

Faktory ovlivňující účinnost antimikrobiálních přísad v kosmetických přípravcích

Bc. Iva Frolková

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Iva Frolková**
Osobní číslo: **T12404**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Faktory ovlivňující účinnost antimikrobiálních přísad v kosmetických přípravcích**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část

1. Mikrobiální kontaminace kosmetických prostředků.
2. Antimikrobiální přísady potlačující růst mikroorganismů v kosmetických prostředcích.
3. Faktory ovlivňující účinnost antimikrobiálních přísad kosmetických prostředků.

Praktická část

1. Příprava modelových vzorků kosmetických prostředků o různých hodnotách pH a vodní aktivity s použitím různých konzervačních látek.
2. Testování antimikrobiální ochrany jednotlivých vzorků kosmetických prostředků.
3. Diskuze výsledků a formulace závěrů práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové 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. 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.
4. GEIS, P. A. Cosmetic Microbiology: A Practical Approach. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 295 p. ISBN 978-0-8493-1453-7.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2014

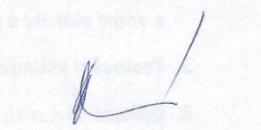
Termín odevzdání diplomové práce:

26. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Román Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

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

.....

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 vzdělávacího 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

Diplomová práce je zaměřena na přípravu modelových pleťových vod obsahující konzervanty a hodnocení jejich antimikrobních vlastností za různých podmínek. Teoretická část se zabývá kosmetickými přípravky, jejich kontaminací a možným výskytem mikroorganismů ve výrobcích. Rovněž je zaměřena na vlivy vnějšího prostředí na mikroorganismy, konzervační látky a faktory ovlivňující jejich výběr a hygienická pravidla výrobního závodu. V praktické části byly připraveny vzorky pleťových vod s různou koncentrací konzervantu methylparabenu a propylparabenu v pH 5, 7, 8. Mikrobiologické hodnocení bylo prováděno na základě 28 denního zátěžového testu na bakteriích *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Z výsledků vyplývá, že vyšší koncentrace konzervantu tj. 0,8% je účinnější než 0,4% koncentrace. Za nejlepší konzervant dle normy ČSN EN ISO 11930 by se dal považovat 0,8% methylparaben.

Klíčová slova: kosmetické přípravky, mikrobiologické hodnocení, konzervační látky, methylparaben, propylparaben, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

The Diploma thesis is focusing on preparation of model lotion containing preservatives and on evaluation of their antimicrobial properties subject to different conditions. The theoretical part occupies with cosmetics, their contamination and a possible presence of microorganism in product. The thesis also focuses on influences of external environment on microorganism, preservatives and some factors influencing their choice and hygienic ruler of a production factory. In the practical part, there were prepared samples of some lotion with different concentration of preservatives methylparaben and propylparaben in pH 5, 7, 8. The microbiological evaluation was done on the basis of 28 day exercise test on bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Result shows that the higher concentration of preservative i.e. 0,8% is more effective than 0,4% of concentration. The best preservative according to the norm ČSN EN ISO 11930 is considered 0,8% methylparaben.

Keywords: cosmetics, microbiological evaluation, preservatives, methylparaben, propylparaben, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce, kterou byla RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté rady a čas, který mi věnovala při zpracování diplomové práce.

Další poděkování patří mým rodičům a sestře za trpělivost a podporu, která mi byla poskytnuta po celou dobu mého studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY	12
1.1 LEGISLATIVA.....	12
1.2 DEFINICE KOSMETICKÉHO PŘÍPRAVKU	13
1.3 KLASIFIKACE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	13
1.3.1 Dle použití.....	13
1.3.2 Dle formy	14
1.4 PLEŤOVÁ VODA A JEJÍ OBECNÁ VÝROBA.....	14
2 MIKROORGANIZMY V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH	16
2.1 BAKTERIE.....	16
2.1.1 Rod <i>Staphylococcus</i>	17
2.1.2 Rod <i>Escherichia</i>	18
2.1.3 Rod <i>Pseudomonas</i>	19
2.1.4 Rod <i>Bacillus</i>	19
2.2 KVASINKY.....	20
2.2.1 <i>Candida albicans</i>	21
2.2.2 Rod <i>Saccharomyces</i>	21
2.3 PLÍSNĚ.....	21
2.3.1 Rod <i>Aspergillus</i> (kropidlák).....	22
2.4 ČINNOST MIKROORGANIZMŮ V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH.....	22
2.5 MIKROBIOLOGIE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	23
2.5.1 Pleťové krémy a pleťová mléka	23
2.5.2 Pudry a zásypy	24
2.5.3 Zubní pasty.....	24
2.5.4 Rtěnky	24
2.5.5 Kolínské vody a parfémy	24
3 HYGIENICKÁ PRAVIDLA VÝROBNÍHO ZÁVODU.....	25
4 KONTAMINACE KOSMETICKÉHO PROSTŘEDKU	26
4.1 PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ KONTAMINACE	26
4.2 ZDROJE MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE	26
4.3 SPRÁVNÁ VÝROBNÍ PRAXE	27
4.4 OCHRANA VÝROBKU PROTI RŮSTU MIKROORGANIZMŮ	28
4.5 MIKROBIÁLNÍ LIMITY	28
5 VLIVY VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ NA MIKROORGANIZMY	29
5.1 PODMÍNKY OVLIVŇUJÍCÍ ÚČINEK VNĚJŠÍCH FAKTORŮ	30
5.2 MECHANIZMUS ÚČINKU VNĚJŠÍCH FAKTORŮ	30
5.3 FAKTORY VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ.....	30
5.3.1 Teplota.....	30
5.3.2 Vodní aktivita.....	31
5.3.3 pH prostředí.....	32

6	KONZERVAČNÍ LÁTKY	34
6.1	KYSELINA BENZOOVÁ A KYSELINA SORBOVÁ.....	35
6.2	PARABENY	35
6.3	HODNOCENÍ ÚČINNOSTI KONZERVACE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ.....	37
6.4	SELF-PRESERVING SYSTÉM.....	38
7	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VÝBĚR KONZERVAČNÍ LÁTKY	39
7.1	FORMULAČNÍ FAKTORY.....	39
7.1.1	Vodní aktivita.....	39
7.1.2	pH.....	41
7.1.3	Rozpusťnost konzervačních látek	42
II	PRAKTICKÁ ČÁST	43
8	MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ	44
8.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	44
8.2	TESTOVANÉ KONZERVANTY	44
8.3	PŘÍSTROJE	44
8.4	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY.....	45
8.5	DEKONTAMINACE POUŽITÉHO MATERIÁLU	45
9	METODIKA	46
9.1	ZÁSADY MIKROBIOLOGICKÉ PRÁCE.....	46
9.2	PŘÍPRAVA PLEŤOVÉ VODY	46
9.3	PŘÍPRAVA ŘEDICÍHO ROZTOKU	47
9.4	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍHO MÉDIA.....	48
9.5	PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍ KULTURY	48
9.6	PŘÍPRAVA INOKULA.....	49
9.7	POSTUP PŘI ODBĚRU VZORKU	49
9.8	VÝPOČET POČTU KOLONIÍ TVOŘÍCÍCH JEDNOTEK CFU	49
9.9	ZKOUŠKA ÚČINNOSTI KONZERVACE	50
10	VÝSLEDKY A DISKUZE	51
10.1	RŮST MIKROORGANISMŮ V PLEŤOVÝCH VODÁCH OBSAHUJÍCÍ PARABENY	53
10.1.1	Vliv parabenů na grampozitivní bakterii <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953 při pH 8	53
10.1.2	Vliv parabenů na gramnegativní bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 při pH 8.....	54
10.1.3	Vliv parabenů na gramnegativní bakterii <i>Escherichia coli</i> CCM 3954 při pH 8	56
10.2	Vliv pH na růst mikroorganismů v modelové pleťové vodě	58
10.3	Vliv množství konzervační látky na růst mikroorganismů	63
	ZÁVĚR	65
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	67
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	73
	SEZNAM OBRÁZKŮ	74
	SEZNAM TABULEK.....	75
	SEZNAM PŘÍLOH.....	76

ÚVOD

Mikroorganismy hrají v přírodě a v životě člověka nezastupitelnou roli, jelikož jsou jedním z hlavních faktorů v tvorbě a zachování životního prostředí. Vyskytují se v půdě, ve vodě, na kůži a ve vzduchu, jehož prostřednictvím se šíří. Kosmetika musí být tedy řádně chráněna před jejich možnou kontaminací. Existuje kontaminace primární, která vzniká již při výrobě kosmetického přípravku nebo kontaminace sekundární, která vzniká používáním výrobku spotřebitelem.

Použití konzervace v kosmetických přípravcích představuje zejména ochranu spotřebitele při vlastním používáním výrobku. Další neméně důležitou funkcí je ochrana samotného výrobku před nežádoucí změnou jeho vlastností způsobenou mikrobiální kontaminací (narušení jeho stability, změna konzistence, barvy, vůně...). K zajištění bezpečnosti výrobků jsou prováděny mikrobiologické testy, které ověřují účinnost konzervační látky. Jelikož jsou konzervační látky v čistém stavu většinou dráždivé, ne-li jedovaté je jejich obsah limitován. Použití vyšší koncentrace by mohlo způsobit vznik alergické reakce.

Velmi častými konzervačními přísadami v kosmetice jsou parabeny. Jedná se o estery para-hydroxybenzoové kyseliny. Z důvodu jejich hojného použití je expozice populace mnohem větší, tím pádem se zvyšuje pravděpodobnost výskytu alergické reakce.

Cílem této práce bylo připravit jednoduchý modelový systém simulující prostředí kosmetických přípravků, konkrétně pleťových vod a zkoumat antimikrobní účinky daných konzervantů v tomto modelovém systému za různých podmínek (různé pH, různá koncentrace konzervační látky). Pro tyto účely byly vybrány konzervanty methylparaben a propylparaben v koncentraci 0,4 a 0,8%. Vzorky byly zaočkovány mikroorganismy *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY

Kosmetika je určena především k udržování osobní hygieny zdravých jedinců. Jelikož má pokožka funkci důležitého kontaktního orgánu, ovlivňuje estetické vědomí jedince a hraje tak významnou roli v oblasti sociologické, psychologické i pedagogické. Kosmetika je jasně rozlišována od léčiv, která jsou používána pro léčbu a prevenci onemocnění a mají vliv na strukturu a funkci těla. Kosmetika se většinou používá denně po delší dobu, tudíž je nesmírně důležité, aby byla zcela bezpečná bez vedlejších účinků. Oproti tomu se farmaceutické léky užívají pouze v krátkém časovém období, s primárním cílem léčit. V tomto případě se někdy mírným nežádoucím účinkům nelze vyhnout. [1, s. 4], [2, s. 5]

1.1 Legislativa

Orgány EU zodpovědné za legislativu kosmetických přípravků jsou Evropská komise a Stálý výbor pro kosmetiku. Evropská komise předkládá legislativní návrhy Evropskému parlamentu a Radě. Stálý výbor pro kosmetiku předkládá návrhy Evropské komisi a spolupracuje s řadou odborných organizací, které vypracovávají stanoviska, doporučení apod. Mezi nejdůležitější organizace patří ECVAM (Evropské centrum pro validaci alternativních metod), SCCP (vědecký výbor pro spotřební zboží) a Cosmetics Europe - The Personal Care Association (dříve COLIPA, Evropská komise pro kosmetiku, parfumerii a toaletní prostředky). Výsledkem činnosti těchto orgánů jsou nařízení, směrnice, rozhodnutí, doporučení, stanoviska, názory a sdělení. [3, s. 6,7]

Směrnice Rady 76/768/EHS ze dne 27. července 1976 o sblížení právních předpisů členských států týkajících se kosmetických prostředků byla nahrazena Nařízením Evropského Parlamentu a Rady č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích ze dne 30. listopadu 2009. Toto nařízení komplexně harmonizuje pravidla Společenství s cílem dosáhnout vnitřního trhu s kosmetickými přípravky a současně zajistit vysokou úroveň ochrany lidského zdraví. [4]

Tímto nařízením se stanoví: definice kosmetického přípravku a dalších pojmů, bezpečnost kosmetického přípravku, vymezení pojmu odpovědné osoby a jejich povinností, požadavky na označení kosmetických přípravků, omezení některých látek, zajištění dozoru nad kosmetickými přípravky a mnoho dalších. [4]

Dalšími závaznými předpisy jsou: nařízení EP a Rady ES č. 1907/2006 – příloha XVII (omezení používání některých výrobků, přípravků a ingrediencí), nařízení EP a Rady ES

č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a vyhláška č. 494/2005 Sb., kterou se stanoví analytické metody kontroly složení kosmetických prostředků. [3, s. 8]

1.2 Definice kosmetického přípravku

V Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 je kosmetický přípravek definován jako jakákoli látka nebo směs určená pro styk s vnějšími částmi lidského těla (pokožkou, vlasovým systémem, nehty, rty, vnějšími pohlavními orgány) nebo se zuby a sliznicemi ústní dutiny, výhradně nebo převážně za účelem jejich čištění, parfemace, změny jejich vzhledu, jejich ochrany, jejich udržování v dobrém stavu nebo úpravy tělesných pachů. [4]

1.3 Klasifikace kosmetických přípravků

1.3.1 Dle použití

Kosmetické přípravky mohou být klasifikovány podle jejich použití, což je zobrazeno v Tabulce č. 1. [1, s. 4]

Tab. 1. Klasifikace kosmetických přípravků podle jejich použití

klasifikace		hlavní produkty
pokožka	kosmetika pro péči o pleť	pleťové čistící vody a pěny, pleťové vody, krémy, masky, masážní krémy
	dekorativní kosmetika	pudry, rtěnky, tvářenky, oční stíny, oční linky, laky na nehty, odlakovače
	tělová kosmetika	mýdla, tekutá mýdla, přípravky do koupele, opalovací krémy, opalovací oleje, deodoranty, bělicí krémy, depilační krémy, repelenty
vlasy	vlasová kosmetika	šampony, vlasové kůry, barvy na vlasy, přeli
	péče o pokožku hlavy	vlasová tonika, přípravky pro růst vlasů
ústa	péče o ústní dutinu	zubní pasty, ústní vody
	vůně	parfémy, toaletní vody

Kosmetika pro péči o pleť má tři hlavní účely použití: čištění kůže, udržení přirozeného povrchu pokožky a ochranu kůže před poškozením. Dekorativní kosmetika se používá zejména na obličej, ostatní kosmetické přípravky této skupiny se pak věnují nehtům. Do tělové kosmetiky patří řada přípravků, včetně repelentů. Do skupiny péče o vlasy spadá vlasová kosmetika a péče o pokožku hlavy. Zubní pasty a ústní vody se řadí do skupiny péče o ústní dutinu. Vůně se používají především na tělo, ale někdy i na vlasy. [1, s. 4], [5, s. 31]

1.3.2 Dle formy

V posledních letech kosmetický průmysl podstatně změnil formy přípravků z důvodu snazší aplikace. Dnes se uplatňují kosmetické přípravky v následujících formách: [2, s. 77]

Roztoky (vody, tonika, lotion) jsou bezbarvé nebo zbarvené, většinou parfémované, vodné nebo vodně alkoholické roztoky, které obsahují jednu nebo více specificky účinných látek (vonné látky, humektanty atd.). Hlavní složky jsou parfémové oleje a jejich kompozice, tuky a tukovité látky, které se zavádí do přípravků pomocí rozpouštědel. Viskozita přípravků se nastavuje přidáním hydrokoloidů. Přípravky se označují buď jako vody (pleťová, po holení, vlasová) nebo tonika. [2, s. 77,78], [6, s. 4]

Další z možných forem jsou gely, emulze, suspenze, oleje, tyčinky – tužky, pasty, mýdla, roztoky tenzidů, pěny, prášky (pudry), masti, aerosoly a laky. [2, s. 78-83], [6, s. 4-9]

1.4 Pleťová voda a její obecná výroba

Pleťové vody se používají po čištění pleti za účelem odstranění stopového množství tuku nebo mýdla. Mohou sloužit také jako osvěžovače kůže. Jsou často posledním krokem před použitím hydratačního krému. Pleťová voda je obvykle určena pro normální pokožku. Obsahuje alkohol, který vykazuje mírný stahující účinek, jeho obsah nesmí být ve vysokém množství a způsobit tak pálení. Produkty s nižším obsahem alkoholu jsou určeny pro citlivou pleť, zatímco produkty s vyšším obsahem alkoholu jsou používány u mastné pleti. [7, s. 498], [8, s. 121]

Obecné složení pleťové vody:

Alkohol	20 %
Propylenglykol	5 %

polyoxyethylene oleyl ether	0,5 %	
parfém	0,2 %	
destilovaná voda	74,3 %	[7, s. 498]

Pleťové vody jsou obvykle vyráběny při pokojové teplotě. Pokud neobsahují mnoho alkoholu nebo konzervační látku, je zapotřebí zvláštní péče, aby se zabránilo kontaminaci mikroorganismy. [1, s. 330]

Nejprve se do čisté vody přidávají humektanty, pufr a zahušťovadlo. Do takto připravené vodné fáze se přidávají další látky rozpustné ve vodě. Emolienty, konzervační látky, parfémy a další složky rozpustné v etanolu nebo v oleji se přidávají k etanolu spolu se solubilizujícími činidly za vzniku alkoholové fáze. Vodná a alkoholová fáze se smíchají při pokojové teplotě. Následně se přidá barvivo pro tónovací účely a pak se směs zfiltruje, k získání průhlednosti. [1, s. 330]

V dnešní době existuje řada pleťových vod bez alkoholu. V tomto případě se složky nerozpustné ve vodě, rozpustí v humektantu za zvýšené teploty. [1, s. 330]

2 MIKROORGANIZMY V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH

V našem životním prostředí se vyskytuje obrovské množství mikroorganismů. Ve vzduchu je to $8 - 35 \cdot 10^2/\text{m}^3$, v půdě $1 \cdot 10^8 - 5 \cdot 10^{10}/\text{g}$ a na pokožce hlavy $1,4 \cdot 10^7/\text{cm}^2$. Velké množství bakterií je i na pokožce rukou a obličeje, což představuje riziko kontaminace kosmetiky při běžném používání. Mezi mikroorganismy kontaminující kosmetiku patří bakterie, nejčastěji *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Kosmetiku obsahující alkohol kontaminují kvasinky (*Candida albicans*, *Saccharomyces sp.*) a plísně (rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*). [1, s. 199, 200]

2.1 Bakterie

Bakterie patří mezi nejčastější původce infekčních onemocnění. Jsou to organizmy s prokaryotickým typem buňky, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí od 0,2 do 2 μm . Některé bakterie jsou schopny růstu při 0 °C, další při teplotách nad 100 °C, existují i bakterie rostoucí při pH 0,06 nebo při pH 12 nebo při tlaku více než 1000 atm. Obecně lze však říci, že optimální růstová teplota většiny bakterií je 25 – 37 °C a pH mírně kyselé až mírně zásadité. Tvar bakteriálních buněk je rozmanitý, většinou se jedná o koky nebo tyčinky, některé rody ale mohou mít tvar spirály, vibria nebo vláken. [1, s. 199], [9, s. 35,51], [10, s. 25], [11, s. 17], [12, s. 68], [13, s. 17], [14, s. 29], [15, s. 8]

Bakterie se také vzájemně liší svým vztahem ke kyslíku. Existují bakterie aerobní, vyžadující kyslík pro svůj růst a množení. Anaerobní bakterie kyslík netolerují, je pro ně toxický a musí být z prostředí vyloučen. Většina bakterií významných v klinické či potravinářské mikrobiologii patří mezi mikroorganismy fakultativně anaerobní, které prospívají jak v přítomnosti, tak i při nedostatku kyslíku. [9, s. 78], [10, s. 52], [16, s. 25]

Na povrchu bakteriální buňky se vyskytuje buněčná stěna, jejíž struktura rozhoduje o barvitelnosti metodou podle Grama. Buněčná stěna grampozitivních bakterií G (+) je cca 20 nm silná a tvoří ji mohutná peptidoglykanová vrstva, kterou pronikají lineární řetězce teichoových kyselin. Tyto kyseliny jsou hlavním povrchovým antigenem grampozitivních bakterií. Stěna těchto bakterií neobsahuje lipidy ani bílkoviny. Oproti tomu je buněčná stěna gramnegativních bakterií tenčí (asi 10 nm), zato složitější. Nad vrstvou peptidoglykanu je přítomna vnější membrána, obsahující lipopolysacharidy, které udávají buňce antigenní vlastnosti. Gramnegativní bakterie neobsahují kyselinu teichoovou, ale mají ve

své struktury lipidy a bílkoviny. Od druhu buněčné stěny se odvíjí odlišné vlastnosti grampozitivních a gramnegativních bakterií. Podstatným rozdílem je různá citlivost k antimikrobním látkám, přičemž vyšší citlivostí se vyznačují grampozitivní bakterie. [9, s. 51-53], [10, s. 28,29], [13, s. 21], [16, s. 24, 25], [17, s. 31-32], [18, s. 33,34], [19, s. 90], [20, s. 89], [21, s. 28], [22]

2.1.1 Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou charakterizovány jako grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující, neopouzdřené, fakultativně anaerobní sférické koky. Většina druhů patří k normální mikroflóře kůže a sliznic člověka, tudíž se lehce mohou stát zdrojem kontaminace. Některé druhy však vyvolávají různá hnisavá onemocnění, nebo mohou být příčinou toxinóz. Stafylokoky odolávají teplotě 55 °C po dobu 30 minut, vyšším koncentracím chloridu sodného a vysychání. Z pohledu patogenity má pro člověka největší význam koaguláza-pozitivní druh *Staphylococcus aureus*. [9, s. 193], [10, s. 60], [13, s. 66]

Staphylococcus aureus

S. aureus je považován za „nejúspěšnější“ lidský patogen a je původcem mnoha závažných infekcí. Druhové jméno *aureus* (latinsky „zlatý“) charakterizuje typické zbarvení kolonií způsobené produkcí zlatožlutého pigmentu. Jeho malá náročnost na kultivační prostředí mu dovoluje růst na chudých půdách. V tekutých půdách se růst projeví zákallem a vytvořením hustého sedimentu. Na pevných půdách roste v sytých pigmentových koloniích, které jsou lesklé, mazlavé a vypouklé. Tvoří řadu toxinů a enzymů, z nichž mnohé se uplatňují jako faktory virulence. Vstupní branou do těla je nejčastěji kůže, trávící a dýchací trakt. Tato bakterie má schopnost koagulovat plazmu a je jedním z nejčastějších původců hnisavých onemocnění kůže (furunkl, karbunkl, infekce ran). Ve tkáni se vytvoří uzavřený opouzdřený hnisavý zánět tzv. absces, který se buď spontánně vyprázdní, nebo chirurgicky odstraní. Dále může produkovat enterotoxin, který je odolný k trávicím šťávám v žaludku a způsobuje alimentární intoxikaci. Po požití tepelně neopracované potravin dochází k zvracení, průjmům a bolesti hlavy, s následujícím rychlým uzdravením.

