

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

**Srovnání účinnosti kvartérních amoniových solí
na různé mikroorganismy.**

(bakalářská práce)

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Poděkování

Děkuji PharmDr. Jiřímu Sekyrovi a RNDr. Liborovi Kučerovi za umožnění provedení laboratorních experimentů v mikrobiologické laboratoři firmy Profarma-Produkt spol. s r. o..

Velmi děkuji Doc. Ing. Františkovi Hamplovi CSc. za pomoc při vývoji postupu syntézy zkoumaných homologů benzododecinia, zejména při stanovení navážek jednotlivých reaktantů.

Dále děkuji MUDr. Věře Melicherčíkové, CSc. a paní Lence Kubíkové z NRL pro dezinfekci a sterilizaci Státního zdravotního ústavu v Praze za vydatnou pomoc při vývoji vhodné testovací metody a zapůjčení pomůcek k provedení suspenzní mikrometody.

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Teoretická část.....	5
2.1. Dezinfekce.....	5
2.1.1. Fyzikální dezinfekce	5
2.1.2. Chemická dezinfekce	6
2.2. Spektrum dezinfekční účinnosti	7
2.3. Mechanismy účinku biocidů.....	7
2.3.1. Mechanismy působení jednotlivých skupin biocidů.....	8
2.4. Kvartérní amoniové sloučeniny	11
2.4.1. Chemické složení KAS.....	11
2.4.2. Výskyt a historie KAS	11
2.4.3. Aktivita KAS	12
3. Experimentální část.....	13
3.1. Materiál	14
3.1.1. Zkoušené sloučeniny bromidů benzalkonia.....	14
3.1.2. Použité kmeny mikroorganismů.....	16
3.1.3. Použité kultivační živné půdy a pomocné roztoky	16
3.1.4. Pomůcky a přístroje	18
3.2. Pracovní postup.....	19
3.2.1. Výběr metody.....	19
3.2.2. Vlastní testování – suspenzní mikrometoda.....	20
3.2.3. Vlastní testování – standardní suspenzní metoda kvalitativní.....	23
3.2.4. Vyjádření výsledků.....	25
4. Výsledky.....	27
5. Diskuze	31
6. Závěr	36
7. Souhrn	38
7. Summary.....	40
8. Literatura	43

1. Úvod

Prvotním impulzem pro práci byly informace uvedené v odborném článku „Obecná metoda kvarternizace N,N-dimethyl-benzylaminů s dlouho-řetězcovými n-alkylbromidy“ od autorů Kamil Kuča, Milan Kivala, Vlastimil Dohnala, který vyšel v časopise *Journal of Applied Biomedicine* 2 (2004). V tomto článku jsou popisovány různé způsoby syntézy kvartérních amoniových sloučenin, konkrétně bromidů benzalkonia s různě dlouhými alkylovými řetězci, vázanými na kvartérní atom dusíku. V článku je popisována i mikrobiologická aktivita jednotlivých sloučenin. Tato aktivita se liší právě podle délky dlouhého alkylového řetězce, vázaného na kvartérní dusík v kationtové části molekuly benzalkonií. Jelikož se v naší republice používá dezinfekční prostředek Ajatin[®] solutio, který spadá do této kategorie dezinfekčních prostředků, velmi nás tento článek zaujal. Ajatin[®] solutio má na kvartérní atom dusíku vázán alkylový řetězec, který je odpovědný za jeho protimikrobní aktivitu, o délce 12 uhlíků. Podle článku je právě tato molekula nejvíce účinná proti kvasinkám a plísním. C₁₄ homolog nejlépe účinkuje proti G⁺ bakteriím a C₁₆ proti G⁻ bakteriím (Kuča, Kival, Dohnala, 2004 – s odkazem na Merianos, 1991). Proto jsme se rozhodli prozkoumat protimikrobní vlastnosti jednotlivých homologů benzalkonií bromidu a případně vylepšit směsí jednotlivých benzalkonií současné vlastnosti přípravku Ajatin[®] solutio.

2. Teoretická část

2.1. Dezinfekce

Dezinfekce je snaha přerušit cestu šíření nákazy od zdroje k vnímavému jedinci, tedy jde jen o odstranění původců infekce. Na rozdíl od sterilizace, kde jde o odstranění všech mikroorganismů z předmětu nebo z prostředí. Je-li dezinfekce správně prováděná, má velice důležitý význam v boji proti vzniku a šíření přenosných nemocí. Dezinfekční procesy se provádí pomocí fyzikálních, chemických nebo kombinovaných postupů. (Votava, 2001, Melicherčíková, 1998)

2.1.1. Fyzikální dezinfekce

Fyzikální metody dezinfekce jsou většinou založené na využití suchého nebo vlhkého tepla a na aplikaci záření. Také se sem mohou zařadit prostředky mechanické, jako je filtrace nebo prostý úklid a očista. Z metod, kde se používá suché či vlhké teplo jsou nejpoužívanější:

- var ve vodě za atmosférického tlaku po dobu 30 minut
- var v přetlakových hrncích po dobu 20 minut
- dezinfekce v mycích, pracích a parních přístrojích při teplotě vyšší než 90 °C
- spalování (působení přímo plamenem)
- proudící horký vzduch o teplotě 110 °C po dobu 30 minut
- pasterizace – zahřátí na 60 – 65 °C na dobu 30 minut nebo rychlé zahřátí na 85 – 90 °C po dobu několika sekund s následným ochlazením
- parní dezinfekční přístroj – pracuje při teplotě nasycené vodní páry 110 °C, tlaku 50 kPa, po dobu 40 – 45 minut
- paroformaldehydová dezinfekční komora – dezinfekce probíhá při teplotě 45 – 75 °C, relativní vlhkost a doba působení je různá (Melicherčíková, 1998)

Pro dezinfekci zářením se používá záření ultrafialové, infračervené a ionizační.

K čištění dutých nástrojů se před vlastní sterilizací může využít ultrazvuku, který má také určité dezinfekční vlastnosti.

Ke snížení mikrobiální kontaminace citlivých roztoků a vzduchu se v praxi používá filtrace – např. HEPA-filtry v laminárních boxech.

K dezinfekčním metodám úklidu a mechanické očisty patří především očista prostorů na mokro, aby nedocházelo k víření prachových částic s mikroby. Odstranění hrubých nečistot z nástrojů před sterilizací usnadní účinek dalších postupů. Pokud není možné, z rizika hrozící infekce, provede se okamžité ponoření nástroje nejméně na půl hodiny do protivirově účinného dezinfekčního prostředku (Votava, 2001).

2.1.2. Chemická dezinfekce

V praxi metody chemické dezinfekce převažují nad metodami fyzikálními. Chemická dezinfekce se provádí roztoky nebo aerosolem dezinfekčních prostředků. Při působení chemické látky je důležitá koncentrace přípravku a také doba použití. Chemické dezinfekční prostředky se nejčastěji dělí podle chemické struktury.

Nejznámější skupiny dezinfekčních látek jsou:

1. oxidační činidla (ozon, peroxid vodíku, kovové peroxidy, perboritan sodný, persíraný, manganistan draselný, peroxosloučeniny – např. persteril)
2. halogeny (chlor a jeho deriváty – chlordioxid, chloridy, chlornany, chloraminy, anorganické i organické sloučeniny jodu, jodofory, deriváty bromu a fluoru)
3. alkylační činidla (aldehydy – formaldehyd, glutaraldehyd)
4. cyklické sloučeniny (fenol a jeho deriváty – např. lysol, salicylové deriváty, chinoliny, furanové deriváty, akridinová barviva)
5. alkálie (hydroxidy, vápno, vápenné mléko, soda)
6. kyseliny a některé jejich soli
 - anorganické kyseliny (kyselina chlorovodíková, sírová, chromová, boritá, chromsírová směs)
 - organické kyseliny (kyselina mléčná, mravenčí, octová, benzoová)
 - estery kyselin (parabeny)
 - peroxokyseliny
7. sloučeniny těžkých kovů (stříbra, mědi, cínu, rtuti), síry, dusíku, fosforu, boru
8. alkoholy a étery (methylalkohol, ethylalkohol, glykoly, glycerol, éter)

9. povrchově aktivní látky – tenzidy (anionaktivní, kationaktivní, amfotenzidy, neionogenní)

10. kombinované sloučeniny (Votava, 2001, Melicherčíková, 1998)

2.2. Spektrum dezinfekční účinnosti

Při chemické dezinfekci dochází ke specifickému účinku chemických látek na mikroorganismy v prostředí. Působení může být: -statické = znamená dočasnou zástavu růstu a množení mikrobů; -cidní = znamená trvalé usmrcení.

Protimikrobiální látky mají různou účinnost na jednotlivé typy mikrobů, které jsou různě odolné. Podle této odolnosti se mikroby dělí do skupin: bakterie, kvasinky s plísněmi, acidorezistentní Mycobacterium, viry (obalené, neobalené) a spory. Ve spojení s výše uvedeným působením pak získáváme dezinfekční prostředky:

bakterio-	}	-cidní	bakterio-	}	-statické
fungi-			fungi-		
tuberkulo-			spori-		
spori-					
viru-					

(Melicherčíková, 1998)

2.3. Mechanismy účinku biocidů

Dezinfekční prostředky většinou svým působením zasahují do metabolismu mikroorganismů a jejich enzymů. Nejčastěji se jedná o následující chemické reakce: oxidace (chlor, peroxid, ozon), hydrolýza (kyseliny, alkálie, horká voda), tvorba solí s bílkovinami (soli těžkých kovů, halogeny), koagulace bílkovin v buňce (KAS, kovy, fenol, alkoholy), změny permeability buněčné membrány (KAS), proniknutí do enzymatického systému (kovy, formaldehyd, fenol), mechanická disrupce (KAS) (Melicherčíková, 1998).

Některé chemikálie jsou natolik účinné, že výsledkem jejich působení je prakticky sterilita. K této „studené sterilizaci“ se užívají především některé plyny, jako například formaldehyd či páry kyseliny peroctové (Votava, 2001).

2.3.1. Mechanismy působení jednotlivých skupin biocidů

- Oxidační činidla – většina oxidačních činidel působí tak, že odštěpuje atomární kyslík (kyslík ve stavu zrodu). Ten porušuje molekulární vazby a tím inaktivuje bakteriální enzymy. Také oxidačně štěpí substance nezbytné pro život buňky. Dezinfekční prostředky na základě oxidačních činidel mají výhodu v tom, že jsou většinou velmi účinné a univerzální – působí nejen na vegetativní formy bakterií, ale i na spory (ve vyšších dávkách) a také na neobalené viry. Těžké kovy (stříbro, zinek) působí na jejich účinek synergicky. Nevýhodou oxidačních činidel je, že mají sníženou účinnost v přítomnosti organických látek, zejména bílkovin. Musí se používat čerstvé a v dostatečném objemu.

- Halogeny – nejdůležitější mechanismus účinku halogenů je založen obdobně jako u oxidačních činidel na oxidačních procesech v buňce účinkem kyslíku ve stavu zrodu. Další mechanismus účinku u halogenů je vznik halogenních sloučenin, které působí toxicky zejména na buněčné bílkoviny. Účinek halogenových preparátů je rychlý a univerzální, optimum je při pH 5 – 8, snižuje se v přítomnosti organických látek.

- Alkylační činidla – do této skupiny patří zejména aldehydy, které se vyznačují značnou toxicitou. Jejich mechanismus účinku je založený na redukčních a alkylačních vlastnostech radikálů. Reagují se skupinami $-NH_2$, a $-OH$ bílkovin a nukleových kyselin, a tím inaktivují buněčné enzymy. Tato činidla jsou vysoce účinná, s jistotou ničí bakterie, viry, plísně i spory.

- Cyklické sloučeniny – mechanismus účinku mají založený na inaktivaci enzymů a koagulaci protoplazmy za vzniku nerozpustných albuminátů po adsorpci na buněčnou stěnu, rozpouštění lipidů a proniknutí do buňky. Účinky mají baktericidní, gramnegativní mikroby jsou odolnější než grampozitivní. Některé působí fungicidně, virucidní účinek většinou nemají. Účinnost stoupá se zvyšováním teploty. Také jsou účinnější v kyselém prostředí a po smíšení s anorganickými solemi ($NaCl$, $CaCl_2$). Organické látky jejich dezinfekční působení silně ruší.

