

České vysoké učení technické v Praze  
Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra přírodovědných oborů

# Studium interakcí kovových nanočástic a mikrobiologických objektů prostřednictvím pokročilých mikroskopických metod

Disertační práce

**Ing. Michaela Rabochová**

Kladno, duben, 2024

Doktorský studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínská a klinická technika

**Školitel:** RNDr. Jan Lorinčík, CSc.

**Školitel specialista:** doc. Ing. Petr Kudrna, Ph.D.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci s názvem „Studium interakcí kovových nanočástic a mikrobiologických objektů prostřednictvím pokročilých mikroskopických metod“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k dizertační práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne

.....

Ing. Michaela Rabochová

## Poděkování

Všem, kteří mi věřili a podporovali mě. A též těm, kteří si jdou za svým snem.

Děkuji všem partnerům, kteří se podíleli na realizaci mých snů a disertační práce. Jsou součástí mé týmové symbiózy a já si vážím našeho společného propojení, které mi dává smysl.

Ze srdce děkuji pěkně svému školiteli RNDr. Janu Lorinčíkovi, CSc. za začátek mé cesty k vědě s cíli nepoznaného a tvořivostí štěstí člověka. Děkuji velice pěkně doc. Ing. Ireně Jarošové Kolouchové, Ph.D. za úžasnou podporu a pozitivní nádech přítomnosti a neomezenosti. Velmi děkuji doc. Ing. Olze Mařátkové, Ph.D. za vědecké vyjádření tvorby naší práce, Ing. Markétě Kulišové a Ing. Anně Miškovské za přípravu mikrobiologických experimentů a naše přátelství. Děkuji paní Mgr. Kristíně Sihelské a Ing. Janu Gutovi za reflexi naší spolupráce. Děkuji panu doc. Ing. Petru Kudrnovi, Ph.D., mému školiteli specialistovi z FBMI ČVUT, za katederní podporu této práce.

# Abstrakt

Rostoucí rezistence mikromycetných patogenů na léčbu abiotickými přípravky představuje významné celosvětové riziko 21. století. Mikromycetní infekce způsobující závažná invazivní a diseminovaná onemocnění spojené s vysokou mírou přidružené mortality jsou vážnou hrozbou pro současnou medicínu zejména imunodeficientních pacientů. Prioritou mnohých vědecko-výzkumných pracovišť po celém je nalezení inovativních metod vývoje antifungálních léčiv, které by umožnily eliminaci těchto mikroorganismů a nastavení takové metodologie, která zajistí reprodukovatelné informace o fyziologickém stavu daných mikroorganismů po působení antifungálních prostředků. Mikromyceta patří mezi eukaryota, jsou tedy strukturně složitější než prokaryotní buňky, a zároveň je jejich růst odlišný od jednobuněčných eukaryot, kterými jsou například kvasinky. Mikromyceta vytváří jak biofilmy, tak velmi odolné asexuální spory, které umožňují překonání náročných či nehostinných podmínek i po dobu několika let. V této souvislosti jsou v rámci této disertační práce studovány aplikační účinky stříbrných biosyntetizovaných nanočástic a abiotický vliv nízkoteplotního plazmatu.

Byl proveden základní výzkum vlivu biosyntetizovaných nanočástic na morfologii buněčného povrchu vybraného mikroorganismu *Candida albicans*, který patří dle World Health Organization mezi patogeny v kategorii kritického rizika pro světovou populaci a veřejné zdraví. Zároveň byla provedena studie vlivu nízkoteplotního plazmatu na morfologii buněčných povrchů vybraných mikromycetných organismů druhů *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum*. Aplikace nízkoteplotního plazmatu na mikromycetní organismy byla do současné doby opomíjena. Výzkum této práce uzavírá studium morfologie struktur vybraných mikromycetných spor a *C. albicans*. Byly zjištěny morfologické změny mikrobiálních struktur vybraných patogenů prostřednictvím pokročilých mikroskopických metod SEM, STEM-in-SEM, AFM a FIB-SEM. Aplikace těchto metod prokázala antifungální působení biosyntetizovaných stříbrných nanočástic na *C. albicans*, včetně potvrzení přítomnosti nanočástic na buněčném povrchu a fungicidní efekt působení netermálního plazmatu na uvedené mikromycetní druhy. Bylo experimentálně zjištěno, že je možné zobrazování spor pomocí SEM bez nutnosti aplikace vodivého povlaku na vzorky. Byla zobrazena vnitřní struktura vybraných mikromycet, která byla provedena tomografickými řezy *C. albicans* a zároveň demonstrovala poškození vnitrobuněčné stavby mikromycetných buněk zejména druhu *A. alternata* vlivem nízkoteplotního plazmatu.

Výsledky této disertační práce přispěly k výběru vhodného účinného typu polydisperzních nanočástic, jehož výzkum v oblasti abiotického působení na *C. albicans* v současné době pokračuje s aplikačním cílem v nemocničním prostředí (léčiva, antifungální obvazy, nátěry a úpravy povrchů). Zjištěná vysoká účinnost netermálního plazmatu na inaktivaci spor a eradikaci biofilmu plísní je využitelná pro humánní i veterinární léčbu fungálních onemocnění kůže a zároveň je vhodná pro sterilizaci a dekontaminaci povrchů, kde doposud běžně používané UV záření není dostatečně účinné.

**Klíčová slova:** SEM, STEM-in-SEM, AFM, FIB-SEM, mikromyceta, biosyntetizované stříbrné nanočástice, nízkoteplotní plazma, plísně.

# Abstract

The increasing resistance of micromycete pathogens to abiotic treatments represents a significant global risk in the 21st century. Micromycete infections causing severe invasive and disseminated diseases with high associated mortality rates are a serious threat to contemporary medicine, particularly for immunodeficient patients. Finding innovative methods of antifungal drug development to eliminate these microorganisms and setting up a methodology that provides reproducible information on the physiological state of the microorganisms after antifungal treatment is a priority for many research institutes around the world. Micromycetes are eukaryotes, thus structurally more complex than prokaryotic cells, and their growth is different from that of unicellular eukaryotes such as yeasts. Micromycetes produce both biofilms and highly resistant asexual spores that allow them to survive harsh or inhospitable conditions for several years. In this context, the application effects of silver biosynthesized nanoparticles and the abiotic effect of low-temperature plasma are studied in this dissertation.

Basic research of the effect of biosynthesized nanoparticles on the cell surface morphology of a selected microorganism *Candida albicans* was performed, which according to the World Health Organization belongs to pathogens in the category of critical risk for the world population and public health. At the same time, the study of the effect of low-temperature plasma on the morphology of cell surfaces of selected micromycete organisms of *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* species was performed. The application of low-temperature plasma on micromycete organisms has been neglected until now. The research of this thesis concludes the study of the morphology of the structures of selected micromycete spores and *C. albicans*. The morphological changes in the microbial structures of the selected pathogens were determined by advanced microscopic methods such as SEM, STEM-in-SEM, AFM and FIB-SEM. The application of these methods demonstrated the antifungal effect of biosynthesized silver nanoparticles on *C. albicans*, including the confirmation of the presence of nanoparticles on the cell surface and the fungicidal effect of non-thermal plasma treatment on these micromycete species. It has been experimentally established that imaging of spores by SEM is possible without the requirement of applying a conductive coating to the samples. The internal structure of selected micromycetes was imaged by tomographic sections of *C. albicans*, demonstrating the damage to the intracellular structure of micromycete cells, particularly of the species *A. alternata*, due to low-temperature plasma.

The results of this dissertation contributed to the selection of a suitable effective type of polydisperse nanoparticles, the research of which in the field of abiotic action on *C. albicans* is currently ongoing with application goals in hospital settings (pharmaceuticals, antifungal dressings, coatings and surface treatments). The observed high efficacy of non-thermal plasma for spore inactivation and biofilm eradication of fungi is applicable for human and veterinary treatment of fungal skin diseases and is also suitable for sterilization and decontamination of surfaces where the commonly used UV radiation is not sufficiently effective.

**Keywords:** SEM, STEM-in-SEM, AFM, FIB-SEM, micromycetes, biosynthesized silver nanoparticles, low-temperature plasma, fungi spores

# Obsah

Seznam symbolů a zkratk .....	8
1 Úvod .....	10
1.1 Přehled současného stavu problematiky rizik onemocnění způsobených mikromycety pro lidský organismus a význam vývoje nových metod léčby .....	12
1.2 Elektronová mikroskopie pro biologické vzorky.....	17
1.3 Cíle disertační práce a její členění .....	20
<b>I. Aplikace pokročilých mikroskopických metod na charakterizaci nanočástic a identifikaci morfologických změn buněčného povrchu <i>Candida albicans</i> vlivem působení stříbrných nanočástic.....</b>	<b>21</b>
2 Přehled současného stavu problematiky interakce <i>Candida albicans</i> a nanočástic .....	21
2.1 <i>Candida albicans</i> .....	23
2.2 Kandióza a kandidémie.....	25
2.3 Nanočástice .....	26
2.3.1 Ag nanočástice.....	28
2.3.2 Antimikrobiální působení Ag nanočástic .....	28
2.3.3 Biosyntéza nanočástic prostřednictvím rostlin a rostlinných extraktů .....	29
2.3.4 Přehled základních technik charakterizace nanočástic .....	31
3 Mikroskopie a charakterizace AgNPs a jejich vliv na <i>Candida albicans</i> .....	34
3.1 Metody .....	34
3.1.1 Identifikace stříbrných nanočástic použitých ve studii .....	34
3.1.2 Charakterizace AgNPs prostřednictvím STEM-in-SEM .....	34
3.1.3 Vizualizace planktonních buněk <i>Candida albicans</i> s AgNPs prostřednictvím SEM ...	37
3.1.4 Mikroskopie atomárních sil – topologie buněčného povrchu.....	37
3.2 Dílčí výsledky a diskuse.....	39
3.2.1 Charakterizace AgNPs prostřednictvím STEM-in-SEM .....	39
3.2.2 Vizualizace interakce buňka-AgNPs prostřednictvím SEM.....	42
3.2.3 Vizualizace buněčného povrchu <i>Candida albicans</i> prostřednictvím AFM .....	44
<b>II. Aplikace pokročilých mikroskopických metod na identifikaci morfologických změn buněčných povrchů vybraných mikromycetních spor a jejich biofilmů vlivem působení nízkoteplotního plazmatu.....</b>	<b>49</b>
4 Přehled současného stavu řešení problematiky vlivu nízkoteplotního plazmatu v mikrobiologii.....	49