Vzhledem k častému výskytu *S. aureus* na pokožce a sliznicích je přirozeně možné, že i při běžném používání kosmetického přípravku, dojde k jeho kontaminaci stafylokoky. Tato kontaminace představuje významné riziko pro spotřebitele. *S. aureus* může kontaminovat celou řadu kosmetických přípravků, oční linky, hydratační krémy, make-upy,

pleťové vody a krémy na tělo. [9, s. 194], [10, s. 121], [11, s. 66,67], [12, s. 96], [13, s. 67], [23, s. 149,151], [24, s. 30], [25, s. 31], [26, s. 24], [27, s. 3]

2.1.2 Rod *Escherichia*

Zahrnuje skupinu gramnegativních, většinou pohyblivých, nesporelujících, fakultativně anaerobních tyčinek o velikosti 0,4 – 2 μm . Jsou patogenní pro člověka, zvířata, hmyz i rostliny. Vyskytují se v kosmetických přípravcích spolu s dalšími zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, jako jsou *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, rody *Proteus* a *Klebsiella*. Tyto mikroorganismy jsou častými původci infekcí urogenitálního ústrojí. Jejich výskyt je závažný zejména v dětské kosmetice, konkrétně v zásypech a dětských olejích. Rostou na základních kultivačních půdách při optimální teplotě růstu 37 °C, ale mohou růst v rozmezí teplot 18 – 42 °C. [9, s. 261,262], [13, s. 71,72], [25, s. 48], [28, s. 4,5]

Escherichia coli

E.coli je typickou součástí střevní flóry člověka a uplatňuje se při syntéze vitamínu B a K. Může však být příčinou závažných onemocnění. Kultivačně je bakterie nenáročná, tudíž roste na základních kultivačních půdách za přístupu vzduchu. Na obyčejných půdách tvoří mírně vypouklé, lesklé kolonie. Vzhledem k schopnosti fermentovat laktózu, se k její izolaci využívají půdy s přidavkem laktózy (Endova, Mc Conkeyho), kde tvoří sytě červené kolonie s kovovým leskem. Patogenita bakterie vyvolává dva typy onemocnění: extraintestinální (infekce močových cest, ran, hnisavé procesy) a onemocnění intestinnálního traktu provázené průjmy. Močové infekce vznikají endogenně a to tak, že se z konečníku dostanou do uretry, do močového měchýře popř. do pánviček ledvin. Vzhledem k anatomii člověka, trpí těmito infekcemi spíše ženy. V trávicím ústrojí se vyskytují čtyři typy enteropatogenních kmenů. *E.coli*, způsobující průjmová onemocnění: enteropatogenní v užším slova smyslu (EPEC), enterotoxigenní (ETEC), enteroinvazivní (EIEC) a enterohemoragické (EHEC). EPEC způsobují těžké průjmy u novorozenců, ETEC vyvolávají tzv. cestovatelské průjmy (po požití kontaminované vody nebo potravy), EIEC se podobají úplavici a dochází při nich k poškození buněk tlustého střeva (stolice s příměsí krve a hlenu) a EHEC tvoří toxin, vyskytující se v tlustém střevě a postihující ledviny. *E.coli* působí také pyogenní infekce – v hodnocení frekvence výskytu bakterií v infikovaných ranách se vyskytuje hned po *Staphylococcus aureus*. Je také jedním z původců meningitidy a sepse. [5, s. 78], [9, s. 262-265], [10, s. 59], [13, s. 72,73], [23, s. 122-125], [24, s. 34], [29], [28, s. 3], [30, s. 1,12]

2.1.3 Rod *Pseudomonas*

Pseudomonády jsou gramnegativní, pohyblivé, nesporulující, aerobní tyčinky. Jsou silně rozšířeny v přírodě i v nemocničním prostředí. Přežívají ve výlevkách, odpadních vodách, slabých dezinfekčních roztocích a v malém množství ve stolici. Velká část zástupců tohoto rodu je považována za nepatogenní bakterie. V kosmetice jsou tyto bakterie nebezpečné zejména v oční kosmetice (oční krémy, řasenky), jelikož mohou vyvolat infekci očí. Nejčastěji se zde vyskytuje *Pseudomonas aeruginosa*, která může způsobovat zmíněné infekce očí nebo infekce popálenin. Vyznačují se vysokou odolností k chemickým i fyzikálním faktorům a tvorbou pigmentu. Kultivace těchto bakterií je nenáročná a optimální teplota růstu je 25 – 30 °C. [12, s. 103], [13, s. 79], [23, s. 102], [24, s. 37], [25, s. 47]

Pseudomonas aeruginosa

Označuje se jako všudypřítomná bakterie, vyskytující se zejména ve vodních zdrojích. Roste na agarových půdách, kde tvoří mazlavé kolonie s nepravidelnými okraji a perleťovým leskem. Vyznačuje se nápadnou „vůní“ (zprvu ovocná, poté amoniakálně páchne) a obvykle vyvolává infekce močových cest, způsobuje sepse, infikuje popáleniny a bér-cové vředy a je původcem infekce respiračního traktu. Často se vyskytuje v nemocničním prostředí, především na JIP, ARO a novorozeneckém oddělení, kde kontaminuje dýchací přístroje a často tak patří mezi původce nozokomiálních infekcí. K onemocnění, ale dochází především u osob s narušenou imunitou. Bakterie produkuje modrozelený pigment pyocyanin, který při onemocnění zbarvuje sekret a hnis. Vzhledem k jejímu vysokému stupni rezistence k antibiotikům, je nutné léčbu infekcí provádět dle stanovené citlivosti na antibiotika. [9, s. 246], [10, s. 121], [11, s. 86], [12, s. 103], [13, s. 79], [23, s. 102], [24, s. 37], [31, s. 8]

2.1.4 Rod *Bacillus*

Jsou grampozitivní, sporulující, aerobní tyčinky. Jeho zástupci se běžně vyskytují v přírodě, zejména v půdě. Setkáme se s nimi taky při kontaminaci živných půd, kde tvoří velké, drsné kolonie. Většina druhů je nepatogenních, výjimku tvoří *Bacillus anthracis*, který je patogenní pro člověka i zvíře. Velká řada je využívána průmyslově jako producenti antibiotik např. *Bacillus subtilis*. Společným znakem všech bacilů je tvorba endospor, které jsou vybaveny odolností k dezinfekčním činidlům, teplu a radiaci. [9, s. 227], [10, s. 60], [23, s. 159], [24, s. 43]

Bacillus subtilis

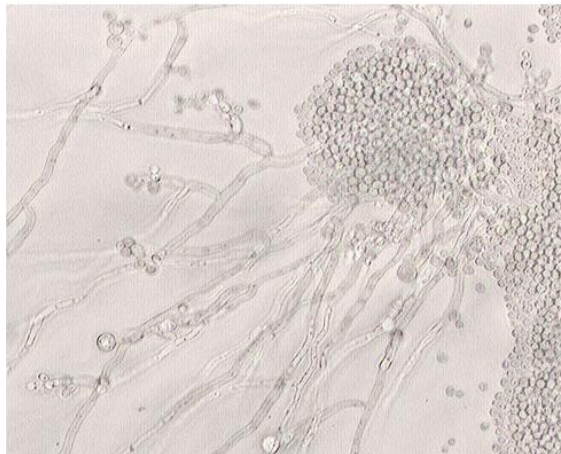
Patří mezi nejrozšířenější bacily a je téměř všudypřítomný (vzduch, hlína, stolice, voda). Roste na obyčejných půdách při teplotě 37 °C. V bujonu se projevuje sedimentem, podobající se chomáčku předeného skla. Na pevných půdách tvoří velké kolonie s plstěným vzhledem. Na krevním agaru kolem kolonií netvoří hemolýzu. Tento bacil je průmyslově využíván, jelikož je schopný produkovat antibiotika. Může vyvolat onemocnění člověka – bakteriemi, otravu z potravin, infekci respiračního traktu a sepsi. Oční kosmetika a nevhodně konzervované systémy mohou dovolit bacilu přežít, klíčit a aktivně se množit. [9, s. 227, 229], [10, s. 121], [18, s. 270], [23, s. 159, 160], [32, s. 358]

2.2 Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní, eukaryotické mikroorganismy, které se množí převážně pučením. Spolu s plísněmi se řadí mezi houby. Vyskytují se zejména v teplém a vlhkém prostředí, což znamená vlhké ručníky, kartáčky na zuby a ruce, houby na mytí nádobí atd. V kosmetických přípravcích jsou přítomné zejména v oční kosmetice. Název se pojí s jejich schopností zkvašovat monosacharidy, popř. disacharidy a trisacharidy na etanol a oxid uhličitý. Nejčastější tvar je krátce elipsoidní, případně kulovitý až vejčitý. Velikost buněk bývá okolo 10 µm a šířka těchto buněk je většinou 3 – 6 µm. Většina kvasinek je fakultativně anaerobních, avšak při anaerobní kultivaci je potřeba stopová dávka kyslíku. Rostou v kyselém pH (4,0 – 6,5) a optimální teplota jejich růstu je 25 – 30 °C. Při kultivaci na pevném médiu, se kvasinky podobají bakteriálním koloniím. Některé z nich mají velký průmyslový význam (výroba piva, vína), jiné mohou vyvolávat onemocnění kůže, podkoží nebo dokonce systémová onemocnění. Tyto mikroorganismy vyvolávají u člověka mykózy. Infekce mohou probíhat buď povrchově, což znamená postihnutí kůže, vlasů, nehtů a sliznice, nebo způsobují infekce hluboké, které mohou zasáhnout orgány. Nejčastěji se vyskytují u osob s oslabeným imunitním systémem, u diabetiků, u lidí se zubními náhradami, dále postihují pacienty dlouhodobě upoutané na lůžko a osoby s nedostatečnou hygienou. Prvořadými původci povrchových i systémových endogenních onemocnění jsou mikroorganismy rodu *Candida*, konkrétně *C. albicans*. [1, s. 199], [9, s. 354], [11, s. 169], [12, s. 80], [13, s. 30, 31], [16, s. 45], [17, s. 45], [18, s. 57], [25, s. 50], [33, s. 20], [34, s. 88], [35, s. 7, 8], [36, s. 13], [37, s. 5]

2.2.1 *Candida albicans*

C. albicans (Obr. 1.) je aerobní mikroorganismus, který roste při 37 i 20 °C. Kultivuje se na Sabouraudově agaru, kde za 24 – 48 hodin vytváří smetanově bílé kolonie, řídké konzistence, s typickým kvasinkovým pachem. Starší kolonie se vyznačují pachem sýra. Projevuje se převážně jako patogenní houba. V menším množství se vyskytuje jako komenzál na kůži a sliznicích avšak za daných podmínek (teplo, vlhko, macerace, porušení kožního povrchu, změny pH, antibiotika,...) dochází ke zvýšení virulence, jejíž následek je invaze kvasinek do tkáně. Vznikají tak ústní a genitální infekce, šupinaté ekzémy, svědění kůže a afty. Může se šířit i hematogenní cestou, čímž postihuje plíce, gastrointestinální trakt a ledviny. [9, s. 352, 354], [11, s. 170], [12, s. 114, 115], [13, s. 98], [23, s. 271, 272], [35, s. 76], [38, s. 6]



Obr. 1. *Candida albicans* [39]

2.2.2 Rod *Saccharomyces*

Tento rod je technologicky nejdůležitější, jelikož je schopen zkvašovat několik druhů cukrů. Buňky mají elipsoidní, vejčitý nebo protáhlý tvar. Nejvýznamnější je *S.cerevisiae*, jejíž čistá kultura se využívá k výrobě piva, vína a jiných alkoholických nápojů a pekařského droždí. [18, s. 295], [34, s. 144]

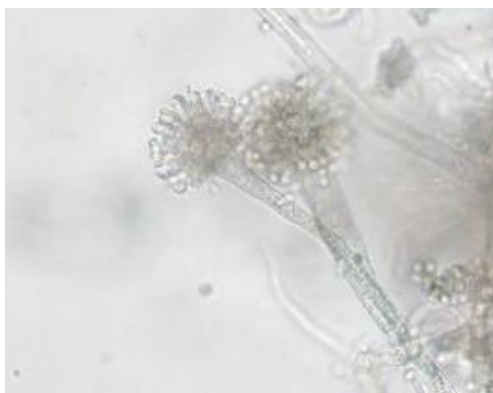
2.3 Plísně

Jsou to mnohobuněčné, eukaryotické, heterotrofní a aerobní mikroorganismy, které se rozmnožují pohlavně nebo nepohlavně. Jsou součástí živé přírody a plní roli destruentů při rozkladu organické hmoty. Vyskytují se ve tvaru vláken (hyf), které se zpravidla větví a splétají v podhoubí (mycelium). Část mycelia vyrůstá nad povrchem a část vrůstá do

substrátu, z kterého čerpá nutriční látky. Mají mnoho specializovaných struktur, které mají specifické funkce. Jejich optimální růstová teplota je 20 – 30 °C a pH 4,5 – 5,5. Některé druhy způsobují u člověka plísňová onemocnění kůže, vlasů a nehtů. [1, s. 199], [11, s. 169], [13, s. 30], [16, s. 45], [17, s. 61], [23, s. 269], [33, s. 20], [40, s. 95]

2.3.1 Rod *Aspergillus* (kropidlák)

Rostou dobře na různých typech půdy, v širokém teplotním rozmezí za 2 – 4 dny. Houby tvoří chmýřité kolonie zbarvené dle barvy mikrokonidií (žlutě, modrozeleně, šedozeleně, černě), někdy tvoří sametový povlak (Obr. 2.). Vyskytují se v prostředí, tudíž se na člověka většinou přenesou vzdušnou čarou, inhalací mikrokonidie. Způsobují závažná onemocnění, zvaná aspergilóza, která postihuje plíce, uši a centrální nervový systém. Infekce jsou mnohdy nozokomiálního charakteru a ohroženi jsou především pacienti s oslabenou imunitou. Zdrojem infekce mohou být stavební práce, ventilátory, koberce, ptačí trus. Některé kmeny tvoří mykotoxiny, které jsou karcinogenní a mohou se vyskytovat v burských oříškách, hrachu, ovoci nebo v celozrnné mouce. [9, s. 356, 357], [18, s. 98], [11, s. 172], [12, s. 115, 116], [23, s. 270-274], [34, s. 26,27]



Obr. 2. *Aspergillus* [41]

2.4 Činnost mikroorganismů v kosmetických přípravcích

Kromě zdravotního rizika, mohou mikroorganismy způsobovat nežádoucí změny kosmetických přípravků, mezi které patří:

- změna barvy a vzhledu
- změna vůně
- změna pH
- pokles viskozity

- zákal a zeslizovatění
- snížení stability emulzí, rozklad emulgátorů
- žluknutí
- tvorba plynu
- rozklad konzervačních látek (rod *Pseudomonas*) [42, s. 10]

Lipolytické účinky, což znamená schopnost hydrolytického rozkladu tuku na glycerol a volné mastné kyseliny mají především rody *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia* a některé kvasinky a plísně. Proteolytické účinky má rod *Pseudomonas* a *Bacillus*. Některé druhy plísní způsobují oxidativní změny, při kterých vznikají oxokyseliny, peroxidy, aldehydy a ketony. [42, s. 10]

2.5 Mikrobiologie kosmetických přípravků

Mnohé kosmetické přípravky vyžadují mikrobiologickou kontrolu, která má upozornit na nedostatky výrobků. Jedná se především o pleťové krémy, pleťová mléka, pudry, zásypy, zubní pasty, rtěnky a pleťové masky. Množství mikroorganismů je výsledkem toho, jaká pozornost byla věnována hygienickému hledisku při výrobě přípravků. Snahou výrobce je tedy minimalizovat výskyt nežádoucích mikroorganismů. Přestože kosmetické přípravky nemají příznivé podmínky pro růst mikroorganismů, mohou výrobky obsahovat až milióny mikroorganismů v 1 g. [43, s. 110]

2.5.1 Pleťové krémy a pleťová mléka

Tyto výrobky jsou poměrně vhodným prostředím pro rozvoj bakterií, kvasinek a plísní. Kontaminace plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium* se projevuje na povrchu krému, ve formě různě barevných skvrn (zelenavé, žlutavé, hnědočerné), prostupujících do hlubších vrstev. Tím je výrobek v poměrně krátké době znehodnocen. Při zjišťování celkového počtu mikrobů u kosmetických přípravků, se používá zpravidla masopeptonový agar. U zjišťování bakterií skupiny *coli-aerogenes* je využíváno Endova agaru nebo agaru s trypaflavinem a bromtymolovou modří. Hemolytické mikroby se zjišťují na krevním agaru a sladidového agaru se využívá u kvasinek a plísní. V pleťových krémech a pleťových mlékách nízké jakosti bylo zjištěno 10 000 mikrobů v 1 g, 1000 kvasinek a 500 plísní. V některých případech byla odhalena přítomnost *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Pokud by došlo ke kontaminaci patogenních mikroorganismů, výrobek se musí pozastavit. [43, s. 110]

2.5.2 Pudry a zásypy

K výrobě pudrů a zásypů se často používají suroviny, které jsou zdrojem MO. Jsou zde přítomny bakterie, kvasinky i plísně, a to v množství několika desítek tisíc v 1 g. Pokud obsahuje výrobek přes 500 kvasinek v 1 g a plísní přes 100 v 1 g, jsou tyto počty indikátorem nevhodně nastavených výrobních procesů. V zásypech se vyskytují i hnilobné bakterie, kterým je potřeba věnovat zvýšenou pozornost. [43, s. 111]

2.5.3 Zubní pasty

V zubní pastě bývají nejčastěji přítomny bakterie, méně kvasinky a plísně. Větší množství MO svědčí o hygienických nedostatcích při výrobě. [43, s. 111]

2.5.4 Rtěnky

U rtěnek zpravidla nedochází k mikrobiologickým závadám. Vyskytne-li se nějaký MO na rtěnkách, jde většinou o povrchovou plíseň. [43, s. 111]

2.5.5 Kolínské vody a parfémy

Z důvodu přítomnosti vysoké koncentrace etanolu jsou tyto výrobky mikrobiologicky nezávadné. [43, s. 111]