- Alkálie – jejich dezinfekční účinek závisí na koncentraci OH^- iontů. Silně účinné jsou roztoky, jejichž pH je vyšší než 12. Mechanismem účinku je drastická destrukce buněčných struktur.

Jejich protimikrobní účinek není příliš ovlivňován přítomností organických látek, protože z bílkovin tvoří měkké, rozpustné albumináty a tuky zmýdelňují. Výborně pronikají organickými materiály do hloubky. Proto se přidávají k jiným dezinficiencím ke zvýšení jejich účinku. Mají široké spektrum účinnosti – působí na všechny typy mikrobů včetně virů a spor, velmi citlivé k nim jsou gramnegativní tyčinky. Teploty nad 40 °C výrazně zvyšují jejich účinek. Nevýhodou je jejich velká žíravost a schopnost poškozovat kovy a textilie.

- Kyseliny – na mikrobicidním účinku kyselin se podílí koncentrace vodíkových iontů, anion, celá nedisociovaná molekula, oxidační schopnosti, povrchová aktivita, dehydratační vlastnosti apod., u anorganických kyselin hodnota pH, u organických kyselin oxidační schopnosti. Na rozdíl od louhů nemusí působit spolehlivě v prostředí zatíženém organickými látkami. Koagulační bílkovin vzniklé kyselé albumináty jsou totiž na rozdíl od alkalických poměrně pevné a mohou tak umožnit mikrobům uvnitř koagula přežít. Leptavost a vysoká korozivnost pak znemožňuje jejich širší praktické využití.

- Sloučeniny těžkých kovů – těžké kovy se vyznačují tzv. oligodynamickým účinkem, kdy jejich ionty přecházejí v nepatrném množství do roztoků a působí bakteriostaticky až baktericidně. Účinek klesá u jednotlivých kovů v tomto pořadí: kadmium – stříbro – zinek – mosaz – měď – rtuť. Oligodynamicky dále působí kobalt, nikl, hliník a olovo. Lepší účinek mají na gramnegativní mikroby než na grampozitivní. Na spory mikrobů, mykobakterie, některé plísně a enteroviry nepůsobí. Mechanismus účinku je založený na koagulaci bílkovin a inaktivaci enzymů tím, že se kov váže v prostředí na sulfhydrylové skupiny. Přítomnost organických látek a nízká teplota účinek těžkých kovů snižují. Anorganické soli těžkých kovů jsou vesměs značně toxické pro člověka a mohou vyvolat alergické reakce.

- Alkoholy a étery – jejich dezinfekční účinek spočívá v rychlé schopnosti koagulovat a denaturovat bílkoviny. Koncentrované roztoky jsou neúčinné a protimikrobní působení se projeví jen v přítomnosti vody. Jejich mísitelnost s vodou klesá se vzrůstající délkou řetězce. Dezinfekční účinek stoupá s molekulovou hmotností a s délkou řetězce, tedy v řadě: methanol – ethanol – propanol – butanol. Alkoholy také rozpouštějí tukové látky. Působí baktericidně a částečně virucidně. Na spory alkoholy prakticky nepůsobí, ale zesilují sporicidní účinek např. kyseliny chlorovodíkové nebo formaldehydu.

- Povrchově aktivní látky – tenzidy snižují povrchové napětí rozpouštědla. Mají asymetrickou molekulovou strukturu. Molekula obsahuje jednu nebo více skupin rozpustných a jednu nebo více skupin špatně rozpustných nebo nerozpustných v daném rozpouštědle. Je-li rozpouštědlem voda, nazývá se rozpustná část skupinou hydrofilní, nerozpustná část hydrofobní. Vázány jsou na sebe přímo nebo přes další funkční skupinu. Při vyšší teplotě se účinnost zvyšuje. Při aplikaci na kůži mohou tvořit film, pod kterým mohou některé mikroorganismy přežít. Do této široké skupiny patří například mýdla, saponáty, detergenty, smáčedla, dispergační prostředky. Jsou to vesměs přípravky určené k mytí, čištění, praní. Dezinfekční účinky z povrchově aktivních látek má prakticky jen skupina kationaktivních tenzidů nazývaná kvartérní amoniové sloučeniny (KAS). Protimikrobní účinky těchto látek se vysvětlují porušením buněčné stěny a cytoplazmatické membrány, případně poruchou funkce v membráně přítomných enzymů. Pro nízké povrchové napětí dobře pronikají do štěrbin a mají čistící (detergentní) účinek. Jejich účinnost ruší mýdlo. Výhodou kvartérních amoniových sloučenin je jejich velmi nízká toxicita, nepronikají a nevstřebávají se pokožkou ani sliznicemi. Proto se často používají jako místní antiseptika. Velmi účinné jsou na grampozitivní bakterie a mikroskopické houby, méně na gramnegativní bakterie, zejména na rody *Pseudomonas* a *Proteus*. Na mykobakterie a spory prakticky nepůsobí. Zcela rezistentní k nim jsou neobalené viry.

- Kombinované sloučeniny – využívají synergického působení různých chemických látek, takže se mohou použít v nižších koncentracích a dosahuje se lepšího dezinfekčního působení. Některé přípravky lze kombinovat s detergenty, tím získají mycí a čistící vlastnosti. Například lze kombinovat oxidační činidla a deriváty halogenů těsně před použitím s běžnými detergenty. Aldehydy a alkoholy se zase mísí s kvartérními amoniovými sloučeninami. (Votava, 2001, Melicherčíková, 1998)

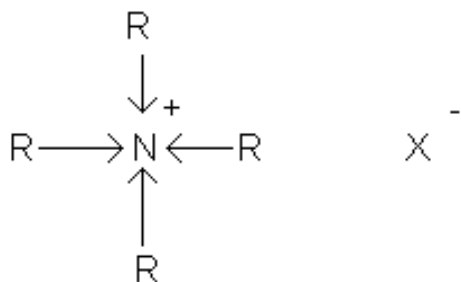
2.4 Kvartérní amoniové sloučeniny

V naší práci jsme se zaměřili na skupinu kvartérních aminových sloučenin.

2.4.1. Chemické složení KAS

Kvartérní amoniové soli jsou produkty nukleofilní substituční reakce alkylového halogenu s terciárním amoniem. Chemicky mají čtyři uhlíkové atomy spojené přímo s dusíkovým atomem kovalentní vazbou, zatímco anion přichází k dusíku elektronovou vazbou. Dusík nese kladný náboj, který je vyrovnáván záporným nábojem anionu. Dusíkový atom a příslušné alkylové skupiny představují funkční část molekuly. Jako anion se používá chlor nebo brom (Merianos, 1991).

Základní vzorec je:



2.4.2. Výskyt a historie KAS

Kvartérní dusíkatá část je esenciální součástí mnoha biologicky aktivních sloučenin. Hraje důležitou roli v mnoha biologických procesech. Od vitamínů (např. thiamin) přes enzymy karboxylázy, které se účastní karbohydrátového metabolismu, cholin, který je vyžadován v transmethylových reakcích tukového metabolismu, acetylcholin – mediátor v přenosu nervových impulsů (Burger, 1960 – převzato od Merianos, 1991). V přírodě bychom mohli nalézt kvartérní dusík například v šípovém jedu kurare, užívaném indiány v Jižní Americe k lovu zvěře.

Počátkem 20. století, vědci zjistili, že po navázání delšího alkylového řetězce na kvartérní dusík, se sloučeniny stávají aktivní a protimikrobní. V historickém využití kvartérních amoniových sloučenin je mnoho etap, ale za nejdůležitější jsou považovány 2 historické milníky: První je práce Jacobs a spol., když prozkoumal strukturu, přípravu a protimikrobní aktivitu. Své práce Jacobs publikoval v letech 1915 a 1916.

Již zde se zmiňuje, že struktura kvartérní amoniové soli souvisí s její protimikrobní aktivitou. Až roku 1935 odhalil Domagk, že za protimikrobní aktivitu je odpovědný dlouhý alkylový řetězec na kvartérním dusíku. To byl druhý nejdůležitější milník ve vývoji KAS. Poté se již brzy začaly první vylepšené kvartérní amoniové soli používat v medicíně i jiných odvětvích (Merianos, 1991).

V první generaci KAS byl jako standard benzalkonium chlorid specifického alkylového rozdělení (C_{12} – 40 %, C_{14} – 50 %, C_{16} – 10 %). Tato první generace byla modifikována aromatickým kruhem, chlórem, methylovou a ethylovou skupinou. Produkty této skupiny s komerčním označením Alkyldimethylethylbenzylammoniumchlorid se řadí již do 2. generace KAS.

V 50. letech dvacátého století přichází 3. generace, u které došlo zejména k značnému snížení orální letální dávky, vylepšení biologické aktivity a čistících vlastností (Merianos, 1991).

2.4.3. Aktivita KAS

Kvartérní amoniové sloučeniny působí v několika stupních:

- 1) adsorpce na součásti bakteriální buněčné stěny
- 2) difuze skrz buněčnou stěnu
- 3) vazba na cytoplazmatickou membránu
- 4) narušení cytoplazmatické membrány
- 5) uvolnění draslíkových iontů a jiných cytoplazmatických složek
- 6) precipitace buněčného obsahu a smrt buňky

Negativně nabitý povrch buněčné stěny napomáhá působení kvartérních amoniových sloučenin, protože svým negativním nábojem přitahuje kationtovou funkční část kvartérních amoniových sloučenin (Merianos, 1991).

3. Experimentální část

Pro stanovení baktericidní, fungicidní a sporicidní účinnosti jednotlivých homologů benzalkonií bromidu jsme byli nuceni zvolit dvě metody, založené na stejném principu. Pro zjištění baktericidní účinnosti jsme mohli zvolit úspornější suspenzní mikrometodu. Protože pro houby a spory není tato metoda vhodná, museli jsme se uchýlit ke klasické standardní suspenzní metodě, ze které byla mikrometoda vyvinuta. Standardní suspenzní metoda je vhodná pro poměrně rychlé kvalitativní hodnocení výsledků. Může se použít pro určení nejkratší účinné expozice při určité koncentraci či určení nejnižší účinné koncentrace při standardní expozici. My jsme ji využili jen pro určení nejnižší účinné koncentrace při standardní expozici, protože pro srovnání účinnosti jednotlivých sloučenin nám tento údaj postačí. Navíc zjišťování nejkratších účinných expozic je materiálově i časově velmi náročné. Suspenzní mikrometoda je určena k hodnocení baktericidní účinnosti chemických látek, využívá systému mikroředění a kultivace v polystyrénových mikrodestičkách s 96 jamkami. Umožňuje stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), minimální baktericidní koncentrace s bílkovinnou zátěží (MBC-B) a minimální baktericidní koncentrace látek ve vodném roztoku (MBC), v jednoduchých pokusech s vysokou reprodukovatelností. Výsledky mikrometody jsou srovnatelné s výsledky standardní suspenzní metody ve zkumavkovém provedení. (Kneiflová, 1988)

Principem suspenzní metody je působení látky na mikroorganismy suspenzované v roztoku této zkoušené látky. Po dané době působení se část směsi vyočkuje do kultivačního média a po inkubaci se hodnotí růst mikroorganismů v závislosti na koncentraci látky a době působení. Ředění zkoušených látek, expozice i kultivace se provádí ve skleněných nebo plastických miskách a zkumavkách a je tedy značně náročná na spotřebu materiálu, prostoru i pracovního času. Proto došlo k modifikaci kvalitativní suspenzní metody na mikrometodu. Suspenzní mikrometoda v základním provedení umožňuje stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), minimální baktericidní koncentrace s bílkovinnou zátěží (MBC-B) a minimální baktericidní koncentrace ve vodném roztoku (MBC) při různých expozicích.

