoucích zdravotních rizik.

Druhé kontaminanty, plísně, jsou v dnešní době velkým problémem, proto je zapotřebí, co nejvíce hlídat výrobu, sterilní podmínky a prostředí. Plísně pomocí svých toxinů mohou způsobit zdravotní problémy. Jejich spory se mohou nacházet v ovzduší nebo vlhkých prostorech, proto jsou podstatné i skladovací podmínky a prostory. Dojde-li ke kontaminaci plísněmi, nastává nejlepší řešení produkt nepoužívat, popř. stáhnout z trhu a přepracovat. Při přepracování by bylo vhodné vzorky antimikrobiálně ošetřit, např. γ -zářením. Záření by v důsledku mělo mít letální účinek proti plísním i některým bakteriím.

Oba vzorky β -aescin i žumen jsou zcela nově vyrobené vzorky, tudíž nebylo reálné dohledat a porovnat s výsledky testování jinou firmou. Výsledky byly sepsány a dodány firmě s doporučením oba vzorky antimikrobiálně ošetřit a upravit jejich chemické, fyzikální a biologické vlastnosti.

4 ZÁVĚR

- Testování vzorku β -aescinu a žumenu bylo provedeno v rámci projektu TAČR (TH02010762) „Suplementy pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu“. Cílem projektu je příprava doplňků stravy na bázi monolaurinů v kombinaci s přírodními látkami, které by při řízené disoluci v zažívacím traktu pozitivně působily na střevní mikrobiom.
- Oba vzorky byly testovány podle normy ČSN EN ISO 11930, konkrétně podle kritéria A. Norma popisuje mikrobiologické hodnocení antimikrobiální ochrany testovaného výrobku vůči bakteriím *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, kvasince *Candida albicans* a plísni *Aspergillus brasiliensis*.
- Vzorek amorfního β -aescinu č. š. 011118 PK 18091 byl rozpuštěn ve sterilní destilované vodě. Látka byla testována v koncentracích 1%, 0,1% a 0,01%. Ve všech třech koncentracích látka splňovala limity kritéria A normy ČSN EN ISO 11930.
- V zásobních roztocích β -aescinu, s inokulem i bez inokula, byla okamžitě po náředění a vyočkování objevena nežádoucí kontaminace. Bližší morfologické a biochemické testy identifikovaly původce bakterie z rodu *Bacillus*, čeledi *Enterobacteriaceae* (*E. coli*) a plísně z rodu *Aspergillus*.
- Paralelně druhá testovaná látka žumen (*Cissus quadrangularis* extrakt č. š. NSIN02069-CQP) byla zředěna destilovanou vodou. Testování bylo provedeno stejně jako u prvního vzorku podle normy ČSN EN ISO 11930 v koncentracích 1%, 0,1% a 0,01% a byly použity stejné testovací mikroorganismy. Kritérium A bylo splněno jen v případě testované koncentrace 0,01%.
- Obdobně jako u β -aescinu, byla u zásobních roztoků žumenu, s inokulem i bez inokula, prokázána nežádoucí kontaminace. Za kontaminaci byly zodpovědny bakterie z rodu *Bacillus*, čeledi *Enterobacteriaceae* (*E. coli*) a plísně z rodu *Cladosporium* a *Fusarium*.
- V celkovém hodnocení byla u β -aescinu prokázána ve všech 3 koncentracích antimikrobiální ochrana výrobku. U druhé testované látky, žumenu, výsledky prokázaly největší antimikrobiální ochranu u koncentrace 0,01%.
- Kontaminace se vyskytovala od počátku testování v různých koncentracích, u různých druhů testovaných mikroorganismů, což znesnadňovalo odečet výsledků.
- Vzhledem ke kontaminaci nebylo provedeno testování s plísní *Aspergillus brasiliensis*.
- Na základě těchto výsledků je nutné pro další testování látky ošetřit např. γ -zářením a zajistit jejich mikrobiální nezávadnost.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1]AAS, J. A., PASTER, B. J., STOKES L. N., OLSEN I., DEWHIRST F. E. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, **43**(11), s. 5721-5732.
- [2]ABE, C. M., FÁ;BIA, A., SALVADOR, I., FALSETTI, N. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008, **52**(3), s. 397-406.
- [3]ADAMS, M. R., MOSS, M. O. *Food microbiology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000, s. 479. ISBN 0-85404-611-9.
- [4]ADELEYE, A. O., ODENIYI, M., JAIYEGBA, K. The influence of cissus gum on the mechanical and release properties of paracetamol tablets – a factorial analysis. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2010, **31**(2), s. 1-2.
- [5]AHMED, T., BHUIYAN, T. R., ZAMAN, K., SINCLAIR, D., QADRI, F. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013,1, s. 1 - 2.
- [6]AMON, P., SANDERSON, I. What is the microbiome? *ADC Education and Practice Edition*, 2017, **102**(5), s. 258-261.
- [7]AN, Y.-J., KAMPBELL, D. H., BREIDENBACH, G. P. *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas. *Environmental Pollution*, 2002, **120**(3), s. 771-778.
- [8]ANDRADE, J. A. B., FREYMÜLLER, E., FAGUNDES-NETO, U. Adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to the ileal and colonic mucosa: an in vitro study utilizing the scanning electron microscopy. *Arquivos de Gastroenterologia*, 2011, **48**(3), s. 199-204.
- [9] ANTÃO, E. - M., WIELER, L. H., EWERS, CH. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, 2009, **1**(1), s. 1-12.
- [10]ARGUDÍN, M. Á., MENDOZA, M. C., RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *IUBA*, 2010, **1**(1), s. 1751-1773.
- [11]BAIBADO, J. T., CHEUNG, H-Y. Seed Extract of Horse Chestnut (*Aesculus hippocastanum* L., 七葉樹) as Effective Medication for Chronic Venous Insufficiency and Other Health Benefits. *Hong Kong Pharmaceutical Journal*, 2010, **17**(4), s. 156-161.

- [12]BANU, J., VARELA, E., FERNANDES, G. Alternative therapies for the prevention and treatment of osteoporosis. *Nutrition Reviews*, 2012, **70**(1), s. 22-40.
- [13]BEASLEY, D. E., KOLTZ, A. M., LAMBERT, J. E., FIERER, N., DUNN, R. R. The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome. *PLOS ONES*, 2015, **10**(7), s. 1-12.
- [14]BENSCH, K., GROENEWALD, J. Z., MEIJER, M. *Cladosporium* species in indoor environments. *Studies in Mycology*, 2018, **89**, s. 177-301.
- [15]BERMAN, L., MOSS, R. L. Necrotizing enterocolitis: An update. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 2011, **16**(3), s. 145-150.
- [16]BIK, E. M., ECKBURG, P. B., GILL, S. R. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *PNAS Journal*, 2006, **103**(3), s. 732-737.
- [17]BOHM, M., SIWIEC, R. M., WO, J. M.. Diagnosis and Management of Small Intestinal Bacterial Overgrowth. *Wiley Online Library, Nutrition in Clinical Practise*, 2013, **28**(3), s. 289-299.
- [18]BUGAREL, M., MARTIN, A., FACH, P., BEUTIN, Lothar. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC Microbiology*, 2011, **11**(1). s. 22-25.
- [19]BUNIKOWSKI, R., MIELKE, M. E. A., SKARABIS, H., WORM, M., ANAGNOSTOPOULOS, I., KOLDE, G., WAHN, U., RENZ, H. Evidence for a disease-promoting effect of *Staphylococcus aureus* – derived exotoxins in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000, **105**(4), s. 814-819.
- [20]CALDERA, L., FRANZETTI, L., VAN COILLIE, E., DE VOS, P., STRAGIER, P., DE BLOCK, J., HEYNDRIKX, M. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas spp.* isolated from different foods. *Food Microbiology*, 2016, **54**, s. 142-153.
- [21]CANTIN, A. M., HARTL, D., KONSTAN, M. W., CHMIEL, J. F. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2015, **14**(4), s. 419-430.
- [22]CANTON, R., CHOUINARD, L., TARRAGÓ, C. A review of the antibacterial activity of ozenoxacin. *Future Microbiology*, 2018, **13**(6), s. 1-2.

- [23]CARRASCO, O. F., VIDRIO, H. Endothelium protectant and contractile effects of the antivaricose principle escin in rat aorta. *Vascular Pharmacology*, 2007, **47**(1), s. 68-73.
- [24]CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 2015, **122**(6), s. 785-794.
- [25]CELANDRONI, F., SALVETTI, S., GUEYE, S. A., MAZZANTINI, D., LUPETTI, A., SENESI, S., GHELARDI, E., CHAKRAVORTTY, D. Identification and Pathogenic Potential of Clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* Isolates. *PLOS ONE*, 2016, **11**(3), s. 1-13.
- [26]CROXEN, M. A., LAW, R. J., SCHOLZ, R., KEENEY, K. M., WLODARSKA, M., FINLAY, B. B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology*, 2013, **26**(4), s. 822-880.
- [27]CUKANOVIC, J., NINIC-TODOROVIC, J., OGNJANOV, V., MLADENOVIC, E., LJUBOJEVIC, M., KURJAKOV, A. Biochemical composition of the horse chestnut seed (*Aesculus hippocastanum* L.). *Archives of Biological Sciences*, 2011, **63**(2), s. 345-351.
- [28]CURTIS, L., LAWLEY, R. *Micro-Facts: the working companion for food microbiologists*. Leatherhead: Leatherhead International, 2003, s. 279. ISBN 1-904007-54-6.
- [29]DA SILVA DANTAS, A., LEE, K. K., RAZIUNAITE, I., SCHAEFER, K., WAGENER, J., YADAV, B., GOW, N. A. R. Cell biology of *Candida albicans* – host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 2016, **34**, s. 111-118.
- [30]DE LA FUENTE, R., BALLESTEROS, C., BAUTISTA, V., MEDINA, A., ORDEN, J. A., DOMÍNGUEZ-BERNAL, G., VINDEL, A. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolates from different countries are clonal in nature. *Veterinary Microbiology*, 2011, **150**(1-2), s. 198-202.
- [31]DHAND, R. The Rationale and Evidence for Use of Inhaled Antibiotics to Control *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Non-cystic Fibrosis Bronchiectasis. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 2018, **31**(3), s. 121-138.
- [32]DUKE, J. A., OTTESEN. J. *Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America*. London: CRC Press, 2009, s. 910. ISBN 978-1-4200-4316-7.
- [33]EDBERG, S. C., RICE, E. W., KARLIN, R. J., ALLEN, M. J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **88**(1), s. 106-116.