3 HYGIENICKÁ PRAVIDLA VÝROBNÍHO ZÁVODU

Kosmetický přípravek nesmí představovat riziko ohrožení zdraví spotřebitele v důsledku přítomnosti mikroorganismů. Hlavním cílem hygienického programu výrobního provozu je mikrobiální kontrola. Má zásadní význam pro ochranu surovin, výrobní proces a finální výrobek. Existuje osm faktorů ovlivňující mikrobiální prostředí závodu. První skupinu tvoří tři pracovní faktory: čistící a sanitární postupy, osobní hygiena zaměstnanců a manipulace se surovinami. Druhá skupina se skládá z pěti technických faktorů, mezi které spadá: sanitace přístrojů, zařízení, skladu, vody a vzduchového systému. Každý z těchto faktorů funguje jako součást kompletní sanitace. Pokud dojde k nedodržení některého z faktorů, materiál nebo výrobek se stává náchylný ke kontaminaci. [10, s. 74], [44, s. 32]

Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující výběr a použití dezinfekční látky patří vlastnosti MO, na který má dezinfekční látka působit, z důvodu různé citlivosti MO k antimikrobním látkám. Dalším faktorem jsou podmínky, za kterých je látka použita (teplota, koncentrace, doba působení látky). Neopomenutelná je rovněž povaha materiálu, na který látka působí. [17, s. 115, 116]

Mezi hlavní skupiny dezinfekčních prostředků se řadí halogeny, kyseliny, oxidační prostředky, louhy, sloučeniny těžkých kovů, alkoholy, aldehydy, tenzidy a cyklické sloučeniny. [11, s. 48, 49], [13, s. 215-219], [33, s. 92-94], [45, s. 31-36], [46, s. 125-126]

Dezinfekce je složitý proces, jehož průběh může ovlivňovat mnoho vnitřních i vnějších faktorů. Proto se obecně doporučuje zachovat dvouetapový postup, což znamená, že dezinfekci by měla předcházet mechanická očista. [10, s. 77], [33, s. 90]

4 KONTAMINACE KOSMETICKÉHO PROSTŘEDKU

Kosmetické přípravky se mohou vyrábět a prodávat jen za předpokladu, že nejsou kontaminovány patogenními mikroorganismy, jelikož při užívání přichází do styku s pokožkou popřípadě se sliznicemi. Avšak i v případě, že mikroorganismy nejsou patogenní, kontaminace je nevhodná jak ze strany uživatele, tak ze strany výrobce. Vyplývá z toho totiž, že výrobní proces proběhl nehygienicky, tudíž došlo k zhoršení kvality výrobku. Výsledkem mikrobiální kontaminace je pak nežádoucí změna vlastností kosmetického prostředku (změna barvy, vůně, viskozity, účinku), způsobená mikrobiálním rozkladem složek kosmetického prostředku a produkcí metabolitů. Dalším nežádoucím výsledkem může být zdravotní riziko, v případě kosmetických prostředků jsou to zejména kožní infekce rukou a očí. [1, s. 200], [25, s. 44]

4.1 Primární a sekundární kontaminace

Kosmetické produkty mohou být kontaminovány dvěma způsoby. Pokud došlo ke kontaminaci mikroorganismy během výroby, nazýváme tuto kontaminaci jako primární. Kontaminace vznikající během používání výrobku spotřebitelem se označuje jako sekundární kontaminace. Zatímco zdrojem primární kontaminace je nejčastěji voda použitá při výrobě a mikroorganismy v ní přítomné (především gramnegativní tyčinky), sekundární kontaminace pochází z bakterií z rukou a z prostředí (grampozitivní koky a grampozitivní tyčinky). K zabránění kontaminace vznikající při výrobě a plnění, je nutné zajistit čisté pracovní prostředí, instalaci prachových filtrů do ventilačního systému, instalaci odvlhčovačů, sterilizaci vody teplem a UV zářením, sterilizaci surovin a školení zaměstnanců o hygieně práce. [1, s. 200], [47, s. 4]

Každá země má své vlastní normy pro povolený počet bakterií ve finálním výrobku. Například v Americe je povolen počet živých bakterií v 1 g výrobku méně než 500, oproti tomu v Japonsku počet bakterií v 1 g nesmí překročit hodnotu 1000. V obou zemích jsou však patogenní mikroorganismy nepřijatelné. [1, s. 200]

4.2 Zdroje mikrobiální kontaminace

Suroviny, přičemž z přírodních zdrojů hrozí vyšší riziko kontaminace než ze syntetických surovin, které bývají mikrobiálně „čisté“.

Voda, která je frekventovaným zdrojem kontaminace a to především díky koliformním bakteriím a pseudomonádám.

Lidské zdroje, kde při běžném denním používání spotřebitelem dochází ke kontaminaci mikroflórou kůže. Při automatizaci výroby se snižuje přímý kontakt pracovníků s výrobkem.

Strojní zařízení a prostředí výroby, kde je nutná dezinfekce a čištění.

Mezi zdroje mikrobiální kontaminace jsou řazeny i *obaly a výrobní prostředí*. [25, s. 45], [48, s. 6]

4.3 Správná výrobní praxe

Primární kontaminaci lze předejít striktním dodržováním „správné výrobní praxe“ (GMP). Úkolem tohoto standardu, obecně známého jako GMP, je zajistit finálním výrobkům adekvátní kvalitu. To se týká všech aspektů v rámci příjmu a skladování suroviny přes fázi výrobního procesu až po přepravu hotového výrobku. Spadá zde také kontrola vzduchu, vhodné konstrukce a vybavení budov a školení personálu. Pokud výrobce nespĺňuje podmínky GMP, produkt se pro spotřebitele stává nepřijatelným. [1, s. 200-206], [45, s. 395], [49, s. 81]

Aby výrobek nebyl primárně kontaminován, měl by být vyroben v hygienickém prostředí, za hygienických postupů. Mezi způsoby zajištění hygienického výrobního prostředí řadíme:

- Využití filtrů k odstranění prachu – jeden gram prachu může obsahovat až milion mikrobů
- Provádění odvlhčování vzduchu – ve vlhkém vzduchu přežívá velký počet gram-negativních bakterií
- Použití filtrů HEPA, které poskytují velmi vysoký stupeň čistoty
- Nainstalování dvojíých dveří nebo přetlakového systému, které zamezí vstupu neošetřenému vzduchu do místnosti [1, s. 207]

K dalším nezbytnostem patří poučení o pracovních postupech, s důrazem na následující:

- Přítomnost obrovského množství bakterií na prstech a jak je odstranit
- Teorie a praxe sterilizačních metod (sušení, UV, chemikálie,...)

- Způsoby odstraňování prachu a mikroorganismů z pracovních oděvů, obuvi atd. [1, s. 207]

Za účelem zvýšení přesnosti, byl zaveden pojem „validace“. Tento pojem definuje, že nestačí jen zavést GMP, ale procesy a postupy musí být vhodně navrženy, vědecky podloženy a systematicky kontrolovány, aby se zjistilo, zda bylo dosaženo vytyčených cílů. [1, s. 207], [50, s. 91]

4.4 Ochrana výrobku proti růstu mikroorganismů

Existují různé způsoby, jak výrobek před růstem mikroorganismů ochránit. Jeden z nejběžnějších způsobů je přidání antimikrobiální látky. Dále se využívá sterilní nebo aseptické výroby a plnění do obalových materiálů, což zabraňuje mikrobiální kontaminaci během skladování a používání. V neposlední řadě se využívá snížení aktivity vody v kosmetickém přípravku. [51, s. 163]

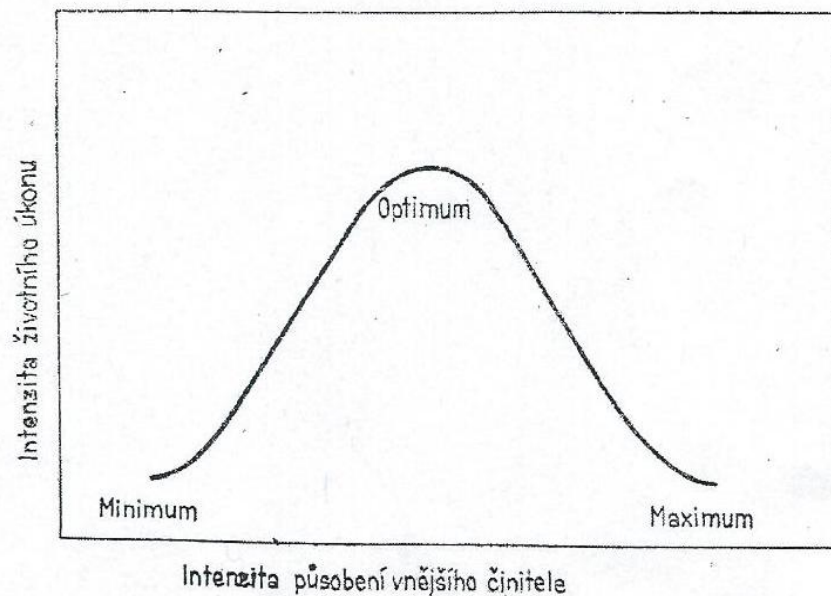
4.5 Mikrobiální limity

Současným trendem je vyžadovat kvantitativní mikrobiální limity. Mezi hlavní hygienická kritéria patří:

- Mikrobiální limity pro finální produkty. Maximálně 1000 organismů/g nebo v 1 ml, absence *Staphylococcus aureus*, *enterobakterie*, *Candida albicans* a *Pseudomonas aeruginosa* v jednom gramu nebo mililitru výrobku. Výjimku tvoří přípravky pro péči o dítě, přípravky určené k oční aplikaci a výrobky pro intimní hygienu, kde maximum tvoří 100 organismů/g nebo ml a absence *Staphylococcus aureus*, *enterobakterie*, *Candida albicans* a *Pseudomonas aeruginosa* v jednom gramu nebo mililitru výrobku.
- Mikrobiální limity pro suroviny. Maximum 100 organismů/g nebo ml a absence *Staphylococcus aureus*, *enterobakterie*, *Candida albicans* a *Pseudomonas aeruginosa* v jednom gramu nebo mililitru výrobku. [51, s. 783], [52, s. 7], [53]

5 VLIVY VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ NA MIKROORGANIZMY

Životní aktivita, růst a množení mikroorganismů jsou závislé na podmínkách vnějšího prostředí. K rozmnožování mikroorganismů je potřeba dostatečné množství živin, energie a vhodné fyzikální, chemické a biologické podmínky. Mikroorganismy jsou k působení těchto faktorů velmi citlivé a rychle na ně reagují. Vliv faktorů vnějšího prostředí může působit buď příznivě, což se využívá k urychlení růstu či k zvýšení metabolické aktivity, nebo nepříznivě. Pokud působí faktor negativně, projeví se to snížením počtu buněk, zastavením jejich dělení nebo odumřením. Na obrázku č. 3 je zobrazena charakteristická křivka s výrazným minimálním, optimálním a maximálním bodem působení faktorů vnějšího prostředí. Minimální účinek faktoru lze vztahovat k začátku růstu a zahájení metabolických procesů, tudíž koncentrace faktoru má téměř zanedbatelný vliv na aktivitu buňky. Při optimálním působení odpovídá mikroorganismus maximální rychlosti růstu, popřípadě nejvyšší metabolickou aktivitou. V bodě maximálního působení dochází k zastavení metabolických procesů a odumírání buněk. [17, s. 102, 103], [54, s. 48, 50]



Obr. 3. Působení vnějších činitelů na bakterie [17, s. 102]

Mikroorganismy mají také schopnost adaptace k vnějšímu prostředí, což znamená přizpůsobení vnějším podmínkám změnou enzymového vybavení nebo změnou složení a tvaru buněk. [17, s. 102]

5.1 Podmínky ovlivňující účinek vnějších faktorů

- Povaha a intenzita působení faktoru. Většina fyzikálních a chemických faktorů, oproti antibiotikům, postihuje téměř všechny bakterie. Čím intenzivněji působí fyzikální faktory, příp. čím koncentrovanější je chemikálie, tím rychleji jsou mikroby zlikvidovány (závislost není lineární).
- Povaha a fyziologický stav organismu. Mladé buňky a buňky ve vegetativní formě jsou výrazněji citlivější než staré buňky a buňky v klidové formě.
- Doba působení. Čím déle faktor působí, tím více jsou mikroorganismy likvidovány.
- Povaha prostředí. Účinek faktoru může být zeslaben (př. silně viskózní prostředí) nebo zesílen (př. změna pH) povahou prostředí. [17, s. 103, 104], [55, s. 198]

5.2 Mechanismus účinku vnějších faktorů

Působení negativních faktorů vede k poškození životně důležitých systémů, které může vést až k hynutí buněk. Může docházet k poškození buněčné stěny, k poškození cytoplazmatické membrány a narušení její permeability, k inhibici enzymatické aktivity, k zastavení procesů biosyntézy, ke změně struktury a vlastností cytoplazmy a k poškození genetického materiálu (působením mutagenů). [54, s. 50]

5.3 Faktory vnějšího prostředí

5.3.1 Teplota

Teplota prostředí je jedním z nejvýznamnějších činitelů ovlivňujících životní pochody mikrobiálních buněk a rychlost jejich rozmnožování. Bakterie mohou obecně růst od -10 do 90 °C. Rozlišují se tři základní teploty: minimální teplota, která udává nejnižší teplotu, při které má MO schopnost se rozmnožovat, optimální teplotu, kde se rozmnožuje nejvyšší rychlostí a teplotu maximální, což je nejvyšší teplota, při které se daný druh rozmnožuje. Podle vztahu k teplotě se mikroorganismy člení do tří skupin: psychrofilní, mezofilní a termofilní. Psychrofilní bakterie mají optimum růstu pod 20 °C a poměrně rychle rostou v rozmezí 0 – 5 °C. Některé plísňe jsou schopny pomalého růstu ještě při teplotách -5 °C. Psychrotrofní mikroorganismy jsou takové, které se rozmnožují při teplotách 0 – 10 °C bez ohledu na jejich optimální teplotu. Optimum růstu u mezofilních bakterií je 20 – 40 °C, přičemž u bakterií je to nejčastěji 37 °C, u kvasinek a plísňí pak

kolem 30 °C. Termofilní mikroorganismy mají optimální teplotu růstu nad 45 °C, avšak pro většinu je optimální teplota 50 – 60 °C. Existují i výjimky, které rostou při teplotě 80 °C nebo dokonce nad 100 °C. [9, s. 86], [17, s. 105], [18, s. 165-168]

Smrtící účinky vysokých teplot se nazývají smrtící (letální) teplotou. Ta vyjadřuje nejnižší teplotu, při které jsou MO usmrceny během určité doby. Krátkodobé zvýšení teploty nad maximální teplotu vyvolává teplotní šok. Obecně lze říci, že teplota přesahující hodnotu maximální teploty usmrcuje MO, pokud působí dostatečně dlouhou dobu. Proběhne zde nevratná denaturace životně důležitých enzymů. Naopak při nižších teplotách než minimálních teplotách růstu, přežívá většina MO poměrně dlouho. Jsou-li však přeneseny z optimální teploty na teplotu okolo 0 °C, dochází k tzv. chladovému šoku, projevující se ztrátou životnosti velké části populace. Zvláště nepříznivě působí pomalé snižování teploty pod 0 °C, jelikož při něm vznikají velké ledové krystalky, které buňku poškozují a usmrcují ji. Naopak rychlé zmrazení na teploty -30 až -90 °C uchová většinu buněk životaschopných, neboť se vytváří jen malé krystalky ledu, které nemají tak škodlivý účinek. Ke konzervačním postupům patří rychlé zmrazení buněk MO v roztoku peptonu nebo bílkovin s následnou sublimací vody. Tím vzniknou lyofilizované kultury se životností několika let. Je třeba si uvědomit, že zmrazením potravin nedochází k usmrcení MO, pouze k zastavení jejich činnosti. [17, s. 106], [52, s. 69], [54, s. 201, 202]

5.3.2 Vodní aktivita

Voda představuje nezbytnou složku buněčné hmoty a představuje prostředí, ve kterém probíhají veškeré chemické reakce. Jelikož nedisociované molekuly vody mohou volně difundovat cytoplazmatickou membránou, k jejímu udržení uvnitř buňky a k zachování metabolismu, musí být dostatečné množství vody i ve vnějším prostředí. Stupeň dostupnosti vody se označuje jako vodní aktivita a_w . Vodní aktivita je rovna poměru tlaku vodních par nad tímto roztokem k tlaku vodních par nad destilovanou vodou, za stejných podmínek. Dosahuje hodnot od 0 do 1, přičemž čistá voda má vodní aktivitu 1, mořská voda 0,98. Z toho vyplývá, že čím vyšší je koncentrace rozpuštěných látek, tím nižší je vodní aktivita. Většina bakterií je schopna se rozmnožovat při vodní aktivitě 0,99 až 0,93. Některé se však rozmnožují za nízkých vodních aktivit 0,65 – 0,63 a při vysokých koncentracích NaCl (20 – 25 %) a nazývají se halofilní MO. Minimální a_w u kvasinek je nižší než u většiny bakterií a pohybuje se od 0,91 do 0,88. Existují tzv. osmotolerantní kvasinky, které jsou schopny se rozmnožovat i při $a_w = 0,73$. Plísně se nejčastěji rozmnožují za

nižší vodní aktivity než bakterie a kvasinky. Jako osmofilní plísně jsou nazývány takové druhy, u nichž je dolní limit $a_w = 0,60$. [17, s. 107], [18, s. 175], [54, s. 204]

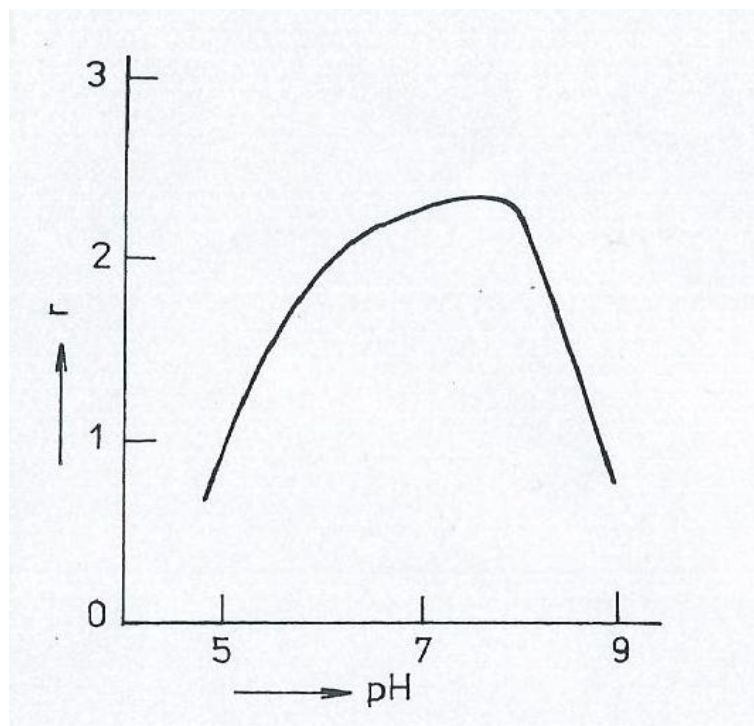
Snížením vodní aktivity prostředí se dá zabránit činnosti MO. Tohoto stavu lze dosáhnout dvěma způsoby: odstraněním vody sušením nebo odpařením a zvýšením koncentrace rozpuštěných látek v prostředí s přidavkem vhodných chemikálií. Mezi chemikálie vhodné pro snížení vodní aktivity se řadí sacharóza nebo chlorid sodný. [17, s. 108], [18, s. 176], [54, s. 204]

5.3.3 pH prostředí

Koncentrace protonů vodíku v prostředí vysoce ovlivňuje růst i biochemickou činnost MO. Bakterie jsou schopny se rozmnožovat pouze v úzkém rozsahu pH, oproti většině plísní, u kterých je rozmezí širší. Příliš nízké nebo naopak příliš vysoké pH MO usmrcuje. Důvodem je inhibice enzymů a transportních bílkovin nebo poškození cytoplazmatické membrány. MO se dělí na alkalifilní, které rostou v zásaditém prostředí a na acidofilní, vyžadující kyselé prostředí. V neutrálním až slabě kyselém prostředí roste většina bakterií. Výjimku tvoří střevní bakterie, které přežívají extrémní pH. Na obrázku č. 4 je zobrazena závislost rychlosti růstu bakterie *E. coli* na pH prostředí. Kvasinky rostou v kyselém prostředí, přičemž optimální pH se pohybuje v rozmezí 4,2 – 5,5. Plísně vyžadují neutrální pH, avšak jejich pH k rozmnožování je velmi široké. pH prostředí ovlivňuje i odolnost buněk ke zvýšeným teplotám, například u rodů *Bacillus* a *Clostridium* neklíčí spory v kyselém pH. Hodnota pH může ovlivňovat:

- Rozmnožování bakterií
- Růst bakterií a jejich vitalitu
- Intenzitu a charakter metabolismu
- Odolnost buněk ke zvýšeným teplotám
- Kyselé pH zabraňuje klíčení spór

Vliv má nejenom hodnota pH, ale i druh kyselin, které se na snížení pH podílí. [17, s. 112, 113], [18, s. 172, 173], [54, s. 204], [56]



Obr. 4. Vliv pH na růst *E. coli* [18, s. 173]

6 KONZERVAČNÍ LÁTKY

I přesto, že se při výrobě kosmetických přípravků dbá na to, aby finální výrobek byl co nejméně kontaminován mikroorganismy, doporučuje se do kosmetických přípravků zabudovat konzervační látku. Ta zabraňuje rozmnožení eventuelně přítomných mikroorganismů a zaručuje, že je přípravek bezpečný a z mikrobiologického hlediska naprosto nezávadný. Obecně platí, že obsah konzervantu je poměrně nízký v poměru k ostatním složkám. [1, s. 201], [2, s. 44], [57, s. 3]

Podle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 je konzervační přísadou látka, která je výhradně nebo převážně určena k potlačení růstu mikroorganismů v kosmetickém přípravku. [4]

Ochrana kosmetického přípravku je velmi obtížný a složitý úkol. Přípravek musí být chráněn od okamžiku výroby až do uplynutí expirační doby. Proto je důležité stabilizovat výrobky, zabránit změnám při delším skladování a při změnách různých klimatických podmínek. V každém výrobku existuje mnoho změn, které mohou nastat. Emulzní produkty mohou měnit viskozitu, čisticí produkty se mohou zakalit. Dále může docházet ke změně barvy a vůně nebo ke žluknutí přítomných olejů. Výrobce tedy musí předvídat, k jakým změnám by mohlo docházet a podle toho formulovat daný výrobek. [40, s. 92]

Každá formulace se liší, tudíž se ke každému výrobku musí přistupovat individuálně. Faktory, které jsou třeba zvážit pro výběr konzervační látky:

- Fyzikální forma produktu (emulze, gel, aerosol, mast,...)
- Balení (kov, plast, sklo, lepenka)
- Zda může být výrobek, při použití spotřebitelem, kontaminován mikroorganismy
- Zda může být výrobek zničený, pokud přijde do kontaktu s některým z běžných mikroorganismů
- Zda jsou ve výrobku materiály, které by mohly inaktivovat konzervační látku
- Jaký je stupeň čistoty surovin pro výrobu kosmetického přípravku
- Zda je možné, že při výrobě a obalových technikách dojde k mikrobiální kontaminaci
- Zda bude daný výrobek vystaven světlu, změnám teploty, kolísání vlhkosti

[40, s. 93]

Ne všechny konzervační látky mohou být přidány do kosmetiky, některé mají nežádoucí vlastnosti. Ideální konzervační látka by měla být účinná proti širokému spektru mikroorganismů, měla by působit v širokém rozmezí pH a při nízkých koncentracích. Důležitá je i kompatibilita s ostatními složkami výrobku, bezpečnost a životnost. Konzervační látka by měla být snadno použitelná a její obsah lehce stanovitelný. [1, s. 202], [40, s. 94], [58, s. 9], [59, s. 58], [60, s. 1]

Použití dvou nebo více konzervačních látek je účinnější než použití pouze jedné konzervační látky. [61, s. 131], [60, s. 1]

Existují tři hlavní mechanismy účinku konzervantů: ztráta permeability cytoplazmatické membrány (následuje uvolnění důležitých látek z buňky a narušení produkce energie), inaktivace esenciálních enzymů a destrukce nukleových kyselin. [42, s. 33]

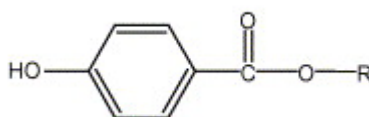
Hlavní obavou, a to u všech výrobků určených pro použití na lidské tělo, je možná iritace kůže. Může tedy vzniknout alergická reakce na konzervační látku. Vzhledem k masovému používání různých kosmetických prostředků je kontakt spotřebitele s určitou konzervační látkou velmi častý, což zvyšuje riziko kontaktních dermatitid. [40, s. 134], [62, s. 49]

6.1 Kyselina benzoová a kyselina sorbová

Organické kyseliny jsou jako jediné konzervační látky povoleny pro použití v biokosmetice. Kyselina benzoová je účinná především na bakterie, ale i na kvasinky a plísně. Používá se v koncentraci 0,05 – 0,1%. Je rozpustná v tucích a její účinnost je při pH 3 – 5. K její inaktivaci dochází při vyšším pH. Kyselina sorbová je rozpustná v tucích a má účinnost v pH 4 – 5,5 (slabě účinná do pH 9). Působí proti kvasinkám a plísním, je slabě účinná proti bakteriím. K inaktivaci dochází při vysokých hodnotách pH a při UV záření. Maximální teplota během zpracování by měla být u obou kyselin nižší než 80 °C. [2, s. 45], [42, s. 34], [58, s. 21, 22], [63, s. 5, 6], [64, s. 72], [65, s. 13], [66, s. 20]

6.2 Parabeny

Parabeny jsou estery kyseliny 4-hydroxybenzoové – methylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP) a butylparaben (BP). Na obrázku 5 je chemická struktura parabenů, kde R=methyl (CH₃), ethyl (C₂H₅), propyl (C₃H₇) a butyl (C₄H₉). [22]



Obr. 5. Chemická struktura parabenů [22]

Patří mezi široce používané konzervační přísady v kosmetice, potravinách a farmaceutických výrobcích. Jejich antimikrobiální aktivita je vyšší proti mikroskopickým houbám než proti bakteriím. Spadají do skupiny lipofilních konzervantů a ve formě solí jsou rozpustné ve vodě. Nedávno se objevily zprávy o škodlivých účincích parabenů na lidské zdraví. Studie však ukazují, že parabeny jsou prakticky netoxické a jejich karcinogenní potenciál nebyl potvrzen. Parabeny se nachází ve všech typech kosmetických přípravků (krémy, rtěnky, mýdla, šampony, make-upy, depilační přípravky, vody po holení) a to buď jednotlivě nebo ve formě tzv. parabenového mixu. Nejčteněji se v kosmetických přípravcích vyskytuje methylparaben, po něm propylparaben, ethylparaben a nejméně se vyskytuje butylparaben. Povolený limit pro použití v kosmetice je 0,8 %. V čisté formě jsou parabeny malé bezbarvé krystaly nebo krystalický prášek, bez znatelného oděru nebo chuti. Neprodukují zabarvení ani nekalí finální výrobek. Jejich všeobecný přehled fyzikálně-chemických vlastností se nachází v tabulce 2.

Tab. 2. Fyzikálně-chemické vlastnosti parabenů [22]

Vlastnosti	Methyl	Ethyl	Propyl	Butyl
Chemický vzorec	C ₈ H ₈ O ₃	C ₉ H ₁₀ O ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	C ₁₁ H ₁₄ O ₃
Molekulová hmotnost	152,16	166,18	180,21	194,23
Bod tání (°C)	131	116-118	96-98	68-69
Bod varu (°C)	270-280	297-298	-	-
index lomu	1,525	1,505	1,505	-
p K	8,17	8,22	8,35	8,37

Parabeny se připravují esterifikací *p*-hydroxybenzoové kyseliny s odpovídajícím alkoholem, za přítomnosti kyselého katalyzátoru.

Popularita použití parabenů jako konzervačních látek vychází z jejich pozitivních vlastností, jako je široké antimikrobiální spektrum, relativně nízká toxicita, stabilita, účinnost v širokém rozmezí pH (4,5 – 7,5), biologická rozložitelnost a nízké náklady. Mezi nevýhody patří inaktivace povrchově aktivními látkami. Hydrofilita parabenů roste od butylparabenu po methylparaben. Parabeny jsou antimikrobiálně aktivní na grampozitivní bakterie, plísňe a kvasinky. Jejich účinnost je vyšší při pH < 7 než při pH nad 7. [22], [58, s. 14-17], [60, s. 1], [64, s. 8-14], [66, s. 21], [67, s. 35,46], [68, s. 3], [69, s. 6,8]

6.3 Hodnocení účinnosti konzervace kosmetických přípravků

Jelikož je kosmetický přípravek směsí mnoha složek, může dojít k inaktivaci konzervační látky. Oleje s nízkou polaritou a povrchově aktivní látky s nízkou hodnotou HLB jsou látky s malým inaktivačním účinkem. Naopak oleje s vysokou polaritou a povrchově aktivní látky s vysokou hodnotou HLB jsou složky s výrazným účinkem na inhibici konzervantů. Účinnost kosmetického přípravku se ověřuje již ve stádiu vývoje výrobku, nebo před uvedením na trh, pomocí standardních zátěžových neboli přežívacích testů. Zkouška není požadována u kosmetických výrobků, u nichž bylo mikrobiologické riziko určeno jako nízké. [1, s. 206], [70], [71, s. 7]

Testování zahrnuje několik kroků: příprava vzorku KP, výběr MO vhodných pro testování, inokulace produktu MO, inkubace produktu, stanovení počtu přežívajících MO a srovnání dosažených výsledků s vyhovujícími standardy. [42, s. 23]

Tato zkouška je referenční metodou, která je primárně určena pro kosmetické výrobky rozpustné ve vodě nebo mísitelné s vodou. Zkouška popsána v normě ČSN EN ISO 11930 zahrnuje uvedení kalibrovaného množství každého testovacího mikroorganismu do kontaktu s přípravkem a zjištění změn v počtu mikroorganismů ve stanovených časových intervalech po stanovenou dobu a za stanovené teploty. [71, s. 7]

Hodnocení konzervace kosmetických přípravků je založeno na vnesení kultur různých mikroorganismů (bakterií, kvasinek, plísňí) do zkoušeného výrobku. Množství přežívajících mikroorganismů se zjišťuje v určených intervalech během 28 dní. Pro každý kmen v každém intervalu se vypočítá hodnota logaritického snížení a porovná se s minimálními hodnotami požadovanými pro hodnocení, které jsou uvedeny v příloze B

výše uvedené normy. Pokud se zkouška použije jako referenční metoda, musí se přísně dodržet všechny postupy. Mikroorganismy přítomné ve zkoušeném výrobku by neměly ovlivnit odečítání testovacích mikroorganismů. [70], [71, s. 8, 9]

Testování účinnosti konzervačních látek určuje stupeň odolnosti kosmetického přípravku vůči mikrobiální kontaminaci. Ideální test by měl brát v úvahu: riziko kontaminace během výrobního procesu, riziko kontaminace při běžném užívání spotřebitelem a riziko kontaminace při nevhodném zacházení s kosmetickým přípravkem (př. nevhodné podmínky uchování KP – teplota, vlhkost). [42, s. 22]

6.4 Self-preserving systém

Po celá léta byly na trh uváděny výrobky bez konzervačních látek nebo produkty, které jsou „samokonzervační“ (self-preserving), jako šampony proti lupům s kyselinou salicylovou (pH 3), sterilní oční kapky nebo antibiotikové masti. Tyto produkty jsou dostatečně konzervovány díky jejich fyzikálně-chemickému složení. Praxe ukázala, že ačkoli produkty neobsahují klasické konzervační látky, přesto jsou nekontaminované a bezpečné pro spotřebitele. [72, s. 163, 164]

Principem self-preserving systému je nastavit optimální fyzikálně-chemické podmínky (tj. nízké pH, nízká aktivita vody), prostřednictvím různých chemikálií (např. kyseliny, soli, chelatační činidla, povrchově aktivní látky, aromatické látky, alkoholy, byliny...) a dodržovat GMP při výrobě. [72, s. 179, 180]

Spotřebitelé dnes vyžadují více přírodních produktů. Výrobci kosmetiky tedy musí používat mírnější konzervanty nebo přírodní konzervační techniky. [72, s. 164]

Produkty bez konzervačních látek nabízejí výhody pro formulace, protože snižují nebo odstraňují přítomnost chemických konzervačních látek, které mohou být zdrojem podráždění pokožky.

Self-preserving systém má následující výhody:

- Snižují se náklady na použití chemických konzervačních látek
- Jsou splněny požadavky spotřebitelů, kteří vyžadují produkty bez konzervantů
- Podpora používání obalů odolných proti kontaminaci
- Snížení nebo dokonce eliminace vznik rezistentních organismů [72, s. 164, 165]

7 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VÝBĚR KONZERVAČNÍ LÁTKY

Existuje celá řada faktorů, které se podílejí na výběru a testování konzervačních přípravků pro daný výrobek. Faktory mohou být různé: fakt, zda určitá konzervační látka může být použita v konkrétní zemi, formulační faktory, antimikrobiální činnost konzervačních látek, vliv složek na konzervační látky, podmínky zpracování, balení a mikrobiologické vyšetření. [72, s. 57]

7.1 Formulační faktory

Tyto faktory mohou mít vliv na aktivitu konzervačních látek. Do této skupiny faktorů patří vodní aktivita, pH a rozpustnost konzervačních látek. [72, s. 57]

7.1.1 Vodní aktivita

Mikroorganismy vyžadují dostupný zdroj vody pro buněčný růst a metabolismus. Pokud dojde ke snížení množství vody, může to na mikroorganismy působit snížením metabolické aktivity, kdy nedochází k rozmnožování, nebo prodloužením generační doby. Existuje několik metod, které se používají ke stanovení vodní aktivity ve vzorku. Hodnoty vodní aktivity pro růst a množení různých druhů bakterií jsou dobře známy. Vodní aktivita bakteriálních druhů se pohybuje v rozmezí 0,99 – 0,86. Většina grampozitivních a gramnegativních bakterií však nejsou schopny růstu při vodní aktivitě nižší než 0,91. Pro růst plísní a kvasinek je hodnota vodní aktivity od 0,98 do 0,62. Pro růst MO je voda důležitá, nicméně je důležité si uvědomit, že některé MO i přes nízkou hodnotu vodní aktivity ve výrobku přežívají, ale nemnoží se. [72, s. 66, 67]

Přežití a růst MO nejsou v každém přípravku stejné. Například životaschopný *Bacillus* nebo spóry plísní jsou snadno izolovány z přípravků s malou vodní aktivitou, jelikož nedostatek vody zabraňuje klíčení. Rtěnky a prášky jsou příklady bezvodých kosmetických výrobků s nízkou vodní aktivitou. I u těchto přípravků se běžně přidávají konzervační látky k zabránění růstu MO, kdyby došlo k neúmyslnému přidání vody při používání spotřebitelem. [72, s. 68]

Přípravky dělíme na výrobky s nízkou aktivitou vody (např. prášky, laky na nehty, rtěnky), což jsou produkty méně citlivé k mikrobiální kontaminaci během používání spotřebitelem. Druhou skupinou jsou výrobky s vyšší aktivitou vody, jedná se o pleťové vody,

krémy, šampony, kondicionéry, tekutá mýdla, které jsou vysoce citlivé k mikrobiální kontaminaci během používání spotřebitelem. [47, s. 4], [72, s. 68]

Vodní aktivita se liší podle druhů přípravků. V Tabulce č. 3 jsou příklady hodnot vodní aktivity a možných druhů MO, které jsou schopny růstu u některých typů kosmetických přípravků. [72, s. 67, 68]

Tab. 3. *Vodní aktivita kosmetických přípravků a druhy MO, které se v nich můžou vyskytovat*

vodní aktivita	kosmetické přípravky	druhy MO, které jsou schopny růstu
0,96 – 0,99	šampony, emulze, make-up kolem oční oblasti, krémy, pleťové vody, odličovače	grampozitivní a gramnegativní bakterie (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
0,90 – 0,95	šampony, vlasové kondicionéry, krémy, pleťové vody, ústní vody	některé gramnegativní a většina grampozitivních bakterií (<i>E. coli</i> , <i>Bacillus sp.</i>), kvasinky a plísně
0,80 – 0,89	většina zubních past, některá mýdla, rtěnky, krémy	prepozitivní bakterie (<i>Staphylococcus aureus</i>), kvasinky a plísně
0,70 – 0,79	pudry, některé gelové zubní pasty, některá mýdla	halofilní bakterie, kvasinky a plísně
0,65 – 0,69	antiperspiranty	osmotolerantní kvasinky
pod 0,6	pudrové produkty	žádné

Následující typy složek mohou být použity ke snížení vodní aktivity: aminokyseliny, glycerol, etylenglykol, propylenglykol, dextriny, chlorid sodný, xantinová guma a etanol. Tyto látky jsou schopné snížit vodní činnost tím, že absorbují vodu z výrobku, tudíž není k dispozici MO. Vysoké koncentrace cukrů (glukóza, sacharóza, sorbitol) mohou vést ke zvýšení osmotického tlaku, ale také ke snížení vodní aktivity. [72, s. 69]

7.1.2 pH

Většina MO je schopna růst při hodnotě pH, která je mezi 4 až 10. Pro bakterie je optimální růstové pH mezi 5,5 – 8,5. Optimální pH pro růst u kvasinek a hub je mezi 4 – 6. Většina MO, které jsou potenciálně nebezpečné pro spotřebitele nebo jejich přítomností hrozí znehodnocení produktu, rostou právě v tomto rozsahu pH. V současné době existují na trhu dva typy kosmetických přípravků, kyselé a zásadité. Mezi kyselé kosmetické přípravky, mající pH mezi 3 – 5, patří výrobky obsahující kyselinu salicylovou, alfa-hydroxy kyselinu, antiperspiranty obsahující 25% roztok hydroxychloridu hlinitého a vlasové kondicionéry. Příkladem alkalického kosmetického výrobku s pH v rozmezí 10 – 14 jsou depilační krémy. [72, s. 69]

Má-li výrobek pH nižší než 4 nebo vyšší než 10, nemusí být přítomna konzervační látka. Vysoké nebo nízké pH je schopno zabránit množení MO nebo jejich dlouhodobému přežití. Výrobky s extrémní hodnotou pH pak mají funkci tzv. „samokonzervování“. [72, s. 69]

Kromě vlivu na růst MO může mít pH vliv na antimikrobiální aktivitu nebo chemickou stabilitu konzervační látky. Kyselina sorbová a benzoová jsou organické kyseliny, využívající se jako konzervační látky. Antimikrobiální aktivita těchto kyselin je při nízkých hodnotách pH a je na tomto faktoru závislá. Pokud se tedy zvýší hodnota pH v daném přípravku, antimikrobiální aktivita těchto kyselin se sníží. Doporučuje se tedy, aby kyselina sorbová a benzoová byly použity pouze u výrobků s pH nižším než 5. Kvartérní amoniové sloučeniny mají dobrou antimikrobiální aktivitu při neutrálním nebo mírně alkalickém pH. Jejich antimikrobiální hodnota se pak snižuje u pH pod 5. Optimální antimikrobiální aktivita u benzylalkoholu je při pH vyšším než 5. U etanolu a parabenů byla stanovena optimální antimikrobiální aktivita v kyselém pH. [72, s. 69, 70]

Kromě antimikrobiální aktivity může pH ovlivnit i chemickou stabilitu konzervační látky. Je známo, že některé konzervační látky (př. kyselina sorbová) jsou v kyselém prostředí nestabilní. Kromě kyselých hodnot pH, může působit nepříznivě i alkalické pH (př. chlorbutanol). V alkalických hodnotách pH dochází u parabenů k hydrolyze. [72, s. 70]

Po určité době může dojít ke změně pH daného preparátu, což může mít vliv na antimikrobiální aktivitu konzervačních látek závislých na pH. Je proto důležité si ověřit, že antimikrobiální aktivita konzervační látky závislé na pH je stabilní. [72, s. 71]

7.1.3 Rozpustnost konzervačních látek

Pro MO je nezbytný zdroj vody, jelikož se množí pouze ve vodné fázi. Emulze je složena z vodné a olejové fáze. V těchto typech přípravků rostou MO ve vodné fázi, nebo se shromažďují na rozhraní olej-voda. Pro zabránění šíření MO v emulzích, musí být přítomny ve vodné fázi konzervační látky v dostatečných koncentracích. Konzervační látky rozpustné ve vodě jsou například imidazolidinyl urea nebo diazolidinyl urea. Parabeny jsou konzervační látky, které mají omezenou rozpustnost ve vodě. [72, s. 71]

Existují konzervační látky, které jsou více rozpustné v oleji než ve vodě. V emulzi (olej ve vodě, voda v oleji) musí být konzervační látka přítomna ve vodné fázi, protože zde působí proti mikrobiální kontaminaci. Je-li konzervant rozpustný ve vodě i v oleji, vznikne rozdělení mezi vodnou a olejovou fází, které je označováno jako rozdělovací koeficient. Je-li vyšší koncentrace konzervační látky v olejové fázi, rozdělovací koeficient nabývá vysokých hodnot. Je nutné podotknout, že při použití neiontové povrchově aktivní látky nebo emulgátoru, dojde ke zvýšení rozdělovacího koeficientu konzervační látky. Na rozdělovací koeficient působí i teplota. Při jejím zvýšení dochází ke zvětšení rozdělovacího koeficientu konzervantu, což způsobuje snížení konzervantu ve vodné fázi. Kyselina benzoová a parabeny jsou příklady konzervačních činidel, které migrují z vodné fáze do olejové. Tím pádem ztrácí antimikrobiální aktivitu proti kontaminaci mikroorganismy ve vodné fázi. Aby k takovým situacím nedocházelo, je řešením buď zvýšit koncentraci konzervační látky ve vodné fázi, nebo omezení rozpustnosti konzervační přísady v olejové fázi. Při použití vysokých koncentrací určitých konzervantů může docházet k podráždění kůže. [72, s. 71, 72]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ

V této kapitole je uveden seznam chemikálií, přístrojů a mikroorganismů, které byly využity během experimentální části diplomové práce.