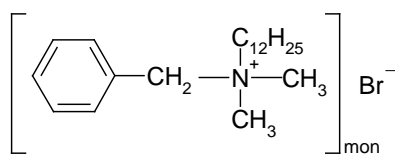
Výhodou mikrometody je malá spotřeba kultivačních médií a možnost zpracování velkého množství materiálu, vzorků látek i mikrobiálních kmenů v krátkém čase. (Kneiflová, 1988)

3.1. Materiál

3.1.1. Zkoušené sloučeniny bromidů benzalkonia

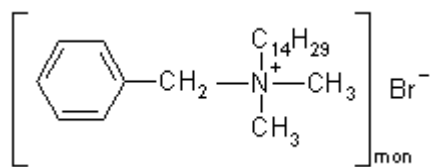
Na našem trhu je nejznámějším běžně dostupným druhem bromidu benzalkonia přípravek známý pod názvem Ajatin[®] solutio a Ajatin[®] tinktura. Tinktura k našemu testu nebyla vhodná, protože kromě KAS obsahuje další protimikrobní látky. Přípravek Ajatin[®] solutio obsahuje benzalkonium s dlouhým alkylovým řetězcem, který je zodpovědný za jeho protimikrobní aktivitu, o délce 12 uhlíků. Dále jsme pro práci potřebovali sloučeniny s délkou tohoto řetězce o 14 a 16 uhlících. Jelikož nejsou tyto homology dostupné, museli jsme nejprve přistoupit k jejich syntéze. Jelikož syntéza není hlavním tématem naší práce, uvedeme si přípravu jen stručně. Základem syntézy je kvarternizace terciárního aminu vhodným alkylačním činidlem. V našem případě jsme použili reakci N,N-dimethylbenzylaminu s příslušným n-alkylbromidem (Kuča, Kivala, Dohnala, 2004 – s odkazem na Zhuravlev et. al., 1954, Rudakova a Popova, 1966, Moss et. al., 1974, Novaki a El Soud, 1999). Připravili jsme navážku N,N-dimethylbenzylaminu s navážkou čištěné vody do destilační baňky. Heterogenní směs jsme za stálého míchání ohřáli na 60 °C. Poté jsme přidali navážku n-alkylbromidu a močoviny. Za stálého míchání jsme teplotu reakční směsi zvýšili na 85 °C (± 5 °C). A pak heterogenní směs homogenizovali 11 hodin na čirý, téměř bezbarvý roztok. Jako kontrolu proběhlé reakce jsme provedli zkoušku na zákal a změřili jsme pH vzniklého produktu, které nesmí být vyšší než 8. Třemi jednotlivými syntézami nám vznikly produkty:

N,N-dimethyl-N-benzyl-N-dodecylamoniumbromid (homolog s 12 uhlíkovým alkylovým řetězcem, C 12)



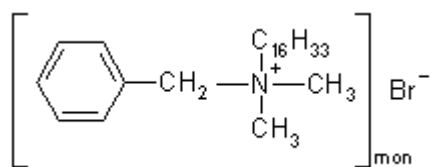
o molekulové hmotnosti: 384,45

N,N-dimethyl-N-benzyl-N-tetradecylamoniumbromid (homolog s 14 uhlíkovým alkylovým řetězcem, C 14)



o molekulové hmotnosti: 412,50

N,N-dimethyl-*N*-benzyl-*N*-hexadecylamoniumbromid (homolog s 16 uhlíkovým alkylovým řetězcem, C 16)



o molekulové hmotnosti: 440,56

Abychom pro další práci znali přesné obsahy látek ve vzniklých velmi viskózních roztocích, provedli jsme stanovení obsahu pomocí argentometrické titrace. Pro přehlednost uvedeme v tabulce:

Tab. 1. Obsah účinné látky v jednotlivých benzalkoniích v koncentrované formě

Zkrácený název připraveného homologu	Obsah účinné látky v [g/100 ml]
Benzalkonium s 12 C řetězcem	83,56
Benzalkonium s 14 C řetězcem	82,28
Benzalkonium s 16 C řetězcem	72,08

Abychom mohli jednotlivé homology mezi sebou porovnávat, upravili jsme je čištěnou vodou pomocí směšovací rovnice na shodnou hodnotu koncentrace:
 $m_1 \cdot w_1 + m_2 \cdot w_2 = (m_1 + m_2) \cdot w_3$.

Nejprve jsme připravili roztoky, které obsahovali ve 100 ml 50 g účinné látky. Zjistili jsme ale, že v takto vysoké koncentraci bychom s nimi nemohli pracovat, protože za běžných laboratorních teplot v roztoku krystalizovaly. Nakonec jsme tedy pro práci připravili roztoky s množstvím účinné látky 3 g/100 ml. Čtvrtým zkoušeným roztokem byla směs jednotlivých homologů, kterou jsme připravili smíšením 3 % roztoků C-12, C-14, C-16 přesně v poměru 1 : 1 : 1.

3.1.2. Použité kmeny mikroorganismů

K testování a porovnávání jednotlivých roztoků benzalkonií a jejich směsi jsme použili referenční kmeny mikroorganismů z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

Tab. 2. Přehled použitých referenčních kmenů mikroorganismů

Název mikroorganismu	Číslo CCM
<i>Staphylococcus aureus</i>	4516
<i>Escherichia coli</i>	4517
<i>Proteus vulgaris</i>	1956
<i>Serratia rubidaea</i>	4684
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1961
<i>Candida albicans</i>	8215
<i>Aspergillus niger</i>	8222
<i>Bacillus subtilis</i>	1999

3.1.3. Použité kultivační živné půdy a pomocné roztoky

Použili jsme dehydratované půdy od firmy HiMedia Indie, jejichž distributorem je Čaderský - Envitek spol. s r.o., Brno. Půdy jsou již dodávány v požadovaném složení. Při přípravě jsme pouze rozpustili danou navážku v čištěné vodě, zkontrolovali pH a vysterilizovali v autoklávu. Agarové půdy jsme rozlili do sterilních Petriho misek z PS o průměru 90 mm.

Pro suspenzní mikrometodu jsme použili: fyziologický roztok, tekutou půdu s hydrolyzáty sóji a kaseinu, tekutou půdu s hydrolyzáty sóji a kaseinu s přídavkem bovinního séra (bílkovinná zátěž), tekutou půdu s hydrolyzáty sóji a kaseinu s přídavkem tweenu a vaječného žloutku (neutralizátor), agarovou půdu s hydrolyzáty sóji a kaseinu, sterilní čištěnou vodu.

Pro standardní suspenzní metodu jsme použili: fyziologický roztok, tekutou půdu s hydrolyzáty sóji a kaseinu, tekutou půdu se sladovým extraktem, agarovou půdu s hydrolyzáty sóji a kaseinu, Sabouraudův glukosový agar s antibiotiky a sterilní čištěnou vodu.

Složení a příprava kultivačních pŮd

- Tekutá pŮda s hydrolyzáty sóji a kaseinu (Soyabean Casein Digest Medium) HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. č. řarže 0000018141

<u>Složení:</u>	pankreatický hydrolyzát kaseinu	17,0 g
	papainový hydrolyzát sóji	3,0 g
	chlorid sodný	5,0 g
	hydrogenfosforečnan draselný	2,5 g
	glukosa monohydrát	2,5 g
	voda čiřtřená	1000 ml

Příprava: 30 g dehydratované pŮdy jsme rozpustili v 1000 ml vody. Ověřili jsme pH ($7,3 \pm 0,2$) a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

- Agarová pŮda s hydrolyzáty sóji a kaseinu (Soyabean Casein Digest Agar) HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. č. řarže 0000014004

<u>Složení:</u>	pankreatický hydrolyzát kaseinu	15,0 g
	papainový hydrolyzát sóji	5,0 g
	chlorid sodný	5,0 g
	agar	15,0 g
	voda čiřtřená	1000 ml

Příprava: 40 g dehydratované pŮdy jsme rozpustili v 1000 ml vody. Ověřili jsme pH ($7,3 \pm 0,2$) a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

- Tekutá pŮda se sladovým extraktem (Malt Extract Broth Base) HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. č. řarže 2G113

<u>Složení:</u>	sladový extrakt	17,00 g
	mykologický pepton	3,00 g
	voda čiřtřená	1000 ml

Příprava: 20 g dehydratované pŮdy jsme rozpustili v 1000 ml vody. Ověřili jsme pH ($5,4 \pm 0,2$) a sterilizovali 10 minut v autoklávu při 115 °C.

- Sabouraudův glukosový agar s antibiotiky (Sabouraud Chloramphenicol Agar) HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. č. řarže 0000015236

<u>Složení:</u>	peptony (z masa a kaseinu)	10,0 g
	glukosa monohydrát	40,0 g
	chloramphenicol	0,05 g
	agar	15,0 g
	voda čiřtřená	1000 ml

Příprava: 65 g dehydratované půdy jsme rozpustili v 1000 ml vody. Ověřili pH ($5,6 \pm 0,2$) a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

- Fyziologický roztok, roztok NaCl Lach-Ner s.r.o. č. šarže 30414 0306

Složení:

chlorid sodný	8,5 g
voda čištěná	1000 ml

Příprava: 8,5 g NaCl jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a auto-klávovali 15 minut při 121 °C.

Jako bílkovinnou zátěž jsme použili bovinní sérum Bioveta a. s., č. šarže 525514 – přídavek 20 % do tekuté půdy s hydrolyzáty sóji a kaseinu. Jako neutralizátor jsme použili sterilní žloutkovou emulsi HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. č. šarže 0000021565 – přídavek 30 g/l a tween 80 (polysorbát 80) Lach-Ner s.r.o. číslo šarže 31520 1106 – přídavek 5 ml/l. Oba roztoky pro neutralizaci jsme přidali do tekuté půdy s hydrolyzáty sóji a kaseinu.

3.1.4. Pomůcky a přístroje

horkovzdušný sterilizátor Stericell SC 55	parní sterilizátor PS-20
termostaty TCH-100	pH-meter Radelkis OP-211/2
analytické váhy AND FA-2000	densi-la-meter Lachema
minishaker MS2	Rotatiter o velikosti kliček 50 µl
ruční inokulátory se 48 jehlami (ježek)	stopky
automatické pipety (+ špičky)	kahan s otočným stojánkem
skleněná kombinovaná elektroda SEOJ 21 ⁺	kalibrační roztoky – pufrý
skleněné kádinky	Erlenmeyerovy baňky
sterilní polystyrénové Petriho misky	bakteriologické kličky
Petriho misky s krevním agarem	sterilní skleněné zkumavky
sterilní polystyrénové mikrotitrační destičky (8x12 jamek)	
filtrační papír, buničitá vata, hliníková folie, igelitové sáčky	

3.2 Pracovní postup

3.2.1. Výběr metody

S výběrem vhodné metody pro zjištění protimikrobní účinnosti našich vzorků jsme měli zpočátku problémy. V literatuře o takových zkouškách není mnoho informací. Až se nám dostala do rukou diplomová práce slečny Kaniakové (2004). Zde byla popsána modifikovaná verze suspenzní mikrometody, ale zároveň velmi cenný odkaz na práci RNDr. J. Kneiflové. Tu jsme obratem sehnali z knihovny Státního zdravotního ústavu. Jelikož jsme neměli s metodou zkušenosti, nevyzněly nám některé drobnosti v textu o postupu práce zcela jednoznačně. Navíc jsme se nemohli rozhodnout zda použít metodu originální nebo modifikovanou. Proto jsme se obrátili o pomoc na vedoucí NRL pro dezinfekci a sterilizaci v Praze p. doktorku Melicherčikovou. Zde jsme byli velice vlídně přijati a jelikož je zde tato metodika rutinní záležitostí, dostali jsme velmi podrobné vysvětlení i s názornou ukázkou. Navíc jsme se dozvěděli, že pokud chceme zkoumat účinnost přípravků na spory a plísňe, nemůžeme mikrometodu použít. Následně jsme obdrželi vysvětlení postupu práce při klasické zku-mavkové suspenzní metodě.