- [34]ERDOGAN, A., RAO S. S. C. Small Intestinal Fungal Overgrowth. *Current Gastroenterology Reports*, 2015, **17**(4), s. 1-8.
- [35]ERKOSAR, B., LEULIER, F. Transient adult microbiota, gut homeostasis and longevity: Novel insights from the *Drosophila* model. *FEBS Letters*, 2014, **588**(22), s. 4250-4257.
- [36]EZBERCI, F., ÜNAL, E. *Aesculus Hippocastanum* (Aescin, Horse Chestnut) in the Management of Hemorrhoidal Disease: Review. *Turkish Journal of Colorectal Disease*, 2018, **28**(2), s. 54-57.
- [37]FETSCH, A., CONTZEN, M., HARTELT, K. *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, **187**, s. 1 - 6.
- [38]FINLEY, R. L., COLLIGNON, P., LARSSON, D. G. J. The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of the Environment. *Clinical Infectious Diseases*, 2013, **57**(5), s. 704-710.
- [39]FLECKENSTEIN, J. M., HARDWIDGE, P. R., MUNSON, G. P., RASKO, D. A., SOMMERFELT, H., STEINSLAND, H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and Infection*, 2010, **12**(2), s. 89-98.
- [40]FRIAS-LOPEZ, J. Targeting specific bacteria in the oral microbiome. *Trends in Microbiology*, 2015, **23**(9), s. 527-528.
- [41]GASTALDO, P., CAVIGLIA, A. M., PROFUMO, P. *Aesculus hippocastanum* L. Horse Chestnut: In Vitro Culture and Production of Aescin. In: Bajaj Y. P. S. *Medicinal and Aromatic Plants VII. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1994, **28** (1), s. 1-12.
- [42]GELLATLY, S. L., HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 2013, **67**(3), s. 159-173.
- [43]GENDREAU, L., LOEWY, Z. G. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *Journal of Prosthodontics*, 2011, **20**(4), s. 251-260.
- [44]GONÇALVES, B., FERREIRA, C., ALVES, C. T., HENRIQUES, M., AZEREDO, J., SILVA, S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Critical Reviews in Microbiology*, 2016, **42**(6), s. 905-927.
- [45]GORDON, R. J., LOWY, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, **46**(5), s. 350-359.

- [46]GREEN, S., LAUE, B., FOSSDAL, C. G., A'HARA, S. W., COTTRELL, J. E. Infection of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* and its detection by quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*, 2009, **58**(4), s. 731-744.
- [47]GREENWAY, F. L., BRAY, G. A. Combination drugs for treating obesity. *Current Diabetes Reports*, 2010, **10** (2), s. 108–115.
- [48]GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö., MAZZA, G. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2007, **47**(3), s. 231-258.
- [49]GURRIERI, C., WEINGARTEN, T. N., MARTIN, D. P., BABOVIC, N., NARR, B. J., SPRUNG, J., VOLCHECK, G. W. Allergic Reactions During Anesthesia at a Large United States Referral Center. *Anesthesia & Analgesia*, 2011, **113**(5), s. 1202-1212.
- [50]HENNEKINNE, J.-A., DE BUYSER, M.-L., DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, **36**(4), s. 815-836.
- [51]HU, J., TORRES, A. G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander?. *Clinical Microbiology and Infection*, 2015, **21**(8), s. 729-734.
- [52]HUI, R., WEN, J. *Cissus Linnaeus*. *Flora of China*, 2007, **12**(1), s. 173-184.
- [53]CHIDAMBARAM, J., VENKATRAMAN, C. A. *Cissus quadrangularis* stem alleviates insulin resistance, oxidative injury and fatty liver disease in rats fed high fat plus fructose diet. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, **48**(8-9), s. 2021-2029.
- [54]CHUZEVILLE, S., PUYMÈGE, A., MADEC, J.-Y., HAENN, I M., PAYOT, S., BISWAS, I. Characterization of a New CAMP Factor Carried by an Integrative and Conjugative Element in *Streptococcus agalactiae* and Spreading in Streptococci. *PLoS ONE*, 2012, **7**(11), s. 1-3.
- [55]JABUR, Z. A., FAKHRY, S. S., HASSAN, M. A., KADHEM, B. Q. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Food. *World J. E. B.*, 2016, **4** (1), s. 83-86.
- [56]JAINU, M. SRINIVASULU, CH., DEVI, S. Gastroprotective action of *Cissus quadrangularis* extract against NSAID induced gastric ulcer: Role of proinflammatory cytokines and oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, **161**(3), s. 262-270.

- [57]JAINU, M., MOHAN, K. V., DEVI, C. S. S. Protective effect of *Cissus quadrangularis* on neutrophil mediated tissue injury induced by aspirin in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, **104** (3), s. 302–305.
- [58]JENKINS, A., DIEP, B. A., MAI, T. T., VO, N. H., WARRENER, P., SUZICH, J., STOVER, C. K., SELLMAN, B. R. Differential Expression and Roles of *Staphylococcus aureus* Virulence Determinants during Colonization and Disease. *MBio*, 2015, **6**(1), s. 1-10.
- [59]JOHLER, S., WEDER, D., BRIDY, C., HUGUENIN, M.-C., ROBERT, L., HUMMERJOHANN, J., STEPHAN, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 2015, **98**(5), s. 2944-2948.
- [60]JUAN, C., PEÑA, C., OLIVER, A. Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 2017, **215**(1), s. 44-51.
- [61]KAPER, J. B., NATARO, J. P., MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, **2**(1), s. 123-140.
- [62]KAREN C. C., JOHN, B. G. Biology of *Clostridium difficile*: Implications for Epidemiology and Diagnosis. *Annual Review of Microbiology*, 2011, **65**(1), s. 501-521
- [63]KĘDZIERSKI, B., KUKULA-KOCH, W., WIDELSKI, J., GŁOWNIAK, K. Impact of harvest time of *Aesculus hippocastanum* seeds on the composition, antioxidant capacity and total phenolic content. *Industrial Crops and Products*, 2016, **86**, s. 68-72.
- [64]KHAN, H. A., AHMAD, A., MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2015, **5**(7), s. 509-514.
- [65]KHAN, L., MAHMOOD, T. Drugs of natural origin. *Special Feature: Traditional Medicine: S&T Advancement*, 2006, **1**(1), s. 53-56.
- [66]KIMATA, M., INAGAKI, N., NAGAI, H. Effects of Luteolin and Other Flavonoids on IgE-Mediated Allergic Reactions. *Planta Medica*, 2000, **66**(1), s. 25-29.
- [67]KING, J., KULHANKOVA, K., SALGADO-PABÓN, W. Staphylococcal toxic shock syndrome: superantigen-mediated enhancement of endotoxin shock and adaptive immune suppression. *Immunologic Research*, 2014, **59**(1-3), s. 182-187.

- [68]KJAERGAARD, A. B., CARR, A. P., GAUNT, M. C. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection in connection with acute gastroenteritis in 7 dogs of Saskatchewan. *The Canadian Veterinary Journal*, 2016, **57**(9), s. 964-968.
- [69]KÖHLER, C.- D., DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?. *International Journal of Medical Microbiology*, 2011, **301**(8), s. 642-647
- [70]KUGADAS, A., CHRISTIANSEN, S. H., SANKARANARAYANAN, S. Impact of Microbiota on Resistance to Ocular *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Keratitis. *PLOS Pathogens*, 2016, **12**(9), s. 1-24.
- [71]LANGDON, A., CROOK, N., DANTAS, G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Medicine*, 2016, **8**(1), s. 1-16.
- [72]LEE, J., ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 2015, **6**(1), s. 26-41.
- [73]LEE, M. □H., ARRECUBIETA, C., MARTIN, F. J., PRINCE, A., BORCZUK, A. C., LOWY, F. D. A Postinfluenza Model of *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 2010, **201**(4), s. 508-515.
- [74]LESBROS-PANTOFLIČKOVÁ, D., CORTHÉSY-THEULAZ, I., BLUM, A. L. *Helicobacter pylori* and Probiotics. *The Journal of Nutrition*, 2007, **137**(3), s. 812-818.
- [75]LEWIS, M. A. O., WILLIAMS, D. W. Diagnosis and management of oral candidosis. *BDJ*, 2017, **223**(9), s. 675-681.
- [76]LI, K., BIHAN, M., YOOSEPH, S., METHÉ, B. A. Analyses of the Microbial Diversity across the Human Microbiome. *PLOS ONE*, 2012, **7**(6), s. 1-18.
- [77]LICITRA, G. Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, **19**(9), s. 10.
- [78]LINDNER, I., MEIER, CH., URL, A., UNGER, H., GRASSAUER, A., PRIESCHL-GRASSAUER, E., DOERFLER, P. Beta-escin has potent anti-allergic efficacy and reduces allergic airway inflammation. *BMC Immunology*, 2010, **11**(24), s. 1-10.
- [79]LIVERMORE, D. M. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 2002, **34**(5), s. 634-640.