4.1	Nízkoteplotní plazma pro abiotické aplikace .....	49
4.2	Úvod do mikromycet použitých ve studii a netermálního plazmatu .....	49
4.2.1	<i>Alternaria alternata</i> .....	49
4.2.2	<i>Aspergillus niger</i> .....	50
4.2.3	<i>Fusarium culmorum</i> .....	51
4.2.4	<i>Fusarium graminearum</i> .....	51
5	SEM mikroskopie biofilmů a spor mikromycet po ozáření nízkoteplotním plazmatem .....	53
5.1	Metody .....	53
5.2	Dílčí výsledky a diskuse .....	53
5.2.1	Dílčí výsledky SEM zobrazování biofilmů .....	53
5.2.2	Dílčí výsledky SEM spor mikromycet .....	59
5.2.3	Vliv pokovení na biologické vzorky .....	64
5.2.4	Snímkování nepokovených vs. pokovených spor mikromycet .....	65
5.2.5	Snímkování nepokovených biofilmů mikromycet .....	67
5.2.6	Snímkování spor mikromycet detekcí BSE .....	68
5.2.7	Snímky spor mikromycet v náklonu .....	71
<b>III. Aplikace pokročilých mikroskopických metod na identifikaci změn vnitřních struktur vybraných mikromycetních spor a <i>Candida albicans</i> vlivem působení antifungálních prostředků.. 72</b>		
6	Přehled současného stavu problematiky zobrazování vnitřních struktur buněk .....	72
6.1	FIB-SEM tomografie v biologii .....	73
6.2	Stručný přehled FIB systému – konstrukce FIB .....	73
6.3	Stručný přehled FIB systému – interakce iontů s pevnou látkou .....	74
6.4	Stručný přehled FIB systému – aplikace FIB .....	76
7	FIB-SEM tomografie spor mikromycet .....	78
7.1	Metody .....	78
7.2	Dílčí výsledky a diskuse .....	78
8	FIB-SEM tomografie <i>Candida albicans</i> .....	88
8.1	Metody .....	88
8.2	Dílčí výsledky a diskuse .....	91
9	Přínos studie pro biomedicínské inženýrství .....	92
10	Závěr .....	93
	Seznam prací disertanta vztahujících se k disertaci .....	95
	Reference .....	96
	Seznam tabulek .....	120
	Seznam obrázků .....	120
	Seznam grafů .....	122

## Seznam symbolů a zkratek

Zkratka	Význam
AAS	Atomová absorpční spektrometrie ( <i>Atomic absorption spectrometry</i> )
AIDS	Syndrom získaného selhání imunity ( <i>Acquired immune deficiency syndrome</i> )
ATCC	Americká sbírka typových kultur ( <i>American type culture collection</i> )
AFM	Mikroskopie atomárních sil ( <i>Atomic force microscopy</i> )
AgNPs	Nanočástice stříbra ( <i>Ag nanoparticles</i> )
BSE	Zpětně odražené elektrony ( <i>Backscattered electrons</i> )
CRISPR	Pravidelně rozložené krátké palindromické repetice ( <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> )
CVŘ	Centrum výzkumu Řež s.r.o.
DLS	Dynamický rozptyl světla ( <i>Dynamic light scattering</i> )
DNA	Deoxyribonukleová kyselina ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
EBD	Depozice elektronovým svazkem ( <i>Electron beam deposition</i> )
EBSD	Difrakce zpětného rozptylu elektronů ( <i>Electron backscatter diffraction</i> )
EDS	Energiově disperzní spektrometrie ( <i>Energy dispersive spectroscopy</i> )
FEG	Zdroj emisního pole ( <i>Field emission gun</i> )
EELS	Spektroskopie energetických ztrát elektronů ( <i>Electron energy loss spectroscopy</i> )
EPS	Exopolysacharidové struktury ( <i>Exopolysaccharide structures</i> )
ET	Everhardt-Thornly
FIB-SEM	Skenovací elektronový mikroskop s fokusovaným iontovým svazkem ( <i>Focused ion beam scanning electron microscopy</i> )
GIS	Systém vstřikování plynu ( <i>Gas injection system</i> )
IBID	Depozice indukovaná iontovým svazkem ( <i>Ion beam induced deposition</i> )
JIP	Jednotka intenzivní péče
FFT	Rychlá Fourierova transformace ( <i>Fast Fourier transform</i> )
FIB	Fokusovaný iontový svazek ( <i>Focused ion beam</i> )
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací ( <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> )
LVSTD	Detektor sekundárních elektronů v nízkém vakuu ( <i>Low vacuum secondary Tescan detector</i> )
mAgNPs/e	Monodisperzní AgNPs s extraktem <i>Vitis vinifera</i>
mAgNPs/w	Monodisperzní izolované AgNPs resuspendované v ultračisté vodě
MALDI-TOF	Time-of-flight hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice ( <i>Time-of-flight matrix assisted laser desorption/ionization</i> )
NMR	Magnetická rezonance ( <i>Nuclear magnetic resonance</i> )
NTA	Analýza sledování nanočástic ( <i>Nanoparticle tracking analysis</i> )
NTP	Nízkoteplotní plazma ( <i>Non-Thermal Plasma</i> )
pAgNPs/e	Polydisperzní AgNP s extraktem <i>Vitis vinifera</i>



Zkratka	Význam
pAgNPs/w	Polydisperzní AgNP resuspendované v ultračisté vodě
PID	Proporiconálně-integračně-derivační parametry ( <i>proportion-integral-derivative parameters</i> )
ROS	Reaktivní formy kyslíku ( <i>Reactive oxidative stress</i> )
SE	Sekundární elektrony ( <i>Secondary electrons</i> )
SEM	Skenovací elektronový mikroskop nebo mikroskopie ( <i>Scanning electron microscope or microscopy</i> )
STEM-in-SEM	Skenovací TEM v SEM ( <i>Scanning TEM in SEM</i> )
TEM	Transmisní elektronový mikroskop nebo mikroskopie ( <i>Transmission electron microscope or microscopy</i> )
TGA	Termogravimetrická analýza ( <i>Thermogravimetric analysis</i> )
TOF-SIMS	Time-of-flight hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů ( <i>Time-of-flight secondary ion mass spectrometry</i> )
UV	Ultrafialový ( <i>Ultraviolet</i> )
UV-Vis	Spektroskopie v UV viditelném spektru ( <i>UV-Visible spectroscopy</i> )
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
WDS	Vlnově dispersní spektroskopie ( <i>Wavelength-dispersive spectroscopy</i> )
WHO	Světová zdravotnická organizace ( <i>World Health Organization</i> )
XPS	Rentgenová fotoelektronová spektroskopie ( <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i> )
XRD	Rentgenová krystalografie ( <i>X-ray crystallography</i> )
3D	Třídídimenzionální ( <i>Three-dimensional</i> )

Symbol	Jednotka	Význam
A	nm <sup>2</sup>	Plocha nanočástice; projekce tvaru nanočástice do roviny ohniska elektronového svazku
Ag	[-]	Chemická značka stříbra
d <sub>ECD</sub>	nm	Kruhu ekvivalentní průměr nanočástice
f <sub>CIRC</sub>	[-]	Kruhovitost nanočástice
P	nm	Obvod nanočástice

# 1 Úvod

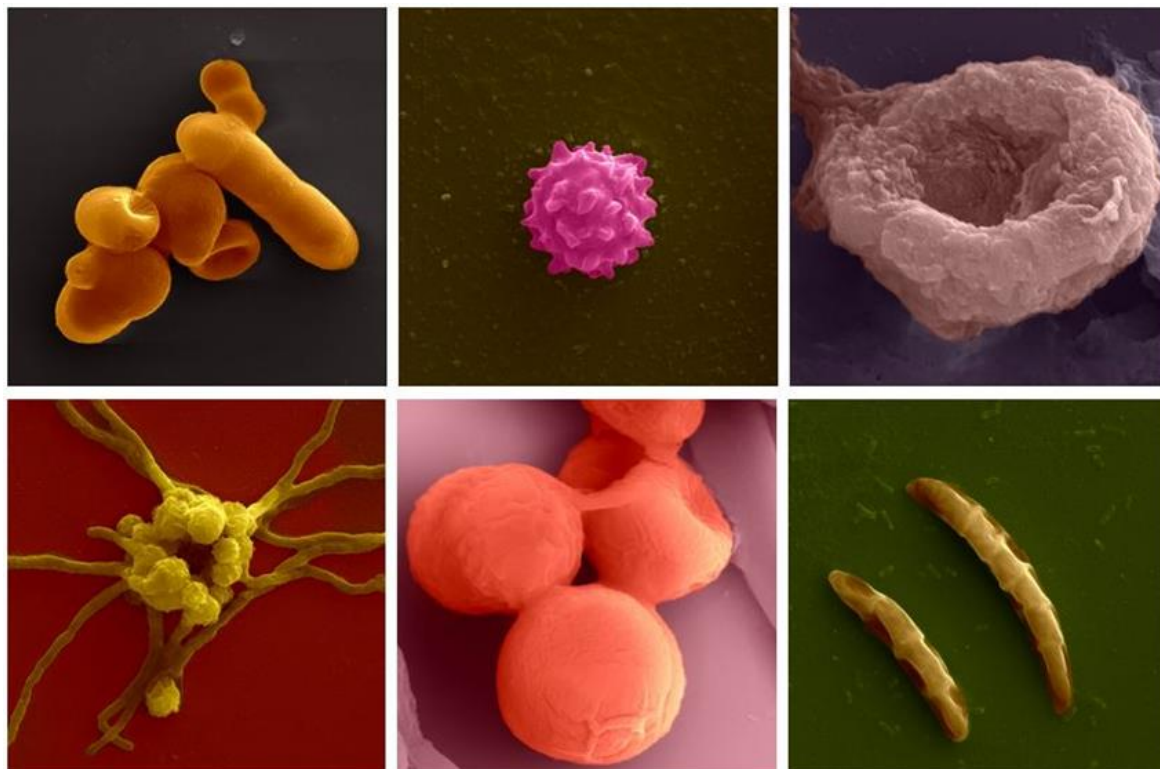
Jsme mikrosvětlem fascinováni. Vynález elektronové mikroskopie nám otevřel pohledy do úplně nových perspektiv. Perspektiv, ve kterých se snoubí půvab a elegance. Předvídané versus nečekané. Pohled do zákoutí, která jsou našemu běžnému pohledu skryta a zapovězena. Jako lidstvo nás spojuje touha překonávat a posouvat opojné hranice poznání či technických možností. A elektronová mikroskopie nám umožnila nahlédnout za oponu fyziologie lidského oka a fyzikální omezení optické mikroskopie ve viditelném světle a ukázala nám nový svět, díky němuž můžeme pochopit procesy, mechanismy a přírodní a fyzikální zákonitosti, které se dějí v mikro a nanometrových měřítcích.