Dilema u suspenzní mikrometody, zda se držet originálu nebo použít modifikovanou metodu, jsme také vyřešili zde. Rozdíl byl v tom, že v původním uspořádání metody se bakteriální suspenze vnáší do jamek mikrodestičky se zkoumanými roztoky ručním inokulátorem (ježkem). Ve formě modifikované došlo k úpravě, jelikož se autorům v tomto provedení nedařilo dosáhnout standardních výsledků. Proto k inokulaci bakteriální suspenze použili automatickou osmikanálovou mikropipetu a očkovali do jamek 10 μ l bakteriální suspenze. V laboratoři NRL nám zapůjčili 8 ručních inokulátorů – ježků se 48 jehlami, kteří byli pro metodu vyrobeni a byli jsme zaškoleni s jejich manipulací, abychom dokázali získat standardní výsledky. Použití ježků je i praktičtější v tom, že jedním naočkujeme celou polovinu mikrodestičky najednou. Dalším druhou polovinu, takže při přeočkování do druhé mikrodestičky můžeme lépe dodržet předepsané časy expozice. Když se bakteriální suspenze očkuje osmikanálovou mikropipetou, může se očkovat pouze po sloupcích, takže při přeočkování do druhé mikrodestičky, při kterém se použije ježek, již může být v časech expozice mezi jednotlivými řadami časový posun.

Nakonec jsme se tedy rozhodli pro použití metody v původním uspořádání. A jelikož jsou kvartérní amoniové sloučeniny známé tím, že mohou ztrácet svou účinnost v bílkovinném prostředí, rozhodli jsme se prozkoumat i tuto vlastnost našich vzorků. Nakonec jsme pomocí suspenzní mikrometody stanovili u našich zkoumaných vzorků:

MIC = minimální inhibiční koncentrace, tj. nejmenší koncentrace, která zastaví růst bakterií

MBC = minimální baktericidní koncentrace, tj. nejmenší koncentrace, která bakterie usmrtí

MBC-B = minimální baktericidní koncentrace v prostředí s bílkovinou (s 20% séra) (Votava, 2001)

MBC/N = minimální baktericidní koncentrace za použití neutralizátoru

Jak jsme již výše uvedli (str. 18), pro stanovení fungicidních a sporicidních vlastností vzorků jsme použili standardní suspenzní metodu. V literatuře jsme nenašli jinou ověřenou metodu pro houby a spory. Jelikož je tato metoda materiálově i časově hodně náročná, rozhodli jsme se pouze pro kvalitativní stanovení určení nejnižší účinné koncentrace při expozici 10 minut, tedy stanovení MBC. Pro porovnání vlastností jednotlivých vzorků by tato informace měla být postačující.

3.2.2. Vlastní testování – suspenzní mikrometoda

Příprava mikrobiální suspenze

Po oživení mikrobiálního kmene z želatinového disku jsme jej pasážovali na krevním agaru, tj. denně jsme kulturu přeočkovávali na nový krevní agar. Pro přípravu suspenze jsme použili 5. pasáž, s 24 hodinovou kulturou. Dvě plné kličky s vyrostlou kulturou jsme přenesli do 50 ml bujónu (tekutá půda s hydrolyzáty sóji a kaseinu). Nechali jsme inkubovat 18 hodin. Filtrací přes sterilní gázu jsme odstranili neroztřepatelné blány. Poté jsme pomocí přístroje Densi-la-meter upravili denzitu suspenze tak, aby odpovídala č. 5 podle stupnice McFarlanda. Tato suspenze by měla obsahovat $10^8 - 10^9$ zárodků/ml. 30 ml připravené suspenze jsme nalili do sterilní Petriho misky o průměru 90 mm, výška hladiny byla přibližně 5 mm. Inokulaci mikrobů do testovaných roztoků v mikrodestičce jsme prováděli vysterilizovanými ježky v plameni. (Melicherčíková).

Abychom znali přesnou mikrobiální zátěž, provedli jsme kontrolu počtu zárodků zředovací metodou a kultivací na agaru. Připravili jsme si řadu 8 zkumavek s 9,0 ml fyziologického roztoku pro každý kmen. Z připravené suspenze jsme odpipetovali do první zkumavky množství 1,0 ml. Po promíchání jsme přenesli 1,0 ml z první zkumavky do druhé, pak z druhé do třetí atd. (vždy za použití čisté špičky). Tak jsme získali řadu ředění $10^{-1} - 10^{-8}$. Z posledních čtyř zkumavek jsme přenesli po 0,5 ml na dvě plotny s krevním agarem. Plotny jsme nechali zaschnout a pak jsme je inkubovali 24 hodin při 37 °C. Po spočítání vyrostlých kolonií jsme mohli stanovit počet zárodků v původní suspenzi. Hodnotili jsme plotny, kde vyrostlo 10 až 300 kolonií. Provedli jsme aritmetický průměr v dubletu a tento výsledek vynásobili 2, čímž jsme získali počet CFU v 1 ml příslušného ředění. Když jsme vynásobili počet CFU v 1 ml příslušným ředěním, získali jsme počet CFU v základní suspenzi.

Vzorce:

Průměr počtu kolonií na plotnách krát 2 = počet CFU/ml.

CFU/ml krát stupeň ředění = počet CFU v základní suspenzi.

Příklad: v ředění 10^{-8} bylo stanoveno 50 CFU/ml

počet CFU v základní suspenzi se vypočte $50 \times 10^8 = 5 \times 10^9$ /ml

Tab. 3. Počty zárodků v mikrobiálních suspenzích pro suspenzní mikrometodu

Název mikrobiálního kmene	Počet CFU/ml v základní suspenzi
<i>Staphylococcus aureus</i>	$8 \cdot 10^9$
<i>Escherichia coli</i>	$4 \cdot 10^9$
<i>Proteus vulgaris</i>	$4 \cdot 10^9$
<i>Serratia rubidaea</i>	$4 \cdot 10^9$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$4 \cdot 10^9$
<i>Candida albicans</i>	$5 \cdot 10^6$

Příprava zkoušených roztoků

Při zkouškách protimikrobní účinnosti dezinfekčních prostředků se většinou pracuje tak, že se originální balení považuje za 100 %. Protože jsme chtěli porovnat účinnost jednotlivých homologů benzalkonií mezi sebou, byl tento trend pro nás nevhodný. Jednotlivé koncentrované roztoky mají různý obsah účinné látky, takže by se v závěru špatně porovnávali.

Jak jsme již výše uvedli (str. 15), nejprve jsme chtěli použít jako primární roztoky s koncentrací 50 g/100 ml. V této koncentraci nám ale vzorky při laboratorní teplotě v roztoku krystalizovali. Největší problém jsme měli především s homologem, který obsahuje dlouhý alkylový řetězec o 16 uhlících. Nakonec jsme byli nuceni sestoupit až na obsah účinné látky 3 g/100 ml. A i pro tuto koncentraci jsme museli mít všechny pomůcky předeřáté v termostatu na 30 °C, jinak nám především homolog s 16 uhlíkovým řetězcem ztuhl v jamkách mikrodestičky.

Ředění vzorků v mikrodestičce

Mikrodestičku jsme si položili tak, že jsme měli 8 řad a 12 sloupců. Všechny jamky jsme naplnili 8-kanálovou mikropipetou 100 µl čištěné vody (MBC), 100 µl kultivačního média (MIC) nebo 100 µl kultivačního média s neutralizátorem (MBC/N). Jednu mikrodestičku jsme použili jako pomocnou, do ní jsme si připravili jednotlivé vzorky. Každý vzorek jsme napipetovali v objemu 200 µl do tří jamek vedle sebe. Pomocí přístroje Rotatiter jsme přenesli 50 µl z pomocné destičky do první řady v pracovní destičce, čímž nám vzniklo ředění 1 g/100 ml. Dále jsme tímto přístrojem provedli ředění vzorků (promíchání obsahu v jamkách jedné řady a přenesení do další řady) a tím jsme získali řadu ředění s koeficientem 3. Ve sloupcích destičky jsme tedy měli koncentrace 1 g/100 ml; 0,333 g/100 ml; 0,111 g/100 ml; 0,037 g/100 ml; 0,012 g/100 ml; 0,004 g/100 ml; 0,0014 g/100 ml. Osmou řadu jsme ponechali bez vzorků pro pozitivní kontrolu růstu mikroorganismů.

Zjištění protimikrobní účinnosti přípravků

Stanovili jsme MIC, MBC-B, MBC a MBC/N při dané expozici. Pro stanovení MIC jsme použili destičku, ve které jsme měli zkoušené vzorky naředěné kultivačním médiem. Připravenou destičku jsme naočkovali připravenou suspenzí mikrobů pomocí ježků. Po 10 minutách expozice jsme z této destičky pomocí ježků provedli inokulaci do kultivační destičky s 200 µl kultivačního média, obohaceného o bovinní sérum (MBC-B při dané expozici). Obě misky jsme zakryli sterilním alobalem, uložili do igelitových sáčků a dali inkubovat na 24 hodin při 37 °C.

MBC ve vodném roztoku, jsme stanovili po inokulaci mikrobiálních suspenzí do roztoků v destičce ředěných vodou a vyočkování ježky po expozici 10 minut do destičky s 200 μ l kultivačního média. MBC/N jsme stanovili stejným způsobem, ale po expozici mikrobiální suspenze 10 minut ve vodném roztoku vzorku jsme očkování ježky provedli do destičky s 200 μ l kultivačního média obohaceného o neutralizátor. Destičky jsme opět přikryli sterilním alobalem, uložili do igelitových sáčků a inkubovali 24 hodin při 37 °C.

Kontrola růstu mikrobiálních kmenů

Výsledek jsme hodnotili po proběhlé inkubaci podle růstu mikroba, který se projevuje sedimentem nebo zákalem v kultivačním médiu v jamkách destičky. Odečet jsme prováděli pomocí lampičky a zrcadla. Pro kontrolu růstu jsme provedli i kontrolní vyočkování na pevnou půdu. Ježka jsme namočili do poloviny desky a inokulum jsme přenesli vpichem na agarovou půdu. Druhým ježkem jsme přeočkovali druhou polovinu destičky na další agarovou půdu. Po inkubaci 24 hodin při 37 °C jsme odečítali růst kolonií. Všechny výsledky odečtené jako zákal v jamkách destiček odpovídaly růstu kolonií na agarové půdě. Také podmínka, že musí být pozitivní růst mikrobů v kontrolní osmé řadě destičky (bez přípravků) byla ve všech provedených zkouškách splněna.

3.2.3. Vlastní testování – standardní suspenzní metoda kvalitativní

Příprava mikrobiální suspenze

Jelikož jsme potřebovali připravit suspenze spor, museli jsme při jejich přípravě postupovat jiným způsobem, než tomu bylo u mikrobiálních kultur pro mikrometodu. Kmeny jsme po oživení z želatinových disků kultivovali na šikmém agaru 6 dní při laboratorní teplotě. Po inkubaci jsme kulturu přelili 5 ml sterilního fyziologického roztoku a vzniklou suspenzi jsme přepipetovali do sterilní zkumavky. Densitu suspenze jsme upravili pomocí přístroje Densi-la-meter tak, aby odpovídala č. 5 podle stupnice McFarlanda. Pro zjištění přesné mikrobiální zátěže jsme provedli kontrolu počtu zárodků pomocí zředovací metody a kultivací na agaru stejným způsobem jako u suspenzí připravených pro suspenzní mikrometodu (str. 20).

Tab. 4. Počty zárodků v mikrobiálních suspenzích pro standardní suspenzní metodu

Název mikrobiálního kmene	Počet CFU/ml v základní suspenzi
<i>Bacillus subtilis</i>	$4 \cdot 10^8$
<i>Aspergillus niger</i>	$4 \cdot 10^7$

Příprava zkoušených roztoků

Vzorky jsme připravili stejným způsobem jako pro suspenzní mikrometodu (viz. str. 20). Výchozí koncentrace byla 3 g/100 ml. Jelikož jsme zkoušené roztoky nalévali do sterilních Petriho misek v objemu 9,9 ml, mohli jsme již tuto koncentraci použít jako zkušební. Ve větším množství vzorku nám žádný přípravek nekystalizoval.