- [80]LOHSE, M. B., GULATI, M., JOHNSON, A. D., NOBILE C. J. Development and regulation of single and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, **16**(1), s. 19-31.
- [81]LOIRAT, CH., FRÉMEAUX-BACCHI, V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2011, **6**(1), s. 1-30.
- [82]LOZUPONE, C. A., STOMBAUCH, J. I., GORDON, J. I., JANSSON, J. K., KNIGHT R. Diversity, stability and resistance of human microflora. *Nature, International of science*, 2012, **489**, s. 220-230.
- [83]LUNA-GIERKE, R. E., GRIFFIN, P. M., GOULD, L. H., HERMAN, K., BOPP, C. A., STROCKBINE, N., MODY, R. K.. Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiology and Infection*, 2014, **142**(11), s. 2270-2280.
- [84]MACFARLANE, G. T., MACFARLANE, S. Human Colonic Microbiota: Ecology, Physiology and Metabolic Potential of Intestinal Bacteria. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2016, **222**(32), s. 3-9.
- [85]MACFARLANE, S., DILLON JF. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, **102**, s. 1187-1196.
- [86]MAL, S., BERENDT, A. R., PEACOCK, S. J. *Staphylococcus aureus* Bone and Joint Infection. *Journal of Infection*, 2002, **44**(3), s. 143-151.
- [87]MARRS C. F., ZHAN,G L., FOXMAN B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **252**(2), s. 183–190.
- [88]MARTINS, N. B., FERREIR, L. A. R., SANTOS, A.L.Q, DE SOUZA, R. R., OLIVEIRA, W. J., MOREIRA, T. A., QUEIROZ, C. L., LIMA, A.M.C. Dermatopathy Caused by *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* in Boa constrictor amarali. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2017, **45**(1), s. 1-4.
- [89]MARTINS, N. I., FERREIRA, C. F. R., BARROS, L., SILVA, S., HENRIQUES M. Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia*, 2014, **177**(5-6), s. 223-240.
- [90]MAZMANIAN, S. K., ROUND, J. L., KASPER, D. L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 2008, **453**, s. 620-625.

- [91]MENA K. D., GERBA C. P. Risk Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in Water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2009, **201**(1), s. 71 - 115.
- [92]MISHRA, G., SRIVASTAVA, S., NAGORI, B. P. Pharmacological and Therapeutic Activity of *Cissus quadrangularis*: An Overview. *International Journal of PharmTech Research*, 2010, **2**(2), s. 1298-1310.
- [93]MOLINA, F., LÓPEZ-ACEDO, E., TABLA, R., ROA, I., GÓMEZ, A., REBOLLO, J. E. Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR. *BMC Biotechnology*, 2015, **15**(1), s. 1-13.
- [94]MORADALI, M. F., GHODS, S., REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, **7**, s. 1-29.
- [95]MORELLI, L., GUARINO, A., QUIGLEY, E. M. M., WALKER, W. A. Probiotics: Definition and Taxonomy 10 Years after the FAO/WHO Guidelines. *World Review of Nutrition and Dietetics. Probiotic Bacteria and Their Effect on Human Health and Well-Being*, 2013, **1**, s. 1-8.
- [96]MULVEY, M. A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 2002, **4**(5), s. 257-271.
- [97]MUNKVOLD, G. P. *Fusarium* Species and Their Associated Mycotoxins. *Mycotoxigenic Fungi*, 2017, **1542**, s. 51-106.
- [98]MURTHY CHIDAMBARA, K. N., VANITHA, A., MAHADEVA SWAMY, M., RAVISHANKAR, G. A. Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Cissus quadrangularis* L. *Journal of Medicinal Food*, 2003, **6**(2), s. 99-105.
- [99]MYLES, I. A., DATTA, S. K. *Staphylococcus aureus*: an introduction. *Seminars in Immunopathology*, 2012, **34**(2), s. 181-184.
- [100]NAVRÁTILOVÁ, Z. *Cissus quadrangularis*: exotická léčivka, 2011, **1**, s. 1-2.
- [101]NETEA, M. G., BROWN, G. D., KULLBERG, B. J., GOW, N. A. R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, **6**(1), s. 67-78.
- [102]NOVÁČKOVÁ, M., CHMEL, R. Brusinky a probiotika – prevence a adjuvantní léčba recidivujících uroinfekcí. *Praktické lékařství*. 2012, **8**(3), s. 110-112.

- [103]JOBEN, J. E., ENYEGUE, D., FOMEKONG, G. I, SOUKONTOUA, Y. B., AGBOR, G. A. *Lipids in Health and Disease*, 2007,**6**(1), s. 2-6.
- [104]JOBEN, J., KUATE, D., AGBOR, G., MOMO, C., TALLA, X. The use of a *Cissus quadrangularis* formulation in the management of weight loss and metabolic syndrome. *Lipids in Health and Disease*, 2006, **5**, s. 1-7.
- [105]ODONKOR, S. T., AMPOFO, J. K. *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research*, 2013, **4**(1), s. 1-2.
- [106]OGORI, A. F. Effect of Cassava Starch Flour Seeding On Functional Properties of Cissus Gum Stem and Root (*Cissum Populnea*). *IOSR Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*, 2013, **7**(2), s. 1-4.
- [107]OLIVEIRA, A. B., MENDONÇA, M. S., AZEVEDO, A. A., MEIRA, R. M. S. A. Anatomy and histochemistry of the vegetative organs of *Cissus verticillata*: a native medicinal plant of the Brazilian Amazon. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2012, **22**(6), s. 1201-1211.
- [108]OLIVEIRA, A. *Cissus verticillata* (Vitaceae). *Ethnopharmacological information and anatomy of vegetative organs*, 2006, 1, s. 1-2.
- [109]OLIVEIRA, L., LANGONI, H., HULLAND, C., RUEGG, P. L. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 2012, **95**(4), s. 1913-1920.
- [110]OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, **17**, s. 32-37.
- [111]PASQUA, M., MICHELACCI, V., DI MARTIN, O. M. L., TOZZOLI, R., GROSSI, M., COLONNA, B., MORABITO, S., PROSEDA, G. The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward Pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*, 2017, **8**, s. 1-12.
- [112]PATEL, P. D. Rapid analysis techniques in food mikrobiology. London: Blackie Academic & Professional, 1994, s. 294. ISBN 0-7514-0030-0.
- [113]PENDERS, J., THUIS, C., VINK, C., STELMA, F. F., SNIJDERS, B., KUMMELING, I., VAN DE BRANDT, P. A., STOBBERINGH, E. E. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Journal Gateway- Pediatrics*, 2006, **118**(2), s. 511-521.

- [114]PINCHUK, I. V., BESWICK, E. J., REYES, V. E. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins*, 2010, **2**(8), s. 2177-2197.
- [115]PITOUT, J. D. D. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 2012, **3**(1), s. 1-16.
- [116]PITTLER, M. H., ERNST, E. Horse chestnut seed extract for chronic venous insufficiency. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012, 11, s. 1.
- [117]POLK, D. B., PEEK, R. M. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 2010, **10**(1), s. 403-414.
- [118]POPP, J., TUCHIN, V. V., MATTHEWS, D. L. *Comparison of UVB and UVC irradiation disinfection efficacies on Pseudomonas Aeruginosa (P. aeruginosa) biofilm*, 2016, 1, s. 988.
- [119]POTU, B. K., RAO, M. S., NAMPURATH, G. K., CHAMALLAMUDI, M. R., PRASAD, K., NAYAK, S. R., DHARMAVARAPU, P. K., KEDAGE, V., BHAT, K. M. R. Evidence-based assessment of antiosteoporotic activity of petroleum-ether extract of *Cissus quadrangularis Linn.* On ovariectomy-induced osteoporosis. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 2009, **114** (3), s. 140–148.
- [120]RAFF, A. B., KROSHINSKY, D. Cellulitis. *JAMA*, 2016, **316**(3) s. 1-3.
- [121]RAJILIČ-STOJANOVIČ, M., SMIDT, H., DE VOS, W. M. Diversity of human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental mikrobiology*, 2007, **9**(9), s. 2125-2136.
- [122]RAJKOWSKA, K., KUNICKA-STYCZYŃSKA, A. Typing and virulence factors of food-borne *Candida spp.* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, **279**, s. 57-63.
- [123]RANJAN, K., NEELIMA, P., GANDHI, S., OJHA, A. K. Clinical and bacteriological aspects of pyoderma. *North American Journal of Medical Sciences*, 2012, **4**(10), s. 222-223.
- [124]SALAMI, T. A. T., ENAHORO OZIEGBE, O., OMEIFE, H. Exfoliative dermatitis: patterns of clinical presentation in a tropical rural and suburban dermatology practice in Nigeria. *International Journal of Dermatology*, 2012, **51**(9), s. 1086-1089.

- [125]SÁNCHEZ, B., DELGADO, S., BLANCO-MÍGUEZ, A., LOURENÇO, A., GUEIMONDE, M., MARGOLLES, A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, **61**(1), s. 1-15.
- [126]SCANNAPIECO, F. A. The oral microbiome: Its role in health and in oral and systemic infections. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2013, **35**(20), s. 163-169.
- [127]SHARMA, P., GUHA ,S., GARG, P., ROY, S. Differential expression of antimicrobial peptides in corneal infection and regulation of antimicrobial peptides and reactive oxygen species by type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens and Disease*, 2018, **76**(1), s. 1.
- [128]SCHÄPE, P, KWON, M. J., BAUMANN, B. Updating genome annotation for the microbial cell factory *Aspergillus niger* using gene co-expression networks. *Nucleic Acids Research*, 2019, **47**(2), s. 559-569.
- [129]SCHOLZ-AHRENS, K. E., ADE, P., MARTEN, B., WEBER, P., TIMM, W., AZIL, Y., GLÜER, C.-C., SCHREZENMEIR, Ju. Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics Affect Mineral Absorption, Bone Mineral Content, and Bone Structure. *The Journal of Nutrition*, 2007, **137**(3), s. 838-846.
- [130]SCHREZENMEIR, J., DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, **73**(2), s. 361-364
- [131]SCHROEDER, B. O., BÄCKHED, F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature Medicine*. 2016, **22**(1), s. 1079–1089.
- [132]SIRTORI, C. R. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacological Research*, 2001, **44**(3), s. 183-193.
- [133]SIUPSINSKIENE, N., JURGUTAVICIUTE, V., KATUTIENE, I., JANCIAUSKAS, D., VAITKUS, S., ADAMONIS, K. *Helicobacter pylori* infection in laryngeal diseases. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2013, **270**(8), s. 2283-2288.
- [134]SJÖLING, Å., SADEGHIPOORJAHROMI, L., NOVAK, D., TOBIAS, J. Detection of major diarrheagenic bacterial pathogens by multiplex PCR panels. *Microbiological Research*, 2015, **172**, s. 34-40.
- [135]*Slovník cizích slov* [online]. Ostrava: ABZ. cz 2005-2019 [cit. 2019-04-05]. Dostupné z: <https://slovník-cizich-slov.abz.cz/>.

