

Antimikrobiální ochrana kosmetických výrobků

Lenka Hasoňová

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lenka HASOŇOVÁ**
Osobní číslo: **T10151**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Antimikrobiální ochrana kosmetických výrobků**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části vypracujte literární rešerši na zadané téma.
2. V úvodní části se věnujte problematice mikrobiální kontaminace kosmetických přípravků a rizikům, která s sebou tato kontaminace může nést.
3. V další části se věnujte látkám, které se využívají v kosmetických přípravcích pro potlačení růstu mikroorganismů.
4. Dále se zaměřte na metody hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetických produktů.

II. Praktická část

1. V praktické části připravte modelové vzorky kosmetických přípravků s použitím komerčních konzervačních látek.
2. U všech vzorků proveďte zkoušku účinnosti konzervace s gramnegativními bakteriemi.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. BAREL, A. O., PAYE, M., MAIBACH, H. I. Handbook of Cosmetic Science and Technology. New York: Informa Healthcare, 2009. 869 p. ISBN 978-1-4200-6963-1.
2. SALVADOR, A., CHISVERT, A. Analysis of Cosmetic Products. Oxford: Elsevier, 2007. 487 p. ISBN 978-0-444-52260-3.
3. GOLDMAN, E., GREEN, L. H. Practical Handbook of Microbiology. Boca Raton: CRC Press, 2009. 852 p. ISBN 978-0-8493-9365-5.
4. GEIS, P. A. Cosmetic Microbiology: A Practical Approach. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 295 p. ISBN 978-0-8493-1453-7.
5. ORTH, D. S., DENYER, S. P., KABARA, J. J. Cosmetic and Drug Microbiology. New York: Informa Health Care, 2006. 375 p. ISBN 978-0-8493-7266-7.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

18. února 2013

Termín odevzdání bakalářské práce:

24. května 2013

Ve Zlíně dne 18. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Ráhula Janiš, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ...*Hasoňová* *Lehka*.....

Obor: ...*CHTP*.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně *24.5.2013*

.....*Hasoňová*.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.*

(3) *Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.*

²⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

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

³⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*

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

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

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

ABSTRAKT

Předkládaná bakalářská se zabývá antimikrobiální ochranou kosmetických přípravků. Zvolenými přípravky pro toto testování jsou připravené pleťové vody obsahující různé typy konzervantů o různých koncentracích. Účinnost těchto konzervantů byla testována na gramnegativních bakteriích *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, které byly zaočkovány do připravených pleťových vod. Testování účinnosti bylo prováděno po dobu 28 dní ode dne zaočkování příslušných bakterií do pleťových vod. Výsledky účinnosti konzervačních látek byly hodnoceny v den 0, 7, 14 a 28. Výsledky byly vyhodnoceny prostřednictvím grafů a bylo zjištěno, že žádný z konzervantů není dostatečně účinný pro snížení mikrobiální kontaminace na požadovanou hodnotu a proto není možné ho použít pro zakonzervování těchto kosmetických přípravků.

Klíčová slova: kosmetický přípravek, pleťové vody, gramnegativní bakterie, účinnost konzervantů, antimikrobiální ochrana kosmetického výrobku

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the antimicrobial protection of cosmetic products. Products selected and prepared for bacterial challenge test were lotions containing various types of preservatives at different concentrations. Effectiveness of these preservatives was tested either on the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* or on *Pseudomonas aeruginosa*. Both microorganisms were inoculated to these prepared lotions. This efficiency testing was carried out according to the legislation for 28 days from the date of the inoculation of bacteria into the lotions. The efficacy results were evaluated on day 0, 7, 14 and 28. Results were evaluated by means of graphs, and it was found that none of the preservative is not effective enough to reduce microbial contamination to the desired value and therefore cannot be used for the preservation of prepared cosmetic products.

Keywords: cosmetic, lotions, Gram-negative microorganisms, efficacy of preservatives, antimicrobial protection results

Poděkování

Chtěla bych poděkovat zejména vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Ivě Hauerlandové, Ph.D. za pomoc a užitečné rady při psaní této práce. Kdykoliv jsem si s něčím nevěděla rady, byla ochotná mi pomoci a za to ji děkuji. Dále bych chtěla poděkovat celé své rodině, která mi při psaní této práce vždy vyšla vstříc a podporovala mě.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné. Dále prohlašuji, že veškerá použitá literatura, která byla použita při psaní této Bakalářské práce, byla řádně ocitována.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY	12
1.1 LEGISLATIVA KOSMETICKÉHO PŘÍPRAVKU.....	14
2 MIKROORGANIZMY KONTAMINUJÍCÍ KOSMETIKU	15
2.1 BAKTERIE	15
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	15
2.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.2 KVASINKY	17
2.3 PLÍSNĚ	18
2.4 KONTAMINACE KOSMETICKÉHO PROSTŘEDKU	19
2.4.1 Primární kontaminace.....	20
2.4.2 Sekundární kontaminace	21
3 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	22
3.1 POŽADAVKY NA ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY.....	22
3.2 DEZINFEKČNÍ LÁTKY A BAKTERICIDY	22
3.3 KONZERVAČNÍ LÁTKY V KOSMETICE.....	24
4 KONZERVAČNÍ LÁTKY V KOSMETICE	25
4.1 ORGANICKÉ KYSELINY	25
4.1.1 Kyselina benzoová	25
4.1.2 Kyselina salicylová	26
4.1.3 Kyselina sorbová.....	26
4.2 ALKOHOLY.....	26
4.2.1 Benzylalkohol	26
4.2.2 Dichlorbenzyl alkohol	26
4.3 HALOGENY	27
4.3.1 Benzalkonium chlorid.....	27
4.3.2 Bromo- 2-nitro-2-propandiol 1,3.....	27
4.4 OSTATNÍ	27
4.4.1 Dimetylol dimetyl hidantoin.....	27
4.4.2 Imidazolidinyl urea.....	27
4.4.3 Orto fenyl-fenol	27
4.4.4 Parabeny	28
4.4.5 Fenoxyetanol	28
4.4.6 Trichloro-2,4,4-hydroxy-2-difenyleter	28
5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ÚČINNOST KONZERVAČNÍCH LÁTEK	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
6 POUŽITÝ MATERIÁL	31

6.1	KMENY BAKTERIÍ	31
6.2	TESTOVANÉ KONZERVAČNÍ LÁTKY	31
6.3	TESTOVANÉ KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY	32
6.4	PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ	33
6.5	MÉDIA PRO KULTIVACI	34
6.5.1	TSA agar (Soyabean Casein Digest Agar)	34
6.6	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	34
6.6.1	Ředící roztok	34
6.6.2	Neutralizační roztok.....	34
7	POUŽITÉ METODY	36
7.1	STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ OCHRANY PLEŤOVÝCH VOD	36
7.1.1	Příprava vzorků	36
7.1.2	Příprava kultur na zaočkování	36
7.1.3	Příprava inokula pro zaočkování pleťových vod	37
7.1.4	Stanovení počtu buněk ve vzorcích pleťových vod	37
7.1.5	Výpočet počtu kolonie tvořících jednotek v 1 ml vzorku (CFU/ml)	38
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
8.1	ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOST TESTOVANÝCH PLEŤOVÝCH VOD	39
8.1.1	Vliv konzervačních látek na gramnegativní bakterii <i>Escherichia coli</i>	39
8.1.2	Vliv konzervačních látek na gramnegativní bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
8.2	ZÁVĚREČNÁ DISKUZE VŠECH VÝSLEDKŮ	44
9	ZÁVĚR	47
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	52
	SEZNAM OBRÁZKŮ	53
	SEZNAM TABULEK	54
	SEZNAM PŘÍLOH	55

ÚVOD

Mikrobiální kontaminace kosmetických prostředků je velmi aktuálním a celosvětovým tématem. U kosmetických přípravků obecně existují dva typy kontaminace. Primární kontaminace může být způsobena již při zpracování surovin a výrobě kosmetického přípravku, ta druhá, sekundární kontaminace naopak může nastat až při spotřebitelském užívání. Aby se zabránilo nežádoucí aktivitě mikroorganismů v přípravcích, je nutno použít antimikrobiální ochranu ve formě konzervačních látek, baktericidů a jiných příbuzných látek.

Po celém světě se neustále testují nové konzervanty s cílem nalézt co nejúčinnější a nejbezpečnější formu ochrany spotřebitele. Jsou to sice látky, které mají antimikrobiální účinky, ale na druhou stranu jsou to také látky, které při určité koncentraci a nepovoleném použití mohou způsobit závažné zdravotní komplikace a podráždění kůže.

Existuje široká škála mikroorganismů, které mohou kontaminovat kosmetické přípravky, a konzervační látka by měla tedy mít značné spektrum účinku. Mnohé vlastnosti kosmetického přípravku, jako je jeho pH nebo složení, mají také značný vliv na účinnost konzervační látky. Z těchto důvodů je v kosmetickém přípravku často používána kombinace dvou či více konzervačních látek, tak aby byla zajištěna dostatečná bezpečnost výrobku. Proto se konzervační látky často kombinují tak, aby bylo dosaženo optimálního a požadovaného účinku a aby mohl být daný kosmetický přípravek schválen jako mikrobiálně a hygienicky nezávadný. Pouze takové výrobky mohou být uvedeny na trh a v konečném výsledku používány spotřebiteli bez zdravotních rizik. Antimikrobiální ochrana výrobku by měla být zachována alespoň po dobu minimální trvanlivosti přípravku, která je vyznačena na obalu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY

Základní definice kosmetického prostředku, která je dána legislativou, je následující: Kosmetickým přípravkem je jakákoliv látka nebo prostředek určený pro styk se zevní částí lidského těla (pokožka, vlasový systém, nehty, rty, zevní pohlavní orgány) s cílem výlučně nebo převážně jen čistit, parfemovat, měnit jejich vzhled, chránit je, udržovat v dobrém stavu nebo korigovat lidské pachy [1].

Kosmetické prostředky můžeme klasifikovat do následujících skupin:

- a) Dekorativní kosmetika zahrnující make-up, kosmetické prostředky pro ošetření rtů jako rtěnky nebo lesky, nehtová kosmetika, oční kosmetika nebo sety dekorativní kosmetiky.
- b) Vlasová kosmetika zahrnující různé druhy šamponů, vlasové kondicionéry, vlasové lotiony a tonika, pěny, krémy, gely, prostředky pro trvalou nebo sety s vlasovou kosmetikou.
- c) Vlasová barviva kam patří barvicí šampony nebo odbarvovací prostředky.
- d) Parfémy a vonné látky kam můžeme zařadit parfémované extrakty, parfémy, toaletní a kolínské vody, dětské toaletní vody.
- e) Prostředky péče o kůži kam můžeme zařadit pleťové prostředky jako denní nebo noční krémy, pleťové odličovače, prostředky péče o ruce, prostředky péče o tělo a dětskou kosmetiku.
- f) Toaletní potřeby jako mýdla, prostředky orální hygieny, holicí prostředky, pudry, prostředky intimní hygieny, koupelové prostředky, deodoranty, antiperspiranty nebo depilační prostředky.
- g) Opalovací prostředky kam můžeme zařadit opalovací krémy nebo mléka.

Řada výrobků nese označení léčebná kosmetika, v tom případě se jedná ale o léčivo a ne o kosmetiku. Sem lze zařadit prostředky jako lubrikační gely nebo bělicí zubní pasty s vyšším obsahem peroxidu vodíku [1].

Kosmetické přípravky mají komplexní složení, obsahují širokou škálu různých ingrediencí a složek. Každý přípravek má svou konkrétní recepturu. Zde jsou uvedeny příklady rámcového složení toaletního mýdla, šamponu 2 v 1 a řasenky.