Ředění vzorků

Jelikož je postup práce rozdílný než u mikrometody, museli jsme si předem připravit od každého přípravku řadu ředění. Z postupu ředění u mikrometody jsme zachovali řadu ředění s koeficientem 3. Protože je u této metody mnohem větší spotřeba zkoušených vzorků, pracovali jsme s tímto množstvím: 50,0 ml roztoku s výchozí koncentrací 3 g/100 ml jsme naředili 100,0 ml čištěné vody. Ze vzniklého roztoku jsme opět vzali 50,0 ml a naředili dalšími 100,0. A takto jsme postup opakovali, až jsme dostali řadu ředění o koncentraci: 3 g/100 ml; 1 g/100 ml; 0,333 g/100 ml; 0,111 g/100 ml; 0,037 g/100 ml; 0,012 g/100 ml; 0,004 g/100 ml.

Zjištění protimikrobní účinnosti přípravků

Připravené naředěné roztoky jsme rozplnili po 9,9 ml do sterilních Petriho misek. Kontrolní miska obsahovala 9,9 ml sterilní čištěné vody. Do středu každé misky jsme přidali 0,1 ml připravené mikrobiální suspenze a krouživým pohybem miskou jsme obsah dobře promíchali. Po expozici 10 minut jsme vyočkovali bakteriologickou kličkou o průměru 4 mm (objem 10 μ l) do kultivačního média, připraveného ve zkumavce. Zkumavky s naočkovaným obsahem jsme inkubovali 7 dní při 37 °C. Po inkubaci jsme provedli vyočkování na příslušné agarové půdy a opět inkubovali při teplotě 37 °C, 5 dní. Všechny zkoušky jsme provedli ve třech opakováních.

Kontrola růstu mikrobiálních kmenů

Výsledek jsme hodnotili nejprve po proběhlé inkubaci ve zkumavkách, kde se růst mikroba projevil zákalem nebo růstem chuchvalců v kultivačním médiu. Po inkubaci na agarových plotnách jsme provedli kontrolu podle růstu kolonií na pevných půdách. Všechny výsledky odečtené jako pozitivní růst v tekutém médiu odpovídaly růstu kolonií na agarové půdě. Podmínka, že musí být pozitivní růst mikrobů v kontrolní misce s čištěnou vodou (bez přípravků), byla také ve všech provedených zkouškách splněna.

3.2.4. Vyjádření výsledků

U obou použitých metod jsme hodnotili růst mikroorganismů podle zákalu v jamkách nebo zkumavkách, potvrzený růstem kolonií po vyočkování na agarové plotny. Zákal v jamkách jsme odečítali pomocí lampičky a zrcadla, zákal a chuchvalce ve zkumavkách proti černému pozadí pracovního stolu. Pozitivní růst jsme v tabulkách označili křížkem. Z takto vyplněných tabulek jsme pak mohli stanovit MIC, MBC, MBC-B, MBC/N. Hodnoty určovala první nejnižší koncentrace přípravku bez viditelného růstu.

U suspenzní mikrometody jsme testovali jeden přípravek ve třech jamkách vedle sebe. Jako účinnou jsme hodnotili koncentraci, při níž ani v jedné jamce nedošlo k růstu mikrobů. Každou zkoušku jsme provedli dvakrát. Při srovnání obou pokusů byla většina výsledků shodná, některé se lišily o 1 ředění. V tomto případě jsme do výsledné tabulky zapsali výsledek odpovídající vyšší koncentraci.

Při standardní suspenzní metodě jsme vždy prováděli jeden pokus pro každý kmen a zkoušený přípravek, který jsme třikrát opakovali. Od každé zkoušky jsme měli tři výsledky, jako účinnou jsme hodnotili koncentraci, při níž ve všech třech opakováních nedošlo k růstu mikrobů.

Pokud u obou metod došlo k růstu mikrobů pouze v kontrolním vzorku (bez dezinfekčních prostředků), psali jsme výslednou koncentraci jako \leq poslední testovaná nejnižší koncentrace. Pokud byl růst pozitivní u všech testovaných koncentrací, zapsali jsme, že výsledná účinná koncentrace je $>$ než poslední nejvyšší koncentrace v našem pokusu.

Schéma č. 1: Příklad zapisování výsledků do tabulek a jejich vyhodnocení
Stanovení MBC-B suspenzní mikrometodou pro *Candida Albicans*

Obsah účinné látky	C 12	C 14	C 16	Směs
1 g/100 ml				
0,333 g/100 ml				
0,111 g/100 ml		X		
0,037 g/100 ml		X X	X	X
0,012 g/100 ml	X X X	X X X	X X X	X X X
0,004 g/100 ml	X X X	X X X	X X X	X X X
0,0014 g/100 ml	X X X	X X X	X X X	X X X
Kontrola	X X X	X X X	X X X	X X X

Obsah účinné látky	C 12	C 14	C 16	Směs
1 g/100 ml				
0,333 g/100 ml				
0,111 g/100 ml		X		
0,037 g/100 ml		X X	X	X
0,012 g/100 ml	X X X	X X X	X X	X X
0,004 g/100 ml	X X X	X X X	X X X	X X X
0,0014 g/100 ml	X X X	X X X	X X X	X X X
Kontrola	X X X	X X X	X X X	X X X

Vysvětlivky: X

růst mikroorganismů



odečtená hodnota MBC-B

Konečné hodnoty MBC-B pro testovaný mikroorganismus *Candida albicans*: homolog s 12 uhlíkovým řetězcem 0,037; homolog s 14 uhlíkovým řetězcem 0,333; homolog s 16 uhlíkovým řetězcem 0,111; směs homologů 0,111. Koncentrace vyjádřená v g/100 ml.

Výsledky metody prováděné ve zkumavkách jsme zapisovali stejným způsobem, ale v závěru jsme měli jen jednu tabulku, do které jsme výsledky zapisovali postupně. Z důvodu velké spotřeby nádobí, prostoru i času jsme vždy prováděli jeden test pro každé ředění a mikroorganismus, který jsme třikrát opakovali.

4. Výsledky

Výsledné hodnoty MIC, MBC, MBC-B a MBC/N zkoušených přípravků, které jsme stanovili pomocí kmenů sbírky CCM, jsou uvedeny v tabulkách č. 5 – 8.

Homolog benzalkonia s 12 uhlíkovým alkylovým řetězcem vykazoval MIC pro kmeny *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* v koncentraci $\leq 0,0014$ g/100 ml; pro kmen *Pseudomonas aeruginosa* 0,012 g/100 ml; pro kmeny *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea*, *Candida albicans* 0,004 g/100ml. MBC po 10 minutové expozici vykazoval pro kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea* v koncentraci 0,004 g/100 ml; pro kmen *Pseudomonas aeruginosa* 0,012 g/100 ml; fungicidně na kvasinkové houby *Candida albicans* působil v koncentraci $\leq 0,0014$ g/100 ml, na vláknité houby *Aspergillus niger* 0,037 g/100 ml; sporicidní vlastnosti prokázal na spory rodu *Bacillus subtilis* v koncentraci $\leq 0,004$ g/100 ml.

Homolog benzalkonia s 14 uhlíkovým alkylovým řetězcem vykazoval MIC pro kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea*, *Candida albicans* v koncentraci $\leq 0,0014$ g/100 ml; pouze pro kmen *Pseudomonas aeruginosa* byla potřebná vyšší koncentrace, a to 0,004 g/100 ml. MBC po 10 minutové expozici vykazoval pro kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea*, v koncentraci $\leq 0,0014$ g/100 ml; pro kmen *Pseudomonas aeruginosa* byla účinná koncentrace 0,012 g/100 ml; fungicidně na kvasinkové houby *Candida albicans* působil v koncentraci $\leq 0,0014$ g/100 ml, na vláknité houby *Aspergillus niger* 0,012 g/100 ml; sporicidní vlastnosti prokázal na spory rodu *Bacillus subtilis* v koncentraci $\leq 0,004$ g/100 ml.

Homolog benzalkonia s 16 uhlíkovým alkylovým řetězcem i směs jednotlivých homologů vykazovaly MIC ve shodných koncentracích jako homolog s 14 uhlíkovým alkylovým řetězcem. Při stanovení MBC po 10 minutové expozici byly potřebné koncentrace pro směs homologů opět shodné s výslednými koncentracemi homologu s 14 uhlíkovým alkylovým řetězcem. Homolog s 16 uhlíkovým alkylovým řetězcem zde již vykazoval rozdíly.

MBC po 10 minutové expozici vykazoval homolog C₁₆ pro kmeny *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea* v koncentraci $\leq 0,0014$ g/100 ml; pro kmen *Staphylococcus aureus* byla účinná koncentrace 0,012 g/100 ml a pro kmen *Pseudomonas aeruginosa* 0,037 g/100 ml; fungicidně na kvasinkové houby *Candida albicans* působil v koncentraci 0,004 g/100 ml, na vláknité houby *Aspergillus niger* 0,012 g/100 ml; sporicidní vlastnosti prokázal na spory rodu *Bacillus subtilis* v koncentraci 0,012 g/100 ml.

V prostředí s neutralizátorem se protimikrobní účinky všech přípravků většinou snížily. Jen v několika případech zůstaly hodnoty MBC na stejné úrovni jako v testech bez neutralizátoru. Byly to například hodnoty MBC pro kmen *Pseudomonas aeruginosa*, kde byly výsledné hodnoty MBC shodné pro všechny vzorky v prostředí bez neutralizátoru i s neutralizátorem. Naopak pro kmen *Serratia rubidaea* se účinnost všech přípravků v prostředí s neutralizátorem snížila, a to o jedno až dvě ředění.

V prostředí zatíženém bílkovinou se protimikrobní účinky všech přípravků snížily ještě výrazněji. V tomto pokusu nezůstala žádná z výsledných hodnot MBC na původně zjištěných účinných koncentracích v prostředí bez bílkovinného zatížení. Účinná koncentrace se v pokusu v bílkovinném prostředí snížila jen zcela výjimečně jen o jedno ředění – např. u homologu s 12 uhlíkovým alkylovým řetězcem pro kmeny *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Ve většině pokusů se však účinnost snížila o dvě až tři ředění a v některých případech dokonce o celou řadu ředění, jako například u homologu s 16 uhlíkovým alkylovým řetězcem pro kmen *Escherichia coli*.

Tab. 5. Stanovené hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) testovaných přípravků v [g/100 ml]

Mikrobiální kmen	Zkoušený přípravek			
	C 12	C 14	C 16	Směs
<i>Staphylococcus aureus</i>	$\leq 0,0014$	$\leq 0,0014$	$\leq 0,0014$	$\leq 0,0014$
<i>Escherichia coli</i>	$\leq 0,0014$	$\leq 0,0014$	$\leq 0,0014$	$\leq 0,0014$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,012	0,004	0,004	0,004
<i>Proteus vulgaris</i>	0,004	$\leq 0,0014$	$\leq 0,0014$	$\leq 0,0014$
<i>Serratia rubidaea</i>	0,004	$\leq 0,0014$	$\leq 0,0014$	$\leq 0,0014$
<i>Candida albicans</i>	0,004	$\leq 0,0014$	$\leq 0,0014$	$\leq 0,0014$

Tab. 6. Stanovené hodnoty minimální baktericidní koncentrace (MBC) testovaných přípravků v [g/100 ml]

Mikrobiální kmen	Zkoušený přípravek			
	C 12	C 14	C 16	Směs
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,004	≤ 0,0014	0,004	≤ 0,0014
<i>Escherichia coli</i>	0,004	≤ 0,0014	≤ 0,0014	≤ 0,0014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,012	0,012	0,037	0,012
<i>Proteus vulgaris</i>	0,004	≤ 0,0014	≤ 0,0014	≤ 0,0014
<i>Serratia rubidaea</i>	0,004	≤ 0,0014	≤ 0,0014	≤ 0,0014
<i>Candida albicans</i>	0,004	≤ 0,0014	0,004	≤ 0,0014
<i>Aspergillus niger</i>	0,037	0,012	0,012	0,012
<i>Bacillus subtilis</i>	≤ 0,004	≤ 0,004	0,012	≤ 0,004

Tab. 7. Stanovené hodnoty minimální baktericidní koncentrace s použitím neutralizátoru (MBC/N) testovaných přípravků v [g/100 ml]