- [136]SMITH, J. L. The Role of Gastric Acid in Preventing Foodborne Disease and How Bacteria Overcome Acid Conditions. *Journal of Food Protection*, 2003, **66**(7), s. 1292-1303.
- [137]SMITH, N., MORI, S. A., HENDERSON, A., STEVENSON, D. W., HEALD, S. V. *Flowering plants of the neotropics*. 1. USA: Princeton University Press, 2003, s. 616. ISBN 0691116946.
- [138]SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. *The Lancet*, 2007, **369**(9577), s. 1961-1971.
- [139]SOUZA, M. N., ORTIZ, S. O., MELLO, M. M., OLIVEIRA, F. M., SEVERO, L. C., GOEBEL, C. S. Comparison between four usual methods of identification of *Candida* species. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2015, **57**(4), s. 281-287.
- [140]SPARAVIGNA, A., GUGLIELMINI, G., TOGNI, S., CRISTONI, A., MARAMALDI, G. Evaluation of anti-cellulite efficacy: A topical cosmetic treatment for cellulite blemishes - A multifunctional formulation. *Journal of cosmetic science*, 2011, **62**(1), s. 305-316.
- [141]SPERANDIO, V. Pathogens' adaptation to the human host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, **115**(38), s. 9342-9343.
- [142]STOHS, S. J., RAY, S. D. A Review and Evaluation of the Efficacy and Safety of *Cissus quadrangularis* Extracts. *Phytotherapy Research*, 2012, **27**(8), s. 1107-1114.
- [143]SUN, H.-D., TENG, S.-W., HUANG, B.-S., HSIAO, S.-M., YEN, M.-S., PETER WANG, P.-H. Combination of ultrasound-guided drainage and antibiotics therapy provides a cosmetic advantage for women with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* breast abscess. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2014, **53**(1), s. 115-117.
- [144]SVENNERHOLM, A. From cholera to enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccine development. *Indian Journal of Medical Research*, 2011, **133**(2), s. 188-96.
- [145]SYDNOR, E. R. M., PERL, T. M.. Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, **24**(1), s. 141-173.
- [146]ŠŤÁSTKOVÁ, Z., KARPÍŠKOVÁ, R., BORKOVCOVÁ, I. Možnosti detekce stafylokokových enterotoxinů. *Chemické listy*, 2012, **106**(1), s. 745-749.
- [147]TAKAHASHI, N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series*, 2005, **1284**, s. 103-112.

- [148]TARR, P. I., GORDON, C. A., CHANDLER, W. L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*, 2005, **365**(9464), s. 1073-1086.
- [149]TASADDUQ, R., GORDON, J., AL-GHANIM, K. A., LIAN, J. B., VAN WIJNEN, A. J., STEIN, J. L., STEIN, G. S., SHAKOORI, A. R. Ethanol Extract of *Cissus quadrangularis* Enhances Osteoblast Differentiation and Mineralization of Murine Pre-Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, **232**(3), s. 540-547.
- [150]TENAILLON, O., SKURNIK, D., PICARD, B., DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, **8**(3), s. 207-217.
- [151]THAKKAR, S., AGRAWAI, R. Enterocolidity *Staphylococcus aureus*. *Gastroenterol Hepatol*, 2010, **6**(2), s. 115-117.
- [152]THORPE, C. M. Shiga Toxin--Producing *Escherichia coli* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 2004, **38**(9), s. 1298-1303.
- [153]TOMÁŠKOVÁ, M. *Mikrobiologický nález a hygiena dutiny ústní u pacientů s obličejovým rozštěpem*. Praha, 2012. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta.
- [154]TONDL, L. *Doplňky výživy ve sportu*. Praha, 2016. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze 3. lékařská fakulta.
- [155]TONG, S. Y. C., DAVIS, J. S., EICHENBERGER, E., HOLLAND, T. L., FOWLER V. G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, **28**(3), s. 603-661.
- [156]TSUI, C., KONG, E. F., JABRA-RIZK, M. A., MOBLEY, H. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, 2016, **74**(4), s. 1-4.
- [157]VANDENESCH, F., LINA, G., HENRY, T. *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012, **2**(1), s. 1-15.
- [158]Velký lékařský slovník [online]. Praha: Maxdorf 1998-2019 [cit. 2019-04-05]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/>.

- [159]VOLTNEROVÁ, N. *Suplementy pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu*. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, fakulta chemicko-technologická.
- [160]VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, s. 495. ISBN 80-902896-6-5.
- [161]VOTAVA, M. Normální mikroflóra. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. Brno: NEPTUN, 2005, s. 352. ISBN 80-86850-00-5.
- [162]WANG, X., GAO, X., HARDWIDGE, P. R. Heat-labile enterotoxin-induced activation of NF- κ B and MAPK pathways in intestinal epithelial cells impacts enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence. *Cellular Microbiology*, 2012, **14**(8), s. 1231-1241.
- [163]WILDEBOER, D., AMIRAT, L., PRICE, R. G., ABUKNESHA, A. Rapid detection of *Escherichia coli* in water using a hand-held fluorescence detector. *Water Research*, 2010, **44**(8), s. 2621-2628.
- [164]WILKINSON, J. A., BROWN, A. M. G. Horse Chestnut - *Aesculus Hippocastanum*: Potential Applications in Cosmetic Skin-care Products. *International Journal of Cosmetic Science*, 2001, **21**(6), s. 437-447.
- [165]WU, S., DUAN, N., GU, H., HAO, L., YE, H., GONG, W., WANG, Z. A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, 2016, **8**(7), s. 101-104.
- [166]XU, J., MAHOWALD, M. A., LEY, R. E. Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *Journals PLOS*, 2007, **5**(7), s. 1574-1586.
- [167]ZHU, W., FILLER, S. G. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 2010, **12**(3), s. 273-282

Obrázky:

Obr. 1: Bakterie střevního mikrobiomu

(převzato z: <http://danielakrcova.cz/2017/05/28/strevni-mikrobiom-budoucnost-optimalizovane-vyzivy/>).

Obr. 2: Kochova zřed'ovací metoda

(převzato z: <http://umtk.vscht.cz/miniatlas-vad/metody/plotnove-metody>).

Obr. 3: Jírovec maďal (převzato z: <https://www.garten.cz/a/cz/6233-aesculus-hippocastanum-jirovec-madal/>).

Obr. 4: Vzorec β -aescinu

(převzato z: <https://www.indiamart.com/proddetail/beta-escin-beta-aescin-15730386812.html>)

Obr. 5: Koloběh přenosu *Escherichia coli*

(převzato a upraveno z: <http://www.ecl-lab.com/fr/ecoli/index.asp>).

Obr. 6: Příznaky infekcí způsobené *Staphylococcus aureus* (převzato a upraveno z: <https://image.slidesharecdn.com/bacterialanimationandmanagement150326094732-conversion-gate01/95/bacterial-animation-and-management-34-638.jpg?cb=1427363307>).

Obr. 7: Průběh stafylokové intoxikace

(převzato a upraveno z: <https://slideplayer.com/slide/4939770/>).

Obr. 8: Pigmenty produkující *Pseudomonas aeruginosa* (převzato z: Mavrodi, D. V., R. F. BONSALL, S. M. DELANEY, M. J. SOULE, G. PHILLIPS a L. S. THOMASHOW. Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*. 2011, **183**(21), 6454-6465. Dostupné z: <https://jb.asm.org/content/183/21/6454>).

Tabulky:

Tab. 1: Přehled probiotik, prebiotik, synbiotik

(převzato a upraveno z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/69/5/1052s/4714932>)

Tab. 2: Kritéria hodnocení antimikrobiální ochrany pro bakterie a kvasinku

(převzato z: ČSN EN ISO 11930)

Patenty:

[1] GAURI, K. K. *Utilization of rutins and aescins in the treatment of ocular circulatory disturbances*. IPC: US 2005/0003029 A1. Německo. 2005.

Dostupné z

<https://patentimages.storage.googleapis.com/cb/ca/3e/c0729e5aff2778/US20050003029A1.pdf>

[2] MENSENN, H. G., MANSTEDTENER, G., HONERLAGEN, H. *Process for the production of anaescin rich concentrate of active material from horse-chestnutseeds*. IPC: A 5230/68. USA. 1971.

Dostupné z:

<https://patentimages.storage.googleapis.com/08/3d/53/5252ec87620f1f/US3609137.pdf>

Normy:

[1] ČSN EN ISO 11930. *Kosmetika - Mikrobiologie - Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku*. Praha: ÚNMZ, 2014. 23 s. Třídící znak 68 1561.

[2] ČSN EN ISO 29621. *Kosmetika - Mikrobiologie - Směrnice pro posuzování rizika a identifikaci mikrobiologicky málo rizikových výrobků*. Praha: ÚNMZ, 2017. 24 s. Třídící znak 68 1560.