Tab. 1. Rámcové složení toaletního mýdla [2]

rámcové složení	funkce	obsah
sodné soli mastných kyselin	aktivní složka	do 80 %
volné mastné kyseliny popř. oleje	emolient	do 5 %
zvlhčující látky (glycerin)	humektant	5 %
fragrance	-	do 1 %
antimikrobika		do 1 %
dextrin, křída	plnivo	podle typu mýdla
syntetický tenzid	kosurfaktant	podle typu mýdla

Tab. 2. Rámcové složení šamponu 2 v 1 [2]

rámcové složení	funkce	obsah
Anionické tenzidy	Primární tenzid	15 %
Amfoterní tenzid	Sekundární tenzid	5 %
Neionický tenzid	Stabilizátor pěny	3 %
Estery mastných kyselin	Emoliační účinek	2 - 3 %
Kationický polymer	Kondicionér	0,5 - 1 %
Parfém	-	-
barvivo	-	-
antimikrobikum	-	-
voda	-	Do 100 %

Tab. 3. Rámcové složení řasenky [2]

rámcové složení	funkce	obsah
vosky	Aktivní látky	30 - 35 %
Minerální oleje	dispergátor	Do 100 %
pigmenty	barvivo	10 - 20 %
voda	rozpouštědlo	15 %
Kationické polymery	Aktivní látka	Do 1 %
konzervant	-	0,1 - 0,5 %

1.1 Legislativa kosmetického přípravku

Za legislativu kosmetického přípravku jsou odpovědné orgány EU, jako je Evropská komise, která předkládá legislativní návrhy Evropskému parlamentu a Radě. Dále je velmi důležitým orgánem Stálý výbor pro kosmetiku, který předkládá své návrhy Evropské komisi. Tento výbor spolupracuje s mnoha dalšími odbornými organizacemi. Výsledkem činnosti těchto orgánů jsou různá nařízení, vyhlášky a směrnice, které jsou pro daný kosmetický prostředek přímo účinné a kosmetický prostředek se jimi musí řídit. Hlavní směrnicí v Evropské unii ovlivňující výrobu, označování a dodávky kosmetiky a osobní péči, je směrnice o kosmetických prostředcích 76/768/EEC, která bude od 11. 7. 2013 nahrazena Nařízením Evropského Parlamentu a Rady č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích ze dne 30. 11. 2009. Volný pohyb kosmetických přípravků v rámci evropského trhu nemůže být omezeno nebo zakázáno členskými státy, pokud tyto výrobky nejsou nebezpečné pro lidské zdraví za obvyklých nebo předvídatelných podmínek použití. Nicméně pokud kosmetický přípravek v souladu s touto směrnicí, představuje nebezpečí pro lidské zdraví, může členský stát, na jehož území je výrobek uváděn na trh přijmout omezující nebo zakazující opatření. V tomto případě, informuje ostatní členské státy a Komisi, aby mohla být přijata vhodná opatření v celé Evropské unii (EU). Samozřejmě se tyto nařízení netýkají jenom kosmetického prostředku jako celku, ale jsou zde také předpisy a vyhlášky, které platí pro jednotlivé ingredience KP, mezi které samozřejmě patří i konzervanty. Velmi důležitá je vyhláška č.494/2005 Sb., kterou se stanoví analytické metody kontroly složení kosmetického prostředku. V této vyhlášce je uveden návod pro zkoušení ingrediencí kosmetického prostředku a vyhodnocení jejich bezpečnosti. Dále předpisy určí požadavky na vlastnosti a dokumentaci, značení a povinnosti odpovědných osob pro všechny členské státy, způsob zajištění dozoru nad kosmetickými prostředky a spolupráci orgánů dozoru členských států. V neposlední řadě je velmi důležitou součástí předpisů povinnost rychlého varování o nebezpečných výrobcích mezi členskými státy a povinnosti odpovědných osob. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 obsahuje mnoho kapitol a příloh. A právě příloha č. VI. je seznam povolených konzervantů [1, 3, 4].

2 MIKROORGANIZMY KONTAMINUJÍCÍ KOSMETIKU

Mezi mikroorganismy kontaminující kosmetické prostředky patří zejména bakterie a mikroskopické houby, což je termín označující jak vláknité mikroskopické houby (plísňe) tak i eukaryotické mikroskopické houby (kvasinky) [5]. Tato kapitola je věnována bakteriím, kvasinkám a plísním, jejichž výskyt v kosmetických prostředcích je nežádoucí. Přítomnost těchto mikroorganismů v kosmetice je kontrolována regulována legislativou.

2.1 Bakterie

Jsou to jednobuněčné organismy s prokaryotickým typem buňky. Jsou kosmopolitní, což znamená, že žijí v nejrůznějších podmínkách i prostředích. Optimální teplota růstu je pro většinu bakterií 25 - 37 °C, existují však i bakterie rostoucí při teplotách nižších i při teplotách extrémně vysokých. Optimální pH pro růst bakterií se pohybuje kolem neutrálního bodu. Podle vztahu ke kyslíku lze bakterie rozdělit na organismy aerobní, anaerobní a fakultativně anaerobní [5].

Bakteriální buňky mohou mít buněčnou stěnu dvojího typu a na základě struktury buněčné stěny rozlišujeme bakterie grampozitivní a gramnegativní. Grampozitivní bakterie mají buněčnou stěnu, tvořenou silnou vrstvou peptidoglykanu, na který jsou navázány řetězce teikoové kyseliny. Na rozdíl od grampozitivních bakterií mají gramnegativní druhy buněčnou stěnu tenčí a podstatně složitější. Stěna je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu a obsahuje takzvanou vnější membránu, která se podobá membráně cytoplazmatické a poskytuje gramnegativním bakteriím zvýšenou ochranu vůči působení některých antimikrobiálních látek [6].

V následujícím textu jsou blíže charakterizovány dva druhy gramnegativních bakterií, které jsou častými kontaminanty kosmetických přípravků a z tohoto důvodu byly zvoleny pro praktickou část bakalářské práce.

2.1.1 *Escherichia coli*

Tato gramnegativní bakterie patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Obecně lze rod *Escherichia* charakterizovat jako gramnegativní rovné tyčky vyskytující se jednotlivě nebo ve dvojicích. Jsou fakultativně anaerobní s optimální teplotou růstu 37 °C [7].

Významným představitelem rodu *Escherichia* je *Escherichia coli* je běžným komenzálem trávicího traktu obratlovců, včetně člověka. Jako součást přirozené střevní mikroflóry je prospěšná díky produkci látek, které brání usídlení patogenních mikroorganismů, podílí se rovněž na tvorbě některých vitamínů. Na druhou stranu může být velmi nebezpečným patogenem. Některé kmeny *E. coli* enterotoxiny případně i další faktory virulence, které jsou příčinou gastrointestinálních onemocnění. Patogenně *E. coli* působí i pokud se dostane mimo střevo, je pak velmi častým původcem infekcí močových cest a nozokomiálních infekcí včetně meningitid a septikémií. Epidemiologicky patogenní kmeny jsou charakterizovány sérologicky pomocí somatických (O), kapsulárních (K) a bičíkových (H) antigenů. Kmeny produkující shigatoxiny mohou vyvolat závažná onemocnění jako je hemoragická kolitida nebo hemolyticko-uremický syndrom. Vysoce infekční je především sérotyp O157:H7. Tato bakterie je jedním z nejstudovanějších mikroorganismů. Jedná se o modelový organismus pro klinické, genové a molekulárně biologické studie. Ačkoli většina kmenů tohoto druhu žije v symbióze ve střevech, mnohé kmeny *Escherichia coli* jsou patogenní pro člověka a zvířata [7, 8].



Obr. 1. *Escherichia coli* v elektronovém mikroskopu [9]

2.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Tato bakterie patří do čeledi *Pseudomonadaceae*. Obecně je rod *Pseudomonas* charakteristický gramnegativními rovnými nebo mírně zakřivenými tyčkami. Tento rod patří mezi aerobní mikroorganismy, které ke svému životu potřebují kyslík. Pohybují se pomocí bičíků. Mezi nejdůležitější zástupce tohoto rodu patří *Pseudomonas aeruginosa*, která se hojně vyskytuje v prostředí, především v půdě nebo vodě. Může být patogenní pro rostliny a produkuje pigmenty [7]. *Pseudomonas aeruginosa* je známá svou environmentální všestranností.

ností, schopností vyvolat onemocnění zejména u oslabených jedinců, a svou rezistencí vůči antibiotikům. Na rozdíl od mnoha bakterií vyskytujících se hojně v prostředí, má *P. aeruginosa* pozoruhodnou schopnost vyvolat onemocnění u hostitele. Pseudomonády se poměrně snadno dokáží přizpůsobit mnoha rozmanitým podmínkám prostředí, rostou a množí se ve vodě a půdě, ale i na rostlinných a živočišných tkáních. Jsou schopny využívat celou řadu organických sloučenin jako zdroj živin. *Pseudomonas aeruginosa* produkuje celou řadu toxických proteinů, které nejen způsobují rozsáhlé poškození tkání, ale také mohou aktivovat různé složky imunitního systému [10]. *Pseudomonas aeruginosa* je univerzální patogen spojený s širokým spektrem infekcí člověka. Kontrola takových infekcí je obtížná, neboť *P. aeruginosa* je přirozeně rezistentní k mnoha antimikrobiálním látkám [11].

2.2 Kvasinky

Kvasinky jsou drobné jednobuněčné organizmy s eukaryotickým typem buňky. Daří se jim zejména ve vlhkém a teplém prostředí. Jejich optimální teplota růstu je 25 - 30 °C. Preferovaným zdrojem živin jsou pro ně cukry a pH optimální pro růst je spíše v kyselé oblasti. Jejich hlavními metabolickými produkty jsou zejména alkoholy a oxid uhličitý. [5]. Kvasinky jsou hojně využívány v potravinářském průmyslu. V současné době existuje 1500 uznaných druhů, které taxonomicky náleží především mezi askomycety a basidiomycety [12]. Typickými druhy jsou *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Candida albicans*.

Mnoho různých druhů kvasinek se může účastnit na spontánním kvašení, ale významné jsou zejména druhy rodu *Saccharomyces* a to zejména druh *Saccharomyces cerevisiae*, který hraje vedoucí úlohu při výrobě fermentovaných nápojů a potravin [13]. *Candida albicans* je diploidní houba, která roste jako kvasinka, ale taky ve formě vláknitých buněk a je původcem ústních a genitálních infekcí u lidí [14, 15]

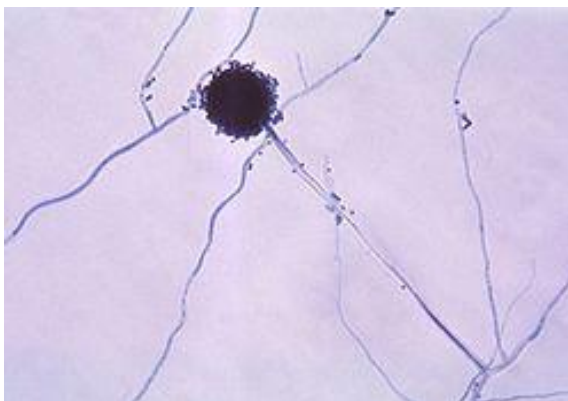


Obr. 2. *Candida albicans* rostoucí na agaru [16]

2.3 Plísně

Plísně jsou mikroskopické houby, které rostou především v prostředí o dostatečné vlhkosti. Optimální teplota růstu je 20 - 30°C, nejlépe rostou při kyselém pH. Jejich hlavními metabolickými produkty jsou různé organické kyseliny. Jsou to aerobní organizmy, tudíž ke svému životu potřebují kyslík. Významné z hlediska kontaminace kosmetiky jsou rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* a mnohé další [5].

Plísně rodu *Penicillium* jsou nejčastějšími mikromycetami, které kromě kontaminace kosmetiky způsobují také kontaminaci široké škály potravin [17]. *Rhizopus* je rod saprofytických hub s četným výskytem v prostředí, zejména na rostlinném materiálu, ovoci a zelenině. Některé druhy rodu *Rhizopus* jsou oportunně patogenní a mohou být původci závažných až fatálních infekcí [18]. Plísně rodu *Aspergillus* mohou způsobit vážná onemocnění u lidí a zvířat. Mezi nejčastější patogenní druhy patří *Aspergillus fumigatus* a *A. flavus*, které produkují aflatoxiny, které jsou karcinogenní. Tyto druhy kontaminují kromě kosmetiky také potraviny, jako jsou ořechy nebo zemědělské suroviny [19].



Obr. 3. Hlava plísně *Aspergillus Niger* [20]

2.4 Kontaminace kosmetického prostředku

Je zakázáno prodávat nebo vyrábět kosmetiku, která je kontaminována patogenními mikroorganismy. I v případě že mikroorganismy nejsou patogenní, je kontaminace nežádoucí, jak z hlediska výrobce, tak z hlediska uživatele. Kontaminace mikroorganismy může způsobit zhoršení kvality výrobku nebo podráždění kůže uživatele.

Každá země má vlastní legislativou dané limity pro počet živých bakterií ve finálním produktu. Například Americká kosmetická společnost vyžaduje, aby celkový počet živých bakterií v 1g produktu nepřesáhl 500 bakterií ve výrobcích pro děti a v oční kosmetice, a u ostatních kosmetických prostředků je povoleno méně než 1000 bakterií na 1 g výrobku. Patogenní bakterie jsou v kosmetických výrobcích naprosto nepřijatelné. Japonská kosmetická společnost zase stanovuje, že počet živých bakterií ve výrobku nesmí překročit hodnotu 1000 CFU/g a přítomnost patogenních bakterií je naprosto nepřijatelná [5].