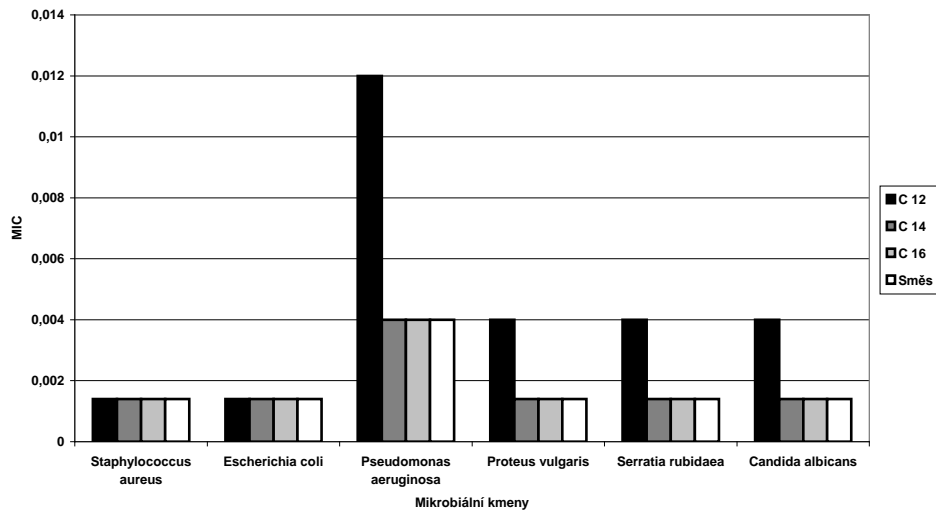
Mikrobiální kmen	Zkoušený přípravek			
	C 12	C 14	C 16	Směs
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,004	≤ 0,0014	0,004	0,004
<i>Escherichia coli</i>	0,333	0,037	≤ 0,0014	0,037
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,012	0,012	0,037	0,012
<i>Proteus vulgaris</i>	0,004	≤ 0,0014	0,004	≤ 0,0014
<i>Serratia rubidaea</i>	0,012	0,012	0,004	0,004
<i>Candida albicans</i>	0,004	≤ 0,0014	0,012	0,004

Tab. 8. Stanovené hodnoty minimální baktericidní koncentrace v prostředí s bílkovinou (MBC-B) testovaných přípravků v [g/100 ml]

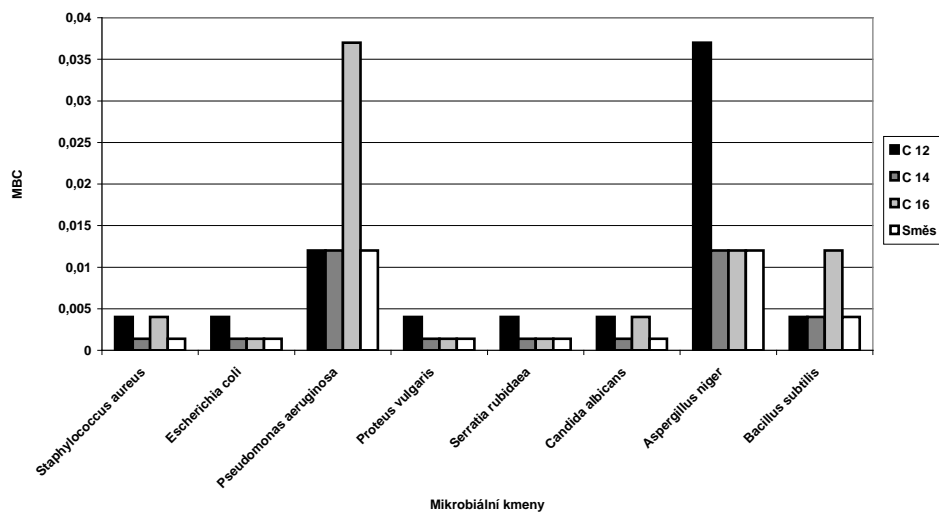
Mikrobiální kmen	Zkoušený přípravek			
	C 12	C 14	C 16	Směs
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,012	0,037	0,012	0,012
<i>Escherichia coli</i>	0,037	0,111	> 1	0,111
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,037	0,111	1	0,333
<i>Proteus vulgaris</i>	0,037	0,012	1	0,111
<i>Serratia rubidaea</i>	1	0,012	1	1
<i>Candida albicans</i>	0,037	0,333	0,111	0,111

Přehled výsledků v grafickém provedení

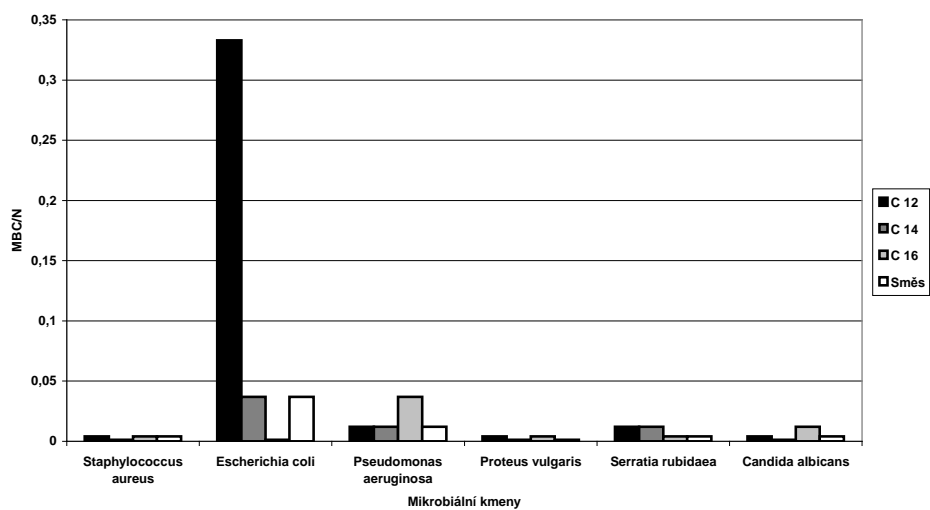
Graf č. 1: Stanovené hodnoty MIC g/100 ml



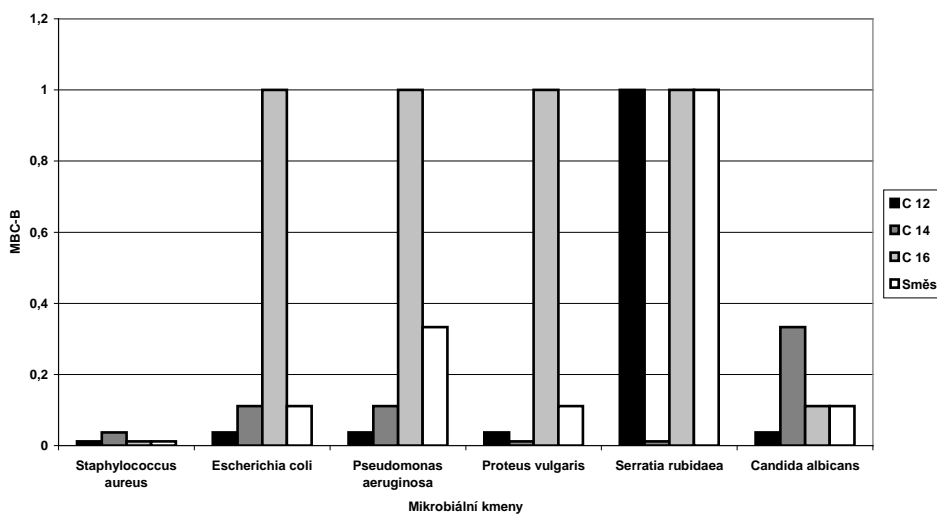
Graf č. 2: Stanovené hodnoty MBC g/100 ml



Graf č. 3: Stanovené hodnoty MBC/N g/100 ml



Graf č. 4: Stanovené hodnoty MBC-B g/100 ml



5. Diskuze

V našem experimentu jsme testovali protimikrobní účinnost přípravků, které se řadí mezi kvartérní amoniové soli. Struktura jejich molekuly je obdobná, liší se pouze různou délkou dlouhého alkylového řetězce ve funkční části jejich molekuly. Pracovali jsme se vzorky:

- N,N-dimethyl-N-benzyl-N-dodecylamoniumbromid - v textu označovaný jako homolog s 12 uhlíkovým alkylovým řetězcem (C_{12}), běžně známý v přípravku Ajatin[®] solutio
- N,N-dimethyl-N-benzyl-N-tetradecylamoniumbromid – v textu označovaný jako homolog s 14 uhlíkovým alkylovým řetězcem (C_{14})
- N,N-dimethyl-N-benzyl-N-hexadecylamoniumbromid – v textu označovaný jako homolog s 16 uhlíkovým alkylovým řetězcem (C_{16})
- čtvrtým vzorkem byla směs jednotlivých homologů, kterou jsme získali smíšením v poměru 1 : 1 : 1

U jednotlivých vzorků jsme stanovili suspenzní mikrometodou MIC, MBC, MBC-B a MBC/N. Jako testovací mikroorganismy jsme použili sbírkové kmeny CCM *Staphylococcus aureus* 4516, *Escherichia coli* 4517, *Proteus vulgaris* 1956, *Serratia rubidaea* 4684, *Pseudomonas aeruginosa* 1961, *Candida albicans* 8215. Standardní suspenzní metodou jsme ověřili účinnost přípravků na vláknité houby a spory. Touto metodou jsme stanovili MBC přípravků pro sbírkové kmeny CCM *Aspergillus niger* 8222 a *Bacillus subtilis* 1999.

Výběrem kmenů jsme měli zastoupeny skupiny aerobních mikroorganismů – grampozitivní, gramnegativní (fermentující i nefermentující), houby (mikroskopické kvasinkovité i vláknité) a bakterie tvořící spory.

Naším základním cílem bylo porovnat protimikrobní účinnost jednotlivých homologů benzalkonia a jejich směsi na jednotlivé druhy mikroorganismů. V literatuře jsme našli údaj, že homolog C_{12} je nejúčinnější proti kvasinkám a plísním, C_{14} homolog nejlépe účinkuje proti G+ bakteriím a C_{16} proti G- bakteriím (Kuča, Kival, Dohnala, 2004 – s odkazem na Merianos, 1991). V našich testech prokázaly všechny tři homology i jejich směs velmi dobré protimikrobní účinky, pokud nebylo prostředí zatíženo bílkovinou. Všechny účinné koncentrace uváděné v dalším textu jsou v g/100ml.

Při stanovení MIC suspenzní mikrometodou, vykazaly homology C_{14} , C_{16} a směs naprosto shodné účinné hodnoty pro testovací mikroorganismy. Tyto hodnoty účinných koncentrací byly velmi nízké ($\leq 0,0014$), kromě kmene *Pseudomonas aeruginosa* byl růst potlačen ve všech zkoušených koncentracích. Pro kmen *Pseudomonas aeruginosa* bylo potřebné účinné ředění jen o jednu řadu vyšší (0,004). Homolog C_{12} při stanovení MIC vykázal shodné vlastnosti s ostatními homology i se směsí pouze pro kmeny *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Pro ostatní kmeny vykázal účinné ředění vždy o jednu řadu vyšší než ostatní vzorky (0,004 a pro *Pseudomonas aeruginosa* 0,012). Přestože se v literatuře uvádí, že kolísání ± 1 ředění se běžně vyskytuje při opakování pokusů (Kneiflová, 1988) a nebývá na tento rozdíl brán zřetel, v tomto testu se nám rozdílný výsledek o jedno ředění zopakoval s naprostou pravidelností, že jsme se rozhodli tento rozdíl nezanedbávat. V závěru v testu MIC prokázaly homology C_{14} , C_{16} a směs shodné protimikrobní účinky. Homolog C_{12} prokázal nižší účinnost o jedno ředění než ostatní proti kmenům *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea* a *Candida albicans*. Provedením této zkoušky se nám tedy deklarované vlastnosti přípravků jednoznačně neprokázaly.

Jelikož jsme chtěli MBC testovaných přípravků stanovit i pro vláknité houby a spory, byli jsme nuceni použít dvou metod. Pro kmeny bakteriální a kvasinkové houby jsme použili suspenzní mikrometodu, pro kmeny vláknité houby a spory jsme použili standardní suspenzní metodu.