8.1 Použité chemikálie

SLES 70% (Sodium Laureth Sulfate), Enapol a.s., Teplice

Tween 40 (Polyoxyethylenesorbitan monopalmitate), Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha

Flavon (Cocamidopropyl Betaine), Enapol a.s., Teplice

Casein Enzyme Hydrolysate, HiMedia, Brno

Nutrient agar, HiMedia, Brno

Chlorid sodný, Lach-Ner s.r.o., Neratovice

Kyselina citronová, Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha

Hydroxid sodný, Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha

Destilovaná voda

8.2 Testované konzervanty

Methylparaben (*p*-Hydroxybenzoic acid methyl ester), Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha

Propylparaben (4-Hydroxybenzoic acid propyl ester), Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha

8.3 Přístroje

Analytické váhy KERN 440-47 N, Německo

Vysokorychlostní mixér Heidolph RZR 2020, Německo

Biologický bezpečnostní box Clean Air Techniek B.V., Nizozemí

Autokláv Varioklav H+P, Německo

Automatické mikropipety Biohit, Finsko

Elektronicky regulované sušárny a inkubátory Memmert, Německo

Biologický termostat BT 120, Česká republika

Chladnička Electrolux, Švédsko

pH-metr GRYF 208L, Česká republika

Vortex Heidolph, Reax top, Německo

Denzitometr Unimed, Česká republika

Laboratorní plasty (plastové zkumavky, špičky pro automatické mikropipety, očkovací kličky a hokejky)

Laboratorní sklo (kádinky, pipety, tyčinky, odměrný válec, odměrná baňka, sterilní Petriho misky, sterilní zkumavky)

8.4 Použité mikroorganismy

Staphylococcus aureus CCM 3953

Pseudomonas aeruginosa CCM 3955

Escherichia coli CCM 3954

8.5 Dekontaminace použitého materiálu

Všechny použité materiály byly dekontaminovány v autoklávu při 132°C po dobu 20 minut.

9 METODIKA

9.1 Zásady mikrobiologické práce

Během práce v mikrobiologické laboratoři byly dodržovány zásady aseptické práce. Tím bylo zabráněno znečištění a znehodnocení vzorků pleťových vod a zkreslení výsledků. Byly tedy používány sterilní pomůcky, které byly zbaveny mikroorganismů pomocí autoklávování, sterilizací, žíháním. Pro snížení kontaminace vzorků ze vzduchu bylo pracováno v bezpečnostním boxu, kde proudil filtrovaný vzduch. Dále byla prováděna pravidelná dezinfekce pracovních povrchů, pomůcek a rukou.

9.2 Příprava pleťové vody

K provedení zátěžového testu byla připravena pleťová voda podle základní formulace:

Složka	100 %	100 g
Tween 40	9 %	9 g
SLES (70%)	9 %	12, 86 g
Flavon (30%)	1,8 %	6 g
Voda	80, 2 %	72,14 g

Nejprve byly naváženy všechny suroviny do kádinky a následně míchány na vysokorychlostním mixeru na homogenní směs. K této základní receptuře byly dále přidány konzervanty o různé koncentraci. Byl použit methylparaben a propylparaben oba v koncentraci 0,4% a 0,8%. Nakonec bylo upraveno pH na 5, 7 a 8 pomocí kyseliny citronové a hydroxidu sodného. Vzorky pleťové vody byly rozpipetovány do plastových zkumavek a sterilizovány v autoklávu při 132°C po dobu 20 minut. Po sterilizaci byly vzorky zaočkovány daným inokulem (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*). Jedna sada pleťových vod tedy představovala naprosto stejné složení a pH vody a lišila se v druhu testované kultury. Celkově bylo pracováno s 12 sadami pleťových vod (Tabulka 4), což znamenalo 72 zkumavek se zaočkovánými pleťovými vodami, jelikož bylo vše prováděno ve dvojím opakování. Zkumavky byly jasně označeny a skladovány při laboratorní teplotě.

Tab. 4. Vzorky testovaných pleťových vod

vzorek	konzervant	koncentrace	pH
1	methylparaben	0,4%	5
2			7
3			8
4		0,8%	5
5			7
6			8
7	propylparaben	0,4%	5
8			7
9			8
10		0,8%	5
11			7
12			8

9.3 Příprava ředícího roztoku

Složení ředícího roztoku:

Casein Enzyme Hydrolysate 0,2 g

Chlorid sodný 1,7 g

Destilovaná voda 200 ml

Složky byly naváženy do skleněné láhve a rozpuštěny v destilované vodě. Poté byl ředící roztok rozplněn do skleněných zkumavek a sterilizován při 132°C po dobu 20 minut.

9.4 Příprava kultivačního média

Složení kultivačního média:

Nutrient agar	11,3 g
Destilovaná voda	400 ml

Složení Nutrient agaru:

Masový pepton	5,0 g/l
Hovězí extrakt	1,5 g/l
Kvasničný extrakt	1,5 g/l
NaCl	5,0 g/l
Agar	15,0 g/l
Konečné pH (při teplotě 25°C)	7,4 ± 0,2

Do skleněné láhve bylo naváženo 11,3 g Nutrient agaru, který byl rozpuštěn v destilované vodě. Následně byl vložen do autoklávu, kde proběhla sterilizaci při 132°C po dobu 20 minut. Po sterilizaci, samovolném ochlazení a dokonalém promíchání bylo kultivační médium asepticky rozlito do sterilních Petriho misek.

9.5 Příprava zásobní kultury

K provedení testu byly použity kultury *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Z těchto kultur byla připravena pomocí křížového roztěru první subkultura. *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* byly kultivovány při 37°C po dobu 48 hodin a *Pseudomonas aeruginosa* při 30°C po dobu 48 hodin. Z této první subkultury byla obdobně připravena druhá subkultura, která byla použita na přípravu inokula.

Postup křížového roztěru:

Do očka vyžíhané kličky byla nabrána kultura, která byla rozetřena na agar ve formě oválu. Po vyžíhání kličky byly z oválu rozetřeny rovnoběžné čáry. Další čáry byly rozetřeny opět vyžíhanou kličkou tak, aby kolmo protínaly předešlé čáry. Poté byla klička vyžíhána a byly udělány další čáry přes předchozí. Na závěr byl přes poslední čáry udělán hádek.

9.6 Příprava inokula

Z připravené druhé subkultury byl sterilní kličkou odebrán vzorek mikroorganismů a přenesen do zkumavky s ředícím roztokem. Po promíchání na vortexu byl změřen zákal na denzitometru, který musel odpovídat 1. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Pokud byla hodnota nižší, byly mikroorganismy přidány, pokud hodnota tento stupeň přesahovala, byl roztok naředěn. Takto připraveným inokulem byly zaočkovány vzorky pleťových vod. Do každého vzorku bylo nepipetováno 100 μl inokula.

9.7 Postup při odběru vzorku

Vzorky byly odebírány v intervalu 0, 7, 14 a 28 dní. V čase 0 byly vzorky pleťové vody naředěny na 10^{-6} a poté mikropipetou přeneseny na Petriho misku s agarem, kde byly rozetřeny sterilní plastovou hokejkou. Misky byly následně kultivovány v případě *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* při teplotě 37°C a *Pseudomonas aeruginosa* při 30°C po dobu 48 hodin. Na závěr byly spočítány kolonie mikroorganismů a vypočítány kolonie tvořící jednotky v 1 ml (CFU/ml). Tento počet odpovídal počtu buněk zaočkových do jednotlivých vzorků pleťové vody. Odběr vzorku po 7, 14 a 28 dnech měl stejný průběh jako odběr vzorku v čase 0. Ke změně docházelo jen u počtu ředění.

Postup při ředění:

0,5 ml vzorku bylo asepticky přeneseno do zkumavky s 4,5 ml sterilního ředícího roztoku. Obsah byl důkladně promíchán. Takto bylo postupováno dál, než bylo dosaženo odpovídající ředění.

9.8 Výpočet počtu kolonií tvořících jednotek CFU

K vyhodnocování počtu mikroorganismů ve vzorku byl použit výpočet CFU:

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

(1)

9.9 Zkouška účinnosti konzervace

Výsledky konzervačních účinků parabenů byly srovnány s mezinárodní normou ČSN EN ISO 11930. Z množství mikroorganismů v daných intervalech byly vypočítány hodnoty logaritmického snížení a porovnány s hodnotícími kritérii pro test účinnosti konzervace (Tabulka 5), která se nachází v příloze B zmíněné normy.

Výpočet pro snížení počtu mikroorganismů, vyjádřené v logaritmických jednotkách:

$$R_x = \lg N_0 - \lg N_x \quad (2)$$

kde:

N_0 – počet mikroorganismů zaočkovaných v čase t_0

N_x – počet přežívajících mikroorganismů v každém intervalu odběru vzorků t_x

Tab. 5. Hodnotící kritéria

Požadované hodnoty snížení v log			
Mikroorganizmy	Bakterie		
Interval	T7	T14	T28
Kritéria A	≥ 3	≥ 3 a NI	≥ 3 a NI
Kritéria B	neprovedeno	≥ 3	≥ 3 a NI
Přijatelné rozpětí odchylky 0,5 log			
NI: žádné zvýšení počtu od předchozího intervalu			

10 VÝSLEDKY A DISKUZE

Zkouška účinnosti konzervace byla prováděna u vzorků s methylparabenem (MP) a propylparabenem (PP) v 0,4 a 0,8% koncentraci. Hodnocení antimikrobiální účinnosti bylo založeno na zaočkování pleťové vody kalibrovaným inokulem. Za kontrolní vzorky byly považovány zaočkované vzorky pleťových vod, které neobsahovaly žádný konzervant (Tab. 6). V intervalech v období 28 dní bylo zjišťováno množství přítomných mikroorganismů (MO) konkrétně *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) a *Escherichia coli* (EC). Pro každý interval a každý kmen byly vypočteny hodnoty CFU/ml, které byly následně vyneseny do grafů.

Zátěžový test je popsán v normě ČSN EN ISO 11930 o hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku. Údaje získané zkouškou účinnosti konzervace se dají použít ke stanovení úrovně antimikrobiální ochrany požadované pro minimalizaci rizika ohrožení spotřebitele a znehodnocení výrobku. Součástí normy jsou dvě kritéria, která vyjadřují ochranné schopnosti kosmetického přípravku. Výsledky experimentu se pak porovnávají s minimálními hodnotami požadovanými pro hodnocení kritéria A nebo kritéria B.

Kritérium A říká, že po 7, 14 a 28 dnech musí dojít ke snížení počtu bakterií nejméně o 3 logaritmické řády a zároveň nesmí dojít k žádnému zvýšení počtu od předchozího intervalu. Pokud je splněno kritérium A, znamená to, že je přípravek chráněn proti pomnožování mikrobů, které může představovat potenciální riziko pro spotřebitele. Mikrobiologické riziko je tedy v tomto případě považováno za tolerované a výrobek splňuje požadavky normy bez dalšího odůvodnění.

Dle kritéria B se musí počet bakterií ve vzorku snižovat nejméně o 3 logaritmické řády v intervalu 14 a 28 dní, přičemž je vyloučeno zvýšení počtu buněk od předchozího intervalu. Když přípravek splňuje kritérium B, musí analýza mikrobiologického rizika prokázat existenci kontrolních faktorů nesouvisejících se složením přípravku. Za ochranný prostředek pro snížení rizika je považováno například ochranné balení ve formě pumpičky, která nabízí vyšší úroveň ochrany než nádobka s víčkem. Jestliže analýza rizika prokáže existenci kontrolních faktorů je mikrobiologické riziko tolerováno.

Pokud výrobek nesplňuje ani kritérium A ani kritérium B, stav přípravku musí být hodnocen výhradně dle posouzení mikrobiologického rizika. Za předpokladu, že je ověřena mikrobiologická kvalita hotového výrobku v čase jeho uvolnění na trh, může být výrobek v balení pro jednorázové použití považován za výrobek s tolerovatelným rizikem.

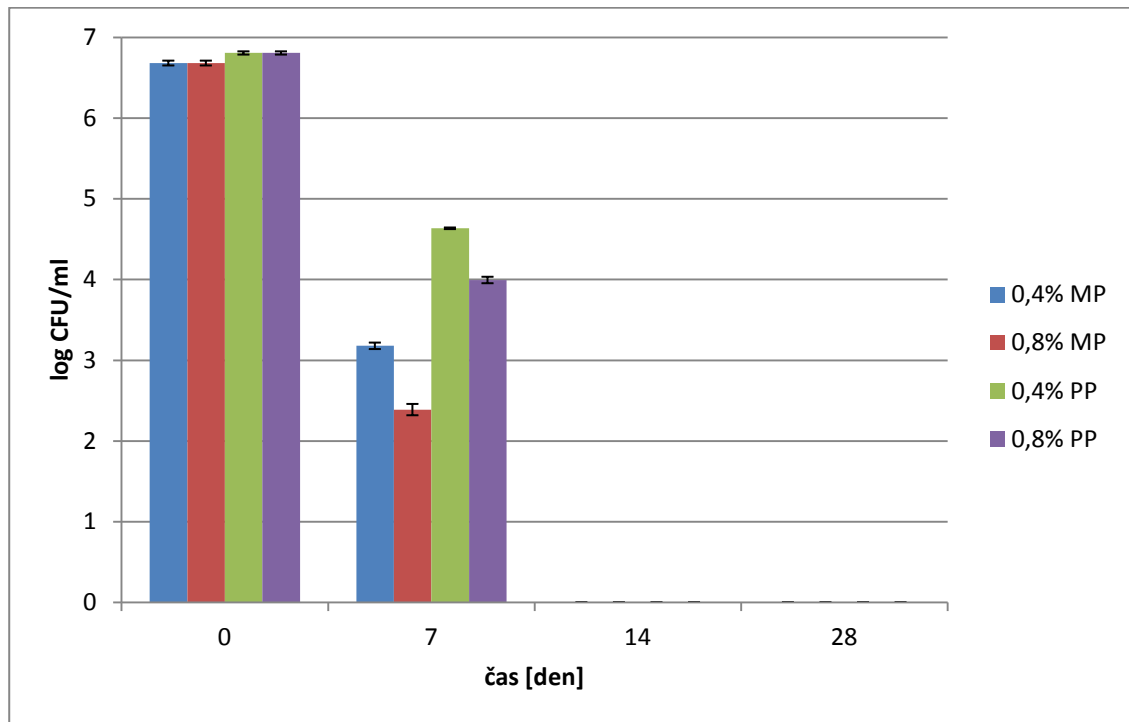
Jestliže kosmetický přípravek neodpovídá žádné z uvedených situací, pak nesplňuje požadavky této mezinárodní normy. V tomto testu je přijatelné rozpětí odchylky 0,5 log.

Tab. 6. Počet jednotek tvořící kolonie (CFU) v pleťových vodách bez konzervantu

vzorek s MO	pH	0 dní	po 7 dnech	po 14 dnech	po 28 dnech
SA	5	6,68 ± 0,03	-	-	-
	7		5,53	-	-
	8		6,00	-	-
PA	5	6,96 ± 0,04	-	-	-
	7		-	-	-
	8		11,53	9,79	9,58
EC	5	6,76 ± 0,03	-	-	-
	7		9,45	8,89	7,90
	8		10,91	10,08	9,87

10.1 Růst mikroorganismů v pleťových vodách obsahující paraben

10.1.1 Vliv parabenů na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* CCM 3953 při pH 8



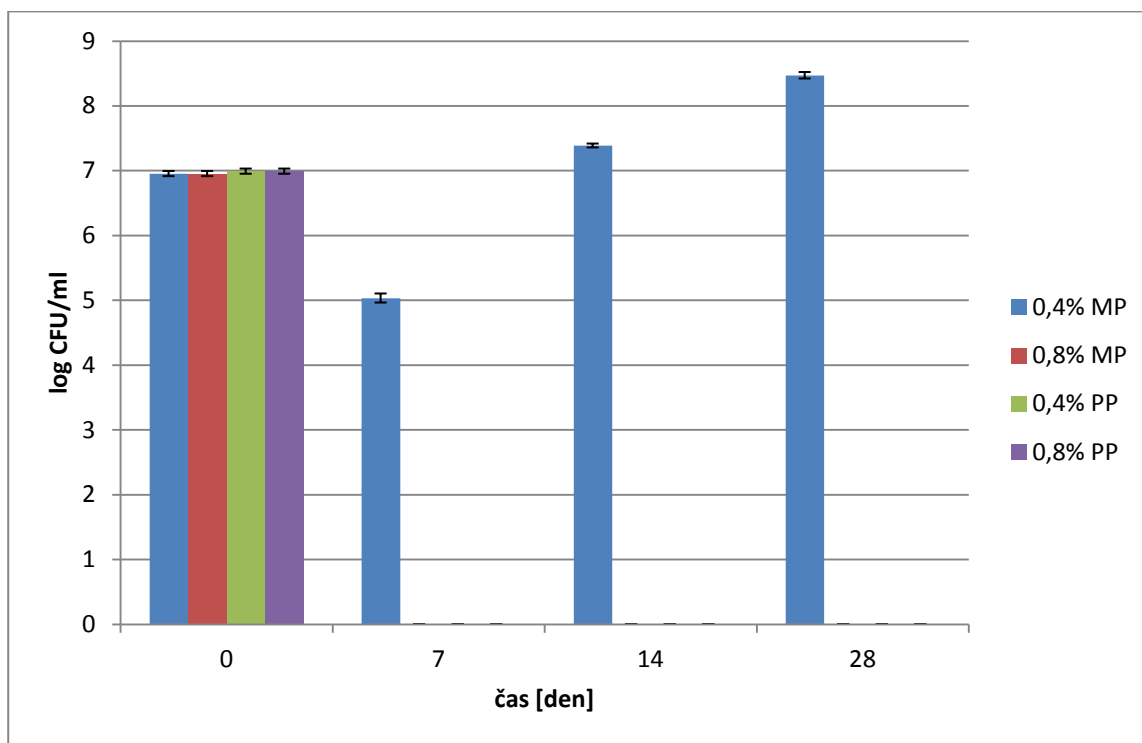
Obr. 6. Počet buněk (log CFU/ml) *Staphylococcus aureus* ve vzorcích pleťových vod o pH 8, obsahující různé konzervanty

Na obrázku 6 jsou výsledky zátěžového testu znázorněny jako závislost log CFU/ml na době skladování. Jako konzervant byl použit methylparaben a propylparaben v koncentraci 0,4 a 0,8%. Vzorky pleťových vody byly zaočkovány kalibrovaným inokulem *Staphylococcus aureus* a pH pleťové vody dosahovalo 8. V čase 0 odpovídá počet buněk množství buněk zaočkovaných do vzorku pleťové vody. V případě použití methylparabenu byl počáteční počet buněk 6,68 log CFU/ml a v případě propylparabenu odpovídal počet buněk vnesených do pleťových vod hodnotě 6,81 log CFU/ml. Při odběru po 7 dnech se počet kolonií ve vzorku snížil ve všech případech. K největšímu poklesu buněk došlo u vzorku s 0,8% methylparabenem, kde byl výsledný počet buněk 2,39 log CFU/ml. Jako druhý nejúčinnější z těchto konzervantů, se projevil 0,4% methylparaben s počtem buněk 3,18 log CFU/ml. V případě propylparabenu se účinněji zachoval 0,8% propylparaben, kde byla hodnota ve vzorcích 3,99 log CFU/ml. 0,4% propylparaben účinkoval nejméně ze všech uvedených, počet buněk byl stanoven na 4,63 log CFU/ml. Ve vzorku pleťové vody bez přítomnosti konzervantu při pH 8 byl po 7 dnech stanoven

počet buněk na 6,00 log CFU/ml, tedy vyšší než u vod obsahujících konzervační látky, což poukazuje na pozitivní vliv konzervantu v pleťové vodě. Při odběru po 14 a 28 dnech byly ve všech případech, včetně kontrolního vzorku, odečteny nulové hodnoty. Všechny výše uvedené konzervanty jsou tedy účinné na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus*, jelikož došlo ke snížení množství buněk ve vzorcích.