Příkladem patogenních mikroorganismů, které nesmí být přítomny ve výrobcích, jsou např. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a mnohé další [5]. K zajištění mikrobiologické bezpečnosti kosmetického prostředku je nutné do výrobku přidat jednu nebo více účinných antimikrobiálních přísad. Tyto složky musí zachovat účinnost po dlouhou dobu užívání kosmetického prostředku. Zvolit vhodnou antimikrobiální látku ale není vůbec jednoduché. Kosmetické prostředky jsou většinou emulzní systémy a antimikrobiální látka musí tedy působit ve vhodné fázi (buď ve vodné nebo v olejové fázi). Většina kontaminujících mikroorganismů přežívá ve vodné fázi, čemuž musí být přizpůsoben výběr vhodné antimikrobiální látky. Ideální antimikrobiální látka dále nesmí být inaktivována faktory, jako je pH kosmetického prostředku, podmínky výrobního procesu nebo přítomnost kosme-

tických ingrediencí, které by mohly snižovat účinnost antimikrobika [21]. Kromě toho, inaktivace mikroorganismů konzervačními látkami by měla být dostatečně rychlá, aby se zabránilo adaptaci mikroorganismů nebo vzniku rezistence ke konzervantu [22]. Existují obecně dva typy mikrobiální kontaminace kosmetického prostředku, a to primární a sekundární.

2.4.1 Primární kontaminace

Kontaminace vzniklá při výrobním procesu je nazývána primární kontaminací. Pochází buď ze surovin používaných pro výrobu kosmetického prostředku, nebo je zdrojem strojní zařízení a personál ve výrobě. Častým zdrojem kontaminace je i voda, která může být kontaminována mikroorganismy, nejčastěji gramnegativními tyčinkami. Prevencí primární kontaminace vznikající během výroby a plnění je hlavně zajištění čistého pracovního prostředí a instalace zařízení jako jsou prachové filtry nebo zvlhčovače. Dále je nutné provádět pravidelné rozborů vody a nelze opomenout ani kontrolu mikrobiologické kvality surovin. Velmi důležité je vzdělávat pracovníky a zajistit, aby udržovali čistotu na pracovišti a aby celá výroba probíhala za vhodných hygienických podmínek. Primární kontaminaci může být zabráněno přísným dodržováním správné výrobní praxe (GMP – good manufacturing practise) [5].

Správná výrobní praxe byla poprvé navržena vládou Spojených států v roce 1963 [23]. GMP je výraz, který zahrnuje všechny požadavky, které musí být dodrženy při výrobě léčiv nebo kosmetiky. GMP musí sledovat celou výrobu od kontroly surovin přes samotnou výrobu a vydání prostředku na trh. V rámci GMP je velmi důležité kontrolovat zejména, zda nedošlo k mikrobiální kontaminaci, což je v dnešní době jeden ze zásadních problémů kosmetiky [24].

Tyto následující podmínky jsou velmi důležité při výrobním procesu a jsou nedílnou součástí právě procesu GMP:

- 1) Použití filtrů k odstranění prachu, jelikož jeden gram prachu může obsahovat až jeden milion mikrobiálních buněk [5]
- 2) Klimatizace - velmi důležitý prvek odvlhčování vzduchu. Ve vlhkém prostředí se vyskytují zejména gramnegativní bakterie, kvasinky a plísňe [5]
- 3) Použití tzv. HEPA filtrů, které zajišťují vysoký stupeň čistoty, dále je nutná sterilizace vody a ostatních surovin [5]

4) V neposlední řadě je velmi důležité, aby pracovníci používali sterilní rukavice a při práci dodržovali hygienické zásady [5]

Celý proces GMP musí samozřejmě splňovat určité normy. Jakákoli opatření v rámci GMP musí být navržena tak aby byly vhodné, musí tedy mít vědecký základ a jsou systematicky kontrolovány [5].

2.4.2 Sekundární kontaminace

Kontaminace, která vzniká při užívání prostředku, se nazývá sekundární kontaminace a je často výsledkem kontaminace bakteriemi přítomnými na ruce a v prostředí. Mezi takové kontaminující mikroorganismy patří především grampozitivní koky a grampozitivní tyčinky. I přesto že správností výrobního procesu a zajištěním hygieny při výrobě se výrobek vyvaruje primární kontaminaci, může se u něj objevit sekundární kontaminace. Jelikož ve vzduchu kolem nás, v půdě, ve vodě nebo i v lidské pokožce existují milióny bakterií, je poměrně složité zabránit právě této kontaminaci. Tato kontaminace může vzniknout, např. pokud je s výrobkem nevhodně zacházeno (např. skladování při nevhodné teplotě a vlhkosti, vrácení výrobku do obalu po jeho kontaktu s pokožkou, nedůsledné uzavírání výrobku apod.). Takové chování spotřebitele vede k sekundární kontaminaci. Z toho vyplývá, že za kontaminaci výrobku je odpovědný spotřebitel, nicméně výrobce musí předvídat určitou míru nevhodného zacházení a pokud možno zajistit dostatečnou konzervaci [5].

3 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

Antimikrobiální látky jsou velmi důležitou ingrediencí, která je přidávána do kosmetického prostředku. Tyto látky se dělí do dvou základních okruhů a to na dezinfekční prostředky a na konzervanty [5].

3.1 Požadavky na antimikrobiální látky

Ne všechny antimikrobiální látky mohou být přidány do kosmetiky. Některé mohou mít totiž nežádoucí účinky a jejich zakomponování do formulace výrobku by tedy byla nevhodná. Problematika antimikrobiálních látek v kosmetických prostředcích je značně komplikovaná, z čehož vyplývá i celá řada požadavků, které by tyto látky měly splňovat [5].

Mezi důležité vlastnosti patří zejména účinnost proti mikroorganismům, snadná rozpustnost ve vodě nebo dobrá rozpustnost v běžně používaných kosmetických ingrediencích. Další velmi důležitou vlastností je vysoká bezpečnost, antimikrobiální látka nesmí dráždit pokožku. Musí být neutrální, aby nedošlo ke změně pH výrobku. Dále nesmí snížit efektivnost produktu a nesmí způsobovat změnu některých dalších vlastností kosmetického prostředku, jako je změna barvy prostředku nebo změna jeho vzhledu. Musí být stabilní v širokém rozsahu teplot a pH. V neposlední řadě je důležitou vlastností snadná dostupnost a existence stabilních dodavatelů. Důležitá je také nízká cena a ekonomické využití [5].

3.2 Dezinfekční látky a baktericidy

Dezinfekční prostředky a baktericidy jsou přidávány do kosmetiky za účelem snížení mikrobiální kontaminace povrchu kůže a udržení kůže v čistém stavu. Využívají se zejména v kosmetických prostředcích určených pro problematickou a aknézní pleť, kde zmírňují projevy onemocnění díky potlačení výskytu bakterií [5]. *Acne vulgaris* je onemocnění kůže postihující pilosebaceózní jednotku v predilekční lokalizaci, tedy na obličeji, trupu a horní polovině zad. Jedná se o velmi komplexní onemocnění, za jehož klinickou manifestaci zodpovídá množství faktorů, mezi které lze zařadit právě i působení mikroorganismů [25].

Další kategorií kosmetických prostředků, do kterých se přidávají baktericidní látky, jsou deodoranty. Apokrinní potní žlázy vyskytující se v axilách produkují sekret obsahující celou řadu organických složek. Jejich rozkladem bakteriální kožní flórou vzniká nepříjemný zápach. Antibakteriální složky deodorantů omezují množení bakterií, které díky produkci hyd-

rolytických enzymů mají schopnost rozkládat složky potu [21, 26]. Velmi často se také využívají v prostředcích proti lupům, protože mají schopnost potlačit výskyt *Pityrosporum ovale*. Jedná se o lipofilní kvasinku, která je běžně přítomna v seboroické oblasti pokožky [27]. V současné době existuje mnoho studií, které naznačují, že *Pityrosporum ovale* hraje důležitou roli při seboroické dermatitidě. Je to chronické zánětlivé onemocnění kůže dětí i dospělých spojené s nadměrnou tvorbou kožního mazu [28]. Existují také klinické studie, které dokazují dobrý účinek některých antimykotik snižujících počet právě těchto kvasinek [29].

Dále jsou dezinfekční látky a baktericidy často používány při sterilizaci v primární kontaminaci během výrobního procesu. Dezinfekční prostředky jsou široce používány v nemocnicích a jiných zdravotnických zařízeních. V těchto prostředcích se nachází řada velmi účinných chemických látek (biocidů) jako jsou alkoholy, fenoly, jód nebo chlór. Většina z těchto účinných látek vykazuje širokospektrou antimikrobiální aktivitu [30]. Je velmi důležité, aby tyto prostředky působily v širokém rozsahu, jelikož různé skupiny bakterií se liší v citlivosti na biocidy. Mezi nejodolnější patří bakteriální spory, mykobakterie a následně pak gramnegativní organizmy, zejména pak rody *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bdellovibrio*, *Legionella* a mnohé další. Naopak koky jsou zpravidla nejcitlivější a do této skupiny můžeme zařadit bakterie rodu *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc*. Mechanizmy podílející se na rezistenci k biocidům jsou v dnešní době intenzivně studovány. Rezistence je typická právě pro bakteriální spory, mykobakterie a gramnegativní bakterie. Tato rezistence může být úzce spojen se změnou propustnosti buněčné membrány pro antimikrobní látku [31]. Na biocidní aktivitu má vliv několik faktorů, zejména koncentrace, doba kontaktu, pH, teplota, interakce s kosmetickými přísadami, a pochopitelně míra kontaminace a fyziologický stav daných mikroorganismů. [32]. Dalším velmi důležitým vlivem na aktivitu dezinfekčních látek je reakce těchto látek s ostatními komponentami, které jsou obsaženy v kosmetickém přípravku. Tyto reakce mohou způsobit snížení účinnosti dezinfekčních prostředků proti mikroorganismům. Typickým příkladem těchto látek jsou například benzalkonium chlorid, chlorhexidin, glukonát a trichlorocarbanilid (TCC) [5].

Aby mohly být dezinfekční látky použity, musí proběhnout testování jejich účinnosti. Ačkoliv všechny dezinfekční testy mají stejný konečný cíl, a sice měření antimikrobiální aktivity chemické látky nebo přípravku, existuje velké množství zkušebních testů a metod. Antimik-

robiální účinnost dezinfekcí je velmi často zkoumána ve třech fázích testování. První fáze se týká laboratorních zkoušek, v nichž se ověří, zda sloučenina nebo směs má antimikrobiální aktivitu. Ve druhé fázi testů, je určeno, za jakých podmínek a při jakém ředění je daný prostředek aktivní: testy simulují reálné podmínky, mezi takové testy patří například testy dezinfekce povrchů. Poslední etapa zahrnuje testy, které mají prověřit účinnost dezinfekce v reálných podmínkách [33].

3.3 Konzervační látky v kosmetice

Konzervační látky se přidávají do kosmetiky, aby potlačily množení mikroorganismů, které kontaminují kosmetiku a mají za úkol tyto mikroorganismy zabít [5]. Kosmetika nemusí být sterilní, ale musí být přiměřeně konzervována nebo jinak chráněna před mikrobiální kontaminací a znehodnocením. Mikroorganismy v kosmetických prostředcích mohou vést k infekci, mohou způsobit změnu barvy nebo zápach prostředku. Největší hrozbou kontaminace je přítomnost patogenů, které mohou potenciálně představovat zdravotní ohrožení. Dokonce i nepatogenní mikroorganismy mohou v kosmetice způsobit za určitých podmínek onemocnění (oportunní patogeny) [34]. Tudíž hlavním úkolem konzervantů je zamezit riziku zhoršení vlastností produktů a potlačit šíření patogenních mikroorganismů [5].

Konzervanty budou blíže popsány v dalších kapitolách, jelikož účinná konzervace kosmetiky není jednoduchý proces přidání jednoho nebo více antimikrobiálních přísad do formulace. Za úspěchem konzervace stojí zvážení mnoha faktorů, které ovlivňují účinnost a stabilitu celkové kompozice výrobku a dále i zvážení jeho chemických a fyzikálních vlastností. Musí se brát v úvahu výrobní postupy, suroviny a předpokládané spotřebitelské použití. Navíc existují mnohá omezení pro používání konzervantů. Jsou to sice látky zabraňující mikrobiální kontaminaci, ale na druhou stranu jsou v dnešní době zkoumány a nacházeny jejich negativní účinky na lidské zdraví [34].

4 KONZERVAČNÍ LÁTKY V KOSMETICE

Kromě svých hlavních složek, jako jsou oleje a voda, kosmetika často také obsahuje látky jako glycerin a sorbitol, které slouží jako zdroj uhlíku pro mikroorganismy [5]. Dále kosmetika obsahuje deriváty aminokyselin a proteiny, které mohou mikrobům sloužit jako zdroj dusíku [35].