Mikroskopie v biologii a lékařství je využívána ať už k identifikaci a klasifikaci mikroorganismů, porozumění způsobům jejich vitálních projevů a procesů mechanismů interakce s prostředím či vůči sobě navzájem, tak i k diagnostice infekčních onemocnění a pochopení principů, jak jejich toxicitu potlačit. Elektronová mikroskopie pak s sebou přinesla možnosti pozorování mikroorganismů s nanometrovými detaily a prostřednictvím fokusovaného iontového svazku (FIB) i příležitost provést řezy a nahlédnout tak do vnitřního prostředí buněk. Stala se tak cenným a plnohodnotným spojencem vědců při vývoji léčivých přípravků a metod proti bakteriálním, mykologickým i virovým onemocněním a pochopení způsobů působení léčebných činitelů rozšiřuje naše možnosti v boji proti vážným onemocněním.

Mikroskopické houby představují všudypřítomnou skupinu eukaryotických aerobních mikroorganismů. Jejich variabilita zahrnuje jednobuněčné či pseudomycelární kvasinky po pravé hyfy plísňových hub tvořících mycelia [1] (Obr. 1). Mikromycetní infekce jsou příčinou úmrtí ~ 1,6 milionu lidí ročně, přičemž jen jejich patogen *Candida albicans* způsobí úmrtí ~ 200 000 ročně v důsledku invazivních a diseminovaných onemocnění [2]. Globální hrozbu představují zejména invazivní kandidózy, které svým spektrem virulence obsahuje symptomatickou kandidózu až po fulminantní sepsi s přidruženou mortalitou [3]. Mikromyceta jsou navíc schopná za příznivých podmínek produkovat mykotoxiny, metabolity toxických látek, které představují závažné nebezpečí pro zdraví lidí i zvířat [4], které může vést až k úmrtí [5]. Mykotoxiny mohou být obsaženy v napadených obilovinách, sušeném ovoci, ořeších i kořeni. Zároveň k růstu mikromycet produkujících mykotoxiny může docházet před i po sklizni, v průběhu skladování v teplých a vlhkých podmínkách. Většina mykotoxinů je navíc chemicky stabilní a přežívá i po zpracování potravin a k infekci dochází přímo konzumací kontaminovaných jídel, přenosem ze zvířat, která jsou krmena infikovaným krmivem [6] nebo kontaktem mikromycet s kůží či jejich inhalací [7]. Tyto toxiny jsou spojeny s různými mykotoxikázami u lidí po celém světě [8].

Abiotické přípravky a metody proti mikromycetním onemocněním a kontaminacím jsou však v současné době omezené, neboť existuje pouze několik tříd antifungálních léků a metod. Stále se zvyšující rezistence a odolnost mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám představuje značnou hrozbu pro medicínu 21. století. Léčiva a prostředky, které v minulosti byly neochvějným pilířem v boji proti mnoha závažným onemocněním nyní ztrácejí svůj léčebný potenciál. Antifungální léky a přípravky je však relativně obtížné vyvíjet ve srovnání

s antibakteriálními léky, zejména z důvodu eukaryotické povahy buněk, proti kterým působí [9]. Vývoj nových léčiv a metod, které umožní eliminovat, nereverzibilně poškodit mikroorganismy či zamezit jejich růstu jsou předmětem zájmu mnoha výzkumných institucí po celém světě, včetně České republiky.



Obr. 1: Mikromyceta (SEM fotografie Rabochová, M., kolorováno v AKVIS Coloriage [10]).

## 1.1 Přehled současného stavu problematiky rizik onemocnění způsobených mikromycety pro lidský organismus a význam vývoje nových metod léčby




















Infekce a onemocnění, jejichž původci jsou mikromyceta, ať už ve formě solitérních planktonních buněk či biofilmu, představují významný klinický celosvětový problém. Jeho význam tkví především ve značné obtížnosti takové infekce potlačit, neboť antimykotická léčba často nemá dostatečný efekt a selhává z důvodů vysoké rezistence patogenů na abiotická léčiva a imunitní reakci hostitele [11]. Lidský organismus je vystaven značné zátěži, která může být v řadě případů až fatální. Zároveň tato léčba představuje značnou finanční zátěž pro poskytovatele zdravotních služeb. K významným predispozičním faktorům invazivní mykotické infekce se pak řadí imunosuprese organismu, používání permanentních katétrů, parenterální výživa, užívání širokospektrých antibiotik a také narušení slizničních bariér v důsledku operace, radioterapie či chemoterapie [12].

Mikromycetní biofilm představuje společenstvo mikroorganismů usazených v matici extracelulární polymerní látky (EPS), kterou samo vytvořilo. Hlavní složku matrice EPS tvoří exopolysacharidy, což jsou dlouhé rozvětvené či lineární molekuly, tvořené zejména heteropolysacharidy skládající se z neutrálních i nabitých cukerných zbytků. Některé expolysacharidy jsou tvořeny homopolysacharidy zahrnující glukany odvozené od sacharózy, celulózy a fruktanů. Jsou velmi rozmanité a obsahují organické i anorganické složky významnou měrou ovlivňující jejich fyzikální vlastnosti a biologickou funkci [13]. V EPS jsou také obsaženy strukturní proteiny a extracelulární deoxyribonukleovou kyselinu (DNA). Pro společenstvo má nezastupitelnou roli hned v několika důležitých funkcích. Především usnadňuje adhezi mikroorganismů k povrchu, zajišťuje jim konstrukční stavební oporu pro růst a umožňuje hydrataci a transport živin. Hlavní úlohu však hraje zejména v rezistenci společenstva vůči nepříznivým vnějším vlivům, a tedy i působení antimikrobiálních látek [14]. EPS tak představuje difuzní bariéru pro aplikované léčivo a způsobuje tak sníženou citlivost buněk vůči antimykotickým přípravkům či obranným látkám imunitního systému hostitele. Pro příklad účinná koncentrace léčivého přípravku proti *C. albicans* může být až tisícinásobně vyšší pro biofilm, než pro aplikaci vůči planktonním buňkám [15].

Po kolonizaci a adhezi usnadňuje biofilm přežití a průběh celého životního cyklu mikroorganismů na široké škále povrchů. K jejich uhnízdění dochází např. na pokožce (kde dochází ke vzniku dermatitidy) [16], v plicích (pneumonie, chronické infekce, cystická fibróza) [17] [18], gastrointestinálním traktu (zánětlivá střevní onemocnění, kolitida vyvolaná *Clostridium difficile*) [19] [20], dásních (parodontitida, infekce po aplikaci implantátu) [21], močových cestách (infekce močových cest) [22], v kostech (osteomyelitida) [23], středním uchu (chronické záněty středního ucha) [24], dutině nosní nebo vedlejší nosních dutinách (rhinosinusitida) [25], nosohltanové sliznice (meningitida) [26] či v ledvinách (zánětlivá onemocnění ledvin) [27]. Tento seznam je jen krátkým výčtem možných prostředí v lidském organismu, které jsou biofilmy schopny kolonizovat. Výčet onemocnění patogenními mikromycetními biofilmy by byl značný.

Patogenní mikromyceta jsou schopna adherovat nejen na epitelálních a endotelálních površích, ale i na abiotických, včetně např. lékařských přístrojů a nástrojů, kloubních náhrad,

širokého spektra implantátů, protetických srdečních chlopní, kardiostimulátorů, ventrikulárních shuntů, katetrů, endoskopů, endotraechálních trubic i kontaktních čoček. Zejména kvasinky (ale nejen ony) tímto způsobem mohou proniknout do krevního řečiště a způsobit infekční onemocnění vnitřních orgánů. Diseminované mykotické infekce mají zároveň vysokou mortalitu, což je velmi znepokojivé [28]. Například rod *Candida* v případě mikromycetních biofilmů je patogen, který je nejčastější příčinou kvasinkových infekcí, čtvrtou nejčastější příčinou vážných nokozomiálních infekcí krevního řečiště a třetí nejčastnější nokozomiální infekcí pacientů na jednotkách intenzivní péče spojeným s významnou morbiditou a mortalitou. Způsobuje spektrum různých onemocnění, jakými jsou například kandidóza, kandidémie, infekční endokartitida, infekce kostí a kloubů, endoftalmitida, meningitida atd. [29]. Výčet onemocnění způsobených mikromycety je však značně rozsáhlý. Světová zdravotnická organizace (WHO) vydala v roce 2022 seznam nejvýznamnějších mikromycetních patogenů (WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action [30].), který představuje sbírku nejvýznamnějších rodů a druhů mikromycetních původců onemocnění s ohledem na současný stav poznání vědy a výzkumu a dopadů na světovou populaci a veřejné zdraví. Zároveň je seznam rozdělen do tří kategorií v závislosti na míře dopadu na veřejné zdraví a vzhledem k riziku antifungální rezistence (Obr. 2).