6 PŘÍLOHY

Příloha 1 – Logaritmické snížení Rx 1% vzorku β -aescinu vůči <i>E. coli</i>	95
Příloha 2 - Logaritmické snížení Rx 1% vzorku β -aescinu vůči <i>St. aureus</i>	95
Příloha 3 - Logaritmické snížení Rx 1% vzorku β -aescinu vůči <i>Ps. aeruginosa</i>	95
Příloha 4 - Logaritmické snížení Rx 1% vzorku β -aescinu vůči <i>C. albicans</i>	96
Příloha 5 - Logaritmické snížení Rx 1% vzorku žumenu vůči <i>E. coli</i> ..	96
Příloha 6 - Logaritmické snížení Rx 1% vzorku žumenu vůči <i>St. aureus</i>	96
Příloha 7 - Logaritmické snížení Rx 1% vzorku žumenu vůči <i>Ps. aeruginosa</i>	97
Příloha 8 - Logaritmické snížení Rx 1% vzorku žumenu vůči <i>C. albicans</i>	97
Příloha 9 - Logaritmické snížení Rx 0,1% vzorku β -aescinu vůči <i>E. coli</i>	97
Příloha 10 - Logaritmické snížení Rx 0,1% vzorku β -aescinu vůči <i>St. aureus</i>	98
Příloha 11 - Logaritmické snížení Rx 0,1% vzorku β -aescinu vůči <i>Ps. aeruginosa</i>	98
Příloha 12 - Logaritmické snížení Rx 0,1% vzorku β -aescinu vůči <i>C. albicans</i>	98
Příloha 13 - Logaritmické snížení Rx 0,1% vzorku žumenu vůči <i>E. coli</i> ..	99
Příloha 14 - Logaritmické snížení Rx 0,1% vzorku žumenu vůči <i>St. aureus</i>	99
Příloha 15 - Logaritmické snížení Rx 0,1% vzorku žumenu vůči <i>Ps. aeruginosa</i>	99
Příloha 16 - Logaritmické snížení Rx 0,1% vzorku žumenu vůči <i>C. albicans</i>	100
Příloha 17 - Logaritmické snížení Rx 0,01% vzorku β -aescinu vůči <i>E. coli</i>	100
Příloha 18 - Logaritmické snížení Rx 0,01% vzorku β -aescinu vůči <i>St. aureus</i>	100
Příloha 19 - Logaritmické snížení Rx 0,01% vzorku β -aescinu vůči <i>Ps. aeruginosa</i>	101
Příloha 20 - Logaritmické snížení Rx 0,01% vzorku β -aescinu vůči <i>C. albicans</i>	101
Příloha 21 - Logaritmické snížení Rx 0,01% vzorku žumenu vůči <i>E. coli</i>	101
Příloha 22 - Logaritmické snížení Rx 0,01% vzorku žumenu vůči <i>St. aureus</i>	102
Příloha 23 - Logaritmické snížení Rx 0,01% vzorku žumenu vůči <i>Ps. aeruginosa</i>	102
Příloha 24 - Logaritmické snížení Rx 0,01% vzorku žumenu vůči <i>C. albicans</i>	102
Příloha 25 - Vyočkování zásobního roztoku 1% β -aescinu s <i>E. coli</i>	103
Příloha 26 - Vyočkování zásobního roztoku 1% β -aescinu se <i>St. aureus</i>	103
Příloha 27 - Vyočkování zásobního roztoku 1% β -aescinu s <i>Ps. aeruginosa</i>	103
Příloha 28 - Vyočkování zásobního roztoku 1% β -aescinu s <i>C. albicans</i>	103
Příloha 29 - Vyočkování zásobního roztoku 1% žumenu s <i>E. coli</i>	104
Příloha 30 - Vyočkování zásobního roztoku 1% žumenu se <i>St. aureus</i>	104
Příloha 31 - Vyočkování zásobního roztoku 1% žumenu s <i>Ps. aeruginosa</i>	104

Příloha 32 - Vyočkování zásobního roztoku 1% žumenu s <i>C. albicans</i>	104
Příloha33 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% β -aescinu s <i>E. coli</i>	105
Příloha 34 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% β -aescinu se <i>St. aureus</i>	105
Příloha 35 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% β -aescinu s <i>Ps. aeruginosa</i>	105
Příloha 36 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% β -aescinu s <i>C. albicans</i>	105
Příloha 37 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% žumenu s <i>E. coli</i>	106
Příloha 38 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% žumenu se <i>St. aureus</i>	106
Příloha 39 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% žumenu s <i>Ps. aeruginosa</i>	106
Příloha 40 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% žumenu s <i>C. albicans</i>	106
Příloha 41 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% β -aescinu s <i>E. coli</i>	107
Příloha 42 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% β -aescinu se <i>St. aureus</i>	107
Příloha 43 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% β -aescinu s <i>Ps. aeruginosa</i>	107
Příloha 44 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% β -aescinu s <i>C. albicans</i>	107
Příloha 45 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% žumenu s <i>E. coli</i>	108
Příloha 46 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% žumenu se <i>St. aureus</i>	108
Příloha 47 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% žumenu s <i>Ps. aeruginosa</i>	108
Příloha 48 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% žumenu s <i>C. albicans</i>	108
Příloha 49 – Kontaminace vzorků	109
Příloha 50 – Vyizolovaná plíseň rodu <i>Cladosporium</i>	109
Příloha 51 – Vyizolovaná plíseň rodu <i>Fusarium</i>	109
Příloha 52 – Vyizolované plísňe z obou vzorků	110

Příloha 1 – Logaritmičké snížení Rx 1% vzorku β -aescinu vůči *E. coli*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Escherichia coli</i>	Logaritmičké snížení (Rx)			
<u>1% β-aescin</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	17.09.2018	18.09.2018	25.09.2018	02.10.2018	09.10.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		2,53	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		NI	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		NI	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		NI	-	-	-

* NI - Žádné zvýšení počtu logaritmičkého snížení od předešlého intervalu, - nebylo možno spočítat logaritmičké snížení

Příloha 2 - Logaritmičké snížení Rx 1% vzorku β -aescinu vůči *St. aureus*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Staphylococcus aureus</i>	Logaritmičké snížení (Rx)			
<u>1% β-aescin</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	17.09.2018	18.09.2018	25.09.2018	02.10.2018	09.10.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		2,24	2,03	-	-
Ředění 10 ⁻³		1,88	NI	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		NI	NI	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		NI	NI	-	-

Příloha 3 - Logaritmičké snížení Rx 1% vzorku β -aescinu vůči *Ps. aeruginosa*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Logaritmičké snížení (Rx)			
<u>1% β-aescin</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	17.09.2018	18.09.2018	25.09.2018	02.10.2018	09.10.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	3,01	-	3,97
Ředění 10 ⁻²		2,58	2,79	-	NI
Ředění 10 ⁻³		NI	NI	-	NI
Ředění 10 ⁻⁴		NI	NI	-	NI
Ředění 10 ⁻⁵		NI	NI	-	NI

Příloha 4 - Logaritmičké snížení Rx 1% vzorku β -aescinu vůči *C. albicans*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<u><i>Candida albicans</i></u>	Logaritmičké snížení (Rx)			
<u>1% β-aescin</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	17.09.2018	19.09.2018	26.09.2018	03.10.2018	10.10.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	6 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		-	-	-	-

Příloha 5 - Logaritmičké snížení Rx 1% vzorku žumenu vůči *E. coli*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<u><i>Escherichia coli</i></u>	Logaritmičké snížení (Rx)			
<u>1% žumen</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	17.09.2018	18.09.2018	25.09.2018	02.10.2018	09.10.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		1,84	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		NI	-	0,68	0,26
Ředění 10 ⁻⁵		NI	-0,75	NI	-0,14

Příloha 6 - Logaritmičké snížení Rx 1% vzorku žumenu vůči *St. aureus*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	Logaritmičké snížení (Rx)			
<u>1% žumen</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	17.09.2018	18.09.2018	25.09.2018	02.10.2018	09.10.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		1,35	1,39	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		1	NI	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		NI	NI	-	-

Příloha 7 - Logaritmicke snížení Rx 1% vzorku žumenu vůči *Ps. aeruginosa*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Logaritmicke snížení (Rx)			
<u>1% žumen</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	17.09.2018	18.09.2018	25.09.2018	02.10.2018	09.10.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		1,14	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		NI	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		NI	-0,61	-0,62	-0,72

Příloha 8 - Logaritmicke snížení Rx 1% vzorku žumenu vůči *C. albicans*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Candida albicans</i>	Logaritmicke snížení (Rx)			
<u>1% žumen</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	17.09.2018	19.09.2018	26.09.2018	03.10.2018	10.10.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	6 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	2,69	2,48	-
Ředění 10 ⁻³		-	2,1	1,99	1,54
Ředění 10 ⁻⁴		-	NI	NI	1,24
Ředění 10 ⁻⁵		-	NI	NI	NI

Příloha 9 - Logaritmicke snížení Rx 0,1% vzorku β-aescinu vůči *E. coli*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Escherichia coli</i>	Logaritmicke snížení (Rx)			
<u>0,1% β-aescin</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	15.10.2018	16.10.2018	23.10.2018	30.10.2018	06.11.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		1,45	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		NI	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		NI	-	-	-

Příloha 10 - Logaritmicke snížení Rx 0,1% vzorku β -aescinu vůči *St. aureus*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	Logaritmicke snížení (Rx)			
<u>0,1% β-aescin</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	15.10.2018	16.10.2018	23.10.2018	30.10.2018	06.11.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		3,46	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		NI	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		NI	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		NI	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		NI	-	-	-

Příloha 11 - Logaritmicke snížení Rx 0,1% vzorku β -aescinu vůči *Ps. aeruginosa*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u>	Logaritmicke snížení (Rx)			
<u>0,1% β-aescin</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	15.10.2018	16.10.2018	23.10.2018	30.10.2018	06.11.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		-	-	-	-

Příloha 12 - Logaritmicke snížení Rx 0,1% vzorku β -aescinu vůči *C. albicans*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<u><i>Candida albicans</i></u>	Logaritmicke snížení (Rx)			
<u>0,1% β-aescin</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	15.10.2018	17.10.2018	24.10.2018	31.10.2018	07.11.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	6 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		3,37	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		3,08	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		NI	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		NI	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		NI	-	-	-

Příloha 13 - Logaritmičké snížení Rx 0,1% vzorku žumenu vůči E.coli.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Escherichia coli</i>	Logaritmičké snížení (Rx)			
0,1% žumen	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	15.10.2018	16.10.2018	23.10.2018	30.10.2018	06.11.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		1,52	-	-	1,16
Ředění 10 ⁻⁴		NI	0,35	0,52	0,81
Ředění 10 ⁻⁵		NI	NI	NI	NI

Příloha 14 - Logaritmičké snížení Rx 0,1% vzorku žumenu vůči St. aureus.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Staphylococcus aureus</i>	Logaritmičké snížení (Rx)			
0,1% žumen	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	15.10.2018	16.10.2018	23.10.2018	30.10.2018	06.11.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	2,22
Ředění 10 ⁻³		1,39	-	1,21	NI
Ředění 10 ⁻⁴		NI	0,74	NI	NI
Ředění 10 ⁻⁵		NI	NI	NI	NI

Příloha 15 - Logaritmičké snížení Rx 0,1% vzorku žumenu vůči Ps. aeruginosa.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Logaritmičké snížení (Rx)			
0,1% žumen	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	15.10.2018	16.10.2018	23.10.2018	30.10.2018	06.11.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		1,53	-	1,38	1,21
Ředění 10 ⁻⁴		NI	-	NI	0,77
Ředění 10 ⁻⁵		NI	-	NI	NI

Příloha 16 - Logaritmicke snížení Rx 0,1% vzorku žumenu vůči *C. albicans*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Candida albicans</i>	Logaritmicke snížení (Rx)			
		0. den	1. den	7. den	14. den
0,1% žumen					
Datum analýzy	15.10.2018	17.10.2018	24.10.2018	31.10.2018	07.11.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	6 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	
Ředění 10 ⁻²		3,07	-	-	
Ředění 10 ⁻³		NI	1,55	1,54	1,67
Ředění 10 ⁻⁴		NI	NI	NI	NI
Ředění 10 ⁻⁵		NI	NI	NI	NI

Příloha 17 - Logaritmicke snížení Rx 0,01% vzorku β-aescinu vůči *E. coli*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Escherichia coli</i>	Logaritmicke snížení (Rx)			
		0. den	1. den	7. den	14. den
0,01% β-aescin					
Datum analýzy	12.11.2018	13.11.2018	20.11.2018	27.11.2018	04.12.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		1,39	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		NI	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		NI	-	-	-

Příloha 18 - Logaritmicke snížení Rx 0,01% vzorku β-aescinu vůči *St. aureus*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Staphylococcus aureus</i>	Logaritmicke snížení (Rx)			
		0. den	1. den	7. den	14. den
0,01% β-aescin					
Datum analýzy	12.11.2018	13.11.2018	20.11.2018	27.11.2018	04.12.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		1,32	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		NI	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		NI	-	-	-

Příloha 19 - Logaritmicke snížení Rx 0,01% vzorku β -aescinu vůči *Ps. aeruginosa*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 1193.