Vzhledem k tomu, že prostředí kosmetického produktu může umožnit růst a množení mikroorganismů, které mohou velmi snadno kontaminovat kosmetické přípravky, je nezbytné prostřednictvím konzervačních látek bránit jejich kontaminaci. Riziko kontaminace je značné zejména u kosmetických prostředků s vysokým obsahem vody.

Nežádoucí jsou patogenní mikroorganismy a oportunně patogenní bakterie, jako jsou *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, které jsou často nalézány v kontaminované kosmetice [36]. Zdrojem kontaminace ale nejsou pouze mikroorganismy, které se do kosmetického prostředku dostaly v průběhu výroby, ale mikroorganismy mohou být obsaženy také ve výchozích surovinách, které jsou pro výrobu použity. Velké nebezpečí může nastat u hotového výrobku. Pokud se v hotovém výrobku při skladování pomnoží velké množství mikroorganismů, dojde k odbourávání jednotlivých komponent preparátu. Taková degradace složek preparátů může vést ke změně vlastností výrobku, což má za následek nežádoucí účinky na lidskou kůži [5].

Konzervační látky používané v kosmetice jsou blíže rozebrány v následujícím textu.

4.1 Organické kyseliny

4.1.1 Kyselina benzoová

Její systematický název je kyselina benzenkarboxylová, triviální název je potom kyselina benzoová. Má vzhled bezbarvých krystalů. Kyselina benzoová (E210) a její soli (sodné E211, draselné E212 a vápenaté E213) se používají jako konzervační prostředky. Kyselina benzoová, její soli a estery, jsou účinné při pH 3 - 5 proti bakteriím, kvasinkám a plísním v koncentracích 600 až 1200 ppm [37].

4.1.2 Kyselina salicylová

Její systematický název je kyselina 2-hydroxybenzoová. Kyselina salicylová a její soli jsou účinné zejména proti bakteriím, kvasinkám a plísním při pH 4 - 6.

Maximální přípustná koncentrace, ve které může být tato kyselina použita je 0,5 %. Dále by se neměla používat vůbec do kosmetických prostředků určených pro děti do 3 let, s výjimkou šamponů, kde je její použití povoleno [37]. Kromě toho že se kyselina salicylová používá jako konzervant, slouží také jako endogenní regulátor růstu rostlin. Bylo zjištěno, že se podílí na široké škáleu metabolických a fyziologických reakcí v rostlinách a tím ovlivňuje jejich růst a vývoj [38].

4.1.3 Kyselina sorbová

Kyselina sorbová a její soli jsou optimálně účinné při pH = 6. Tato kyselina může být použita v maximální koncentraci 0,6 %. Působí zejména proti kvasinkám a plísním [37]. Kyselina sorbová a její soli inhibují různé bakterie v různých fázích jejich životního cyklu. Tato schopnost kyseliny sorbové inhibovat bakterie o různé fyziologické aktivitě může být zodpovědná za její široké spektrum účinku. Inhibice růstu bakterií pomocí kyseliny sorbové může mít za následek pozměnění buněčných membrán, inhibici transportu látek a inaktivaci klíčových enzymů [39].

4.2 Alkoholy

4.2.1 Benzylalkohol

Benzylalkohol je bezbarvá, čirá, slabě aromaticky zapáchající kapalina. Je rozpustná ve vodě, ethanolu a etheru. Je inaktivní při vyšším pH než 8. Může být použit v maximální koncentraci do 1 % [37].

4.2.2 Dichlorbenzyl alkohol

Má velmi široké spektrum účinnosti, používá se hlavně proti plísním a kvasinkám. Optimální účinek má zejména při pH 4 - 10. Maximální přípustná koncentrace, ve které může být použit je 0,15 %. Tento typ konzervantu je kompatibilní s většinou složek kosmetických prostředků [37].

4.3 Halogeny

4.3.1 Benzalkonium chlorid

Je účinný proti grampozitivním bakteriím, kvasinkám a plísním. Optimální účinnost dosahuje při pH 5 - 9 a může být použit maximálně v koncentraci 0,25 %. Tento konzervant ale bohužel není kompatibilní s anionickými tensidy, proteiny a nitráty. Může být zdrojem alergií [37].

4.3.2 Bromo- 2-nitro-2-propandiol 1,3

Optimální účinnost má při pH nižším než 8. Jeho obvyklá aplikace bývá v koncentracích do 0,1 %. Velmi dobře se rozpouští ve vodě a v alkoholech. Nesnáší se s komponentami, které obsahují – SH skupinu (např. cystein) a některými kovy (např. Al). Je tady možná reakce s amidy nebo aminy za vzniku nitrosaminů nebo nitrosamidů. Tyto látky jsou považovány za kancerogeny [37].

4.4 Ostatní

4.4.1 Dimetylol dimetyl hidantoin

Optimální účinek při pH 4 - 9 proti bakteriím, plísním a kvasinkám. Je rozpustný ve vodě a alkoholech, maximální přípustná koncentrace je 0,6 % [37].

4.4.2 Imidazolidinyl urea

Optimální účinek při pH 3 - 9, maximální koncentrace 0,6 %. Jedná se o konzervant s velmi dobrou rozpustností ve vodě, glycerinu a dalších alkoholech. Je kompatibilní se všemi ionogenními tensidy a také proteiny, je ale citlivý na teploty kolem 40 °C [37].

4.4.3 Orto fenyl-fenol

Středně účinný proti grampozitivním bakteriím, kvasinkám a plísním. Optimální účinnost při pH 4 - 10. Maximální přípustná koncentrace tohoto konzervantu je 0,2 % [37].

4.4.4 Parabeny

Parabeny jsou skupinou chemických látek, které jsou často využívány při konzervaci kosmetických prostředků. V dnešní době jsou ale v podezření že mohou mít karcinogenní účinek. Jsou to methyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl nebo isobutyl kyseliny 4-hydroxybenzoové a jejich solí. Jejich účinek je velmi široký a vyšší při pH pod 7. Doporučené koncentrace u esterů jsou 0,4 % a u směsi esterů 0,8 %. Nejsou kompatibilní s neionogenními a kationickými tenzidy, estery celulózy a želatinou [37].

Parabeny jsou důležité přísady v kosmetických prostředcích pro potlačení růstu mikroorganismů. Nicméně, vzhledem k četnému použití v kosmetice, patří parabeny mezi nejčastější alergeny a jsou schopny vyvolat alergickou kontaktní dermatitidu [40].

4.4.5 Fenoxyetanol

Je velmi účinný hlavně na gramnegativní bakterie. Optimální účinek vyžaduje pH 4 - 9, doporučená koncentrace do 1 %. Fenoxyetanol je špatně rozpustný ve vodě, lépe v alkoholech [37].

4.4.6 Trichloro-2,4,4-hydroxy-2-difenyleter

Je účinný na bakterie grampozitivní. Optimálního účinku je dosaženo při pH 4 - 9 a jeho maximální přípustná koncentrace je 0,3 %. Je nerozpustný ve vodě, rozpouští se zejména v organických rozpouštědlech. Nelze jej kombinovat s neionogenními tenzidy a lecitiny [37].

5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ÚČINNOST KONZERVAČNÍCH LÁTEK

Volba vhodného konzervantu je závislá na mnoha faktorech. Závisí na jeho rozpustnosti ve vodě, jelikož mikroorganismy rostou zejména ve vodné fázi přípravku. Dále závisí na pH systému. Vhodné pH pro růst a množení mikroorganismů se pohybuje kolem neutrálního bodu. Antimikrobika fenolické povahy (estery kyseliny hydroxybenzoové) jsou neúčinnější při $\text{pH} = 8$, ale na druhou stranu látky obsahující kvartérní dusík jsou účinné pouze v alkalické oblasti pH. Další velmi významný faktor je rozdělovací koeficient mezi vodnou a olejovou složkou. Velmi důležitou podmínkou pro každé antimikrobiotikum je, že musí být kompatibilní se všemi dalšími složkami, které jsou obsaženy v kosmetickém prostředku [34].

Jelikož existuje mnoho faktorů, které ovlivňují účinnost konzervace, není možné najít ideální konzervační látku. Taková látka by musela mít široké spektrum aktivity, což je schopnost konzervační přísady eliminovat širokou škálu mikroorganismů. Takový výrobek by musel být účinný jak proti gramnegativním tak grampozitivním bakteriím, kvasinkám a plísním. Obvykle je používán konzervační systém k dosažení tohoto cíle. Kosmetické konzervanty by měly být účinné při nízkých koncentracích, aby se snížily náklady, minimalizovaly toxické účinky a nesmí mít nepříznivý vliv na fyzikální vlastnosti hotového výrobku. Konzervant by měl být stabilní při jakýchkoliv podmínkách, které mohou nastat při výrobě konečného produktu (tj. teplota, pH, atd.). Ideální kosmetické konzervanty by měly nabídnout ochranu při výrobě a měly by zachovat účinnost kosmetického výrobku po dobu předpokládané životnosti výrobku v ruce spotřebitele [37].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 POUŽITÝ MATERIÁL

6.1 Kmeny bakterií

Antimikrobiální účinky byly testovány na gramnegativních bakteriích. Konkrétně bylo pracováno s kmeny bakterií *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955.

6.2 Testované konzervační látky

- Konzervant Verstatil PC (Dr. Straetmans)

Složení (INCI) : Fenoxyetanol (Phenoxyethanol), Kaprylylglykol (Caprylyl Glycol)

Podle výrobce je tento konzervant spolehlivý pro konzervaci produktů péče o pleť. Je rozpustný ve vodě, chemicky stabilní s nízkým dopadem na stabilitu kosmetického prostředku. Použití tohoto konzervantu je nezávislé na pH daného kosmetického přípravku [41].

- Konzervant Verstatil SL (Dr. Straetmans)

Složení (INCI) : voda (Aqua), Levulinát sodný (Sodium Levulinate), Sorbát draselný (Potassium Sorbate)

Tento konzervant je podle výrobce dobře snášenlivý s pokožkou, dále se jedná o produkt, který lze snadno zakomponovat do formulace kosmetického prostředku. Doporučuje se použití v kombinaci s antimikrobiálními povrchově aktivními látkami pro zlepšení vlastností přípravku. Pro jeho použití je nezbytné, aby se pH daného kosmetického přípravku pohybovalo v rozmezí 4 – 6 [41].

- Konzervant Verstatil BP (Dr. Straetmans)

Složení (INCI) : Fenoxyetanol (Phenoxyethanol), kyselina benzoová (Benzoic acid)

Tento konzervant obsahuje synergickou směs fenoxyetanolu a kyseliny benzoové a nezpůsobuje barevné změny kosmetického prostředku. Pro jeho použití je nezbytné, aby se pH daného přípravku pohybovalo v rozmezí 4 – 6 [41].

6.3 Testované kosmetické přípravky

K testování antimikrobiální účinnosti byly podle zadané základní receptury připraveny vzorky pleťových vod.

- Základní receptura pleťové vody

Složení:

Tween 40 (HiMedia)	8,9 g
Spolapon AES (Enaspol a.s.)	12,71 g
Cocamidopropyl betain (Enaspol a.s.)	6,67 g
NOVETHIX L-10 polymer (Lubrizol)	1,6 g
<u>Destilovaná voda</u>	<u>70, 12 g</u>
Složení celkem	100 g

Prvním krokem pro přípravu pleťových vod bylo, že se nechal zbobtnat polymer NOVETHIX (polymer: voda = 1 : 3). Jelikož u přípravy kontrolního vzorku bylo zjištěno, že polymer se špatně rozpouští, bylo provedeno jeho nabobtnání. Následně byly všechny suroviny naváženy do kádinky a byly míchány na vysokorychlostním mixéru Heidolph RZR 2020. Po dokonalém vymíchání na homogenní směs byly k této základní receptuře přidány různé typy konzervantů o různých koncentracích. Byly používány tři typy konzervantů o třech různých koncentracích. V poslední fázi bylo pH pleťových vod upraveno pomocí kyseliny citronové na pH 4,5 - 5,5. Tímto postupem bylo získáno 9 různých vzorků pleťových vod, které se lišily typem použité konzervační látky a její koncentrací. Desátým vzorkem byl vzorek kontrolní, do kterého nebyla přidána žádná konzervační látka. Přehled jednotlivých vzorků pleťových vod a množství použitých konzervačních látek je uvedeno v Tab. 4.

Tab. 4. Přídavek konzervantu do základní receptury

Vzorek	Konzervant	Množství konzervantu [g]
1	Versatil PC	0,8 g
2	Versatil PC	0,9 g
3	Versatil PC	1 g
4	Versatil SL	1 g
5	Versatil SL	1,5 g
6	Versatil SL	2 g
7	Versatil BP	0,5 g
8	Versatil BP	0,75 g
9	Versatil BP	1 g
10 kontrola	Bez konzervantu	-

6.4 Přístroje a vybavení

Vysokorychlostní mixér Heidolph RZR 2020

Digitální váhy, OHAUS, Švýcarsko

Autokláv Varioklav H+P, Německo

Laboratorní sklo (skleněné pipety, sterilní misky, sterilní hokejky, sterilní kličky, kádinky, skleněné zkumavky)

Laboratorní plasty (plastové zkumavky, sterilní špičky)

Automatické mikropipety Biohit a Nichipet ex.