Kritické riziko	Vysoké riziko	Střední riziko
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> ( <i>Candida glabrata</i> )	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> ( <i>Candida krusei</i> )
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffeii</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

Obr. 2: Seznam nejvýznamnějších druhů mikromycetních patogenů podle míry rizika dle WHO (upraveno z [30]).

Současný neutěšený stav vysokého počtu onemocnění a s ní spojenou mortalitou (Tab. 1) způsobenou mykotickými infekcemi má přímou souvislost s omezeným množstvím antifungálních léčivých prostředků. Syntéza nových léčiv je navíc obtížná z důvodu vysoké podobnosti mikrostruktur mikromycetních a lidských buněk [31], která ztěžuje identifikaci cílů

pro zacílení léčiva, vysoké toxicity antimykotik a rezistencí mikromycet vůči abiotickým léčivům [32]. Vědecko-výzkumné organizace po celém světě se tak snaží zaměřit vývoj na nové účinné strategie překonávající rezistence mikromycet. Toho se snaží dosáhnout jak v oblasti zvýšení synergického efektu kombinace antimykotik či modulaci stávajících antimykotik, syntézou nových léčiv, vývojem imunoterapie i využití působení nanočástic ať už s přímým účinkem či jako nosičů antimykotických léčiv [32] [33] a výzkumem nových léčebných metod jako například použití nízkoteplotního plazmatu [34].

Tab. 1: Celková mortalita pacientů s onemocněním způsobeným mikromycetním patogenem dle WHO (data převzata z [30]).

Druh	Celková mortalita [%]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	47-88
<i>Candida albicans</i>	20-50
<i>Candida auris</i>	29-53
<i>Candida parapsilosis</i>	20-45
<i>Candida tropicalis</i>	55-60
<i>Coccidioides spp.</i>	2-13
<i>Cryptococcus gattii</i>	43*, 10-23**
<i>Cryptococcus neoformans</i>	41-61
<i>Eumycetoma</i>	nedostatek dat
<i>Fusarium spp.</i>	43-67
<i>Histoplasma spp.</i>	21-53***, 9-11
<i>Lomentospora prolificans</i>	50-71
<i>Mucorales</i>	23-80
<i>Nakaseomyces glabrata (Candida glabrata)</i>	20-50
<i>Paracoccidioides spp.</i>	3-23
<i>Pichia kudriavzeveii (Candida krusei)</i>	44-67
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	0-100
<i>Scedosporium spp.</i>	42-46
<i>Talaromyces marneffeii</i>	12-21

Pozn.: \*u pacientů s meningitidou, \*\*u pacientů s infekcí CNS a plic, \*\*\*u pacientů s HIV.

Mikromyceta, na jejichž druhy *Candida albicans*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* a *Fusarium graminearum*, na které se tato práce zaměřuje, jsou složité a adaptivní mikroorganismy. Pokud jsou vystaveny nepříznivým vnějším podmínkám, jsou schopny přežít a následně regenerace a dalšího vývoje včetně množení další populace. To představuje značné medicínské a celopopulační riziko pro léčbu chorob vyvolanými těmito patogeny.

*Candida albicans* je rozšířená komenzální mikromyceta, která kolonizuje orofaryngeální dutinu, gastrointestinální trakt a vaginální prostředí. Ačkoliv je u značné části populace součástí běžné mikrobiální flóry, u imunodeficientních lidí může dojít k poruše normální homeostáze a rozvoji patogenních a oportunních infekcí. V závislosti na závažnosti infekce může dojít k lokalizovaným povrchovým poruchám sliznic až k invazivnímu onemocnění vyústěné v multiorgánová selhání a život ohrožující stavy [35]. *C. albicans*, s níž je při infekčním výskytu v krevním řečišti pacientů spojena úmrtnost, je navíc nejčastěji se vyskytující

kvasinkou izolovanou z biologických vzorků pacientů [36]. V současné době jsou pro léčbu infekcí *C. albicans* dostupné čtyři hlavní druhy léčiv: antimykotika na bázi polyenů, azolů, echonokandiny a 5-flucytosin (5FC). Tato antimykotika však mají svá omezení z pohledu toxicity pro hostitele, recidivy infekcí, vysokých pořizovacích nákladů, dostupnosti a omezeného spektra použití [37]. Přes variabilitu možné léčby dochází také především ke vzniku evoluční rezistence kvasinek vůči léčivům, přičemž klíčový je nejen výzkum mechanismů, ke kterým při ní dochází [38], ale také především vývoj nových účinných typů léčiv.

V této souvislosti jsou studovány aplikační účinky kovových nanočástic zejména pro svou zvýšenou biokompatibilitu a vhodnou fungicidní účinnost, která minimalizuje vznik rezistence [37]. Zejména nanočástice získané metodou biosyntézy tvoří moderní nanobiotechnologii [37], [39]. V současné době je výzkum v oblasti vývoje nových a biologicky šetrných nanočástic jedním z hlavních směrů výroby nanočástic, která představuje vhodnou alternativu k fyzikálním a chemickým syntézám [40]. Stříbrné nanočástice mají působivé využití v medicínských aplikacích, zejména pro své abiotické a protizánětlivé účinky. Jejich všestranná použitelnost je dána zejména jejich laditelnými vlastnostmi a širokým spektrem fyzikálně-chemického působení majícího vliv na výborné antimikrobiální účinky, protizánětlivé působení a protinádorovou aktivitu [41]. Dále jsou stříbrné nanočástice uplatnitelné jako transportní substrát léčiv, může být součástí biomateriálů a povlaků pro zdravotnické přístroje a implantáty, obvazů pro regeneraci tkání atd. [42].

Další rozvíjející se a vhodnou metodou eliminace patogenních mikromycet je aplikace nízkoteplotního plazmatu (NTP). Aplikace NTP v medicíně i jiných oborech (potravinářství, zemědělství apod.) je dynamicky se rozvíjející interdisciplinární obor a jeho použití je věnována stále větší pozornost. Výzkum v oblasti NTP se ukazuje jako velmi slibný a publikací v této oblasti exponenciálně přibývá [43]. NTP vykazuje účinnou schopnost eliminace mikromycetních kontaminantů, a především inaktivace jejich rezistentních spor [44]. Předpokládá se, že interakce NTP a živých buněk je synergická, ale doposud není dobře pochopena [45]. V případě NTP je pak žádoucí vytvoření databáze vlivu jeho působení při uvedených parametrech na co nejširší skupinu druhů mikromycet [46]. Mikromyceta jsou velmi odolná a způsobují závažné komplikace ve zdravotnictví zejména u imunosupresivních jedinců. V potravinářství mohou být navíc zdrojem druhotné kontaminace povrchů z kontaminovaných potravin nebo z kontaminovaných povrchů na potraviny. Ročně plísň znehodnotí až 20 % zemědělské produkce [47]. Navíc 30 – 40 % všech druhů mikromycet mohou produkovat za příznivých podmínek mykotoxiny [48], které představují vážnou hrozbu pro lidské zdraví, přičemž jejich toxicita může vést až k úmrtí [49]. Rozvoj metod NTP v lékařství směřuje k inaktivaci patogenů a tedy sterilizaci, dekontaminaci a podpoře hojení ran, protinádorové terapii, léčbě chronických infekcí, jakožto i sterilizaci kontaminovaných povrchů [50]. Netermální plazma bylo testováno při aplikacích na bakterie [51] a kvasinky [52], ovšem o znalosti jeho vlivu na mikromyceta a zejména na mikromycetní biofilmy jsou stále nejasné. Inaktivace biofilmů a spor je velmi náročná, neboť jsou vůči antifungální léčbě značně rezistentní [53]. Mikromyceta mají několik forem života, které se liší svou odolností k dezinfekčním prostředkům a antibiotikům. Dosavadní metody zkoumají efekt antimikrobiálních látek často formou stanovení změny metabolické aktivity nebo změny

v podílu kultivovatelných množství kolonií. Tyto metody nejsou dostatečné a dostatečně nevypovídají o fyziologických změnách daných mikroorganismů.

Pochopení vlivu působení antifungálních látek a metod prokazujících abiotické účinky je významným faktorem pro umožnění vývoje nových léčiv a metod a hybnou silou pro jejich postupné uvedení do léčebné praxe. V případě výzkumu se zaměřením na vizuální porozumění antifungálního působení na buňky patogenu vyžaduje použití široké škály pokročilých mikroskopických metod, umožňujících pohled nejen na buněčnou morfologii, ale také do nitra buněk. Skenovací elektronová mikroskopie a mikroskopie atomárních sil je v biomedicínských aplikacích používána pro charakterizaci topografie povrchu buněk či tkání. Tato práce demonstruje užitečnost a přínos metod SEM, STEM-in-SEM, FIB-SEM a potažmo AFM pro stanovení vlivu stříbrných nanočástic na buňky patogenu *Candida albicans* a NTP na patogenní mikromyceta (spory a biofilmy) *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* a *Fusarium graminearum*.



## 1.2 Elektronová mikroskopie pro biologické vzorky

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) již od dob svého rozšíření v 30. letech 20. století významnou metodou zobrazování mikro a nanosvětla. Nachází uplatnění téměř ve všech oblastech lidského poznání, kde je třeba provést morfologické analýzy na mikrometrové nebo nanometrové úrovni. Moderní SEM však jde dále a poskytuje všestranné možnosti měření a detekcí v širokém spektru ať už vědecko-výzkumných institucí, ale také v průmyslu a výrobě.

Mikroskopie a zejména skenovací elektronová mikroskopie je jedním ze základních metod pochopení struktury a vlastností povrchů v biologii [54]. Vizualizace buněčného obsahu a jemné vnitřní struktury mikroorganismů představuje fundamentální pilíř výzkumu v biologii. Představa o vnitřním uspořádání buněk a organel umožňuje charakterizaci morfologie, pochopení strukturní biologie a také porozumění evoluci [55]. Zobrazení složité intracelulární struktury buněk a tkání může zásadním způsobem ovlivnit pochopení počátečních změn, ke kterým dochází při rozvoji chorobných procesů. Lokalizace uspořádání organel a jejich interakcí pak může poskytnout důležité informace vedoucí ke stanovení včasné diagnózy [56].