Dle výše uvedených kritérií v normě ČSN EN ISO 11930 by pleťové vody splňovaly kritérium A, kdy je mikrobiologické riziko považováno za tolerované. Po 7 dnech se ve všech případech snížila hodnota počtu buněk o minimálně 3 logaritmické řády a nedocházelo ke zvyšování počtu buněk od předchozích intervalů, čímž byly podmínky pro kritérium A splněny.

10.1.2 Vliv parabenů na gramnegativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 při pH 8



Obr. 7. Počet buněk (log CFU/ml) *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích pleťových vod o pH 8, obsahujících různé konzervanty

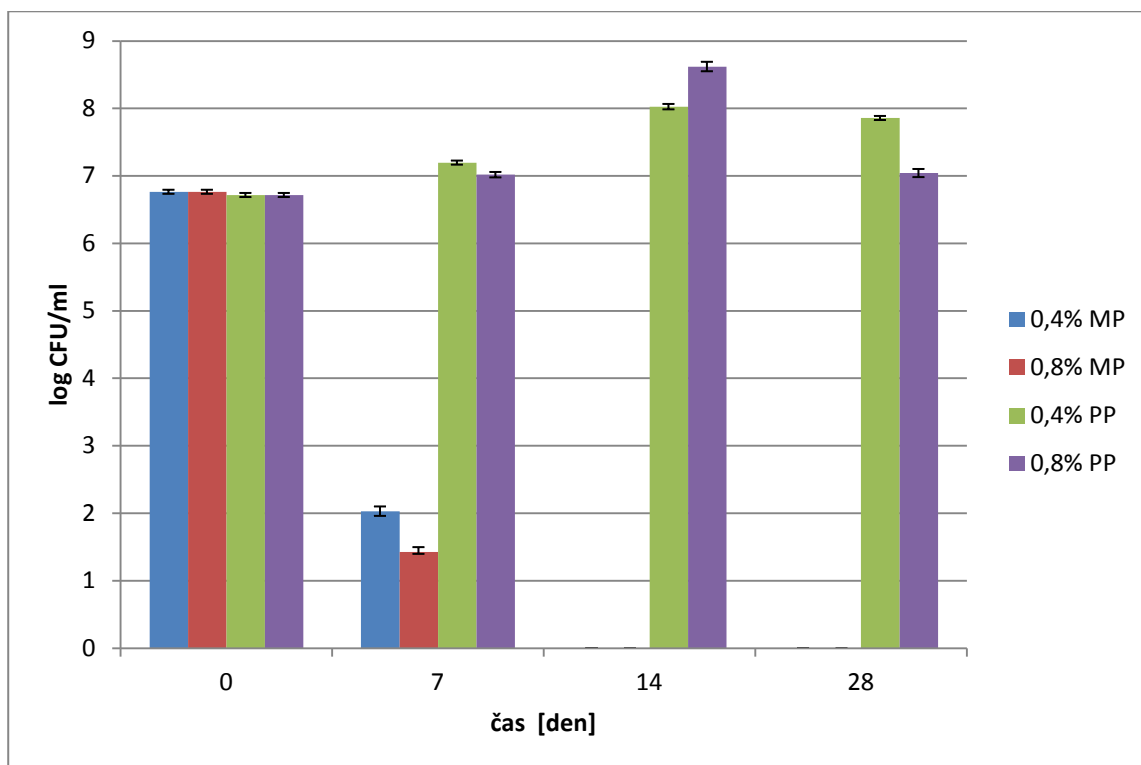
Výsledky zátěžového testu na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* jsou znázorněny na obrázku 7. Ke vzorkům pleťových vod byly přidány již výše uvedené konzervanty a pleťová voda odpovídala pH 8. Po zaočkování pleťových vod inokulem byl stanoven počáteční počet buněk (tedy počet v čase 0). Pro pleťové vody s methylparabenem byla hodnota

CFU/ml 6,96 log a u vzorků s propylparabenem 6,99 log CFU/ml. U kontrolního vzorku pleťové vody, který neobsahoval žádný konzervant, došlo po 7 dnech k namnožení buněk a jejich počet se vyšplhal na 11,53 log CFU/ml. Při odběru po 14 dnech se počet buněk ve vzorku snížil na 9,79 log CFU/ml. Po 28 dnech byl počet buněk stanoven na 9,58 log CFU/ml, což představovalo vyšší množství buněk, než jejich zaočkované množství. Po 7 dnech se v případě 0,4% methylparabenu snížila hodnota počtu buněk na 5,03 log CFU/ml. Po 14 dnech se však hodnota zvýšila o 2 logaritmické řády na 7,39 log CFU/ml a po 28 dnech dokonce na 8,47 log CFU/ml, což přesahuje počet zaočkovaných buněk *Pseudomonas aeruginosa*. Takové zvyšování počtu bakterií od předchozích intervalů je v rozporu s kritériem A i B, které udává norma ČSN EN ISO 11930. V případě přítomnosti 0,8% methylparabenu byl již po 7 dnech počet buněk nulový. Stejného výsledku bylo dosaženo i po 14 a 28 dnech. V přítomnosti konzervantu propylparabenu, u jakékoli použité koncentrace, se ve vzorku po 7 dnech nevyskytovaly žádné buňky. Tato hodnota zůstala po 14 a 28 dnech konstantní. Jelikož byla u těchto konzervantů splněna podmínka snížení počtu buněk minimálně o 3 logaritmické řády po 7 dnech a nedošlo ke zvyšování počtu buněk, lze zkonstatovat, že mikrobiologické riziko by v takových výrobcích bylo považováno za tolerované.

Za účinný konzervant na gramnegativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa* lze tedy považovat 0,8% methylparaben, 0,4% propylparaben a 0,8% propylparaben.

0,4% methylparaben je tedy účinnější na *Staphylococcus aureus* než na *Pseudomonas aeruginosa*. Naopak 0,8% methylparaben, 0,4% propylparaben a 0,8% propylparaben účinkují rychleji na *Pseudomonas aeruginosa* než na *Staphylococcus aureus*.

10.1.3 Vliv parabenů na gramnegativní bakterii *Escherichia coli* CCM 3954 při pH 8



Obr. 8. Počet buněk (log CFU/ml) *Escherichia coli* ve vzorcích pleťové vody o pH 8, obsahující různé konzervanty

Výsledky inhibičního působení konzervantů na gramnegativní bakterii *Escherichia coli* jsou znázorněny na obrázku 8. Počet buněk ve vzorcích pleťové vody s přítomným methylparabenem odebíraném v čase 0 byl 6,76 log CFU/ml. Ve vzorku pleťové vody obsahující propylparaben byl počáteční počet buněk 6,72 log CFU/ml. Po 7 dnech se jako nejúčinnější konzervant projevil 0,8% methylparaben, který snížil počáteční množství buněk na 1,43 log CFU/ml, což znamená snížení počtu buněk o 7 logaritmických řádů. U 0,4% methylparabenu byl počet buněk po 7 dnech stanoven na 2,03 log CFU/ml. Po odběru po 14 a 28 dnech se v přítomnosti obou methylparabenů počet kolonií postupně snižoval až na nulovou hodnotu. V případě 0,4% propylparabenu po 7 dnech klesl počet buněk na 7,20 log CFU/ml a ve vzorku s 0,8% propylparabenem se počet snížil na 7,02 log CFU/ml. Po 14 dnech se počet v obou případech použití propylparabenu zvýšil, přičemž u 0,4% propylparabenu se hodnota dostala na 8,03 log CFU/ml a v přítomnosti 0,8% propylparabenu byl počet kolonií stanoven na 8,62 log CFU/ml, což znamená zvýšení počtu buněk od původního množství. Při odběru po 28 dnech se počet buněk ve vzorku obsahujícím 0,4% propylparaben mírně snížil na 7,86 log CFU/ml a v případě

0,8% propylparabenu došlo k poklesu na 7,04 log CFU/ml. Ve vzorku bez konzervantu došlo po 7 dnech k pomnožení *Escherichia coli* na 10,91 log CFU/ml, po 14 dnech se počet kolonií snížil na 10,08 log CFU/ml a při odběru po 28 dnech odpovídal počet buněk 9,87 log CFU/ml.

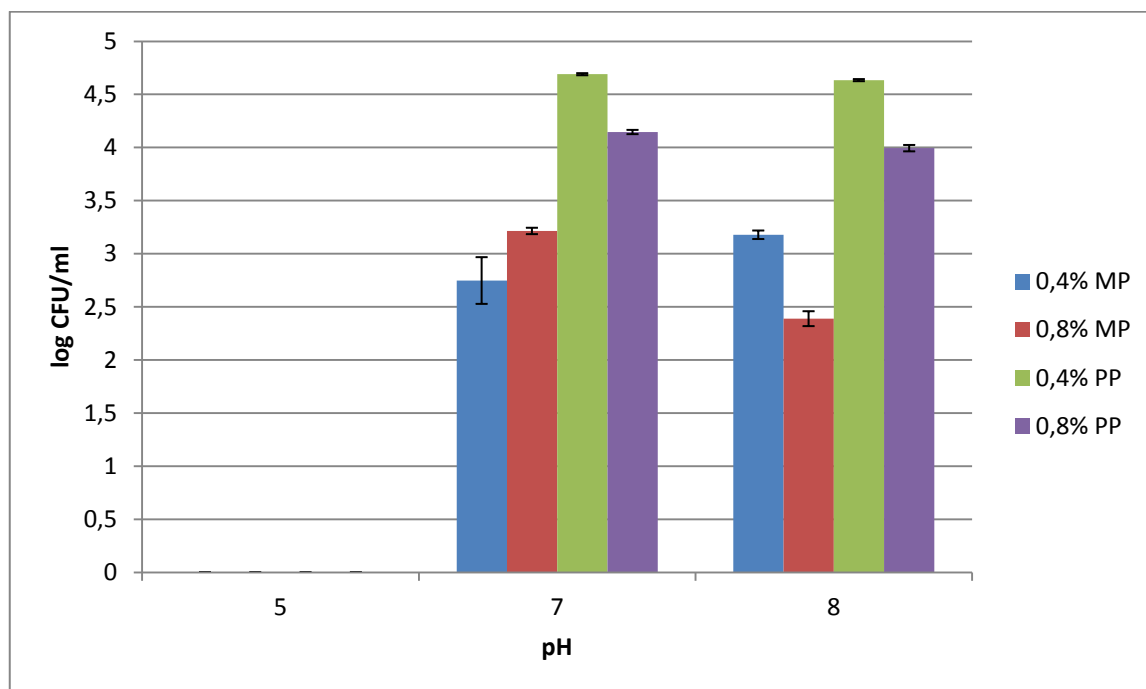
Na základě normy ČSN EN ISO 11930 může být 0,4% methylparaben a 0,8% methylparaben považován jako účinný vzhledem k bakterii *Escherichia coli* v pleťové vodě, jelikož by tento výrobek splňoval kritérium A. Propylparaben by jako konzervant v tomto případě neuspěl, jelikož nedošlo v žádném případě k snížení počtu buněk minimálně o 3 logaritmické řády, naopak se kolonie po 14 dnech začaly množit.

V porovnání s výsledky působení propylparabenu na *Staphylococcus aureus* lze říci, že propylparaben na tuto grampozitivní bakterii účinkoval daleko více. Naopak methylparaben měl vyšší účinek na gramnegativní bakterii *Escherichia coli* než na *Staphylococcus aureus*. Ze srovnání k bakterii *Pseudomonas aeruginosa* vyplývá, že 0,4% methylparaben působí lépe na *Escherichia coli*, zatímco propylparabeny působí efektivněji na *Pseudomonas aeruginosa*.

Jako shrnutí lze říci, že v případě grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* by bylo možné ke konzervaci použít všechny uvedené konzervanty. To může podporovat skutečnost, že *Staphylococcus aureus* je poměrně náročný na živiny. [73, s. 107] U gramnegativní *Pseudomonas aeruginosa* by nebylo možné použít 0,4% methylparaben a u gramnegativní *Escherichia coli* by nebyl vhodným konzervantem 0,4% ani 0,8% propylparaben. Tyto výsledky odpovídají faktu, že grampozitivní bakterie jsou více citlivé na přítomnost parabenů než gramnegativní bakterie. [74] Gramnegativní bakterie, konkrétně *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*, se vyznačují vysokou odolností proti konzervačním látkám a změně fyzikálních podmínek. [73, s. 107, 147] Z těchto poznatků vyplývá, že nejlepší a současně jediný konzervant, který by působil na všechny 3 bakterie dle kritérií v normě ČSN EN ISO 11930 je 0,8% methylparaben.

10.2 Vliv pH na růst mikroorganismů v modelové pleťové vodě

10.2.1 Vliv pH na růst grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 3953 – po 7 dnech



Obr. 9. Počet buněk (log CFU/ml) *Staphylococcus aureus* ve vzorcích pleťové vody o různém pH

Na obrázku 9 je zobrazena závislost log CFU/ml na pH. Testované vzorky pleťové vody byly před zaočkováním bakterie *Staphylococcus aureus* upraveny na pH 5, 7 a 8. Grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* v nejnižším pH po 7 dnech nerostla. V pH 7 za použití konzervantu methyparabenu v koncentraci 0,4% byl počet buněk stanoven na 2,75 log CFU/ml. Při pH 8 za použití stejného konzervantu o stejné koncentraci byl počet kolonií ve vzorku pleťové vody vyšší než v případě pH 7 a to 3,18 log CFU/ml. V přítomnosti vyšší koncentrace methylparabenu při pH 7 byl počet kolonií 3,21 log CFU/ml. V prostředí pH 8 byl počet buněk ve vzorku o stejném složení nižší o 1 logaritmický řád 2,39 log CFU/ml. Ve vzorku pleťové vody o pH 7, která obsahovala 0,4% propylparaben dosahoval počet buněk 4,69 log CFU/ml. 4,63 log CFU/ml byl počet buněk, který se vyskytoval ve vzorku pleťové vody s 0,4% propylparabenem a pH 8. V případě použití 0,8% propylparabenu v pH 7 bylo množství kolonií 4,15 log CFU/ml. Ve vzorku pleťové vody v prostředí pH 8 za použití 0,8% propylparabenu byl počet kolonií stanoven na 3,99 log CFU/ml.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že *Staphylococcus aureus* v pH 5 neroste ani v jednom z případů. Ve vzorcích s pleťovou vodou o pH 7 rostl *Staphylococcus aureus* nejlépe. Nejvyššího počtu buněk dosáhla bakterie za použití 0,4% propylparabenu a nejnižšího počtu buněk v případě 0,4% methylparabenu. Při pH 8 rostl mikroorganismus nejlépe za přítomnosti 0,4% propylparabenu a nejnižší za použití 0,8% methylparabenu. Obecně lze říci, že v přítomnosti methylparabenu roste *Staphylococcus aureus* méně než za přítomnosti propylparabenu.

Optimální pH růstu *Staphylococcus aureus* je 6,8 – 7,5. [75, s. 20]

10.2.2 Vliv pH na růst gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 – po 7 dnech

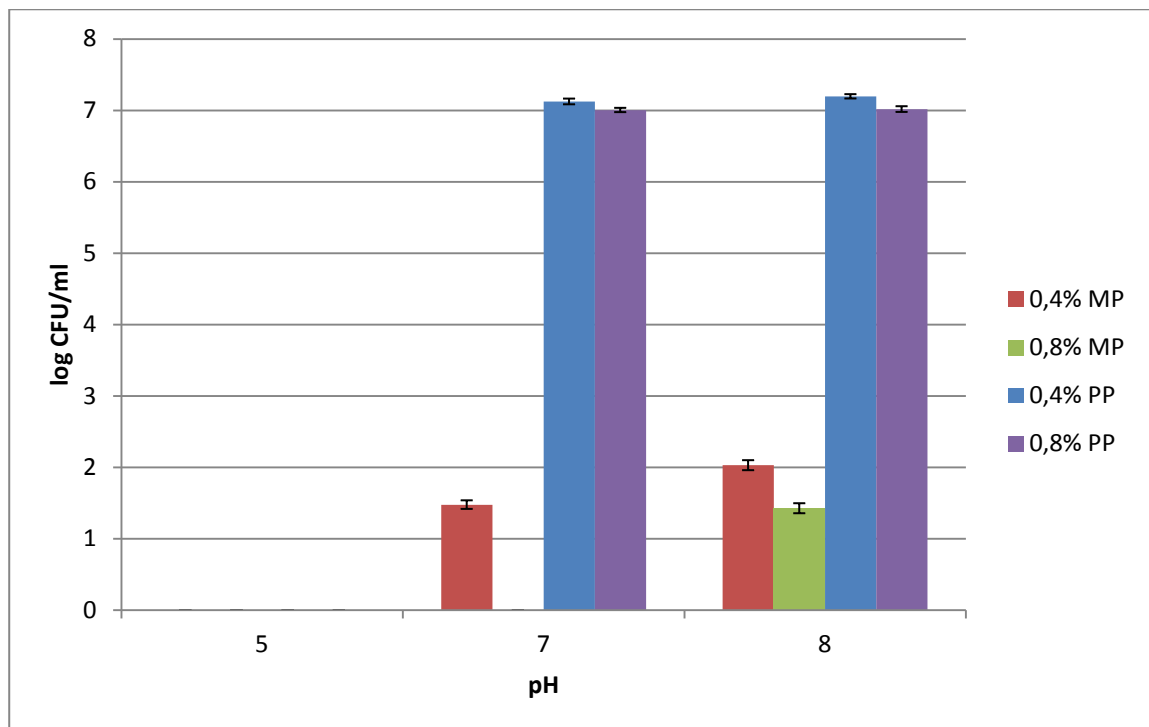
Tab. 7. Hodnoty CFU/ml ve vzorku pleťové vody s *Pseudomonas aeruginosa* při různém pH a odlišném typu a množství konzervantu

použitý konzervant	pH		
	5	7	8
0,4% methylparaben	-	-	5,03 log CFU/ml
0,8% methylparaben	-	-	-
0,4% propylparaben	-	-	-
0,8% propylparaben	-	-	-

V tabulce 7 jsou uvedeny hodnoty počty kolonií bakterie *Pseudomonas aeruginosa* v pH 5,7 a 8 ve vzorcích pleťové vody za přítomnosti methylparabenu a propylparabenu v koncentraci 0,4% a 0,8% po 7 dnech. Optimální pH růstu je pro *Pseudomonas aeruginosa* 6,6 – 7,0. [76]

Za podmínek, kdy je pH 5 a 7 je hodnota počtu buněk nulová. V situaci, kdy pH odpovídá 8 a vzorek pleťové vody obsahoval 0,4% methylparabenu bylo množství buněk stanoveno na 5,03 log CFU/ml. V přítomnosti ostatních parabenů *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorku nerostla.