Lednička

Plynový kahan

Vortex, (Heidolph REAX top), Německo

Denzitometr (Unimed), Česká republika

Biologický termostat BT 120, Česká republika

6.5 Média pro kultivaci

6.5.1 TSA agar (Soyabean Casein Digest Agar)

Složení:

TSA agar (HiMedia)	16,0 g
Destilovaná voda	400,0 ml

Příprava: Bylo naváženo 16 g TSA agaru do skleněné lahve a následně rozpuštěno ve 400 ml destilované vody. Takto připravené médium bylo dáno do autoklávu, kde bylo sterilizováno v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

6.6 Příprava roztoků

6.6.1 Ředící roztok

Složení:

Casein Enzyme Hydrolyste (HiMedia)	0,2 g
NaCl (LachNer)	1,7 g
Destilovaná voda	200,0 ml

Příprava: Suroviny byly naváženy do skleněné lahve a rozpuštěny ve 200 ml destilované vody. Takto připravený ředící roztok byl sterilizován v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

6.6.2 Neutralizační roztok

Složení:

Eugonic LT 100 Brook Base (HiMedia)	12,96 g
Tween 80 (HiMedia)	5,0 g
Destilovaná voda	1 000,0 ml

Příprava: Nejdříve bylo naváženo 5 g Tweenu 80 do skleněné lahve a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Tuto směs bylo nutno zahřát, jelikož Tween 80 je tenzid a špatně se rozpouští ve studené destilované vodě. Dále bylo naváženo 12,96 g Eugonic LT 100 Brook Base do skleněné lahve a rozpuštěno ve 400 ml směsi Tween 80 s destilovanou vodou. Takto připravený neutralizační roztok byl následně sterilizován v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

7 POUŽITÉ METODY

7.1 Stanovení antimikrobiální ochrany pleťových vod

7.1.1 Příprava vzorků

Připravené pleťové vody byly pipetovány do sterilních plastových zkumavek. Plastové zkumavky a víčka byly sterilizovány UV zářením po dobu 20 minut. Ze zásobních roztoků pleťových vod bylo odebíráno 10 ml do každé ze zkumavek. Nakonec bylo získáno 60 vzorků pleťových vod, které byly dostatečně popsány, aby nedošlo k nežádoucí záměně. Bylo získáno 30 zkumavek s jednotlivými testovanými vzorky lišících se typem použité konzervační látky a jejich koncentrací, které byly zaočkovány danými mikroorganismy. Bylo pracováno se třemi typy konzervantů o třech různých koncentracích a byly používány dvě gramnegativní bakterie. Vše bylo prováděno ve dvou opakováních, proto je výsledný počet zkumavek 60.

Rozpis všech zkumavek a jejich obsah je uveden v příloze 1.

7.1.2 Příprava kultur na zaočkování

Pro testy byly použity gramnegativní bakterie *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Z této kultury byla připravena 1. subkultura pomocí křížového roztěru.

Provedení křížového roztěru:

Kultura byla odebrána sterilní kličkou a byla nanášena na povrch připraveného pevného kultivačního média. Poté byla klička vyžihána a nanášený vzorek byl rozetřen pomocí 4 rovnoběžných čar. Následně byla klička znova vyžihána a byly provedeny další 4 čáry kolmo k těm předešlým. Poté byla klička vyžihána a na půdu byly udělány další 4 čáry přes ty předešlé. Nakonec byla klička vyžihána a přes poslední čáry byl udělán hádek

Takto připravená 1. subkultura byla kultivována na TSA agaru při 30 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby byla z první subkultury připravena 2. subkultura stejným způsobem, která byla následně používána pro přípravu inokula sloužícího k zaočkování pleťových vod.

7.1.3 Příprava inokula pro zaočkování pleťových vod

Do dvou skleněných sterilních zkumavek bylo napipetováno 4,5 ml ředícího roztoku. Dále byly k přípravě inokula použity připravené 2. subkultury *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* na pevné půdě, ze kterých byly sterilní kličkou odpíchnuty izolované kolonie a ty byly následně suspendovány do připravených zkumavek.

Tyto suspenze ve zkumavce byly dostatečně promíchány na vortexu, tak aby vznikla homogenní směs a byly proměřeny na denzitometru. Bylo nutné, aby hodnoty na denzitometru ukazovaly 1. stupeň McFarladnovy zákalové stupnice. Pokud byly hodnoty nižší, tak byly sterilní kličkou přidána kultura, pokud naopak byly hodnoty vyšší, bylo nutno suspenzi naředit. Takto připravené suspenze bylo možno použít jako inokulum. Do každé plastové sterilní zkumavky obsahující pleťovou vodu bylo zaočkováno 100 μ l takto připraveného inokula. Byly připraveny dvě inokula, jedno obsahující bakterii *Escherichia coli* a druhé obsahující bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Dále bylo připraveno i 10 kontrolních zkumavek, které nebyly zaočkovány mikroorganismy. Zkumavky byly pečlivě popsány, aby nedošlo k záměně.

7.1.4 Stanovení počtu buněk ve vzorcích pleťových vod

Stanovení počtu buněk ve vzorcích pleťových vod bylo prováděno v dnech 0, 7, 14 a 28 ode dne zaočkování pleťových vod.

a) **Den 0** - bylo vyočkováno na pevné půdy pouze inokulum, které bylo 4x naředěno. Cílem bylo zjistit počáteční počet buněk zaočkových do jednotlivých vzorků pleťových vod.

Postup ředění inokula před začátkem inkubace vzorků (den 0):

Byla připravena řada 4 sterilních skleněných zkumavek s 10 ml sterilního ředícího roztoku. Bylo odebráno 0,1 ml připraveného inokula a to bylo přeneseno do 1. zkumavky. Poté byl dobře promíchán obsah 1. zkumavky na vortexu a z té zkumavky bylo odebráno 0,1 ml a přeneseno do další zkumavky. Takto bylo pokračováno až do 4. ředění

Z jednotlivých ředění inokula bylo pomocí automatické pipety vyočkováno 100 μ l na tuhé půdy (TSA agar) a tento objem byl rozetřen po povrchu půdy pomocí sterilní hokejky. Takto připravené půdy byly kultivovány při teplotě 30°C po dobu 48 hodin. Po uplynutí této

doby bylyisky vyhodnoceny, byly spočítány kolonie a vypočítány hodnoty CFU/ml – kolonie tvořících jednotek v 1ml.

b) Den 7, 14 a 28

Tyto dny udávají dobu vyočkování pleťových vod na pevné půdy od doby zaočkování pleťových vod. V tyto dny se prováděla 3 po sobě jdoucí ředění.

Postup ředění v těchto dnech:

Do 1. zkumavky bylo napipetováno 4,5 ml neutralizačního roztoku + 0,5 ml zaočkováno pleťové vody. Tato suspenze byla dobře promíchána na vortexu. Ve 2. zkumavce bylo 4,5 ml ředícího roztoku a do této zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml suspenze připravené ve zkumavce č. 1, takto připravená suspenze byla dobře promíchána. Ve 3. zkumavce bylo 4,5 ml ředícího roztoku a bylo do ní přidáno 0,5 ml suspenze připravené ve zkumavce č. 2, tato suspenze byla dobře promíchána.

Na pevné půdy bylo následně vyočkováno 100 µl vzorků odebraných ze zkumavky č. 2 a č. 3. Tento objem byl následně rozetřen sterilní hokejkou. Poté byly půdy kultivovány při teplotě 30°C po dobu 48 hodin. Po uplynutí této doby byly spočítány kolonie a vypočítány hodnoty CFU/ml. Nakonec byly vyhodnoceny výsledky a udány závěry.

7.1.5 Výpočet počtu kolonie tvořících jednotek v 1 ml vzorku (CFU/ml)

Tento výpočet je nezbytný pro získání hodnot, které jsou následně vyneseny do grafů a hodnotí se podle nich účinnost daných konzervačních látek.

- Ukázka výpočtu CFU/ml pro inokulum (den 0):

$$CFU/ml = \frac{\text{průměrný počet kolonií}}{\text{ředění}} \cdot \frac{1000(\mu l)}{\text{pipetovaný objem } (\mu l)}$$

$$CFU/ml = \frac{500}{10^{-3}} \cdot \frac{1000 (\mu l)}{100 (\mu l)} = 5 \cdot 10^6 \text{ kolonií na 1 ml}$$

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

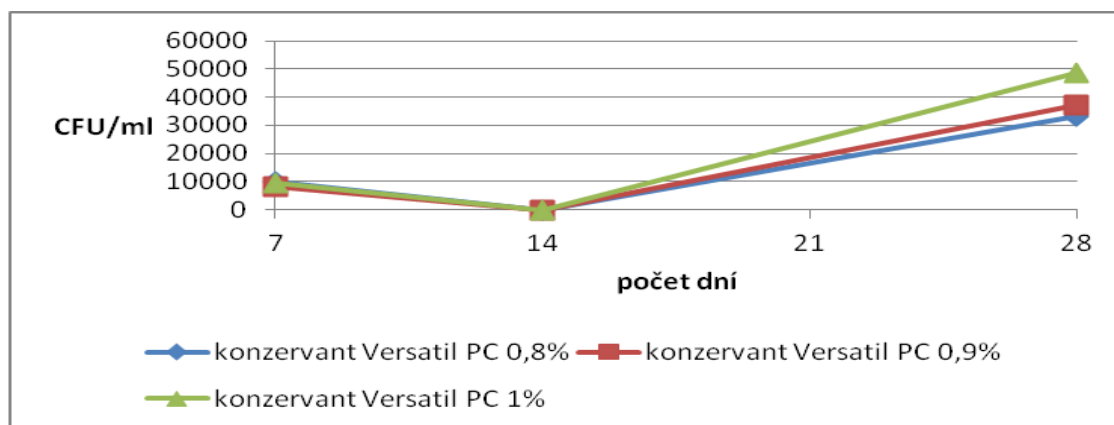
8.1 Antimikrobiální účinnost testovaných pleťových vod

Antimikrobiální účinnost byla testována použitím 3 různých konzervačních látek ve 3 různých koncentracích, které byly přidány do připravených pleťových vod. Účinnost konzervantů byla sledována na gramnegativních bakteriích *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, které byly zaočkovány do připravených pleťových vod.

Pro jednotlivé vzorky pleťových vod byly vypočteny hodnoty CFU/ml. Tyto hodnoty v čase 0 (tedy ihned po zaočkování) a hodnoty po 7, 14 a 28 dnech inkubace vzorků, byly vyneseny do grafů. Pro větší přehlednost byly do jednoho grafu zaznamenány výsledky pro všechny použité koncentrace daného konzervantu. Grafy jsou v následujícím textu okomentovány, a byla posuzována antimikrobiální ochrana pleťových vod. Bylo tedy zjištěno, zda použité konzervanty dokáží potlačit růst gramnegativních bakterií *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích pleťových vod.

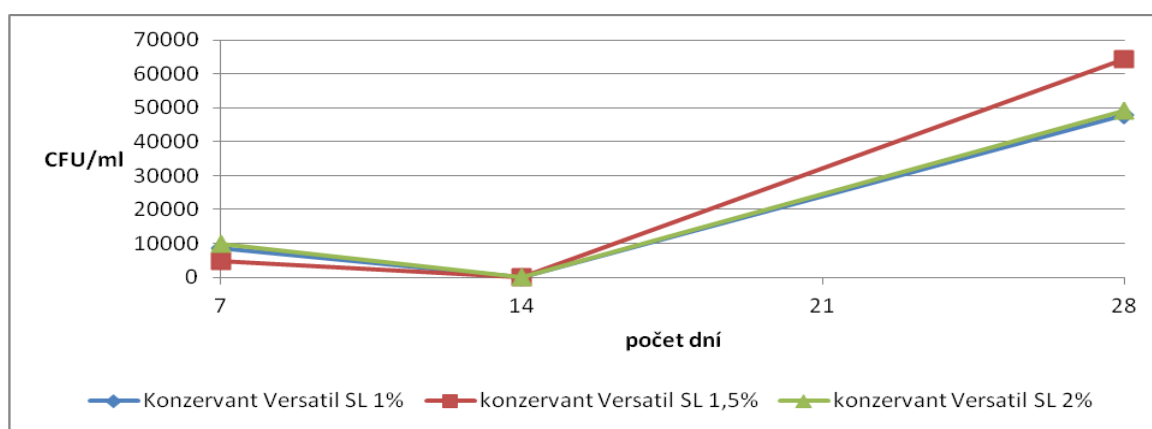
8.1.1 Vliv konzervačních látek na gramnegativní bakterii *Escherichia coli*

Hodnoty CFU/ml pro den 0 jsou ve všech vyhodnoceních stejné, jelikož jsou to hodnoty inokula, obsahující bakterii *Escherichia coli*, kterým byly zaočkovány všechny plastové zkumavky určené pro daný mikroorganismus. Tato hodnota, tedy počet buněk na začátku testování, byla $5 \cdot 10^6$ CFU/ml. V grafu byly vyhodnoceny pouze výsledky, které byly získány po odečtu po 7, 14 a 28 dnech. Den 0 byl $5 \cdot 10^6$ kolonií na 1 ml pro všechny tři následující grafy.