Elektronová mikroskopie přes nesporné výhody, které s sebou v oblasti biologického poznání přináší prostřednictvím kontinuálního získávání nových informací, má i určité limity a omezení. Tyto meze většinou vychází z fyzikální podstaty využití svazku elektronů, jakožto interakčních částic pro kontakt s povrchem vzorku. Mezi hlavní úskalí skenovací elektronové mikroskopie lze zařadit:

- Nabíjení vzorku – biologické vzorky obecně jsou téměř nevodivé vzhledem k nutnosti dehydratace z důvodu skenování ve vakuu. Hromadění náboje na povrchu vzorku pak způsobuje artefakty obrazu, který se projevuje jako přeexponované místo s rozmazanými strukturami a nejčastěji má tvar čar nebo pruhů napříč snímkem. V některých případech je nabíjení tak silné, že není možné vzorek sám o sobě zobrazit [57] a může dokonce fungovat jako elektronové zrcadlo [58]. Existuje mnoho metod, jak vliv nabíjení omezit, které lze obecně rozdělit do tří kategorií – optimalizace přípravy vzorku, podmínek zobrazování a nastavení mikroskopu. V případě přípravy vzorku jde především o vodivé spojení vzorku se substrátem a mikroskopickým stolcem (pomocí může vodivá pasta) a nanesení vodivé vrstvy (pokovení) například zlata, platiny, uhlíku apod. Pokovení však může mít vliv na případné výsledky EDS. V případě zobrazování řezů (např. tkání) je vhodné připravit je co nejtenčí s nejmenším možným objemem. U podmínek zobrazování pak je vhodné co nejvíce omezit dobu skenování, tj. čas, po který svazek setrvává na vzorku, snížit proud svazku, velikost apertury či urychlovací napětí, popřípadě použít jiný druh detektoru než sekundárních elektronů (secondary electrons, SE), například zpětně odražené elektrony (back-scattered electrons, BSE), neboť signál je méně ovlivněn nabíjením vzorku. Pokud to umožňuje vybavení mikroskopu, je možné použít skenování při proměnlivém tlaku v komoře, který umožní částečný rozptyl náboje [59].
- Vliv vakua – velmi citlivé buněčné struktury mohou vlivem nezbytné dehydratace nutné pro zobrazování ve vakuu mít sklon k porušení či kolabování. V případě velmi

citlivých vzorků tak nabývá na důležitosti jeho vhodná fixace a správná metoda vysoušení vzorků [60] nebo přímo jejich zmrazení a zobrazení v kryostavu. Popřípadě, je-li to možné, použít SEM s možností proměnlivé volby tlaku (variable pressure SEM), nízkovakuové SEM (low vacuum SEM) či přímo environmentální SEM umožňující pozorování hydratovaných vzorků [61].

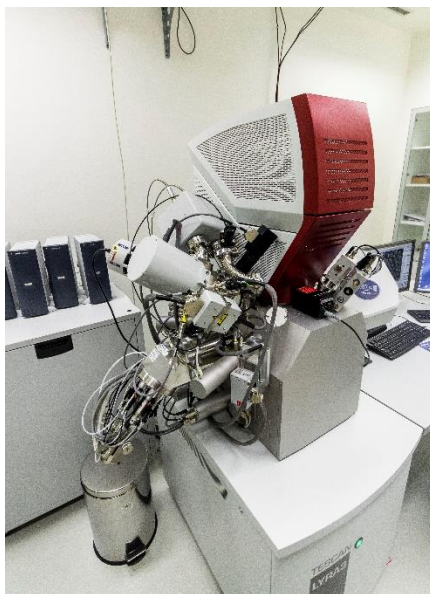
- Radiační poškození – vzniká interakcí elektronů svazku s atomy vzorku, a to v podstatě dvěma možnými způsoby: elastickým a neelastickým rozptylem. Při neelastickém rozptylu, tedy interakci elektronového svazku s elektrony v obalu jádra vzorku, může dojít k přenosu značné energie, která se projeví zvýšením lokální teploty známé jako radiační tepelné poškození [62] a emisi rentgenového záření či elektronů [63]. Dalším jevem doprovázejícím neelastický rozptyl a který má velký význam zejména u biologických vzorků, je ionizační poškození, tzv. radiolýza [64], díky níž dochází k poškození chemických vazeb a vyrážení lehkých prvků jako H, N a O [65]. V případě elastického rozptylu dochází k interakci elektronů svazku s atomovými jádry vzorku a může tak dojít k posunutí atomu z původní polohy v atomové mřížce nebo dokonce jeho vyražení (knock-on) a tvorbě lokálních defektů [66]. Vliv radiačního poškození lze potlačit, nikoliv však úplně odstranit, neboť vzniká ze zobrazovací podstaty.

Kontaminace uhlovodíky na povrchu vzorku – při průchodu elektronového svazku komorou vzorek může docházet ke kontaktu s uhlovodíky, jejich disociaci a depozici na povrch vzorku. Tato kontaminace bývá výraznější zejména u nízkých urychlovacích napětí [67]. Tato kontaminace se projevuje nahromaděním uhlíkové vrstvy na povrchu vzorku a vede ke snížení jasů snímku, snížení rozlišení morfologie povrchu a generování signálu, který není pro vzorek reprezentativní. Může pak mít vliv zejména na výsledky analýz energiově dispersní spektrometrie (EDS), difrakce zpětného rozptylu elektronů (EBSD), popř. spektroskopie energetických ztrát elektronů (EELS, electron energy loss spectroscopy) [68]. Tato kontaminace může pocházet z vnitřního prostředí mikroskopu, například plynné uhlovodíky v atmosféře komory mikroskopu z čerpacích olejů, maziva vakuových vývěv či uvolněné z těsnících kroužků [62] či přímo ze vzorku. Omezení projevů depozice uhlovodíků spočívá zejména v co nejčistší práci se vzorkem (v rukavicích, dezinfekce vzorku, je-li to možné), popř. je-li to z povahy vzorku možné, lze aplikovat čištění plazmatem (plasma cleaner) či ohřev/vakuový ohřev nebo naopak ochlazení vzorku [68].

Při práci s elektronovým mikroskopem je klíčovým cílem tato omezení a úskalí co nejvíce potlačit a minimalizovat. Povědomí o rizicích interakce elektronů se zkoumanou látkou pak jde ruku v ruce se s optimalizací snímkování s ohledem na nejlepší možné získané výsledky a snaze o co největší snížení rizik poškození vzorku.

Pro mikroskopické snímkování v rámci této práce byl použit skenovací elektronový mikroskop verze LYRA3 GMU od společnosti TESCAN ORSAY HOLDING, a.s., Česká republika (Obr. 3). Přístroj je vybaven autoemisní katodou FEG (Field Emission Gun), přičemž urychlovací napětí se pohybuje v rozmezí 0,05 – 30 kV. Mezi integrované detektory patří pro chemické analýzy energiově dispersní spektrometrie (EDS) a pro krystalografické analýzy detektor difrakce zpětného rozptylu elektronů (EBSD). Dále je mikroskop vybaven fokusovaným iontovým svazkem (FIB) s Ga zdrojem, který vytváří usměrněný tok urychlených iontů fokusovaných do místa dopadu vhodný pro mikroobrábění či zobrazování pevných látek v nanometrovém

měřítka. Disponuje též tzv. GIS (gas injection system), který umožňuje jak nanášení tenkých vrstev materiálu (v tomto případě Pt, W, C) či mikroobrábění. Mikroskop je standardně vybaven detektory sekundárních elektronů (SE) a zpětně odražených elektronů (BSE) včetně detektoru sekundárních elektronů v nízkém vakuu (LVSTD). Pro přípravu TEM lamel je SEM vybaveno i mikromanipulátorem. Speciálně pro biologické aplikace byl zakoupen detektor STEM-in-SEM, který umožňuje transmisní mód a příležitost získat snímky blízké snímkům z transmisního elektronového mikroskopu (TEM) s výhodami rastrovacího mikroskopu. Speciální držák vzorků je pak optimalizován pro manipulace s TEM mřížkou.



*Obr. 3: Skenovací elektronový mikroskop Centra výzkumu Řež s.r.o. (fotografie CVŘ).*

### 1.3 Cíle disertační práce a její členění

Disertační práce představuje základní výzkum v oblasti studia vlivu antifungálních metod nízkoteplotního plazmatu (NTP) a biosyntetizovaných stříbrných nanočástic na vybrané eukaryotní patogenní organismy pomocí pokročilých mikroskopických metod. Pozorovatelným projevem působení antifungálních prostředků jsou tvarové deformace, které pro mikroorganismy studované v této práci doposud nebyly v dostatečné míře popsány nebo vysvětleny. Z toho vychází tři hlavní cíle této práce:

1. Aplikace pokročilých mikroskopických metod na charakterizaci nanočástic a identifikaci morfologických změn buněčného povrchu *Candida albicans* vlivem působení stříbrných nanočástic
2. Aplikace pokročilých mikroskopických metod na identifikaci morfologických změn buněčných povrchů vybraných mikromycetních spor a jejich biofilmů vlivem působení nízkoteplotního plazmatu
3. Aplikace pokročilých mikroskopických metod na identifikaci změn vnitřních struktur vybraných mikromycetních spor a *Candida albicans* vlivem působení antifungálních prostředků

Tyto cíle zároveň tvoří z rešeršního i experimentálního pohledu obsahově ucelené celky. Tyto celky vyplývají z druhu použitého abiotického prostředí na testovaný mikroorganismus a zaměřením studií na povrchovou, resp. vnitřní morfologii buněk a jsou navzájem provázány prostřednictvím použití metod skenovací elektronové mikroskopie jakožto prostředí pro výzkum dopadů uvedených metod na eukaryotní mikroorganismy. Každý tematický celek obsahuje úvod do řešené problematiky následovaný použitou metodikou a uzavřený shrnutím dílčích výsledků a diskusí.