Mikroorganismus	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Logaritmicke snížení (Rx)			
0,01% β -aescin	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	12.11.2018	13.11.2018	20.11.2018	27.11.2018	04.12.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	2,61	-	-
Ředění 10 ⁻³		1,47	NI	1,33	1,27
Ředění 10 ⁻⁴		NI	NI	NI	NI
Ředění 10 ⁻⁵		NI	NI	NI	NI

Příloha 20 - Logaritmicke snížení Rx 0,01% vzorku β -aescinu vůči *C. albicans*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Candida albicans</i>	Logaritmicke snížení (Rx)			
0,01% β -aescin	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	12.11.2018	14.11.2018	21.11.2018	28.11.2018	05.12.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	6 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		3,46	3,77	-	-
Ředění 10 ⁻²		3,16	NI	-	-
Ředění 10 ⁻³		NI	NI	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		NI	NI	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		NI	NI	-	-

Příloha 21 - Logaritmicke snížení Rx 0,01% vzorku žumenu vůči *E. coli*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930.

Mikroorganismus	<i>Escherichia coli</i>	Logaritmicke snížení (Rx)			
0,01% žumen	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	12.11.2018	13.11.2018	20.11.2018	27.11.2018	04.12.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		1,27	1,43	1,72	-
Ředění 10 ⁻⁴		NI	NI	NI	-
Ředění 10 ⁻⁵		NI	NI	NI	-

Příloha 22 - Logaritmicke snížení Rx 0,01% vzorku žumenu vůči *St. aureus*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930

Mikroorganismus	<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	Logaritmicke snížení (Rx)			
<u>0,01% žumen</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	12.11.2018	13.11.2018	20.11.2018	27.11.2018	04.12.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻³		1,19	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁴		NI	-	-	-
Ředění 10 ⁻⁵		NI	-	-	-

Příloha 23 - Logaritmicke snížení Rx 0,01% vzorku žumenu vůči *Ps. aeruginosa*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930

Mikroorganismus	<u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u>	Logaritmicke snížení (Rx)			
<u>0,01% žumen</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	12.11.2018	13.11.2018	20.11.2018	27.11.2018	04.12.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	3 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		-	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		-	-	2,26	2,26
Ředění 10 ⁻³		1,16	1,49	1,74	NI
Ředění 10 ⁻⁴		NI	NI	NI	NI
Ředění 10 ⁻⁵		NI	NI	NI	NI

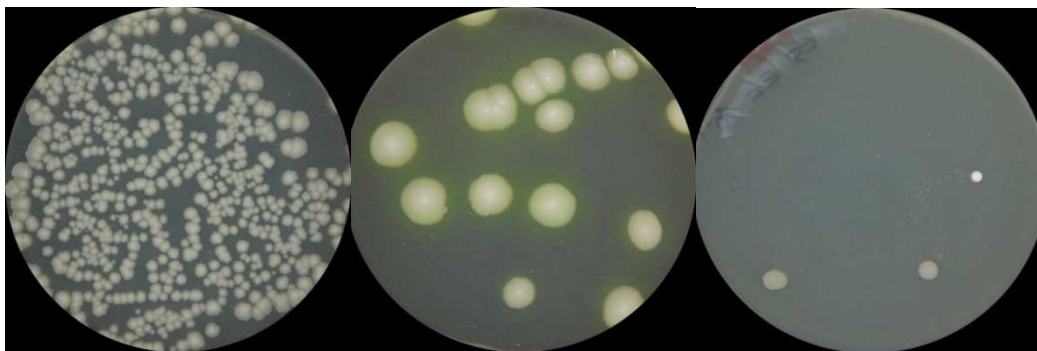
Příloha 24 - Logaritmicke snížení Rx 0,01% vzorku žumenu vůči *C. albicans*.

Porovnání s normou ČSN EN ISO 11930

Mikroorganismus	<u><i>Candida albicans</i></u>	Logaritmicke snížení (Rx)			
<u>0,01% žumen</u>	0. den	1. den	7. den	14. den	28. den
Datum analýzy	12.11.2018	14.11.2018	21.11.2018	28.11.2018	05.12.2018
Kritérium A	-				
Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	6 x 10 ⁶				
Ředění 10 ⁻¹		3,49	-	-	-
Ředění 10 ⁻²		3,17	2,35	2,47	2,48
Ředění 10 ⁻³		-	2,17	2,17	2,26
Ředění 10 ⁻⁴		NI	NI	NI	NI
Ředění 10 ⁻⁵		NI	NI	NI	NI

Příloha 25 – Vyočkování zásobního roztoku 1% β -aescinu s *E. coli* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



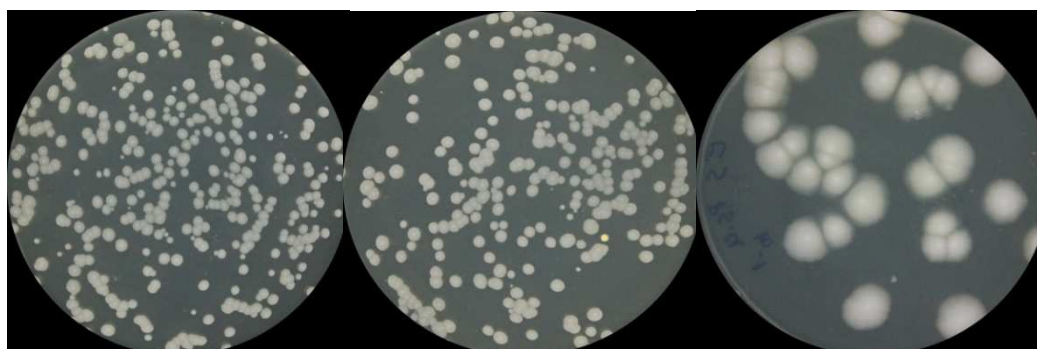
Příloha 26 - Vyočkování zásobního roztoku 1% β -aescinu se *St. aureus* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



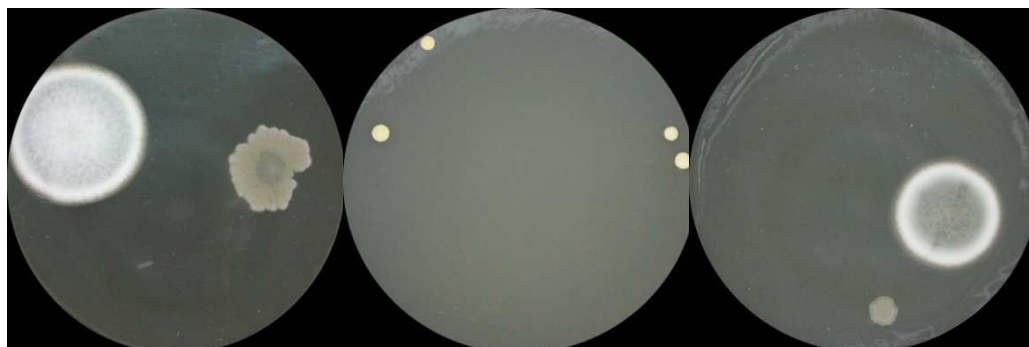
Příloha 27 - Vyočkování zásobního roztoku 1% β -aescinu s *Ps. aeruginosa* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



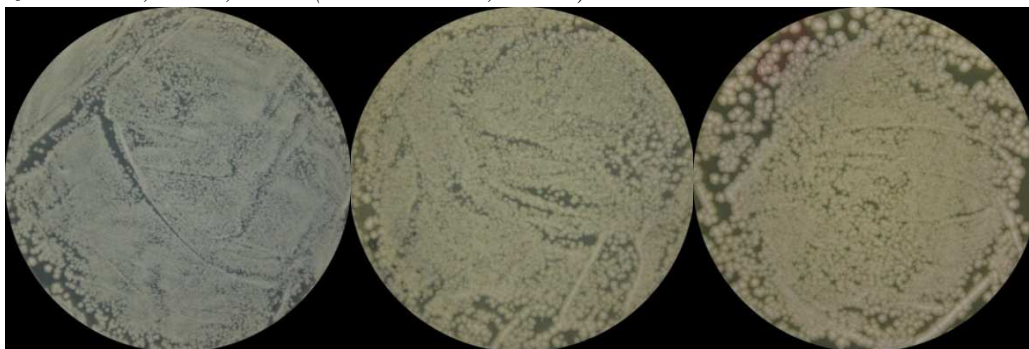
Příloha 28 - Vyočkování zásobního roztoku 1% β -aescinu s *C. albicans* na SDA (30°C, 48 h.)

zleva – 7. den (kontaminace), 14. den, 28. den (kontaminace) (Foto: J. Vacková, Bacmed)