Obr. 4. Počet buněk (CFU/ml) *Escherichia coli* ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil PC o koncentracích 0,8 %, 0,9 % a 1 %

Na obrázku 4. je graficky znázorněn počet buněk *E. coli* ve vzorcích pleťových vod obsahujících Versatil PC v koncentracích 0,8 %, 0,9 % a 1 %. Jak již bylo řečeno výše, hodnota pro den 0 je $5 \cdot 10^6$ kolonií na 1ml. Jak je z grafu patrné v den 7 byly všechny tři hodnoty CFU/ml přibližně $1 \cdot 10^4$ kolonií, což znamená že konzervanty ve všech koncentracích snížily kontaminaci pleťových o leden logaritmický řád. Toto snížení ale není dostatečné a takové množství buněk *E. coli* není přijatelné v žádném kosmetickém přípravku. Po uplynutí dalších sedmi dní, tedy v den 14 je patrné, že se počet buněk snížil téměř na nulovou hodnotu. Je tedy možno říct, že po 14 dnech inkubace vzorků pleťových vod je kosmetický prostředek z hlediska spotřebitele bezpečný. Při delší době skladování vzorků pleťových vod však počet buněk narůstal, což naznačuje adaptaci buněk *E. coli* k použité konzervační látce. Poslední testování bylo provedeno 28 dní od zaočkování pleťových vod. Z grafu je zřejmé, že mikrobiální kontaminace mezi dny 14 a 28 velmi vzrostla a hodnoty CFU/ml pro konzervant Versatil PC 1 % se pohybují kolem $33 \cdot 10^3$ kolonií na 1 ml, hodnoty CFU/ml pro konzervant Versatil PC 0,9 % jsou kolem hodnoty $37 \cdot 10^3$ a je vidět že nejvíce účinný byl konzervant Versatil PC 0,8 % kde se hodnoty CFU/ml pohybují okolo $48 \cdot 10^3$ kolonií na 1 ml.

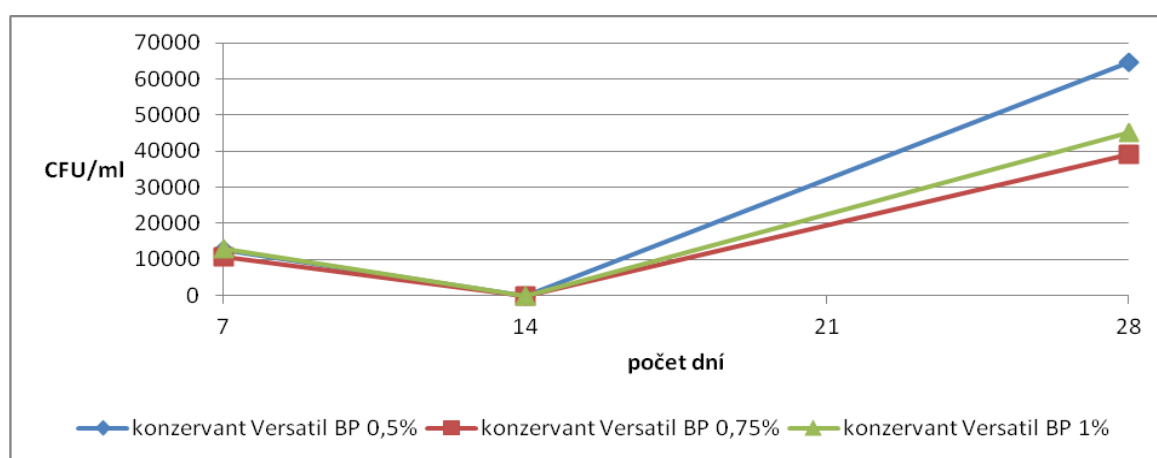


Obr. 5. Počet buněk (CFU/ml) *Escherichia coli* ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil SL o koncentracích 1 %, 1,5 % a 2 %

Obrázek 5. znázorňuje antimikrobiální účinnost konzervantu Versatil SL o koncentracích 1%,1,5% a 2%. Křivky, které zobrazují účinnost konzervantů Versatil SL v koncentraci 1,5% a 2% jsou téměř totožné, tudíž se dá říci, že vykazují stejnou aktivitu vůči *E. coli*. Hodnota CFU/ml pleťových vod v den 0 byla $5 \cdot 10^6$, což znamená, že všechny konzervanty v den 7 tuto kontaminaci snížily na hodnoty kolem $9 \cdot 10^3$ kolonií na 1 ml, což jsou ale neustále nepřijatelné hodnoty vzhledem k nutnosti zajistit bezpečnost kosmetického prostředku. Po 14 dnech se mikrobiální aktivita výrazně snížila téměř na nulovou hodnotou, což jsou

hodnoty přípustné k použití daného kosmetického přípravku. Podobně jako v případě Versatilu PC, i v těchto vzorcích došlo po dvou týdnech k opětovnému nárůstu počtu buněk a použitou konzervační látku tedy nelze považovat za účinnou.

Poslední testování proběhlo 28 den, zde je vidět že mikrobiální kontaminace vzrostla u konzervantu Versatil SL 1,5% na hodnoty $64 \cdot 10^3$ kolonií na 1 ml, a nejvyšší účinek prokázaly konzervanty Versatil SL 1% a 2%, kde se hodnoty CFU/ml pohybují okolo $49 \cdot 10^3$ kolonií na 1 ml. Je tedy patrné že konzervant od 14 dne po 28 den snížil svou účinnost a není vhodným konzervantem působícím proti bakterii *Escherichia coli*.



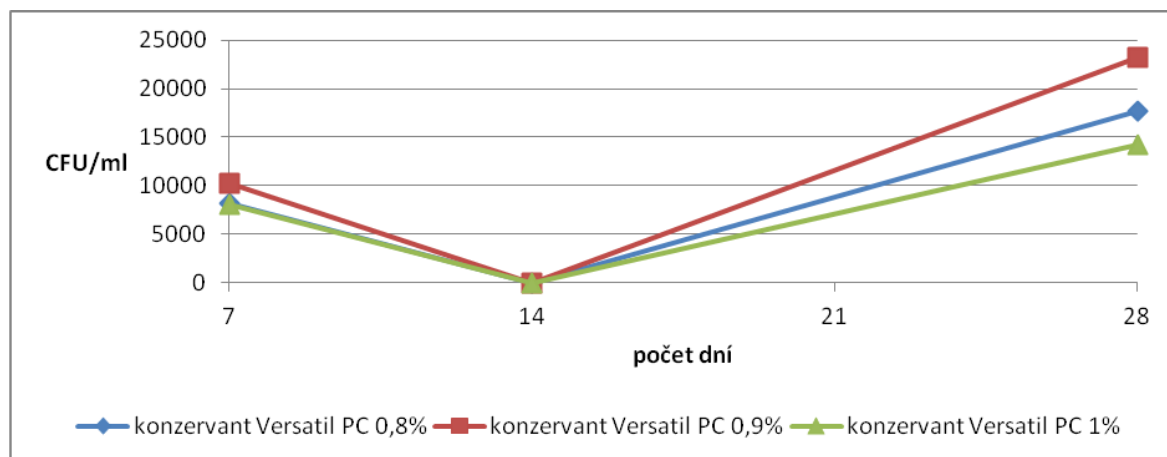
Obr. 6. Počet buněk (CFU/ml) *Escherichia coli* ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil BP o koncentracích 0,5 %, 0,75 % a 1 %

Poslední graf týkající se bakterie *Escherichia coli* ukazuje antimikrobiální účinnost konzervantu Versatil BP v koncentracích 0,5 %, 0,75 % a 1 %. V den nula byla hodnota mikrobiální kontaminace pleťových vod $5 \cdot 10^6$ CFU/ml. Po sedmi dnech, jak je vidět z grafu byla kontaminace snížena na hodnoty kolem $11 \cdot 10^3$ kolonií na 1 ml pro konzervanty ve všech koncentracích. V den 14 je tomu přesně tak jako v předcházejících dvou grafech, počet buněk byl výrazně snížen. Tyto výsledky se ale změnilo po uplynutí dalších 14 dní, protože mikrobiální aktivita začala opět velmi narůstat. Hodnoty u konzervantu Versatil BP 0,5 % byly okolo $64 \cdot 10^3$ kolonií na 1 ml, hodnoty konzervantu Versatil BP 1 % vykazují hodnoty okolo $45 \cdot 10^3$ CFU/ml a za nejúčinnější je na základě grafu možno považovat konzervant Versatil BP v koncentraci 0,75 %, kde jsou hodnoty okolo $39 \cdot 10^3$ kolonií na 1 ml. Rozdíly ve stanovených hodnotách CFU/ml pro různé koncentrace konzervační látky jsou však velmi malé a řádově se pohybují stále ve stejném rozsahu.

Ani u této konzervační látky nebyly prokázány dostatečné účinky vůči *E. coli* a konzervant Versatil BP v žádném případě nevyhovuje požadavkům nutným pro zakonzervování těchto připravených pleťových vod.

8.1.2 Vliv konzervačních látek na gramnegativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

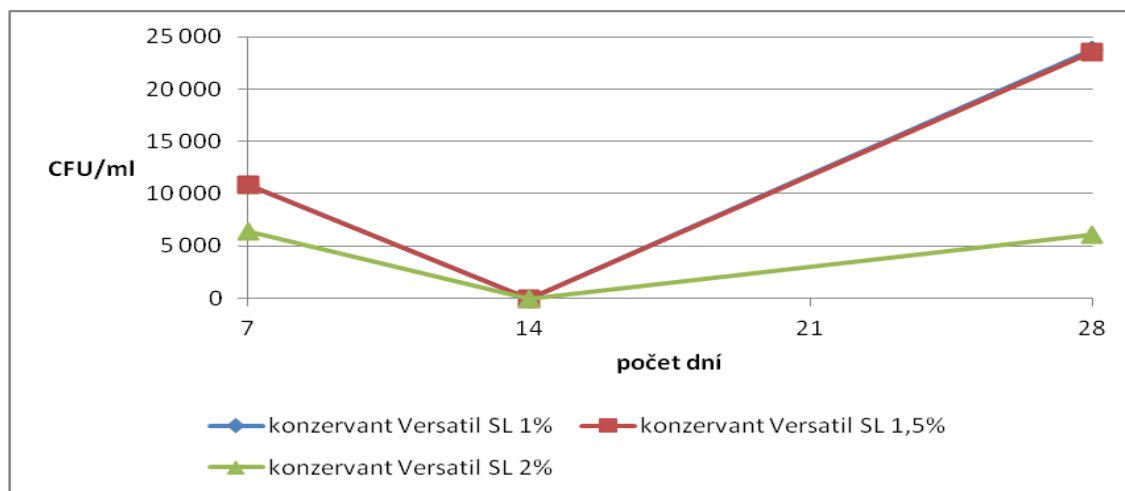
Hodnoty CFU/ml pro den 0 jsou ve všech vyhodnoceních stejné, jelikož jsou to hodnoty inokula, obsahující bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, přepočítané na objem zaočkovaného vzorku. Tato hodnota byla $9 \cdot 10^5$ CFU/ml. V grafu byly vyhodnoceny pouze výsledky, které byly získány po odečtu po 7, 14 a 28 dnech. Den 0 byl tedy $9 \cdot 10^5$ kolonií na 1 ml pro všechny tři následující grafy.