# I. Aplikace pokročilých mikroskopických metod na charakterizaci nanočástic a identifikaci morfologických změn buněčného povrchu *Candida albicans* vlivem působení stříbrných nanočástic

## 2 Přehled současného stavu problematiky interakce *Candida albicans* a nanočástic

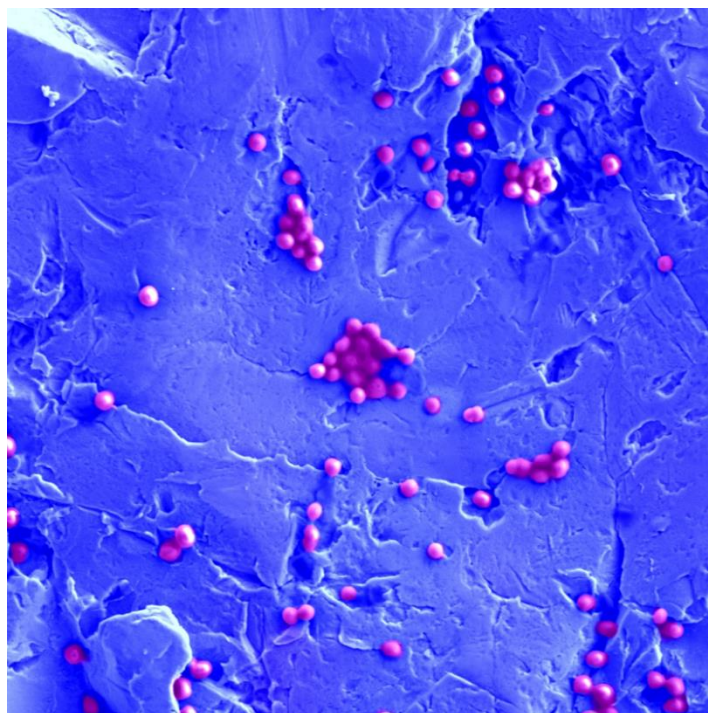
Rychlý vznik lékové rezistence vyvolává v současné době nesmírné obavy napříč nadnárodními i národními zdravotnickými organizacemi. Lidské tělo je denně vystavováno tisícům potenciálních patogenů a zejména v posledních několika desetiletích, kdy se antimikrobiální látky staly nepostradatelnou součástí léčby mikrobiálních infekcí, vznikají značné problémy s rezistivitou vůči léčivům. Dochází k omezování použití a samotné účinnosti starších, ale i nových typů léků. Hlavním důsledkem rezistence vůči léčbě pak může být zvyšující se morbidita a mortalita u některých druhů chorob nehledě na nutnost aplikace silnějších léčebných preparátů, invazivnější terapie a zvyšujících se nákladů na samotnou léčbu.

V 21. století došlo sloučením známých terapeutických vlastností vybraných kovů (popř. jiných materiálů) s moderními nanotechnologickými postupy k značnému rozmachu výroby nanočástic. Zejména syntéza nanočástic s přesně danými specifikacemi co se týká tvaru, velikosti, funkcionality apod. přinesla rozvoj nových terapeutických přístupů k léčbě chorob vznikajících v důsledku rezistence mikroorganismů, které je způsobují. Zejména pak nanočástice stříbra vynikají svým potenciálem díky snižování akutní toxicity, dobré biokompatibilitě a široké dostupnosti.

Rezistivita mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám je v současné době velmi diskutovaným tématem, kterému se věnují mnohá vědecko-výzkumná pracoviště po celém světě. Odolnost mikrobů představuje závažný problém při léčbě nemocí, kdy jsou běžná antibiotika či chemoterapeutika pro léčbu prakticky nepoužitelná. World Health Organization (WHO) and the European Centre for Disease Prevention and Control varují před stále rostoucí bakteriální rezistencí vůči antibiotikům a považují ji za jeden z nejhorších problémů pro dlouhodobé zdraví lidstva [69] (Obr. 4). Nedostatečné tempo vývoje nových typů antibakteriálních léčiv je v současné době vzhledem k rostoucí hrozbě rezistence velmi rizikové. Dle ročních analýz WHO bylo v roce 2021 v klinickém vývoji pouze 27 nových antibiotik působících proti prioritním patogenům<sup>1</sup>, což představuje pokles oproti 31 přípravkům vyvíjených v roce 2017 [70].

---

<sup>1</sup> Seznam prioritních patogenů je k dispozici v dokumentu WHO [273].



Obr. 4: *Staphylococcus aureus* na titanovém žetonu před testy antibakteriálních látek (SEM fotografie Rabochová, M., kolorováno v AKVIS Coloriage [10], velikost zorného pole 33  $\mu$ m).

Nepříznivý trend v počtu invazivních mykotických infekcí vedoucí k vysoké morbiditě a mortalitě imunosupresivních pacientů vs. rezistivita mikroorganismů na podání antimykotických léčiv představuje závažný celosvětový problém [71]. Vysoká mortalita se vyskytuje zejména u hospitalizovaných pacientů rozvinutou kandidovou infekcí, tedy imunodeficientních pacientů nejčastěji po transplantacích orgánů či krvetvorné tkáně, na jednotkách intenzivní péče (JIP), po nebo v průběhu léčby imunosupresivy (léčba onkologických onemocnění, syndromu získaného selhání imunity (AIDS) atd.). Mezi rizikové faktory se řadí také novorozenecký nebo seniorní věk [72]. *Candida albicans* je pak nejčastější příčinou diseminované kandidózy, která představuje invazivní život ohrožující chorobu [73]. Těžště komplikované diagnostiky mykotických infekcí spočívá především v multifaktorovém projevu kolonizace, který je zpočátku onemocnění často zaměňován s jiným typem infekcí [74]. Způsoby léčby invazivních kandidóz jsou shrnuty v práci [75].

S příchodem rozvoje nanotechnologií a znalostí abiotických vlastností některých prvků došlo k rozmachu vývoje nanočástic a jejich implementaci do medicíny. Mnoho anorganických nanočástic je syntetizováno se specifickými vlastnostmi pro biologické, farmaceutické, diagnostické či biomedicínské aplikace. Vzhledem k jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem představují reprezentativní kandidáty pro řešení lékových rezistencí.

V nedávné době bylo vyvinuto mnoho přístupů k syntéze nanočástic s využitím fyzikálních, chemických či biologických metod. Všechny tyto metody mají své výhody i nevýhody. Mezi zvažovanými aspekty jednotlivých metod jsou i biologická aplikovatelnost, náročnost syntézy a pořizovací náklady. Současné fyzikálně-chemické přístupy s sebou často přinášejí produkci toxického odpadu, čím dál více do popředí se dostává biologická syntéza nanočástic za použití rostlinných částí a extraktů či mikroorganismů. Biosyntetizované nanočástice lze navíc získat ve velkých množstvích a jejich syntéza je zároveň šetrná k životnímu prostředí.

Jedním z hlavních zaměření této práce je mikroskopická analýza biosyntetizovaných stříbrných nanočástic využívajících extraktu *Vitis vinifera*. U takto syntetizovaných nanočástic pak byla stanovena jejich charakteristika a zkoumány antifungální vlastnosti na významný lidský patogen *Candida albicans*, který způsobuje mnoho těžkých a závažných chorob, jakými jsou kandidóza či kandidemie a které ohrožují čím dál více lidských životů.

Předkládaná studie přispívá k poznání biosyntetizovaných stříbrných nanočástic pomocí mikroskopických a mikroanalytických metod zaměřením se na jejich antifungální působení dané velikostí či předpokládanou synergií s bioaktivními látkami z extraktu *Vitis vinifera* na vybraný mikroorganismus *Candida albicans*. Samotná syntéza nanočástic využívá velmi dobře dostupné suroviny a ekologicky šetrné výroby bez toxického odpadu. Morfologie biosyntetizovaných Ag nanočástic byla charakterizována s využitím skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), transmisní detekce elektronů skenovacího elektronového mikroskopu (STEM-in-SEM), mikroskopu atomárních sil (AFM), které byly provedeny v rámci této disertační práce. Uvedené metody se vhodně doplňovaly s metodami Dynamic light scattering (DLS), UV–Visible spectroscopy (UV-Vis), rentgenové difrakce (XRD) a atomové absorpční spektrometrie (AAS), které byly provedeny na pracovišti VŠCHT a nejsou obsahem této disertační práce, avšak tvoří součást společné publikace (152). Bylo též provedeno zpracování obrazu v software FIJI/ImageJ [76]. Taktéž byla pozorována interakce nanočástic s *Candida albicans* a jejich vliv na buněčnou morfologii.

Výsledky přináší nový vhled do problematiky šetrné ekologické syntézy stříbrných nanočástic s předem definovanými vlastnostmi a prokázání abiotické aktivity proti významnému lidskému patogenu *Candida albicans*. Tato studie podporuje závěr, že použití takto syntetizovaných stříbrných nanočástic má významný potenciál při přípravě dalších antibiotických léčiv.