Testované přípravky v tomto testu vykazaly větší rozdíly v protimikrobní účinnosti na jednotlivé mikroorganismy než v testu stanovujícím MIC. Na gram-pozitivní kmen zastoupený *Staphylococcus aureus* byl v našem testu nejúčinnější homolog C_{14} a směs homologů ($\leq 0,0014$), homolog C_{12} a C_{16} vykazují proti tomuto kmeni účinnou koncentraci o jednu řadu ředění vyšší (0,004). Účinnost proti bakteriím gramnegativním vykazaly obdobné vlastnosti homolog C_{14} a C_{16} . Oba dokázaly usmrtit kmeny *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea* ve všech testovaných ředěních, jejich MBC proti těmto kmenům jsme stanovili $\leq 0,0014$. U zástupce nefermentujících gramnegativních bakterií *Pseudomonas aeruginosa* byly účinné koncentrace potřebné k usmrcení kmene vyšší. Pro homolog C_{14} byla účinná koncentrace vyšší o 2 ředění (0,012), pro homolog C_{16} vyšší dokonce o 3 ředění (0,037). Směs homologů vykazala pro všechny gramnegativní bakterie shodné účinky jako C_{14} . Homolog C_{12} vykázal proti gramnegativním bakteriím nižší účinnost. Proti zástupcům fermentující řady bylo potřeba účinné koncentrace shodně o jednu řadu ředění vyšší (0,004). Proti nefermentující *Pseudomonas aeruginosa* vykázal homolog C_{12} shodnou účinnost jako homolog C_{14} (0,012). Proti zástupci kvasinkové houby *Candida albicans* byly v našem testu nejúčinnější homolog C_{14} a směs homologů ($\leq 0,0014$). O jednu řadu ředění výše, bylo potřeba k účinku homologů C_{12} a C_{16} (0,004). Kmen vláknité houby *Aspergillus niger* vykázal větší odolnost vůči námi zkoušeným přípravkům než-li kmen kvasinkové houby. Účinná koncentrace byla pro homology C_{14} , C_{16} a směs 0,012, pro C_{12} dokonce 0,037. Velmi překvapivé byly výsledky zkoušky na účinnost přípravků proti sporám. Zde všechny přípravky vykazaly účinnost v koncentraci $\leq 0,004$, kromě homologu C_{16} (0,012).

Při stanovení MBC za použití neutralizátoru některé hodnoty MBC zůstaly na svých původních hodnotách, ve všech ostatních případech bylo zapotřebí vyšší koncentrace k usmrcení mikroorganismů, a to 1 – 2 řady ředění. Proti gram-pozitivnímu *Staphylococcus aureus* vykázal nejlepší účinnost v prostředí s neutralizátorem homolog C_{14} ($\leq 0,0014$). U gramnegativních bakterií byly výsledky mezi jednotlivými kmeny rozdílné. Proti kmeni *Escherichia coli* vykázal nejlepší protimikrobní účinnost homolog C_{16} ($\leq 0,0014$).

Pro kmen *Proteus vulgaris* za použití neutralizátoru měly shodnou nejlepší účinnost homolog C₁₄ a směs homologů ($\leq 0,0014$).

Pro kmen *Serratia rubidaea* opět směs homologů, ale samostatně homolog C₁₆ (0,004). Pro kmen *Pseudomonas aeruginosa* byly výsledky naprosto shodné jako v prostředí bez neutralizátoru, tedy shodná účinnost homologů C₁₂, C₁₄ a směsi (0,012) a nižší účinnost homologu C₁₆ o jednu řadu ředění (0,037). Pro kmen *Candida albicans* v prostředí s neutralizátorem prokázal nejlepší protimikrobní účinnost homolog C₁₄.

Pokus stanovení MBC v bílkovinném prostředí nám potvrdily údaje, že bílkovinné prostředí snižuje účinnost kvartérních amoniových sloučenin. Nejvíce byl ovlivněn bílkovinným prostředím homolog C₁₆. U něj klesla protimikrobní účinnost proti většině testovacích kmenů o několik řad ředění. Pro kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea* jsme stanovili hodnotu MBC v bílkovinném prostředí 1. Pro kmen *Escherichia coli* jsme dokonce hodnotu MBC v tomto provedení nedokázali zjistit (> 1), protože růst kmene nebyl potlačen v žádném námi zkoušeném ředění přípravku. Nejméně byla ovlivněna účinnost v bílkovinném prostředí všech přípravků proti kmeni *Staphylococcus aureus*. Zde vykazaly shodnou účinnost homology C₁₂, C₁₆ a směs homologů (0,012), homolog C₁₄ pouze o jednu řadu ředění nižší (0,037). Nejvíce odolným kmenem v bílkovinném prostředí se ukázala *Serratia rubidaea*. Všechny vzorky proti tomuto kmeni vykazaly shodnou účinnost (1), kromě homologu C₁₄, kterému stačila koncentrace 0,012. Nejlépe účinným homologem v prostředí s bílkovinou se prokázal C₁₂. Vykázal ve většině případů nejnižší potřebné koncentrace k usmrcení testovacích mikroorganismů, kromě kmene *Serratia rubidaea*.

Naše výsledky ověření různé protimikrobní účinnosti jednotlivých homologů benzalkonia na různé skupiny mikroorganismů nebyly zcela jednoznačné. V testu MIC byly výsledné hodnoty účinných koncentrací opravdu velmi podobné, lišící se maximálně o jednu řadu ředění. Pokud bychom brali zřetel i na tento rozdíl, měly homology C₁₄ a C₁₆ shodné protimikrobní vlastnosti, homolog C₁₂ nižší o jednu řadu ředění pro většinu gramnegativních bakterií a pro kmen *Candida albicans*.

V testu MBC výsledky protimikrobní účinnosti jednotlivých homologů také nebyly příliš rozdílné. Pokud bychom brali v úvahu rozdíl v účinnosti i o jednu řadu ředění, mohli bychom říci, že homolog C₁₄ potvrdil svou lepší účinnost na grampozitivní bakterie.

V účinnosti na gramnegativní bakterie vykázal homolog C_{16} shodné účinky s homologem C_{14} , pro kmen *Pseudomonas aeruginosa* dokonce o jednu řadu ředění horší. Homolog C_{12} v našem testu nepotvrdil svou lepší fungicidní účinnost.

V testu MBC, kde bylo prostředí zatíženo bílkovinou, vykázaly homology C_{14} a C_{16} horší odolnost vůči tomuto prostředí a jejich protimikrobní účinnost se několikanásobně snížila. Tento jev bude zřejmě dán strukturou jejich molekuly, kdy delší alkylový řetězec lépe reaguje s molekulou bílkoviny.

Překvapivé byly výsledky sporicidní účinnosti přípravků. O homologu C_{12} , u nás známý jako Ajatin[®] solutio, se běžně uvádí, že sporicidní vlastnosti nemá. Od ostatních homologů jsme očekávali výsledek obdobný. V našem testu však prokázaly všechny homology velmi dobrou sporicidní vlastnost. Zřejmě by bylo vhodné tuto vlastnost ověřit ještě na jiných sbírkových kmenech.

Příznivým zjištěním v testech byl jev, že směs homologů přebírá v protimikrobní účinnosti lepší vlastnosti svých jednotlivých složek.

Celkově vyšly naše výsledné hodnoty účinných koncentrací lépe než je běžně v literatuře o Ajatinu[®] solutio uváděno. Tento jev bude zřejmě způsoben tím, že jsme počítali se skutečnou koncentrací účinné látky v roztoku. U běžně prováděných zkoušek se počítá s výchozím vzorkem jako 100 %. Při tom k dispozici jsou roztoky Ajatinu[®] solutio s obsahem účinné látky 1 g/100ml nebo 10 g/100 ml.

6. Závěr

V našem testu jsme se snažili porovnat účinnost jednotlivých homologů benzalkonia na jednotlivé druhy mikroorganismů. V literatuře uváděné vlastnosti se nám nepodařilo stoprocentně potvrdit. Homolog C_{14} vykazoval lepší účinnost proti grampozitivním bakteriím, ale jen v prostředí nezatíženém bílkovinou. Homolog C_{16} vykazoval velmi dobré vlastnosti proti gramnegativním bakteriím, ale homolog C_{14} měl v testech vlastnosti obdobné. Homolog C_{12} vykazoval většinou horší protimikrobní vlastnosti.

Dokonce i na houby, proti kterým by měl účinkovat lépe. Homolog C_{12} vykázal lepší vlastnosti pouze v prostředí zatíženém bílkovinou.

Výsledky stanovené pro kmen *Candida albicans* suspenzní mikrometodou, by zřejmě bylo ještě dobré ověřit standardní suspenzní metodou.

Při přípravě mikrobiální suspenze kvasinkové houby na zákal č. 5 podle stupnice McFarlanda jsme dosáhli počtu zárodků v suspenzi pouze $5 \cdot 10^6$. Při přeočkování pomocí ručních inokulátorů jsme na jednotlivých trnech tedy měli méně přenášených zárodků než u bakteriálních kmenů.

Sporicidní vlastnosti přípravků byly velmi překvapivé až zarážející, proto by bylo vhodné ověřit je ještě na jiných sbírkových kmenech.

Pozitivním zjištěním zkoušek bylo, že směs homologů přebírá lepší vlastnosti svých složek v protimikrobní účinnosti. Navíc ve směsi mizel problém, který jsme měli se samostatnými homology C_{14} a C_{16} , s jejich vysokou viskozitou a tendencí krystalizovat v roztoku. Čím delší byl alkylový řetězec ve funkční části molekuly, tím se tyto vlastnosti zhoršovaly. Se směsí homologů tyto problémy nebyly. Ověřili jsme vlastnosti směsi, která byla připravena v poměru 1 : 1 : 1 jednotlivých složek. Zřejmě by bylo dobré prověřit protimikrobní vlastnosti směsi, připravené v jiných poměrech jednotlivých homologů.

V případných dalších pokusech bychom po zkušenostech s fyzikálními vlastnostmi přípravků spíše doporučovali standardní suspenzní metodu, i když je mnohem pracnější, náročnější na čas i materiál. Především s homologem C_{16} byl problém, že v jamkách měl tendence krystalizovat, což ve větším objemu v Petriho miskách odeznělo.

7. Souhrn

V práci jsme se snažili porovnat protimikrobní účinnost bromidů benzalkonia s různě dlouhými alkylovými řetězci, vázaného v účinné kationtové části molekuly. Pracovali jsme s homology, které měly délku tohoto řetězce 12, 14 a 16 uhlíků a se směsí homologů, smíchaných v poměru 1 : 1 : 1. Protimikrobní účinnost jsme porovnávali na zástupcích G+ bakterií, G- bakterií, kvasinek, plísní a spor. Použili jsme zástupce kmenů z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně, a to: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*. Stanovili jsme MIC, MBC, MBC/N a MBC-B pomocí suspenzní mikrometody pro všechny kmeny kromě plísně a zástupce spor. Pro *Aspergillus niger* a *Bacillus subtilis* jsme stanovili pouze MBC, a to standardní suspenzní metodou.

Výsledky účinných koncentrací jednotlivých testů jsou uvedeny g/100 ml.

V testu MIC byla protimikrobní účinnost všech zkoušených přípravků téměř shodná. Pro kmen *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* vykazaly všechny zkoušené homology i směs účinnost při koncentraci $\leq 0,0014$. Pro kmen *Pseudomonas aeruginosa* homology C_{14} , C_{16} a směs 0,004, homolog C_{12} 0,012. Pro kmeny *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea*, *Candida albicans* homology C_{14} , C_{16} a směs shodně $\leq 0,0014$, homolog C_{12} 0,004.