Obr. 7. Počet buněk (CFU/ml) *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil PC o koncentracích 0,8 %, 0,9 % a 1 %

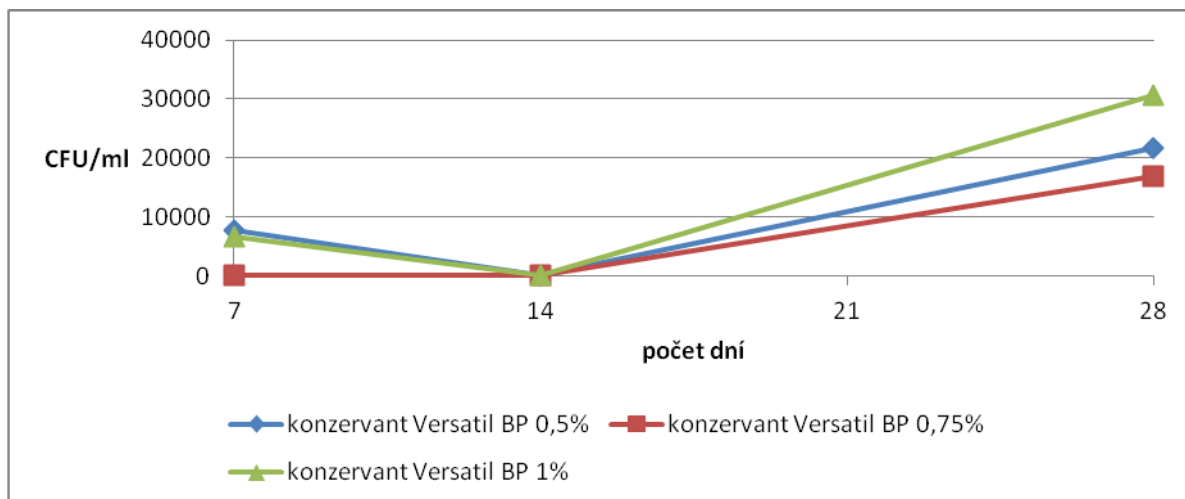
Na obr. 7 jsou znázorněny hodnoty CFU/ml pro bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, která byla zaočkována do vzorků pleťových vod obsahujících konzervační látku Versatil PC v koncentracích 0,8 %, 0,9 % a 1 %. V den 0 byla hodnota počtu buněk *P. aeruginosa* v pleťových vodách $9 \cdot 10^5$ kolonií na 1 ml, jak je již uvedeno výše. V den 7 se hodnoty CFU/ml pro konzervant Versatil PC 0,9 % pohybují okolo $10 \cdot 10^3$ CFU/ml, hodnoty pro konzervanty Versatil PC 0,8 % a 1% se pohybují okolo $8 \cdot 10^3$ CFU/ml. Ve shodě s výsledky získanými pro *E. coli*, i zde byl pozorován po 14 dnech inkubace vzorků výrazný pokles počtu mikroorganismů. V den 28 jsou hodnoty konzervantu Versatil PC 0,9 % $23 \cdot 10^3$ CFU/ml, a lze tedy tuto koncentraci považovat za nejméně účinnou. Hodnoty pro konzervant Versatil PC 0,8 % jsou $18 \cdot 10^3$ kolonií na 1 ml. Za neúčinnější v tento den je možno

považovat podle grafu konzervant Versatil PC 1%, jehož hodnoty se pohybují okolo $14 \cdot 10^3$ CFU/ml.



Obr. 8. Počet buněk (CFU/ml) *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil SL o koncentracích 1 %, 1,5 % a 2 %

Na obrázku 8. jsou uvedeny počty buněk ve vzorcích v jednotlivých časových intervalech. Účinnost konzervantu Versatil SL byla sledována v koncentracích 1 %, 1,5 % a 2 %. V den 0 byla mikrobiální kontaminace pleťových vod $9 \cdot 10^5$ CFU/ml. V den 7 jak je vidět v grafu je účinnost konzervantů Versatil SL 1 % a 1,5 % téměř totožná a odpovídá hodnotám $10 \cdot 10^3$ kolonií na 1 ml. Hodnoty pro konzervant Versatil SL 2 % jsou $6 \cdot 10^3$ CFU/ml, což naznačuje, že tato nejvyšší testovaná koncentrace má nejvyšší inhibiční účinky na daný mikroorganismus. I v případě výsledků pro *P. aeruginosa* bylo zaznamenáno výrazné snížení hodnot CFU/ml v odběru po dvou týdnech inkubace. Od 14. dne však také docházelo k opětovnému množení buněk *P. aeruginosa* a hodnoty byly dokonce vyšší než tomu bylo v den 7. V závěrečné fázi testu se dá podle výsledků za nejúčinnější považovat konzervant Versatil SL v koncentraci 2 %, u kterého se hodnoty CFU/ml pohybují okolo $6 \cdot 10^3$, což je hodnota srovnatelná se dnem 7. Naopak u konzervantů Versatil SL 1 % a 1,5 % tato kontaminace vzrostla až na hodnoty okolo $23 \cdot 10^3$.



Obr. 9. Počet buněk (CFU/ml) *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil BP o koncentracích 0,5 %, 0,75 % a 1 %

Na obrázku 9. je graficky znázorněna účinnost konzervantu Versatil BP o koncentracích 0,5 %, 0,75 % a 1 %. V den 0 byla hodnota mikrobiální kontaminace pleťových vod rovna hodnotě $9 \cdot 10^5$ CFU/ml. V den 7 je podle grafu nejúčinnější koncentrací tohoto konzervantu koncentrace 0,75 %, která vedla ke značnému poklesu hodnot CFU/ml v testovaných vzorcích. Konzervanty Versatil BP 0,5 % a 1 % vykazovaly hodnoty $7 \cdot 10^3$ CFU/ml.

Opět lze pozorovat snížené množství bakterií po dvou týdnech inkubace s následným opětovným množením těchto bakterií. Nejúčinnější koncentrací Versatilu BP byla koncentrace 0,75 % a hodnoty se v těchto vzorcích vod pohybují okolo $17 \cdot 10^3$ CFU/ml. Konzervant Versatil BP 0,5 % vykazuje hodnoty $21 \cdot 10^3$ kolonií na 1 ml. Podle grafu je za nejméně účinný považován konzervant Versatil BP v 1% koncentraci, při jehož účinku se hodnoty CFU/ml pohybují okolo $30 \cdot 10^3$.

8.2 Závěrečná diskuze všech výsledků

Zátěžové testy pro hodnocení účinnosti konzervačních látek byly prováděny v souladu s legislativními požadavky. Výsledky antimikrobiální ochrany připravených pleťových vod byly vyhodnoceny na základně sestrojení grafů, které uvádí hodnoty CFU/ml vypočtené pro jednotlivé vzorky pleťových vod.

Bylo sestrojeno 6 grafů, první tři se týkají gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a další tři se týkají gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Ze všech grafů je patrné, že konzervanty, které byly použity a to konkrétně konzervant Versatil PC o koncentraci 0,8

%, 0,9 % a 1 %, dále konzervant Versatil SL o koncentraci 1 %, 1,5 % a 2 % a konzervant Versatil BP o koncentraci 0,5 %, 0,75 % a 1 %, snížily v první polovině testu počáteční mikrobiální kontaminaci. Hodnoty počtu buněk na začátku testu se pro oba mikroorganismy pohybovaly v rozmezí 10^5 - 10^6 CFU/ml. V prvním odběru vzorků po 7 dnech, i ve druhém odběru po 14 dnech byla tato počáteční hodnota vlivem konzervační látky snížena.

Účinek konzervačních látek byl nejvyšší po 14 dnech inkubace vzorků pleťových vod. Úkolem konzervační látky se však zajistit bezpečnost výrobku po dobu jeho používání spotřebitelem a z tohoto hlediska je dvoutýdenní účinnost naprosto nedostačující.

Všechny testované konzervační látky ztrácely svoji účinnost během testu a pravděpodobně zde docházelo buď k inaktivaci konzervantu vlivem interakce se složkami kosmetického prostředku, nebo se mikroorganismy ve vzorku dokázaly adaptovat na dané prostředí.

Navíc se nabízí otázka, zda jsou připravené pleťové vody dostatečně stabilní a v průběhu skladování nedochází ke změnám jejich chemického složení a vlastností. Studium těchto aspektů však nebylo předmětem předkládané bakalářské práce, ta se soustředila pouze na antimikrobiální aktivitu konzervačních přísad přidaných do pleťových vod.

Konečné zhodnocení dosažených výsledků tedy může znít následovně. Použité komerčně dostupné konzervační látky nelze použít pro konzervaci připravených pleťových vod o stávajícím složení. Koncentrace konzervačních látek byly voleny podle doporučení výrobce, avšak v tomto rozmezí nedokázaly vést k uspokojivé inhibici gramnegativních bakterií *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*.

V kapitole 6.2. jsou uvedeny aktivní složky konzervačních preparátů použitých v této práci. Jednou z těchto složek je sorbát draselný (INCI Potassium Sorbate). Tato látka byla testována na gramnegativních bakteriích *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* a dále na mikromycetách *Aspergillus niger* a *Candida albicans*. Ve zmiňované studii byl sorbát přidáván do rinse-off kosmetických prostředků, tedy prostředků, které se z pokožky oplachují. Byl použit v koncentraci 0,4 %. Autoři studie potvrdili jeho vysokou účinnost. Již za jeden týden byl schopen snížit mikrobiální kontaminaci na požadovanou hodnotu [42]. Výsledky výše uvedené studie nelze potvrdit praktickou částí této bakalářské práce. I přesto že tato látka byla obsažena v konzervantu Versatil SL, účinnost Versatilu nebyla dostatečná pro snížení mikrobiální kontaminace na požadovanou hodnotu.

Další ze složek použitých konzervantů je fenoxyetanol, který je podle literatury sám o sobě účinný proti bakteriím až ve vyšších koncentracích. Je tedy možné, že byl v použitých konzervantech zastoupen v menších koncentracích, než odpovídají jeho účinku proti bakteriím. Navíc fenoxyetanol není podle uvedeného zdroje příliš účinný proti gramnegativním bakteriím, což by se dalo potvrdit praktickou částí této bakalářské práce [34].

Podle literatury jsou konzervanty plně účinné pokud splňují tzv. kritéria A, což znamená, že výrobek je chráněn vůči mikrobiální kontaminaci a mikrobiologické riziko je tolerovatelné. Kritéria A jsou splněna pokud konzervant sníží mikrobiální kontaminaci kosmetického přípravku nejméně o tři logaritmické řády. Lze tedy konstatovat, že použité konzervanty v rámci zátěžového testu nespĺňují tato kritéria A, protože nedošlo ani v případě jednoho mikroorganismu k dostatečnému snížení počtu buněk v pleťových vodách. [43].

Jednou ze složek komerčních přípravků používaných v této bakalářské práci byla i kyselina benzoová (INCI Benzoic Acid), která je podle literatury širokospektrá a účinná proti gramnegativním bakteriím a jejím mechanismem účinku je narušení funkce cytoplazmatické membrány. Těchto účinků však nebylo dosaženo v testovaných koncentracích a v pleťových vodách o daném složení [43].

9 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na konzervační látky používané v kosmetice a na testování jejich účinnosti. Kosmetické prostředky musí splňovat celou řadu požadavků, aby mohly být uvedeny na trh a využívány spotřebitelem. Nejdůležitějším požadavkem je jejich bezpečnost, a to i bezpečnost mikrobiologická. Celá řada mikroorganismů může kontaminovat kosmetiku a způsobit celou řadu nežádoucích jevů, ať už přímé ohrožení zdraví spotřebitelů, jejichž účinek v konkrétním výrobku musí být ověřen.

Praktická část bakalářské práce se zabývá konkrétním testováním antimikrobiální ochrany pleťových vod připravených podle základní receptury. Do těchto vod byly přidány konzervanty typu Versatil PC o koncentraci 0,8 %, 0,9 % a 1 %, dále Versatil SL o koncentraci 1 %, 1,5 % a 2 % a konzervant Versatil BP o koncentraci 0,5 %, 0,75 % a 1 %. Dále byly do těchto vod zaočkovány gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Zátěžové testy probíhaly vždy 28 dní a výsledky byly odečítány ve dni 0, 7, 14 a 28 a byly vyhodnoceny na základně grafů, do kterých byly zaneseny hodnoty CFU/ml.

Konkrétní výsledky byly vyhodnoceny a diskutovány a bylo zjištěno, že ani jeden z použitých konzervantů není sám o sobě dostatečně účinný pro dostatečnou antimikrobiální ochranu těchto připravených pleťových vod.