## 2.1 *Candida albicans*

Rod *Candida* představuje kvasinkové dimorfní houby o velikosti cca 2 – 20  $\mu\text{m}$ . Jednotlivé buňky jsou označovány jako blastospory, přičemž mohou vytvářet i rezistentní chlamydospory. Rod *Candida* zahrnuje několik druhů odlišujících se různou patogenitou, přičemž více než 95 % invazivních onemocnění způsobují *Candida albicans* (typická je pro ni tvorba klíčících hyf po inokulaci v séru), *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* atd. [77] [78]. Několik druhů kvasinek má své genomy kompletně sekvenované (např. *Saccharomyces cerevisiae* v r. 1996 či *Schizosaccharomyces pombe* v r. 2002) a taktéž probíhá výzkum, který by kvasinkovým genům přiřadil fyziologickou funkci, neboť studium kvasinek přináší jak vhled do problematiky fungování jednoduchých eukaryot, tak výzkumu lidských nemocí a dědičných poruch [79]. Vzhledem k tomu, že je jejich genom ve značné míře flexibilní a vykazuje vysokou míru variability na různé podmínky prostředí, je znalost plasticity genomu předmětem značného zájmu genetiků. Mikroorganismus má vysoce dynamický diploidní heterozygotní genom, který může vykazovat variace značné šíře chromozomálního přeuspořádání a aneuploidii, které mají značný dopad na patogenitu, virulenci a rezistenci vůči lékům [80]. Editace genomu *Candida albicans* a ovlivnění jeho patogenity v současné době probíhá i s využitím CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) [81] [82] [83]. Slibná metoda představuje další

alternativu v řešení odolnosti patogenů vůči antibiotickým látkám prostřednictvím studia jejich genetického kódu [84] [85] [86].

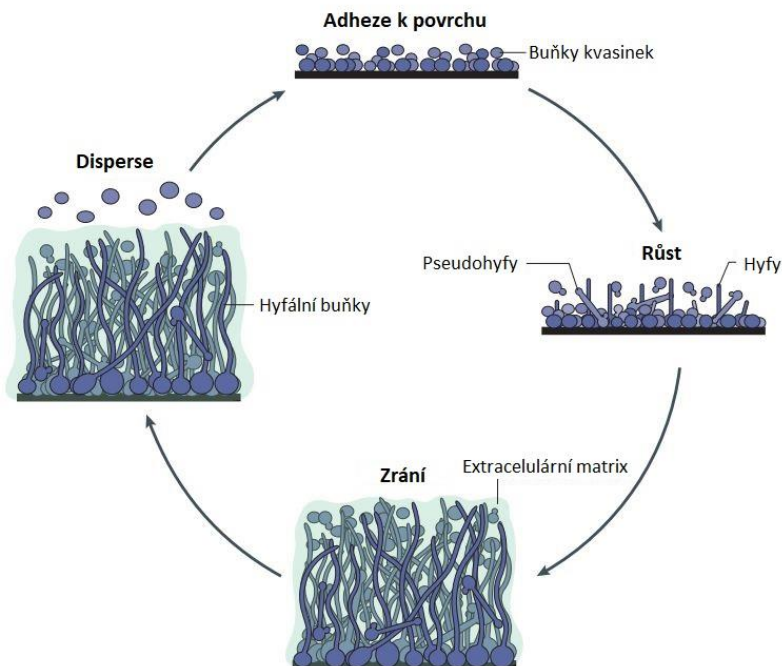
*Candida albicans* je jednou z hlavních příčinou humánních kandidóz a je známa jako oportunní patogen. Ačkoliv je přítomna v lidském mikrobiomu jako neškodný komenzál, po narušení rovnováhy hostitel-mikrobiom-hostitelská imunitní odpověď, může způsobovat infekce od povrchových až po život ohrožující systémové. Příčinu patogenity způsobuje mnoho faktorů: tvorba biofilmu, thigmotropismus, morfogeneze, povaha molekul zprostředkávající adhezi (adheziny) a invazi do hostitelské tkáně, fenotypický dimorfismus (také jako phenotypic switching) a vylučované extracelulární hydrolytické enzymy [87] [88] [89].

Hlavním faktorem patogenity kvasinky rodu *Candida albicans* však představuje její schopnost tvořit hustě nahromaděné shluky buněk, tzv. biofilm, který je umožňuje rezistenci vůči antifungálním lékům, stresovému prostředí i imunitnímu systému svého hostitele [90]. Biofilm tvoří společenství mikrobiálních buněk pevně vázaných k matrici, fázovému rozhraní nebo sobě navzájem obalených extracelulární matricí, kterou tvoří sloučeniny vzniklé samotnou produkcí buněk. Tato sloučenina pak komunitu chrání před vnějšími vlivy. Zároveň spolu prostřednictvím biofilmu mohou buňky komunikovat měnit své vlastnosti, což poskytuje celému společenství značné výhody oproti buňkám soliterním [91]. Mikrobiální biofilmy jsou tedy mnohem odolnější (až tisícinásobně) než buňky planktonní [92]. Biofilmy tvořené *Candida albicans* jsou vysoce strukturované, tvořené kvasinkami, pseudohyfy a hyfy obklopené extracelulární matrix (obsahující proteiny, lipidy, nukleové kyseliny a sacharidy) [93]. Cyklus tvorby biofilmu se sestává ze čtyř fází (viz Obr. 5):

1. Adheze kvasinkových buněk na povrch.
2. Proliferace, při níž dochází k tvorbě biofilmu v jejímž průběhu adherované k povrchu tvoří bazální vrstvu obsahující kvasinkové, pseudohyální a hyální buňky.
3. Zrání do komplexního strukturovaného biofilmu, ve kterém jsou buňky uzavřeny v extracelulární matrix.
4. Disperze kvasinkových buněk vně biofilmu.

Buňky *Candida albicans* adherují s úspěchem na jakýkoliv typ biotického či abiotického povrchu pomocí adhezivních proteinů kovalentně vázaných na buněčnou stěnu kvasinky [94]. Následně se buňky ukotví a z dělicích se kvasinkových buněk se začnou tvořit pseudohyfy a hyfy, které se prodlužují a prolifерují dokončením biofilmu [93]. Extracelulární polysacharidová matrix pak chrání obsah biofilmu [94]. V pozdějších stádiích tvorby biofilmu se vytvoří hyfy, které tvoří jeho podpůrnou složku pro stabilitu celkové struktury. Jakmile je biofilm vyzrálý, dochází k poslední fázi, při které biofilm postupně pomalu rozptyluje pučící kvasinkové buňky z hyf, které přispívají k šíření infekce [93].





Obr. 5: Cyklus tvorby biofilmu *Candida albicans* [93].

Pro biofilm *Candida albicans* je charakteristické, že má složitou strukturu. Hustota buněk v něm obsažených je vysoká a biofilm vykazuje celkově sníženou metabolickou aktivitu a zvýšenou odolnost vůči stresovým podmínkám, přičemž extracelulární matrix pak funguje jako fyzická bariéra. Biofilm také může obsahovat tzv. perzistentní buňky v bazální vrstvě. Tyto buňky se dále nedělí a mají sníženou metabolickou aktivitu, díky čemuž se stávají vysoce odolné vůči antimikrobiálním látkám [93] [95].

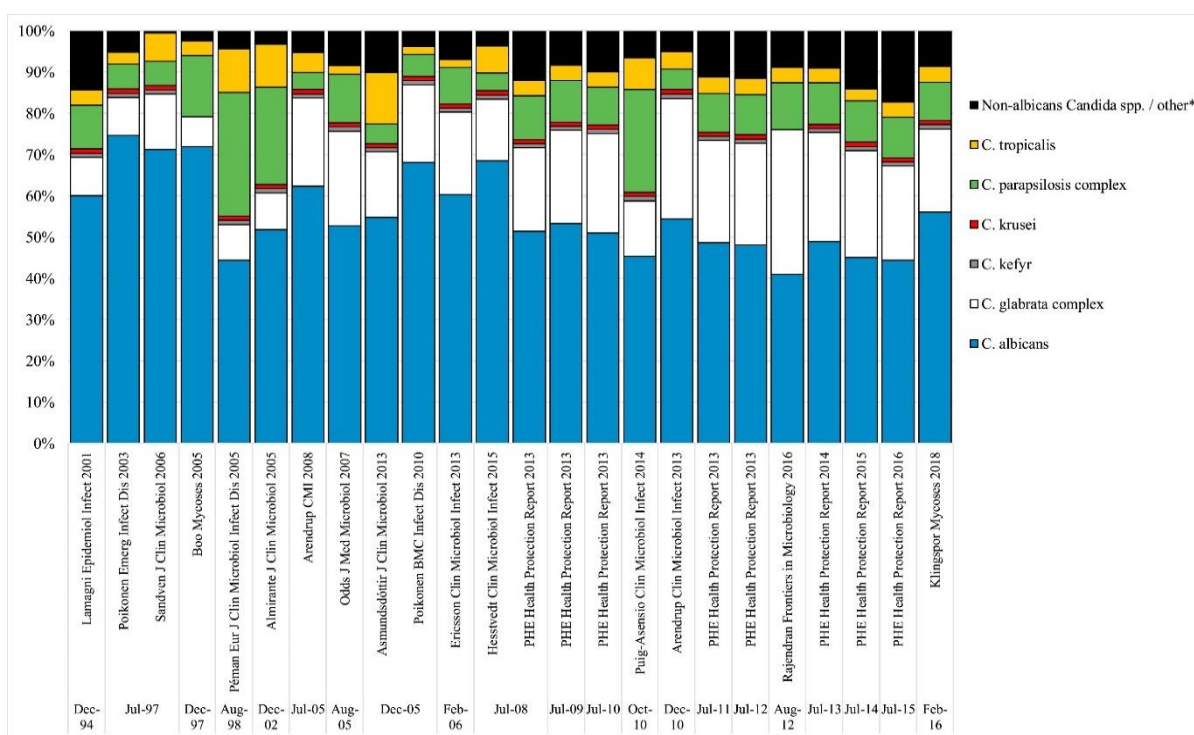
Kvasinky jsou často schopny kolonizovat a kontaminovat lékařské nástroje, protetika (umělé kloubní náhrady, srdeční chlopně, zubní náhrady apod.), kardiostimulátory, kontaktní čočky či přímo povrchy sliznic [87]. Ačkoliv bylo analyzováno značné množství faktorů, které ovlivňují biofilm, samotný molekulární mechanismus jeho tvorby stále zůstává neobjasněn [96].