V testu MBC vykázal protimikrobní účinnost na kmen *Staphylococcus aureus* homolog C_{14} a směs homologů v koncentraci $\leq 0,0014$, homology C_{12} a C_{16} v koncentraci 0,004. Na kmeny *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea* homology C_{14} , C_{16} a směs $\leq 0,0014$, homolog C_{12} 0,004. Na kmen *Pseudomonas aeruginosa* homology C_{12} , C_{14} a směs 0,012, homolog C_{16} 0,037. Na kmen *Candida albicans* homolog C_{14} a směs $\leq 0,0014$, homology C_{12} a C_{16} 0,004. Na kmen *Aspergillus niger* homology C_{14} , C_{16} a směs 0,012, homolog C_{12} 0,037. Na spory kmene *Bacillus subtilis* homology C_{12} , C_{14} a směs $\leq 0,0014$, homolog C_{16} 0,037.

V testu MBC/N vykázal protimikrobní účinnost proti kmeni *Staphylococcus aureus* homolog C_{14} v koncentraci $\leq 0,0014$, homology C_{12} , C_{16} a směs 0,004.

Proti kmeni *Escherichia coli* homolog C_{16} v koncentraci $\leq 0,0014$, homolog C_{14} a směs 0,037, homolog C_{12} 0,333. Proti kmeni *Pseudomonas aeruginosa* homology C_{12} , C_{14} a směs 0,012, homolog C_{16} 0,037. Proti kmeni *Proteus vulgaris* homolog C_{14} a směs $\leq 0,0014$, homology C_{12} a C_{16} 0,004. Proti kmeni *Serratia rubidaea* homolog C_{16} a směs 0,004, homology C_{12} , C_{14} 0,012. Proti kmeni *Candida albicans* homolog C_{14} $\leq 0,0014$, homolog C_{12} a směs 0,004, homolog C_{16} 0,012.

V testu MBC-B vykázaly protimikrobní účinnost proti kmeni *Staphylococcus aureus* homology C_{12} , C_{16} a směs v koncentraci 0,012, homolog C_{14} 0,037. Proti kmeni *Escherichia coli* homolog C_{12} 0,037, homolog C_{14} a směs 0,111 a homolog C_{16} > 1 . Proti kmeni *Pseudomonas aeruginosa* homolog C_{12} 0,037, homolog C_{14} 0,111, směs 0,333 a homolog C_{16} 1. Proti kmeni *Proteus vulgaris* homolog C_{12} 0,037, homolog C_{14} 0,012, směs 0,111 a homolog C_{16} 1. Proti kmeni *Serratia rubidaea* homolog C_{14} 0,012, homology C_{12} , C_{16} a směs 1. Proti kmeni *Candida albicans* homolog C_{12} 0,037, homolog C_{16} a směs 0,111, homolog C_{14} 0,333.

Dle literatury je homolog C_{12} nejúčinnější proti kvasinkám a plísním, C_{14} homolog proti G+ bakteriím a C_{16} proti G- bakteriím (Kuča, Kival, Dohnala, 2004 – s odkazem na Merianos, 1991). Naše výsledky ověření různé účinnosti jednotlivých pomologů na různé skupiny mikroorganismů nebyly zcela jednoznačné. Výsledky se často lišili pouze o jedno ředění. Homolog C_{14} vykazoval lepší účinnost proti grampozitivním bakteriím, ale jen v prostředí nezátíženém bílkovinou. Homolog C_{16} vykazoval velmi dobré vlastnosti proti gramnegativním bakteriím, ale homolog C_{14} měl v testech vlastnosti obdobné. Homolog C_{12} vykazoval ve většině testů horší protimikrobní vlastnosti, pouze se ukázalo, že je odolnější proti bílkovinnému zatížení prostředí. Překvapivé byly velmi dobré výsledky sporicidní účinnosti přípravků. Pozitivním zjištěním zkoušek bylo, že směs homologů přebírala lepší vlastnosti svých složek v protimikrobní účinnosti. Navíc ve směsi mizel problém, který jsme měli se samostatnými homology C_{14} a C_{16} , s jejich vysokou viskozitou a tendencí krystalizovat v roztoku. Zjištěné protimikrobní účinky zkoušených přípravků by bylo ještě vhodné ověřit na jiných sbírkových kmenech. Také by bylo zajímavé ještě prověřit protimikrobní vlastnosti směsi, připravené v jiných poměrech jednotlivých homologů.

7. Summary

We tried to compare antimicrobial effectiveness of Benzalkonium bromide with various lengths of alkyl chains fixed in effective cationic section of the molecule in this dissertation. We worked with homologues that had the alkyl chain length 12, 14 and 16 carbon atoms and also with the mixture of homologues mixed in ratio 1 : 1 : 1. We were comparing the antimicrobial effectiveness against the members of G+, G- bacteria, torula, fungi and spores. We used agents from the Czech collection of microorganisms of the Natural science faculty of the Masaryk University Brno. Namely they are: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis*. We determined MIC, MBC, MBC/N and MBC-B by the help of suspension micromethod for all strains except the fungi and spores members. Concerning the *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis* we determined only the MBC. This was executed by the standard suspension method.

The results of effective concentrations of particular tests are mentioned in g/100ml.

The antimicrobial effectiveness in the MIC test was nearly identical for all tested preparations. Concerning the bacterial strain of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* all homologues and also a mixture proved their effectiveness in concentrations under 0,0014. Concerning the strain *Pseudomonas aeruginosa* the effective concentrations for C₁₄, C₁₆ homologues was 0,004 and for homologue C₁₂ 0,0012. Concerning the *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea*, *Candida albicans* strains the effective concentrations of homologue C₁₄, C₁₆ was under 0,0014 and homologue C₁₂ was equal 0,004.

The antimicrobial effectiveness against the strain of *Staphylococcus aureus* was proved in test for MBC in concentration under 0,0014 for homologue C₁₄ and the mixture of homologues, for homologue C₁₂ and C₁₆ the concentration was 0,004. Concerning the strain of *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia rubidaea* we proved that homologues C₁₄, C₁₆ and the mixture worked in concentration under 0,0014 and homologue C₁₂ worked in 0,004. For the strain *Pseudomonas aeruginosa* the C₁₂ and C₁₄ homologues and the mixture the effective concentration was 0,012 and for homologue C₁₆ it was 0,037.

Effective concentration against the strain of *Candida albicans* was under 0,0014 for homologue C₁₄ and the mixture for homologue C₁₂ and C₁₆ the concentration was 0,004. Against the strain of *Aspergillus niger* homologues C₁₄, C₁₆ and the mixture worked in concentration 0,012. Homologue C₁₂ worked in concentration 0,037. The homologues C₁₂, C₁₄ and the mixture in concentration under 0,0014 affected the spores of strain of *Bacillus subtilis*. The homologue C₁₆ affected in 0,037.

The antimicrobial effectiveness against the strain of *Staphylococcus aureus* was proved in test for MBC/N in concentration under 0,0014 for homologue C₁₄ and the mixture of homologues, for homologue C₁₂ and C₁₆ the concentration was 0,004. Concerning the strain of *Escherichia coli* the homologue C₁₆ worked in concentration under 0,0014. Homologue C₁₄ and the mixture worked in 0,0037 and homologue C₁₂ in 0,333. For the strain of *Pseudomonas aeruginosa* the C₁₂ and C₁₄ homologues and the mixture the effective concentration was 0,012 and for homologue C₁₆ it was 0,037. The effective concentration for *Proteus vulgaris* was under 0,0014 at C₁₄ homologue and the mixture and 0,004 at homologues C₁₂ and C₁₆. At *Serratia rubidaea* we proved that homologue C₁₆ and the mixture worked in concentration under 0,004 and homologues C₁₂ and C₁₄ worked in 0,012. Effective concentration against the strain of *Candida albicans* was under 0,0014 for homologue C₁₄, for homologue C₁₂ and the mixture the concentration was 0,004. Homologue C₁₆ worked in 0,012.

The antimicrobial effectiveness against the strain of *Staphylococcus aureus* was proved in test for MBC-B in concentration 0,0012 for homologue C₁₂, C₁₆ and mixture and 0,037 for C₁₄ homologue. Concerning the strain of *Escherichia coli* the homologue C₁₂ worked in concentration 0,037. Homologues C₁₄ and the mixture worked in 0,111 and homologue C₁₆ in concentration higher then 1. For the strain of *Pseudomonas aeruginosa*, the effective concentration for the C₁₂ homologue was 0,037 and for homologue C₁₄ it was 0,111, for the mixture 0,333 and for the C₁₆ homologue 1. The effective concentration for *Proteus vulgaris* was 0,037 at C₁₂ homologue, 0,012 at homologue C₁₄, 0,111 at the mixture and 1 at the homologue C₁₆. At *Serratia rubidaea* we proved that homologue C₁₄ worked in concentration 0,012 and homologues C₁₂ and C₁₆ and the mixture worked in 1.

Effective concentration against the strain of *Candida albicans* was 0,037 for homologue C₁₂, for homologue C₁₆ and the mixture it was 0,111 and for C₁₄ homologue 0,333.

According to the literature the C₁₂ homologue is the most effective against torula and fungi. C₁₄ homologue works the best against G+ bacteria and C₁₆ homologue against G- bacteria (Kuča, Kival, Dohnal, 2004 – with reference to Merianos, 1991). The results coming from our testing of different homologues against various microbial strains are not that unambiguous then the literature says. The results differ only by one dilution. Homologue C₁₄ shows better efficiency against G- bacteria but only in media without the protein presence. Homologue C₁₆ shows very good properties against G- bacteria but on the other hand the C₁₄ has almost the same qualities. Homologue C₁₂ embodies worse antimicrobial qualities in a majority of performed testing but it shows that it is more resistant against the media with a protein load. Quite good sporecidal efficiency of all prepared preparations was very surprising. The mixture of homologues overtakes the better properties of its particular members in antimicrobial efficiency. This information was considered as a very positive finding. Together with this positive effect we have discovered that the mixture also removes the disadvantage of homologues C₁₄ and C₁₆ with their high viscosity and tendency to crystallize from the solution. It would be recommended to verify the obtained antimicrobial effectiveness data against the different strains from the microbial collection. It would also be interesting to prove the antimicrobial properties of the mixture that would be prepared from the same particular homologues but in different ratios.

8. Literatura

- Bednář M. a kol.: Lékařská mikrobiologie, Marvil, Praha, 1999
- Buchta, P., Jílek, P., Horáček, J., Horák, V.: Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty, Praha, Nakladatelství Karolinum, 2000, s. 24 – 31
- Denyer, S.P., Maillard, J.-Y.: Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria, J Appl Microbiol Symposium Supplement 2002, 92, s. 35 – 45
- Greenwood, D. a kol.: Lékařská mikrobiologie, Grada Avicenum, Praha, 1999, 1156 s.
- Hampl F.: ústně předané informace – syntéza benzalkonií a jejich vlastnosti, VŠCHT Praha, 2007
- Kaniaková M.: Interakce farmaceuticky významných bakterií s protimikrobními látkami (diplomová práce), Hradec Králové, 2004
- Kneiflová J.: Hodnocení baktericidní účinnosti dezinfekčních prostředků suspenzní mikrometodou, IHE, Praha, Čs. Epid, Mikrobiol, Imunol, 1988, 37, č. 2 s. 97 – 104
- Kuča, Kivala, Dohnala: Obecná metoda kvarternizace N,Ndimethyl-benzylaminů s dlouhořetězcovými n-alkylbromidy, J Appl Biomed 2004, 2, s. 195 – 198
- Maillard, J.-Y.: Bacterial target sites for biocide action, J Appl Microbiol Symposium Supplement 2002, 92, s. 16 – 27
- Melicherčíková V.: Sterilizace a dezinfekce ve zdravotnictví, Grada Publishing, Praha, 1998, s. 45 – 70
- Melicherčíková V.: ústně předané informace – postupy práce suspenzní mikrometody a standardní suspenzní metody, NRL pro dezinfekci a sterilizaci SZÚ v Praze, 2007
- Merianos J. J. In Block S. S. (ed.), Disinfectoin, sterilization and preservation; Lea and Febinger, PA, 1991, s. 225 – 255
- Standardní metody pro hodnocení dezinfekční účinnosti chemických látek, Praha, AHEM, příloha č. 1/1985, s. 1 – 14
- Votava M.: Lékařská mikrobiologie obecná, Neptun, 2001, s. 147 – 160