10.2.3 Vliv pH na růst gramnegativní bakterie *Escherichia coli* CCM 3954 – po 7 dnech



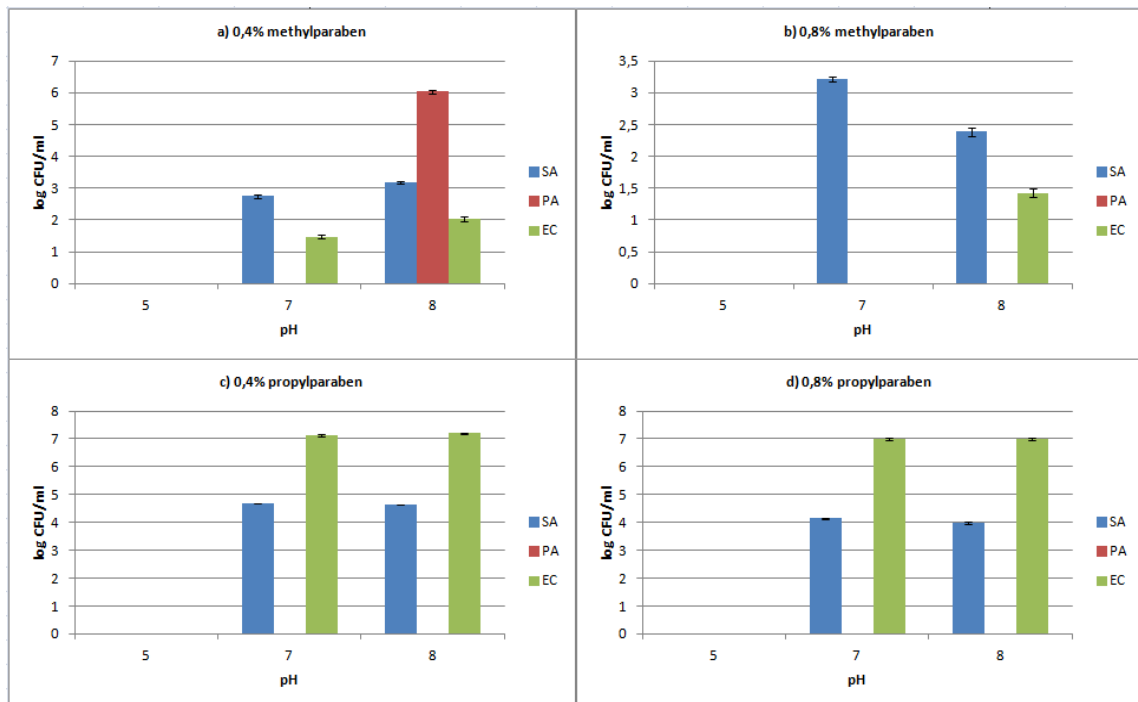
Obr. 10. Počet buněk (\log CFU/ml) *Escherichia coli* ve vzorcích pleťové vody o různém pH

Na obrázku 10 je znázorněna závislost \log CFU/ml na hodnotě pH 5,7 a 8. Za podmínek, kdy měly vzorky s pleťovou vodou pH 5, byl počet buněk *Escherichia coli* nulový. Při pH 7 a 0,4% methylparabenu dosahoval počet buněk 1,48 \log CFU/ml. Počet kolonií byl vyšší při pH 8 a byl stanoven na 2,03 \log CFU/ml. V přítomnosti 0,8% methylparabenu při pH 7 *Escherichia coli* nerostla, ale při pH počet buněk odpovídal 1,43 \log CFU/ml. V případě vzorků obsahujících 0,4% propylparaben byl počet buněk v pH 7 7,12 \log CFU/ml a v pH 8 7,20 \log CFU/ml. Za přítomnosti 0,8% propylparabenu byly hodnoty počtu buněk velmi podobné. Při pH 7 činila hodnota 7,00 \log CFU/ml a při pH 8 7,02 \log CFU/ml.

Můžeme tedy konstatovat, že pH 5 není příznivé pH pro růst *Escherichia coli*. Při pH 7 roste nejvíce ve vzorku s 0,4% propylparabenem a nulové hodnoty dosahuje v případě 0,8% methylparabenu. U pH 8 je situace obdobná. Za použití 0,4% propylparabenu je počet buněk nejvyšší a za přítomnosti 0,8% methylparabenu nejnižší. Stejně jako v případě bakterie *Staphylococcus aureus*, roste *Escherichia coli* lépe ve vzorku obsahující propylparaben než ve vzorcích s methylparabenem.

Optimální pH pro růst *Escherichia coli* odpovídá hodnotě 6-8. [75, s. 20]

10.2.4 Srovnání mikroorganismů *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a *Escherichia coli* CCM 3954 v přítomnosti shodných konzervantů o stejné koncentraci – po 7 dnech



Obr. 11. Porovnání počtu buněk (log CFU/ml) různých bakterií ve vzorcích pleťových vod za stejných podmínek

Obrázek 11 znázorňuje 4 grafy v závislosti log CFU/ml na pH. V levém horním rohu je vyobrazeno množství buněk, které rostlo za daných podmínek v přítomnosti 0,4% methylparabenu. V pravém horním rohu je zobrazen růst mikroorganismů ve vzorcích pleťových vod obsahujících 0,8% methylparaben. Vliv přítomnosti 0,4% propylparabenu je graficky znázorněn v levém dolním rohu a v pravém dolním rohu se vyskytuje závislost log CFU/ml na pH za použití 0,8% propylparabenu. Do vzorků pleťových vod byly zaočkovány následující mikroorganismy: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*.

Ve všech případech konzervantů v obou koncentracích a v podmínkách, kdy pleťová voda odpovídá pH 5, neroste ani jedna z naočkovaných bakterií. Z grafu s 0,4% methylparabem je patrné, že *Staphylococcus aureus* roste při pH 7 v počtu buněk 2,75 log CFU/ml a při pH 8 3,18 log CFU/ml. *Pseudomonas aeruginosa* roste jen při pH 8 a *Escherichia coli* při pH 7 a pH 8. Nejvyšší počet buněk všech uvedených mikroorgani-

zmů ve vzorcích pleťové vody za použití 0,4% methylparabenu rostlo v pH 8. Nejvyšší počet buněk dosáhla gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

V pravém horním rohu nám graf zobrazuje růst *Staphylococcus aureus* při pH 7 a pH 8, přičemž vyššího nárůstu dosahval při pH 7. *Pseudomonas aeruginosa* neroste v žádném z uvedených pH a *Escherichia coli* roste pouze v pH 8. Za použití 0,8% methylparabenu rostlo nejvíce druhů mikroorganismů při pH 8. V této formulaci dosahoval *Staphylococcus aureus* nejvyššího počtu kolonií.

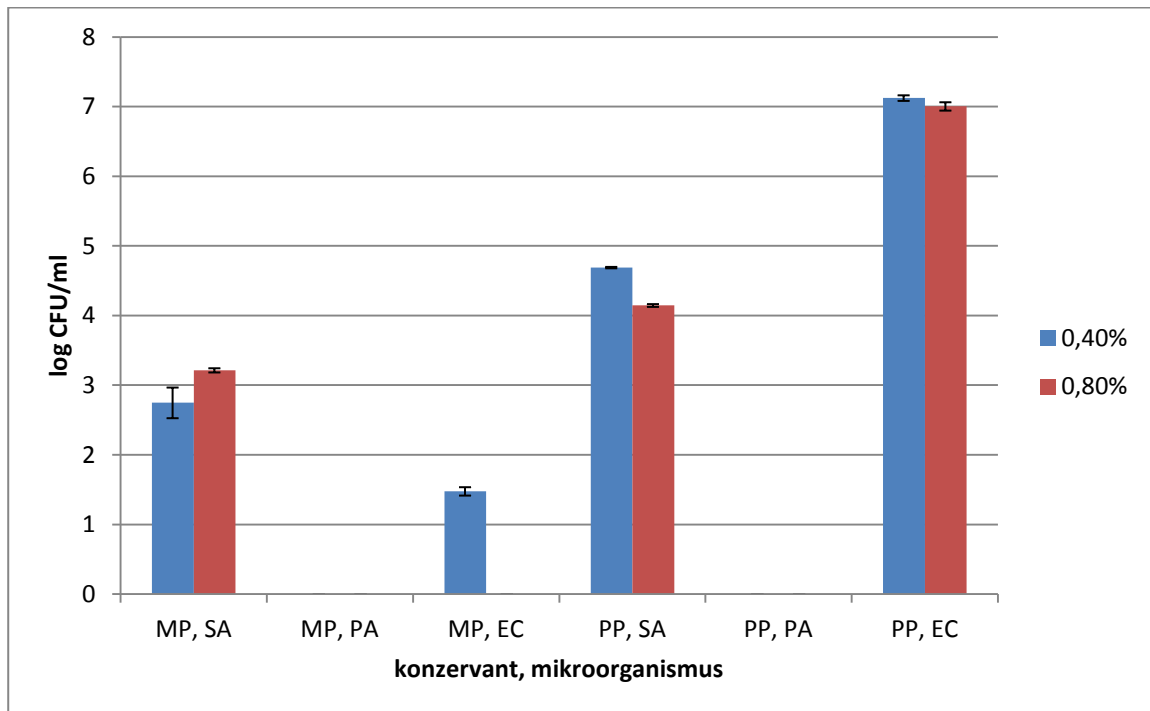
Na grafu s 0,4% propylparabenem, kde vzorky pleťové vody obsahovaly 0,4% propylparaben rostly bakterie *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Grampozitivní bakterii se dařilo lépe v prostředí s pH 7, zatímco gramnegativní bakterie rostla o trochu lépe v pH 8.

Na posledním grafu lze vidět, že *Pseudomonas aeruginosa* opět neroste v žádném z pH. *Staphylococcus aureus* roste v pH 7 i v pH 8, kde je jeho počet buněk o trochu nižší. Počet buněk *Escherichia coli* ve vzorku bylo téměř stejné jak při pH 7, tak při pH 8. Za přítomnosti 0,8% propylparabenu i 0,4% propylparabenu roste nejvíce gramnegativní bakterie *Escherichia coli*.

Nejméně odolná k výše uvedeným konzervantům je *Pseudomonas aeruginosa*, která rostla jen v pleťové vodě s 0,4% methylparabenem v pH 8. *Staphylococcus aureus* rostl nejvíce ve vzorku s 0,4% propylparabenem v pH 7 a nejméně s 0,8% methylparabenem v pH 8. Počet buněk *Escherichia coli* byl nejvyšší v pleťové vodě s 0,4% propylparabenem s pH 8. Lze říci, že tato bakterie rostla více v pH 8 než v pH 7.

10.3 Vliv množství konzervační látky na růst mikroorganismů

10.3.1 Vliv koncentrace parabenů na mikroorganismy v prostředí pH 7

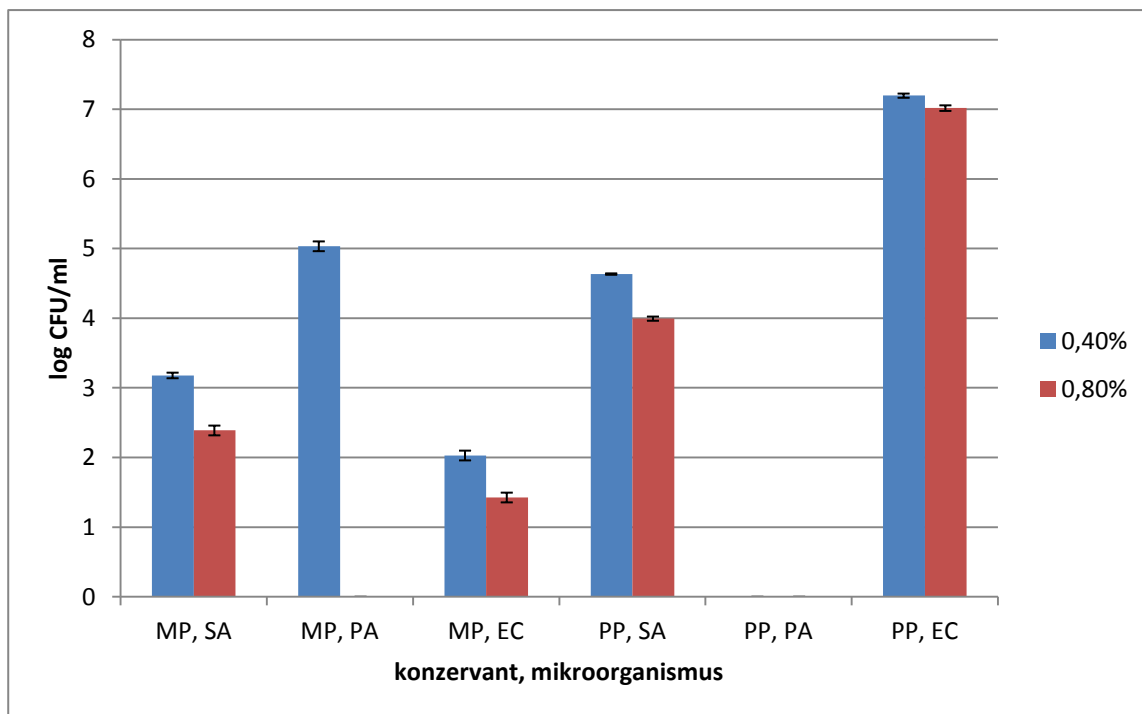


Obr. 12. Počet buněk (\log CFU/ml) bakterií ve vzorcích pleťové vody o pH 7 v závislosti na koncentraci daných konzervantů

Na obrázku 12 je znázorněna závislost \log CFU/ml na koncentraci konzervantu působící na různé druhy bakterií v pleťové vodě o pH 7. Na *Staphylococcus aureus* působil více 0,4% methylparaben než 0,8% methylparaben. Ve výsledné hodnotě vzorku s 0,4% methylparabenem se však objevila největší směrodatná odchylka v celém experimentu, což napovídá o nepřesnosti výsledku. Gramnegativní *Pseudomonas aeruginosa* nerostla ani v jedné koncentraci uvedených konzervantů. *Escherichia coli* rostla jen v 0,4% methylparabenu. V případě použití propylparabenu rostla jak *Escherichia coli*, tak *Staphylococcus aureus* více za použití 0,4% propylparabenu.

Na všechny bakterie působil více 0,8% koncentrace než 0,4% parabenů. Výjimku tvořil *Staphylococcus aureus* v přítomnosti methylparabenu.

10.3.2 Vliv koncentrace parabenů na mikroorganismy v prostředí pH 8



Obr. 13. Počet buněk (\log CFU/ml) bakterií ve vzorcích pleťové vody o pH 8 v závislosti na koncentraci daných konzervantů

Výsledky působení různé koncentrace parabenů jsou uvedeny na obrázku 14. Vzorky byly testovány při pH 8. *Staphylococcus aureus* byl více odolný k nižší koncentraci jak v případě methylparabenu, tak i propylparabenu. *Pseudomonas aeruginosa* rostla jen v případě 0,4% methylparabenu. Poslední bakterií byla *Escherichia coli*, která taktéž rostla méně při nižších koncentracích konzervantů.

Vzhledem k výsledkům z předchozího grafu lze zkonstatovat, že vyšší koncentrace byla na všechny druhy testovaných bakterií více účinná než koncentrace nižší.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo připravit modelovou pleťovou vodu a zhodnotit antimikrobní účinky přítomných konzervantů. Teoretická část se zaměřuje na informace o kosmetických přípravcích a možné přítomnosti mikroorganismů. Dále jsou zmíněna hygienická pravidla výrobního závodu, kontaminace kosmetického přípravku a vlivy vnějšího prostředí na mikroorganismy. V textu je věnována pozornost také konzervačním látkám a faktorům ovlivňující výběr konzervantu. Praktická část se zabývala testováním antimikrobní ochrany připravených vzorků pleťových vod. Jako konzervanty byly použity methylparaben a propylparaben oba v koncentraci 0,4% a 0,8%. Do pleťových vod byly zaočkovány gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* a grampozitivní *Staphylococcus aureus*. Výsledky zátěžového testu byly odečítány v intervalech 0, 7, 14 a 28 dní. Hodnoty byly zpracovány do grafů jako log CFU/ml.

Na základě získaných výsledků a diskuze lze vyvodit tyto závěry:

- Na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* ve vzorku pleťové vody o pH 8 po 7 dnech působil nejvíce 0,8% methylparaben a nejméně 0,4% propylparaben. Dle normy ČSN EN ISO 11930 by pleťové vody se všemi použitými konzervanty splňovaly kritéria, podle kterých je mikrobiologické riziko považováno za tolerované.
- Účinný konzervant působící na gramnegativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa* je 0,8% methylparaben, 0,4% propylparaben a 0,8% propylparaben.
- Použití 0,4% methylparabenu je účinnější na *Staphylococcus aureus* než na *Pseudomonas aeruginosa*.
- V případě gramnegativní bakterie *Escherichia coli* se použití methylparabenu ukázalo jako mikrobiologicky bezpečné.
- Propylparaben působí více na grampozitivní *Staphylococcus aureus* a na gramnegativní *Pseudomonas aeruginosa* než na gramnegativní *Escherichia coli*. Oproti tomu methylparaben účinkuje na *Staphylococcus aureus* méně než na *Escherichia coli*.
- Grampozitivní bakterie jsou více citlivé na působení parabenů než gramnegativní bakterie.
- Na uvedené bakterie nejlépe působí 0,8% methylparaben.
- V pleťové vodě o pH 5 po 7, 14 a 28 dnech neroste žádná z uvedených bakterií.

- *Pseudomonas aeruginosa* v daných intervalech neroste při pH 5 ani při pH 7.
- *Escherichia coli* roste nejvíce při pH 8.
- Na všechny testované bakterie působila více 0,8% koncentrace konzervační látky než 0,4% koncentrace.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MITSUI, Takeo. *New cosmetic science*. New York: Elsevier Science, 1997. ISBN 04-448-2654-8.
- [2] LANGMAIER, Ferdinand. *Základy kosmetických výrob*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2001. ISBN 80-731-8016-2.
- [3] SALVADOR, Amparo a Alberto CHISVERT. *Analysis of Cosmetic Products*. Spa-in: Elsevier, 2007. ISBN 978-0-444-52260-3.
- [4] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?;jsessionid=Th1LT5LG2TxkydpGhX70VF1zyzmVqbrm3PZpqVGqF7NmG3Q1Tcsk!-1809337175?uri=CELEX:32009R1223>
- [5] BRESSER, Harald. *Krása a zdraví kůže: jak pečovat o kůži a léčit její chorobné změny*. Olomouc: Dobra a Fontána, 1999. ISBN 8086179249.
- [6] KREJČÍ, Jiří. *Kosmetické přísady a prostředky*. (přednáška) Zlín, 2013.
- [7] BOARD, Niir. *Modern Technology of Cosmetics*. Delhi: Asia Pacific Business Press, 2004. ISBN 978-817-8330-815.
- [8] SCHMITT, W. H. a D. F. Williams. *Chemistry and technology of the cosmetics and toiletries industry*. 2. vyd. London: Blackie Academic, 1996. ISBN 978-075-1403-343.
- [9] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. ISBN 859-4-315-0528-0
- [10] GEIS, Philip. *Cosmetic microbiology: a practical approach*. 2. vyd. New York: Taylor, 2006. ISBN 08-493-1453-4.
- [11] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-802-4731-704.
- [12] RYŠKOVÁ, Olga. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie: učební texty pro bakalářské studium*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-246-0135-4.

- [13] RYŠKOVÁ, Olga. *Mikrobiologie: pro studující zubního lékařství*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0834-0.
- [14] ROSYPAL, Stanislav. *Bakteriologie a virologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 1994. ISBN 80-858-2716-6.
- [15] WEARING, Judy. *Bacteria: staph, strep, clostridium, and other bacteria*. New York: Crabtree Pub., 2010. ISBN 978-077-8753-889.
- [16] GÖPFERTO VÁ, Dana. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena: pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. 3. dopl. vyd. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-725-4223-0.
- [17] BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. 2. vyd., Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. ISBN 978-80-7318-973-0.
- [18] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995. ISBN 80-856-0571-6.
- [19] BUCHTA, Vladimír. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-718-4565-5.
- [20] HILL, L. a B. KIRSOP. *Bacteria*. New York: Cambridge University Press, 1991. ISBN 05-213-5224-X.
- [21] SRIVASTAVA, S. a P. SRIVASTAVA. *Understanding bacteria*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2003. ISBN 14-020-1633-6.
- [22] Parabený. *ScienceDirect* [online]. [cit. 2013-10-22]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0278691505000530>
- [23] PŘECECHTĚL, Ferdinand. *Lékařská mikrobiologie*. 2. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1995. ISBN 80-210-1087-8.
- [24] KRAMÁŘ, Radim. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2007. ISBN 978-80-7394-021-8.
- [25] HAUERLANDOVÁ, Iva. *Mikroorganizmy na kůži a mikrobiální kontaminace kosmetiky*. (přednáška) Zlín, 2013.