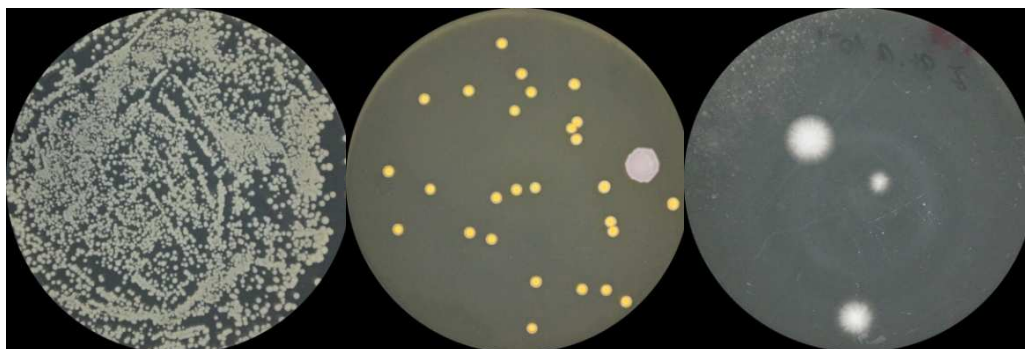
Příloha 29 - Vyočkování zásobního roztoku 1% žumenu s *E. coli* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



Příloha 30 - Vyočkování zásobního roztoku 1% žumenu se *St. aureus* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (kontaminace) (Foto: J. Vacková, Bacmed)



Příloha 31 - Vyočkování zásobního roztoku 1% žumenu s *Ps. aeruginosa* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



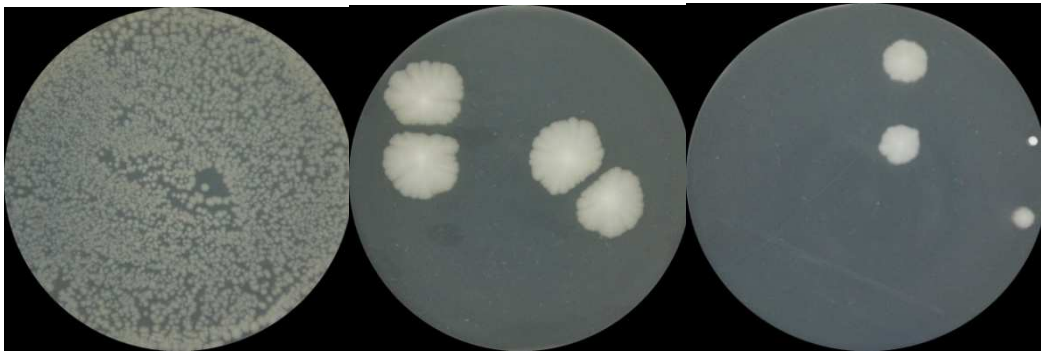
Příloha 32 - Vyočkování zásobního roztoku 1% žumenu s *C. albicans* na SDA (30°C, 48 h.)

zleva – 7. den (kontaminace), 14. den (kontaminace), 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



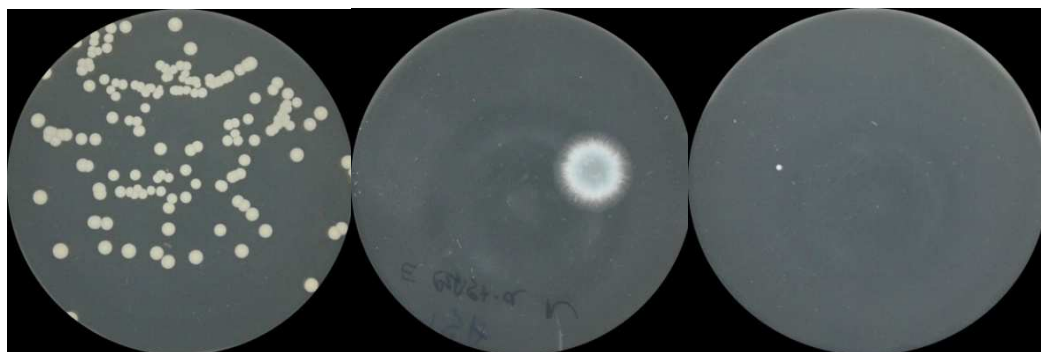
Příloha 33 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% β -aescinu s *E. coli* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



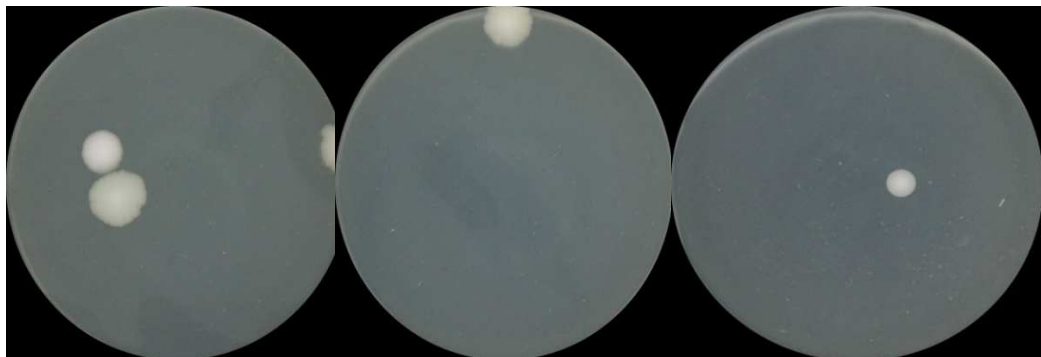
Příloha 34 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% β -aescinu se *St. aureus* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den (kontaminace), 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



Příloha 35 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% β -aescinu s *Ps. aeruginosa* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



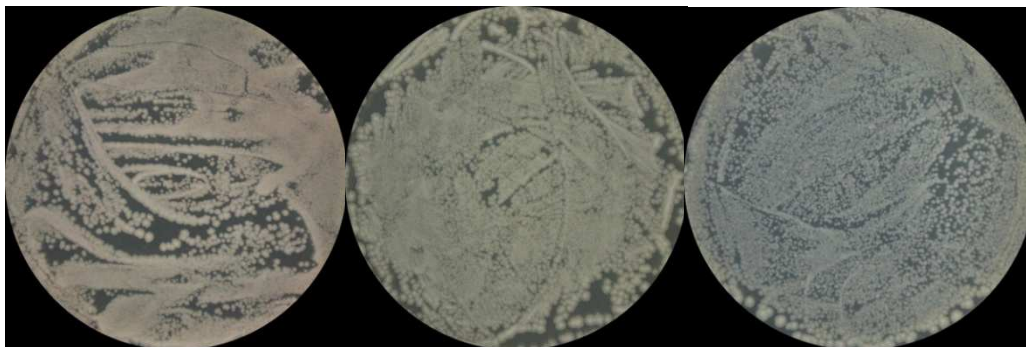
Příloha 36 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% β -aescinu s *C. albicans* na SDA (30°C, 48 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



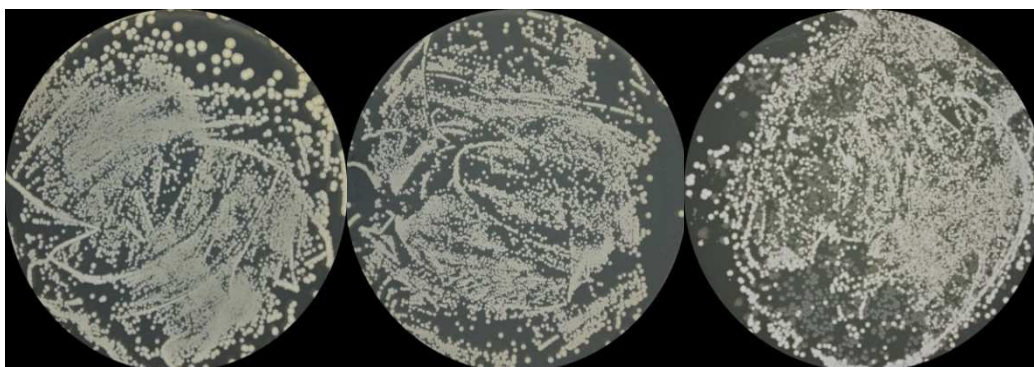
Příloha 37 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% žumenu s *E. coli* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



Příloha 38 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% žumenu se *St. aureus* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (kontaminace) (Foto: J. Vacková, Bacmed)



Příloha 39 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% žumenu s *Ps. aeruginosa* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den (kontaminace), 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



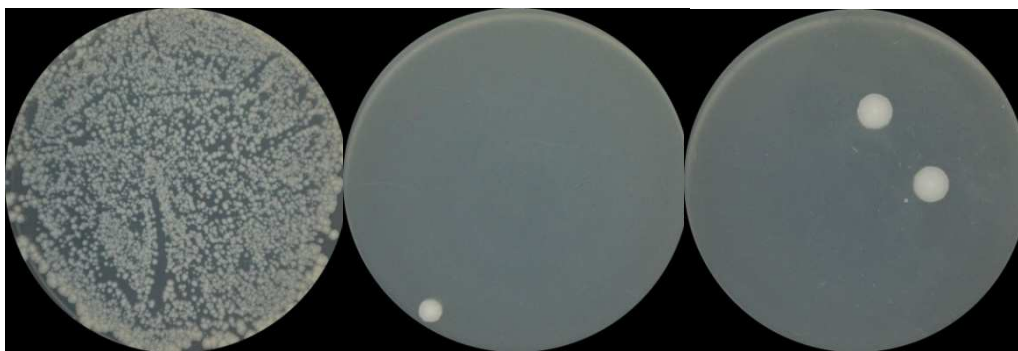
Příloha 40 - Vyočkování zásobního roztoku 0,1% žumenu s *C. albicans* na SDA (30°C, 48 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (kontaminace) (Foto: J. Vacková, Bacmed)