Na závěr této práce se tedy dá říci, že tyto konzervační látky za podmínek popsanych v praktické části práce nemohou být použity, jelikož výsledky jejich antibakteriálního působení na *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* nejsou dostatečné. Při použití takto zakonzervované pleťové vody by mohlo dojít k ohrožení zdraví spotřebitele, k nežádoucím reakcím na pokožce, nebo ke znehodnocení výrobku a změně jeho vlastností.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Česká Republika. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. In: *Úřední věstník L 342*. 22/12/2009. Dostupné z: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:01:CS:HTML>
- [2] BOARD, N. *Modern Technology Of Cosmetics*. 1st ed. Delhi: Asia Pacific Business Press Inc, 2004. ISBN 978-8178330815.
- [3] SALVADOR, Amparo a Alberto CHISVERT. *Analysis of Cosmetic Products*. Spain: Elsevier, March 2007. ISBN 978-0-444-52260-3.
- [4] Approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. In: *Council Directive 76/768/EEC*. 27 July 1976.
- [5] MITSUI, T. *New Cosmetic Science*. first edition. The Netherlands: Elsevier Science B. V, 1997. ISBN 0 444 82654 8.
- [6] BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. 2. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně Academia centrum, 2010. ISBN 978-80-73189730.
- [7] Sedláček: taxonomie prokaryot.
- [8] GARCIA, M. I. a C. LE BOUGUÉNEC. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic Escherichia Coli. *Bulletin de l'Institut Pasteur*. July-September 1996, Issue 3, pages 201-236.
- [9] Escherichia coli v elektronovém mikroskopu. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-05-15]. Dostupné z: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:EscherichiaColi_NIAID.jpg
- [10] WINSOR, FLEMING, WHITESIDE, HANCOCK a BRINKMAN. Improved comparative analysis and population genomics capability for Pseudomonas genomes. *Pseudomonas Genome Database*. 2011, Issues 39. DOI: 596-600.
- [11] KERR, SNELLING. Pseudomonas aeruginosa: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*. December 2009, Issue 4, pages 338-344.
- [12] KURTZMAN a Jure PIŠKUR. Taxonomy and Phylogenetic diversity among the yeasts. *Topics in Current Genetics*. 2006, Volume 15, pages 29-46.

- [13] DEQUIN, Sylvie a Serge CASAREGOLA. The genomes of fermentative Saccharomyces. *Comptes Rendus Biologies*. August-September 2011, Volume 334, pages 687-693.
- [14] RYAN, Kenneth J. a C. George RAY. *Sherris Medical Microbiology*. 4 th ed. Anglie: Mc-Graw Hill, 2004. ISBN 0-8385-8529-9.
- [15] D'ENFERT, Christophe a Bernhard HUBE. *Candida: Comparative and Functional Genomics*. France: Caister Academic Press, 2007. ISBN ISBN 978-1-904455-13-4.
- [16] Candida albicans rostoucí na agaru. KAPLAN, William. *Public Health Image Library (PHILL)* [online]. ID 3192. 1969 [cit. 2013-05-15]. Dostupné z: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=3192>
- [17] LEGAN, J. D. Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1993, volume 32, pages 33-53.
- [18] Rhizopus. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-05-13]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Rhizopus>
- [19] MACHIDA, Masayuki a Katsuya GOMI. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Norfolk UK: Caister Academic Press, 2010, pages 1-19. ISBN 978-1-904455-53-0.
- [20] GEORG, Lucille K. CDC Public Health Image Library: the conidial head of an Aspergillus niger fungus. In: *Centers for Diseases Control and Prevention*[online]. 1955 [cit. 2013-05-13]. Dostupné z: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=3964>
- [21] MCCARTHY, TJ. Formulated factors affecting the activity of preservatives. *Ka-bara, ed. Cosmetic and Drug Preservation, Principles and Practices*. New York: Marcel Dekker 1984, pages 359-387.
- [22] BAREL, André O., Marc PAYE a Howard I. MAIBACH. *Handbook od Cosmetic Science and Technology*. New York: Marcel Dekker, 2001. ISBN 0-8247-0292-1.
- [23] AKERS, Michael J. *Sterile drug products: Good manufacturing practice*. UK: Informa, August 2009. first ed. ISBN 9780849339936.

- [24] MCCORMICK, Kate. *Quality*. UK: Elsevier, July 2002, Good manufacturing practise. ISBN 978-0-7506-5113-4.
- [25] WEBSTER a Anthony V. RAWLINGS. *Acne and its therapy*. New York: informa healthcare, 2007. ISBN 978-082472971-4.
- [26] WILLIAMS a SCHMITH. *Chemistry and Technology of the Cosmetics and Toiletries Industry*. London: Chapman & Hall, 1996. ISBN 978-0-7514-0334-3.
- [27] Immune reactions to *Pityrosporum ovale* in adult patients with atopic and seborrheic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. May 1990, Volume 22, pages 739-742.
- [28] BUCHVALD, Dušan. Seboroická dermatitída. *Detská dermatovenerologická klinika LFUK a DFNSP, Bratislava*. 2009, č. 3, pages 98-101.
- [29] FAERGEMANN. *Pityrosporum ovale and skin diseases* [online]. Keio J. Med. 1993 [cit. 2013-05-15]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8255067>
- [30] MCDONNELL, Gerald a A. Denver RUSSELL. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. January 1999, Volume 12, pages 147-179.
- [31] RUSSELL, A.D. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infection*. December 1999, Volume 43, pages S57-S68.
- [32] RUSSELL, A.D. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *The Lancet Infectious Diseases*. December 2003, Volume 3, pages 794-803.
- [33] REYBROUCK, Gerald. The testing of disinfectants. *International Biodeterioration a Biodegradation*. 1998, Volume 41, pages 269-272.
- [34] GEIS, Philip A. *Cosmetic Microbiology: A Practical Approach*. second edition. New York London: Taylor a Francis group, 2006. ISBN 0-8493-1453-4.
- [35] MIŠURCOVÁ, Ladislava. *Základy biologie*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně Academia centrum, 2010. ISBN 978 – 80 – 7318 – 434 – 6.

- [36] LUNDOV, MOESBY, ZACHARIAE a JOHANSEN. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis*. February 2009, Volume 60, pages 70-78.
- [37] LANGMAIER, Ferdinand. *Základy kosmetických výrob*. Zlín: UTB-Academia Centrum Zlín, 2011. ISBN 80-7318-016-2.
- [38] Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*. March 2010, Volume 68, pages 14-25.
- [39] SOFOS, PIERSON, BLOCHER a BUSTA. Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. *International Journal of Food Microbiology*. February 1986, Volume 3, pages 1-17.
- [40] Determination of parabens in cosmetic products by supercritical fluid extraction and capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*. December 1998, Volume 377, pages 85-93.
- [41] *Drstraetmans: intelligence behind beauty* [online]. 2013 [cit. 2013-05-15]. Dostupné z: <http://www.dr-straetmans.de/en/>
- [42] *Eastman: Sorbic Acid and Potassium Sorbate as Cosmetic Preservatives*. USA: Eastman Chemical Company Corporate Headquarters, 1998. ISBN 800-327-8626.
- [43] Orth, D. S., Kabara, J. J., Denyer, S. P., Tan, S. K. (2006). *Cosmetic and Drug Microbiology*. Informa Health Care, New York. 375 s.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

TCC	Trichlorocarbanilid
ppm	Parts per milion (počet části na 1 milion)
CFU	Kolonie tvořících jednotek (Colony forming unit)
Al	Hliník
EU	Evropská Unie
GMP	Správná výrobní praxe (good manufacturing practise)
E210	É-čka, stabilizátory a konzervanty
HEPA	Speciální, vysoce účinný systém vhánění čistého vzduchu (High Efficiency Particulate Air)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. <i>Escherichia coli</i> v elektronovém mikroskopu [9]	16
Obr. 2. <i>Candida albicans</i> rostoucí na agaru [16].....	18
Obr. 3. Hlava plísně <i>Aspergillus Niger</i> [20].....	19
Obr. 4. Počet buněk (CFU/ml) <i>Escherichia coli</i> ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil PC o koncentracích 0,8 %, 0,9 % a 1 %	39
Obr. 5. Počet buněk (CFU/ml) <i>Escherichia coli</i> ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil SL o koncentracích 1 %, 1,5 % a 2 %	40
Obr. 6. Počet buněk (CFU/ml) <i>Escherichia coli</i> ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil BP o koncentracích 0,5 %, 0,75 % a 1 %	41
Obr. 7. Počet buněk (CFU/ml) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil PC o koncentracích 0,8 %, 0,9 % a 1 %	42
Obr. 8. Počet buněk (CFU/ml) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil SL o koncentracích 1 %, 1,5 % a 2 %	43
Obr. 9. Počet buněk (CFU/ml) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve vzorcích pleťových vod obsahujících konzervant Versatil BP o koncentracích 0,5 %, 0,75 % a 1 %	44

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Rámcové složení toaletního mýdla [2].....</i>	13
<i>Tab. 2. Rámcové složení šamponu 2 v 1 [2]</i>	13
<i>Tab. 3. Rámcové složení řasenky [2].....</i>	13
<i>Tab. 4. Přídavek konzervantu do základní receptury.....</i>	33

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: PŘESNÝ ROZPIS ZKUMAVEK A JEJICH OBSAH

PŘÍLOHA P I: PŘESNÝ ROZPIS ZKUMAVEK A JEJICH OBSAH

Celkem při této práci bylo pracováno s 60 plastovými zkumavkami obsahující 10 ml pleťové vody. Ve všech těchto zkumavkách bez výjimky byla základní receptura pleťové vody. Tyto zkumavky se ale lišily obsahem různých typů konzervantů v různých koncentracích a obsahem různých typů bakterií. Jak již bylo řečeno, všechny zkumavky obsahují základní recepturu a liší se:

1. Zkumavka – konzervant Versatil PC, koncentrace 0,8 %, bakterie *Escherichia coli*
2. Zkumavka – konzervant Versatil PC, koncentrace 0,9 %, bakterie *Escherichia coli*
3. Zkumavka – konzervant Versatil PC, koncentrace 1 %, bakterie *Escherichia coli*
4. Zkumavka – konzervant Versatil SL, koncentrace 1 %, bakterie *Escherichia coli*
5. Zkumavka – konzervant Versatil SL, koncentrace 1,5 %, bakterie *Escherichia coli*
6. Zkumavka – konzervant Versatil SL, koncentrace 2 %, bakterie *Escherichia coli*
7. Zkumavka – konzervant Versatil BP, koncentrace 0,5 %, bakterie *Escherichia coli*
8. Zkumavka – konzervant Versatil BP, koncentrace 0,75 %, bakterie *Escherichia coli*
9. Zkumavka – konzervant Versatil BP, koncentrace 1 %, bakterie *Escherichia coli*
10. Zkumavka – bez přítomnosti konzervantů, bakterie *Escherichia Coli*, tato zkumavka sloužila pouze jako kontrolní
11. Zkumavka – konzervant Versatil PC, koncentrace 0,8 %, bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

12. Zkumavka – konzervant Versatil PC, koncentrace 0,9 %, bakterie *Pseudomonas aeruginosa*
13. Zkumavka – konzervant Versatil PC, koncentrace 1 %, bakterie *Pseudomonas aeruginosa*
14. Zkumavka – konzervant Versatil SL, koncentrace 1 %, bakterie *Pseudomonas aeruginosa*
15. Zkumavka – konzervant Versatil SL, koncentrace 1,5 %, bakterie *Pseudomonas aeruginosa*
16. Zkumavka – konzervant Versatil SL, koncentrace 2 %, bakterie *Pseudomonas aeruginosa*
17. Zkumavka – konzervant Versatil BP, koncentrace 0,5 %, *Pseudomonas aeruginosa*
18. Zkumavka – konzervant Versatil BP, koncentrace 0,75 %, bakterie *Pseudomonas aeruginosa*
19. Zkumavka – konzervant Versatil BP, koncentrace 1 %, bakterie *Pseudomonas aeruginosa*
20. Zkumavka – bez konzervantu, bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, zkumavka složí pouze jako kontrolní
21. Zkumavka – konzervant Versatil PC, koncentrace 0,8 %, bez bakterie, kontrolní zkumavka
22. Zkumavka – konzervant Versatil PC, koncentrace 0,9 %, bez bakterie, kontrolní zkumavka
23. Zkumavka – konzervant Versatil PC, koncentrace 1 %,
24. Zkumavka – konzervant Versatil SL, koncentrace 1 %, bez bakterie, kontrolní zkumavka
25. Zkumavka – konzervant Versatil SL, koncentrace 1,5 %, bez bakterie, kontrolní zkumavka

26. Zkumavka – konzervant Versatil SL, koncentrace 2 %, bez bakterie, kontrolní zkumavka
27. Zkumavka – konzervant Versatil BP, koncentrace 0,5 %, bez bakterie, kontrolní zkumavka
28. Zkumavka – konzervant Versatil BP, koncentrace 0,75 %, bez bakterie, kontrolní zkumavka
29. Zkumavka – konzervant Versatil BP, koncentrace 1 %, bez bakterie, kontrolní zkumavka
30. Zkumavka – bez konzervantu a bez bakterie, kontrolní zkumavka

Tady je rozepsáno 30 zkumavek, každá z těchto zkumavek byla připravena dvakrát, tudíž konečný počet zkumavek byl 60. Vše bylo prováděno 2x aby byla zajištěna vyšší spolehlivost tohoto tetování a bylo dosaženo přesnějších výsledků.