- [26] FREEMAN-COOK, Lisa a Kevin D FREEMAN-COOK. *Staphylococcus aureus infections*. Philadelphia: Chelsea House Publishers, 2006. ISBN 978-079-1085-080.
- [27] FLORES, M. Deterioration of Raw Materials and Cosmetic Products by Preservative Resistant Microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1997, 40 (2), s. 157-160. DOI:10.1016/S0964-8305(97)00037-1
- [28] SUSSMAN, Max. *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. New York: Cambridge University Press, 1997. ISBN 05-214-5361-5.
- [29] *Escherichia coli*. Univerzita Karlova 3. Lékařská fakulta [online]. [cit. 2013-10-24]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/rep/esco.htm>
- [30] BERG, Howard C. *E. coli in motion*. New York: Springer, 2004. ISBN 03-870-0888-8.
- [31] SAMADPOUR, Mansour. *Molecular typing of Pseudomonas aeruginosa in distribution systems*. Denver, CO: AWWA Research Foundation and American Water Works Association, 2001. ISBN 15-832-1136-5.
- [32] GRAUMANN, Peter. *Bacillus: cellular and molecular biology*. 2. vyd. Norfolk: Caister Academic Press, 2012. ISBN 978-190-4455-974.
- [33] PODSTATOVÁ, Hana. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena: učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium*. 1. vyd. Olomouc: Epava, 2001. ISBN 80-862-9707-1.
- [34] FRAGNER, Petr. *Malá lékařská mykologie*. Praha: AVICENUM, 1984. ISBN 08-004-84
- [35] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVI. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-718-4990-1.
- [36] KRASKE, Eva-Maria a Hana MASLOWSKÁ. *Kandidóza: přirozená léčba onemocnění způsobeného kvasinkami*. 1. vyd. Praha: INFORMATORIUM, 1996. ISBN 80-860-7300-9.
- [37] TENNEY, By Louise. *Candida albicans: a nutritional approach*. Pleasant Grove, Utah: Woodland Books, 1996. ISBN 09-139-2328-1.

- [38] BENDOVIÁ, Hana. *Toxikologický profil konzervačních látek*. (přednáška) Hrotovice, 2012.
- [39] *Candida albicans* obrázek. WikiSkripta [online]. [cit. 2013-10-25]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Candida_albicans.jpg
- [40] SINGH, S. K. *Handbook on Cosmetics (Processes, Formulae with Testing Methods)*. Asia Pacific Business Press Inc., 2010. ISBN 9788178331294
- [41] *Aspergillus* obrázek. *Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodověcká fakulta* [online]. [cit. 2013-10-25]. Dostupné z: <http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Aspergillus>
- [42] HAUERLANDOVÁ, Iva. *Mikrobiální rizika výroby kosmetických prostředků*. (přednáška) Zlín, 2013.
- [43] UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ. *Mikrobiologie potravin a kosmetiky*. (učební text). Zlín, 2013.
- [44] MAREN, M. L Van Der. *Lignes directrices de bonnes pratiques de production des produits cosmétiques (BPPC)*. Strasbourg: Conseil de l'Europe, 1995. ISBN 92-871-2848-0.
- [45] FRAISE, A., J-Y. MAILLARD a S. SATTAR. *Principles and practice of disinfection, preservation, and sterilization*. 5. vyd. Chichester, West Sussex: John Wiley, 2012. ISBN 978-144-4333-251.
- [46] KRS, Václav a Radek HANEK. *Materiály I pro studijní obor Kosmetička*. 2. vyd. Praha: Informatorium, 2011. ISBN 978-80-7333-085-9.
- [47] LUNDOV, Michael Dyrgaard, Lise MOESBY, Claus ZACHARIAE, Jeanne Duus JOHANSEN a Maria LLOMPART. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis* [online]. 2009, 60 (2). DOI: 10.1111/j.1600-0536.2008.01501.x.
- [48] HANEK, Radek. *Mikroorganismy a kosmetické přípravky*. (přednáška) Frymburk, 2011.
- [49] LINTNER, By Karl. *Global regulatory issues for the cosmetics industry*. Norwich, N.Y: William Andrew, 2007. ISBN 978-081-5515-692.

- [50] NALLY, Joseph D. *Good manufacturing practices for pharmaceuticals*. 6. vyd. New York, NY: Informa Healthcare, 2007. ISBN 978-084-9339-721.
- [51] BAREL, André, Marc PAYE a Howard MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. 3. vyd. New York: Informa Healthcare, 2009. ISBN 14-200-6963-2.
- [52] EUROFINS. *Testování KP*. (přednáška) Hrotovice, 2012.
- [53] Mikrobiologická kontrola. *Sicherheitsbewertung* [online]. [cit. 2013-10-30]. Dostupné z: <http://www.sicherheitsbewertung.com/cz/risiken.htm>
- [54] ADAMUS, Tomáš. *Základy mikrobiologie a imunologie*. 1. vyd. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita, 2007. ISBN 978-80-248-1284-7.
- [55] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-868-5000-5.
- [56] Vliv faktorů na mikroorganismy. *Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. [cit. 2013-11-06]. Dostupné z: http://biomikro.vscht.cz/vyuka/mzp/V_V_podm.pdf
- [57] FALCON, Janine. Understanding Preservatives. *Cosmetics*. 2009, 38. ISSN: 03151301.
- [58] HANEK, Radek. *Mikroorganismy v KP*. (přednáška) Frymburk, 2011.
- [59] WINTER, Ruth. *A consumer's dictionary of cosmetic ingredients complete information about the harmful and desirable ingredients found in cosmetics and cosmeceuticals*. 6. vyd. New York: Three Rivers Press, 2005. ISBN 978-030-7494-597.
- [60] JUN-QIANG, Huang. Determination of seven preservatives in cosmetic products by micellar electrokinetic chromatography. *International journal of cosmetic science*. 2013, 1. DOI:10.1111/ics.12040.
- [61] IWATA, Hiroshi a Kunio SHIMADA. *Formulas, ingredients and production of cosmetics: technology of skin- and hair-care products in Japan*. New York: Springer, 2013. ISBN 44-315-4060-1.
- [62] WILIAMS, D. F. *Chemistry and technology of the cosmetics and toiletries industry*. 2. vyd. London: Blackie Acad., 1996. ISBN 07-514-0334-2.

- [63] JEDLIČKA, Milan. *Souhrn informací o konzervačních systémech*. (přednáška) Hrotovice, 2012.
- [64] DASTYCHOVÁ, Eliška. *Látky konzervační z pohledu dermatologa*. (přednáška) Hrotovice, 2012.
- [65] HORSKÝ, Ondřej. *Konzervační látky*. (přednáška) Hrotovice, 2012.
- [66] Antimikrobní látky. *Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. [cit. 2013-11-09]. Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/vyuka/fm/Lecture4.pdf>
- [67] BURLANDO, Bruno. *Herbal Principles in Cosmetics Properties and Mechanisms of Action*. Hoboken: CRC Press, 2010. ISBN 978-143-9812-143.
- [68] SONI, M. G. Safety assessment of propyl paraben: a review of the Published literature. *Food and Chemical Toxicology*. 2001, 39. s. 513-532
- [69] ŠMIDRKAL, Jan. *Konzervační látky, vlastnosti a aplikace*. (přednáška), Hrotovice, 2012
- [70] Konzervace kosmetiky. *Státní zdravotní ústav* [online]. [cit. 2013-11-10]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ucinnost-konzervace-kosmetiky>
- [71] ČSN EN ISO 11930. *Kosmetika - Mikrobiologie - Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2012.
- [72] ORTH, Donald. *Cosmetic and drug microbiology: New York: Informa healthcare, 2006. ISBN 08-493-7266-6*.
- [73] BRANNAN, Daniel K. *Cosmetic microbiology: a practical handbook*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1997. ISBN 08-493-3713-5.
- [74] Citlivost bakterií na parabeny. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. [cit. 2014-05-13]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/ktk/www_324/studium/KP/texty_xml/chemoanabiosa.xml
- [75] NEWTON, David E. *Food chemistry*. New York: Facts On File, 2007. ISBN 08-160-5277-8.
- [76] *Pseudomonas aeruginosa*. *Online Textbook of Bacteriology* [online]. [cit. 2014-05-13]. Dostupné z: http://textbookofbacteriology.net/nutgro_4.html

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MP methylparaben

PP propylparaben

MO mikroorganismus

SA *Staphylococcus aureus*

PA *Pseudomonas aeruginosa*

EC *Escherichia coli*

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Candida albicans</i>	21
<i>Obr. 2. Aspergillus</i>	22
<i>Obr. 3. Působení vnějších činitelů na bakterie</i>	29
<i>Obr. 4. Vliv pH na růst E. coli</i>	33
<i>Obr. 5. Chemická struktura parabenů</i>	36
<i>Obr. 6. Počet buněk (log CFU/ml) Staphylococcus aureus ve vzorcích pleťových vod o pH 8, obsahující různé konzervanty</i>	53
<i>Obr. 7. Počet buněk (log CFU/ml) Pseudomonas aeruginosa ve vzorcích pleťových vod o pH 8, obsahující různé konzervanty</i>	54
<i>Obr. 8. Počet buněk (log CFU/ml) Escherichia coli ve vzorcích pleťových vod o pH 8, obsahující různé konzervanty</i>	56
<i>Obr. 9. Počet buněk (log CFU/ml) Staphylococcus aureus ve vzorcích pleťové vody o různém pH</i>	58
<i>Obr. 10. Počet buněk (log CFU/ml) Escherichia coli ve vzorcích pleťové vody o různém pH</i>	60
<i>Obr. 11. Porovnání počtu buněk (log CFU/ml) různých bakterií ve vzorcích pleťových vod za stejných podmínek</i>	61
<i>Obr. 12. Počet buněk (log CFU/ml) bakterií ve vzorcích pleťové vody o pH 7 v závislosti na koncentraci daných konzervantů</i>	63
<i>Obr. 13. Počet buněk (log CFU/ml) bakterií ve vzorcích pleťové vody o pH 8 v závislosti na koncentraci daných konzervantů</i>	64

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Klasifikace kosmetických přípravků podle jejich použití</i>	13
<i>Tab. 2. Fyzikálně-chemické vlastnosti parabenů</i>	36
<i>Tab. 3. Vodní aktivita kosmetických přípravků a druhy MO, které se v nich můžou vyskytovat</i>	40
<i>Tab. 4. Vzorky testovaných pleťových vod.....</i>	47
<i>Tab. 5. Hodnotící kritéria</i>	50
<i>Tab. 6. Počet jednotek tvořící kolonie (CFU) v pleťových vodách bez konzervantu.....</i>	52
<i>Tab. 7. Hodnoty CFU/ml ve vzorku pleťové vody s Pseudomonas aeruginosa při různém pH a odlišném typu a množství konzervantu</i>	59

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha P I Hodnoty log CFU/ml ve vzorcích pleťových vod za přítomnosti methylparabenu
- Příloha P II Hodnoty log CFU/ml ve vzorcích pleťových vod za přítomnosti propylparabenu
- Příloha P III Fotografie mikroorganismů

PŘÍLOHA P I: HODNOTY LOG CFU/ML VE VZORCÍCH PLEŤOVÝCH VOD ZA PŘÍTOMNOSTI METHYLPARABENU

PI a. Počet buněk vyjádřené v log CFU/ml v pleťové vodě s 0,4% MP a pH 5

vzorek s MO	log CFU/ml			
	0 dní	po 7 dnech	po 14 dnech	28 dní
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,68 ± 0,03	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,96 ± 0,04	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6,76 ± 0,03	-	-	-
vzorek bez MO	-	-	-	-

PI b. Počet buněk vyjádřené v log CFU/ml v pleťové vodě s 0,4% MP a pH 7

vzorek s MO	log CFU/ml			
	0 dní	7 dní	14 dní	28 dní
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,68 ± 0,03	2,75 ± 0,22	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,96 ± 0,04	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6,76 ± 0,03	1,48 ± 0,06	-	-
vzorek bez MO	-	-	-	-

PI c. Počet buněk vyjádřené v log CFU/ml v pleťové vodě s 0,4% MP a pH 8

vzorek s MO	log CFU/ml			
	0 dní	7 dní	14 dní	28 dní
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,68 ± 0,03	3,18 ± 0,04	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,96 ± 0,04	5,03 ± 0,07	7,39 ± 0,03	8,47 ± 0,05
<i>Escherichia coli</i>	6,76 ± 0,03	2,03 ± 0,07	-	-
vzorek bez MO	-	-	-	-

PI d. Počet buněk vyjádřené v log CFU/ml v pleťové vodě s 0,8% MP a pH 5

vzorek s MO	log CFU/ml			
	0 dní	7 dní	14 dní	28 dní
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,68 ± 0,03	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,96 ± 0,04	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6,76 ± 0,03	-	-	-
vzorek bez MO	-	-	-	-

PI e. Počet buněk vyjádřené v log CFU/ml v pleťové vodě s 0,8% MP a pH 7

vzorek s MO	log CFU/ml			
	0 dní	7 dní	14 dní	28 dní
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,68 ± 0,03	3,21 ± 0,03	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,96 ± 0,04	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6,76 ± 0,03	-	-	-
vzorek bez MO	-	-	-	-

PI f. Počet buněk vyjádřené v log CFU/ml v pleťové vodě s 0,8% MP a pH 8

vzorek s MO	log CFU/ml			
	0 dní	7 dní	14 dní	28 dní
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,68 ± 0,03	2,39 ± 0,07	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,96 ± 0,04	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6,76 ± 0,03	1,43 ± 0,07	-	-
vzorek bez MO	-	-	-	-

PŘÍLOHA P II: HODNOTY LOG CFU/ML VE VZORCÍCH PLEŤOVÝCH VOD ZA PŘÍTOMNOSTI PROPYLPARABENU

PII a. Počet buněk vyjádřené v log CFU/ml v pleťové vodě s 0,4% PP a pH 5

vzorek s MO	log CFU/ml			
	0 dní	po 7 dnech	po 14 dnech	28 dní
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,81 ± 0,02	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,99 ± 0,04	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6,72 ± 0,03	-	-	-
vzorek bez MO	-	-	-	-

PII b. Počet buněk vyjádřené v log CFU/ml v pleťové vodě s 0,4% PP a pH 7

vzorek s MO	log CFU/ml			
	0 dní	po 7 dnech	po 14 dnech	28 dní
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,81 ± 0,02	4,69 ± 0,01	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,99 ± 0,04	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6,72 ± 0,03	7,12 ± 0,04	7,46 ± 0,02	7,44 ± 0,09
vzorek bez MO	-	-	-	-

PII c. Počet buněk vyjádřené v log CFU/ml v pleťové vodě s 0,4% PP a pH 8

vzorek s MO	log CFU/ml			
	0 dní	po 7 dnech	po 14 dnech	28 dní
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,81 ± 0,02	4,63 ± 0,01	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,99 ± 0,04	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6,72 ± 0,03	7,20 ± 0,03	8,03 ± 0,04	7,86 ± 0,03
vzorek bez MO	-	-	-	-

PII d. Počet buněk vyjádřené v log CFU/ml v pleťové vodě s 0,8% PP a pH 5

vzorek s MO	log CFU/ml			
	0 dní	po 7 dnech	po 14 dnech	28 dní
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,81 ± 0,02	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,99 ± 0,04	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6,72 ± 0,03	-	-	-
vzorek bez MO	-	-	-	-

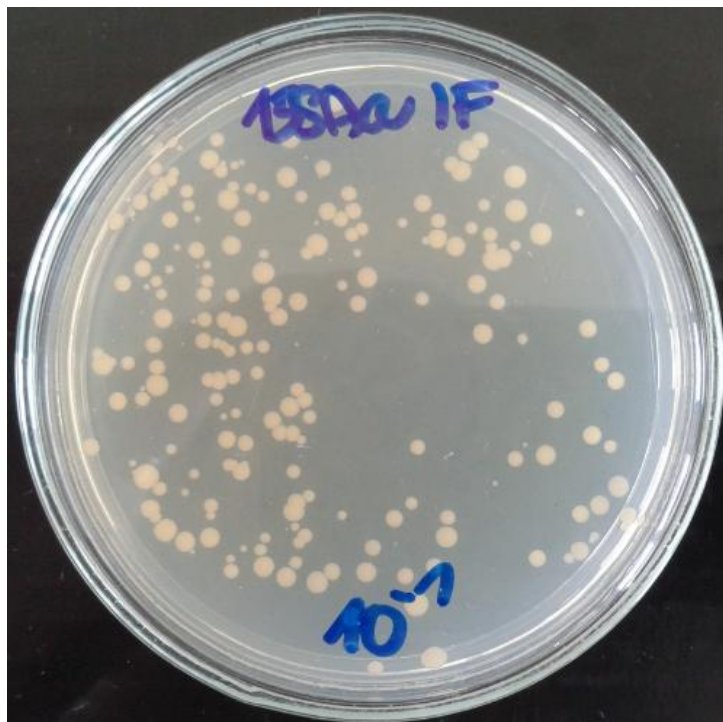
PII e. Počet buněk vyjádřené v log CFU/ml v pleťové vodě s 0,8% PP a pH 7

vzorek s MO	log CFU/ml			
	0 dní	po 7 dnech	po 14 dnech	28 dní
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,81 ± 0,02	4,15 ± 0,02	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,99 ± 0,04	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6,72 ± 0,03	7,00 ± 0,06	7,54 ± 0,04	7,88 ± 0,02
vzorek bez MO	-	-	-	-

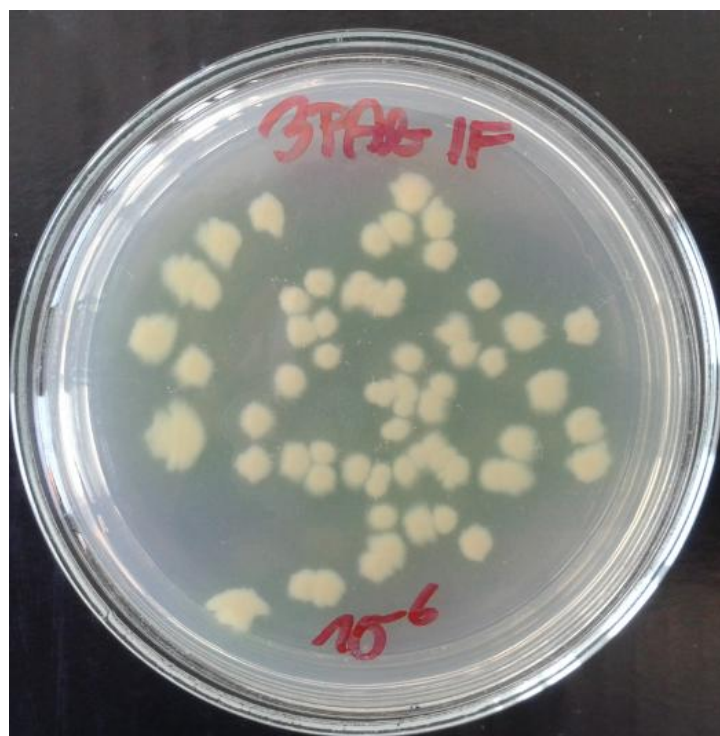
PII f. Počet buněk vyjádřené v log CFU/ml v pleťové vodě s 0,8% PP a pH 8

vzorek s MO	log CFU/ml			
	0 dní	po 7 dnech	po 14 dnech	28 dní
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,81 ± 0,02	3,99 ± 0,03	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,99 ± 0,04	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6,72 ± 0,03	7,02 ± 0,04	8,62 ± 0,07	7,04 ± 0,06
vzorek bez MO	-	-	-	-

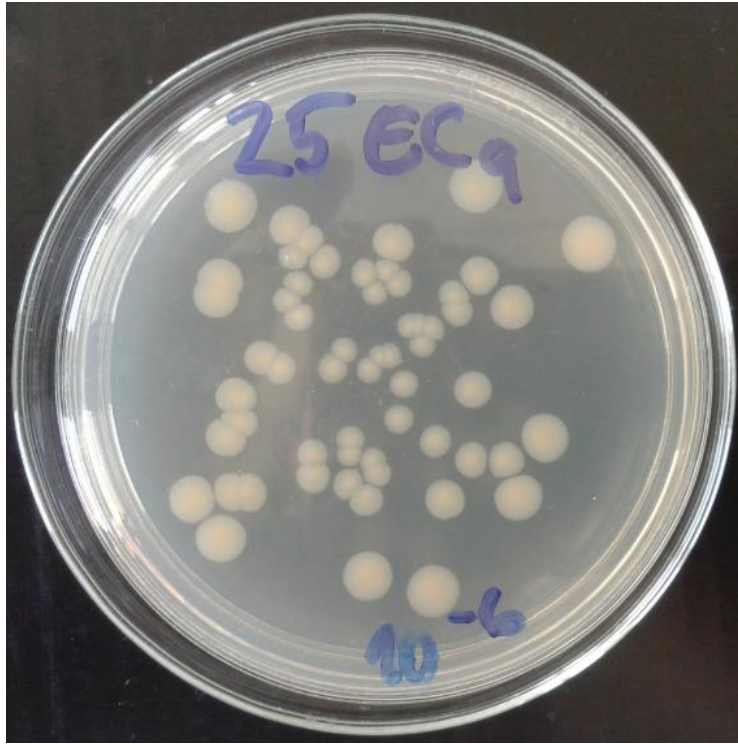
PŘÍLOHA P III: FOTOGRAFIE MIKROORGANIZMŮ



PIII a. Staphylococcus aureus



PIII b. Pseudomonas aeruginosa



PIII c. Escherichia coli