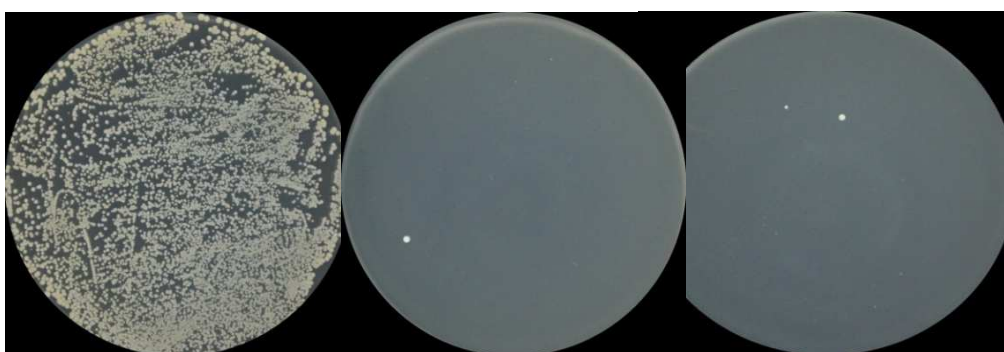
Příloha 41 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% β -aescinu s *E. coli* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



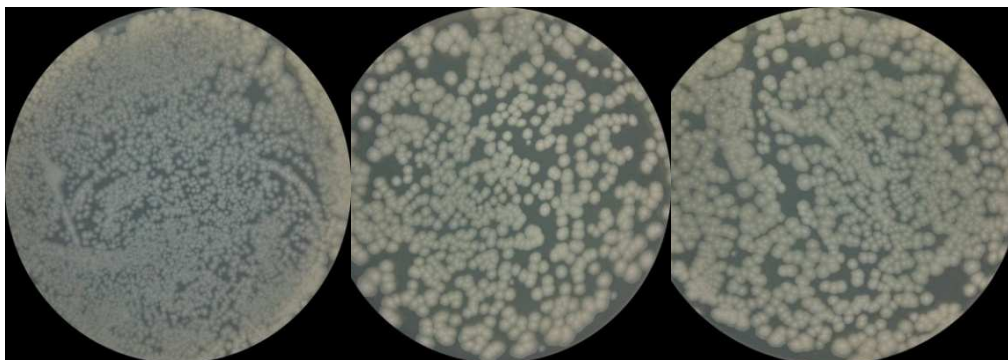
Příloha 42 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% β -aescinu se *St. aureus* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



Příloha 43 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% β -aescinu s *Ps. aeruginosa* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



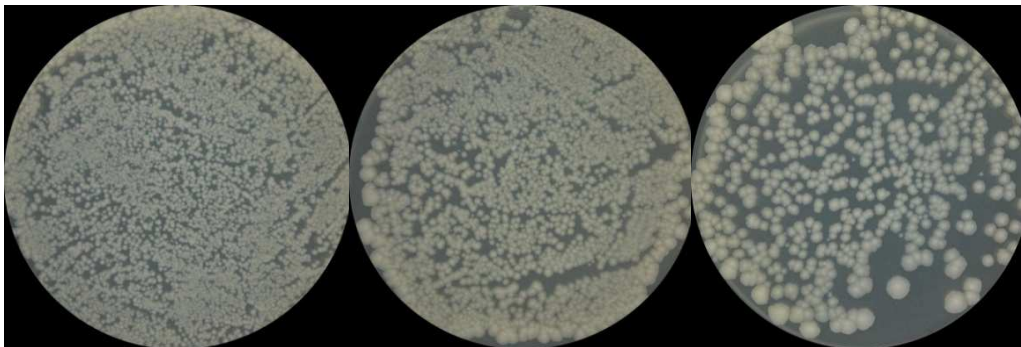
Příloha 44 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% β -aescinu s *C. albicans* na SDA (30°C, 48 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



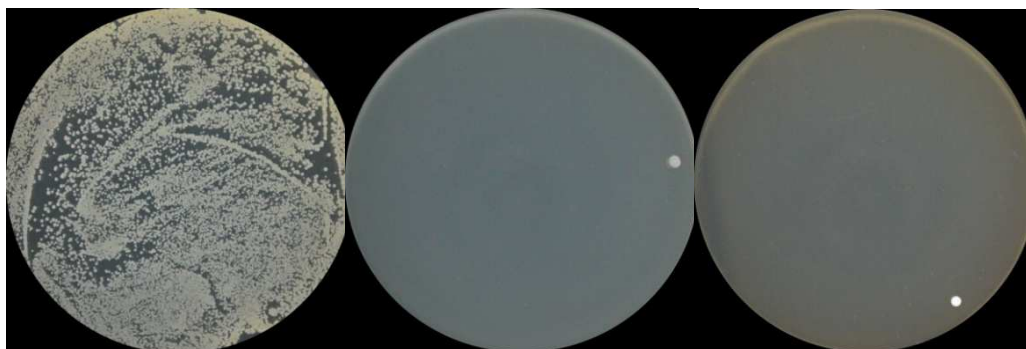
Příloha 45 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% žumenu s *E. coli* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



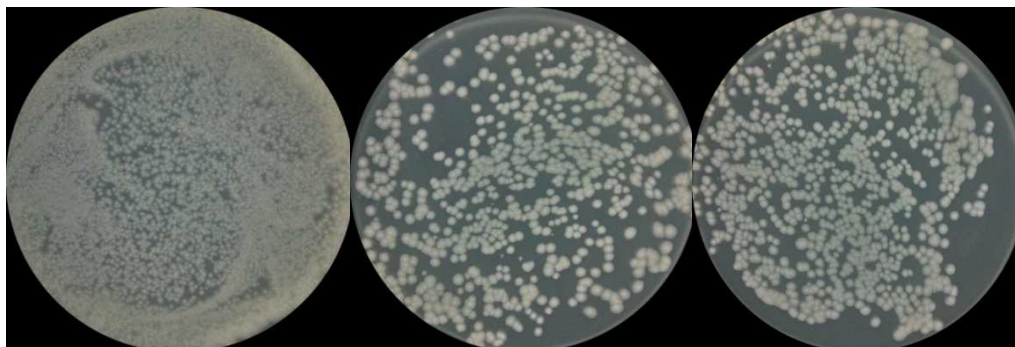
Příloha 46 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% žumenu se *St. aureus* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



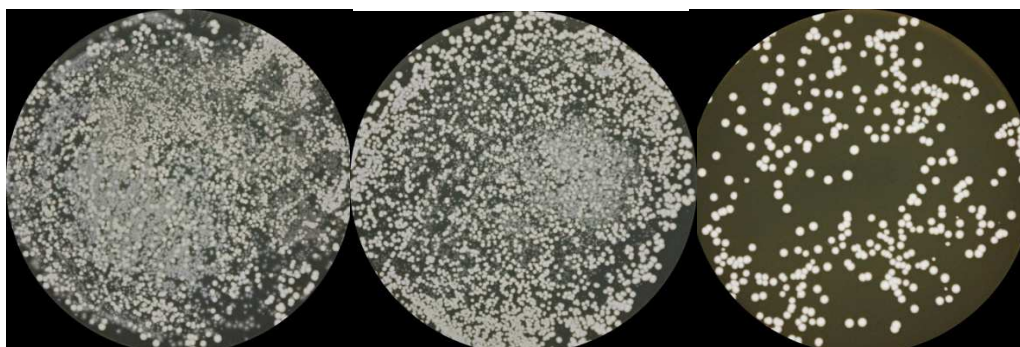
Příloha 47 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% žumenu s *Ps. aeruginosa* na TSA (37°C, 24 h.)

zleva – 7. den, 14. den, 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



Příloha 48 - Vyočkování zásobního roztoku 0,01% žumenu s *C. albicans* na SDA (30°C, 48 h.)

zleva – 7. den (kontaminace), 14. den (kontaminace), 28. den (Foto: J. Vacková, Bacmed)



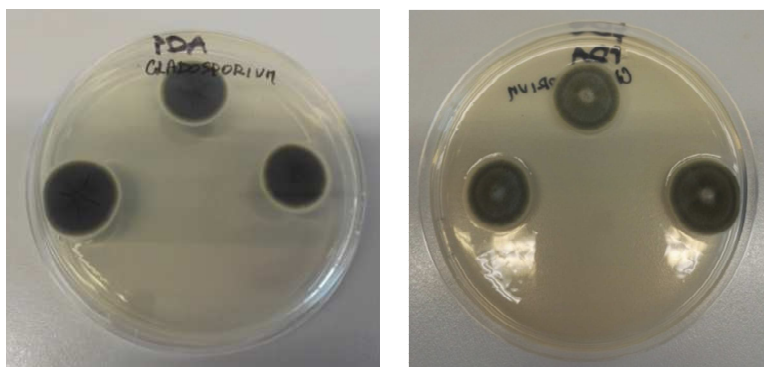
Příloha 49 – Kontaminace vzorků plísněmi na TSA (25°C, 5 dní)

zleva - rod *Fusarium*, rod *Cladosporium*, rod *Aspergillus* (Foto: J. Vacková)



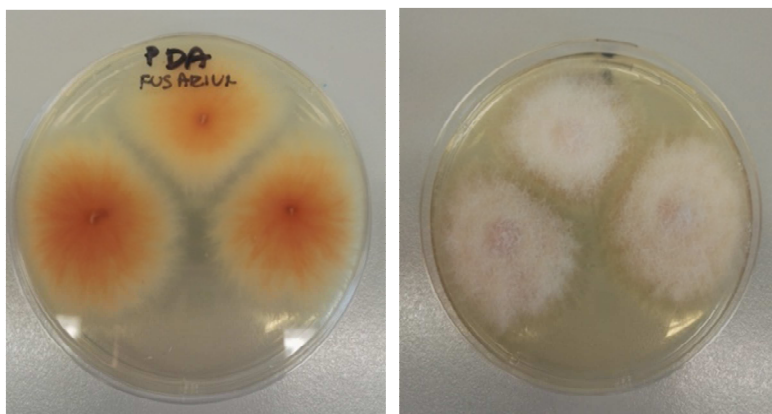
Příloha 50 – Vyizolovaná plíseň rodu *Cladosporium* na PDA ze vzorku žumenu (25°C, 5 dní)

(Foto: J. Vacková)



Příloha 51 – Vyizolovaná plíseň rodu *Fusarium* na PDA ze vzorku žumenu (25°C, 5 dní)

(Foto: J. Vacková)



Příloha 52 – Vyzolované plísně z obou vzorků kultivované na PDA (25 °C, 5 dní)

zleva – plísně rodu *Aspergillus*, rodu *Cladosporium*, rodu *Fusarium* (Foto: J. Vacková)