## 2.2 Kandióza a kandidémie

Invazivní mykotické infekce způsobené rodem *Candida* – kandióza a její forma kandidémie – jsou, zodpovědné za nejčastěji se vyskytující život ohrožující mykotické infekce u hospitalizovaných pacientů. Zatímco kandióza je onemocnění, které postihuje zejména sliznice či kůži a v případě imunitně oslabených lidí i orgány, kandidémie je především invazivní nozokomiální infekce krevního řečiště, při níž mohou být také zasaženy vnitřní orgány a bývá spojena s vysokou mortalitou [97] [98]. Metastatické infekce pak mohou vznikat v játrech, plicích, slezině, kostech či oku a mohou zůstat lokalizované či vést k sekundární kandidémii [99].

V populačních studiích epidemiologického vývoje v Evropě byla provedena analýza a shromažďování dat od ledna 2000 do února 2019 týkající se výskytu kandiózy.

Celková souhrnná míra incidence kandidémie byla 3,88/100 000, přičemž nejvyšší incidence byla pozorována na JIP: 5,5/1000 přijatých pacientů, mortalita pacientů 30. den po přijetí pak byla 37 %, dále pak centrech terciální péče: 0,96/1000 přijatých pacientů, mortalita pacientů 30. den byla 38 % a smíšená skupina fakultních a všeobecných nemocnic: 0,52/1000 přijatých pacientů, mortalita pacientů 30. den byla 37 %. Evropská incidence kandidémie pak byla extrapolována na přibližně 79 nových případů denně. Pro 29 pacientů mohla mít fatální následky [100]. Celkový přehled zastoupení rodu *Candida* dle druhů způsobující kandidémie je uveden na Obr. 6, přičemž nejvyšší zastoupení má druh *Candida albicans* (v souladu i se zdroji např. [101], [102], [97]).



Obr. 6: Diferenciace rodu *Candida* prostřednictvím populačních studií. Studie jsou označeny jménem prvního autora, časopisem a rokem vydání. Seřazeno chronologicky podle mediánu studovaného období zleva doprava [100].

Zvýšená míra výskytu kandidóz byla pozorována i v souvislosti s koronavirovou pandemií Covid-19. V jejím důsledku se projevila u značné části pacientů těžká respirační insuficience, která vyžadovala hospitalizaci na JIP. Bylo prokázáno, že takto hospitalizovaní pacienti, kteří jsou léčeni kortikosteroidy potlačující projevy těžkého průběhu Covid-19, jsou ohroženi ve vysoké míře invazivním mykotickým infekcím včetně kandidóz a plicní aspergilózy [103] [104]. Případové studie tohoto fenoménu lze uvést na příkladech viz [105], [106], [107], [108].

### 2.3 Nanočástice

Nanotechnologie si získaly velkou pozornost vědců pro svůj potenciál v široké oblasti oborů od medicíny, biomedicíny, elektroniky, průmyslu až po zemědělství, textilní průmysl, kosmetiku atd. Bez nadsázky lze říci, že jedním z nejdůležitějších vědních oborů 21. století. Na značném významu pak získávají zejména v oblasti diagnostiky a zdravotnictví.

Nanočástice jsou pak objekty se všemi třemi vnějšími rozměry v nanostupnici, pokud se délka nejdelší a nejkratší osy nanoobjektu výrazně neliší (obvykle více než třikrát – pak jde o nanovláknko či nanodesku), definované dle normy ČSN P CEN ISO/TS 27687 [109].

Ve stručném přehledovém měřítku lze nanočástice rozdělit do čtyř významných skupin [110]:

1. Nanočástice na bázi kovů

V čisté formě některého z kovů např. Ag, Au, Cu, Pt, atd., jejichž kovová jádra lze transformovat do formy větších kovových klastrů o požadovaném geometrickém uspořádání či obalit povrchově aktivní organickou vrstvou [111] [112].

2. Nanočástice na bázi slitin kovů

Slitiny vybraných kovů v případě výroby tohoto typu nanočástic mohou mít aditivní pozitivní dopad na požadované vlastnosti zejména v oblasti strojírenství, elektroniky nebo reakční katalýzy [110] [113].

3. Nanočástice na bázi oxidů kovů

Tato varianta nanočástic je připravována na bázi oxidu kovu či hydroxidu kovu [110]. Nanočástice typu  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{MnO}_2$  či  $\text{TiO}_2$  jsou nejrozšířenějšími představiteli tohoto typu. Nesporným kladem je jejich vysoká stabilita, laditelná morfologie a transformovatelnost povrchu a jednoduchá příprava [111].

4. Magnetické nanočástice

Strukturu magnetických nanočástic tvoří jádro složené z oxidů železa a obalu, jakým je např. z oxid křemičitý. Jejich použití je zejména jako nanokatalyzátory k urychlení reakčního procesu v chemických či biologických aplikacích [114] nosiče cílových léčiv či se používají k detekci pomocí magnetické rezonance [115].

5. Polovodičové nanočástice

Polovodičové nanočástice – známé tako jako kvantové tečky (quantum dots) jsou koloidní fluorescenční polovodičové nanokrystaly [116]. Velký poměr povrchu vůči objemu tohoto typu nanočástic umožňuje funkcionalizaci jednotlivých částí různými organickými činidly. A v důsledku značného množství reaktivních míst na povrchu je možné využít je pro syntézu supramolekulárních sestav [117]. Disponuje jedinečnými optickými (vynikající fotoindukovaný přenos elektronů) a elektrickými vlastnostmi jsou velmi používány ve fotokatalytických aplikacích [118].

6. Polymerní nanočástice

Pro svou vysokou míru biokompatibility, biodegradability a možnosti kontrolované syntézy co se týká stability tvaru, povrchového potenciálu a velikosti jsou polymerní nanočástice uplatňovány především jako nosiče léčiv. Terapeutický účinek je zvýšen zejména díky inzerci aktivních molekul do nanosystémů a jejich ochranou před okolním prostředím [119].

V medicíně jsou pak nanotechnologie cíleny zejména na následující výzkumné úkoly:

- cílená distribuce léčiva na specifické místo určení jako jsou buňky či tkáně,
- lepší absorpce ve vodě špatně rozpustných léků,
- distribuce velkých makromolekulárních léků do konkrétních intracelulárních organel,

- distribuce dvousložkového léčiva pro kombinovanou terapii,
- transcytóza léčiv skrze epitel či endotel,
- detekce účinnosti terapeutického prostředku in vivo v reálném čase,
- vizualizace místa působení léčiva navázaného na terapeutické agens prostřednictvím vhodných zobrazovacích metod [120].

### 2.3.1 Ag nanočástice

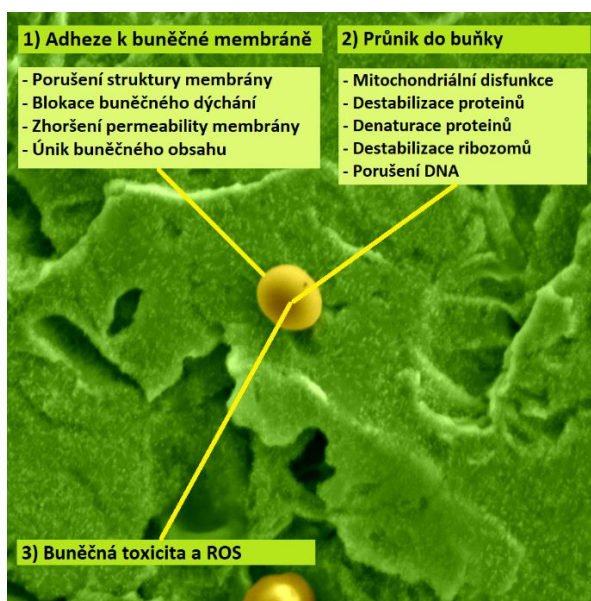
Kombinací nanotechnologií s materiály, které mají vlastní mikrobiální aktivitu, lze získat vhodný typ antimikrobiálních látek pro boj s rezistencí vůči antibiotickým léčivům a přípravkům. Především nanočástice na bázi kovů přitahují velký zájem vědců z důvodu jejich účinnosti proti patogenním mikroorganismům a velké reaktivitě [121]. V centru zájmu je především produkce nanočástic stříbra, zlata, mědi, selenu a z oxidů pak oxid železa, titanu, kobaltu, hliníku, platiny a zinku atd. [122] [123]. Stříbrné nanočástice si pak získaly velkou pozornost pro své širokospektrální antimikrobiální vlastnosti, které byly prokázány u gram pozitivních (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* atd.) gramnegativních (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* atd.) bakterií [124], dále virů (*Hepatitis B virus* [125], *Bunyamwera virus* [126], HIV-1 [127] atd.) a hub (*Aspergillus fumigatus* [128], *Bipolaris spicifera* [129], *Colletotrichum falcatum* [130] atd.).

### 2.3.2 Antimikrobiální působení Ag nanočástic

Antimikrobiální působení nanočástic je závislé na řadě faktorů přípravy v závislosti na požadované antimikrobiální aktivitě. Na účinnost mají vliv fyzikálně-chemické vlastnosti jakými jsou jejich velikost, tvar, povrchová modifikace, poréznost, stabilita ve fyziologických podmínkách atp. Záleží také na způsobu aplikace, tedy zda budou součástí např. kompozitních materiálů ve formě povlaků či obalových materiálů nebo budou působit individuálně např. ve vhodných disperzích [131]. Ačkoliv plné porozumění antibakteriálního působení nanočástic ještě není zcela pochopeno [132], mezi hlavní mikrobicidní účinky lze zařadit (Obr. 7):

- a) Navázání nanočástic na povrch buněčné membrány a narušení její funkce, permeability a blokaci buněčného dýchání [133] [134]. Nanočástice se mohou hromadit na buněčné stěně a membráně a tam způsobit morfologické změny jako například odchlípnutí membrány a smršťování cytoplazmy [135]. Lze pozorovat také navázání nanočástic na membránové proteiny, což má za následek výrazné zhoršení propustnosti membrány a transport iontů a v tomto důsledku může dojít k nekontrolovatelnému úniku buněčného obsahu a transportu skrze cytoplazmatickou membránu způsobenou zvýšenou permeabilitou membrány [135].
- b) Stříbro je považováno za Lewisovu kyselinu, a tak je po průniku do buňky schopno interagovat se sloučeninami obsahujícími fosfor a síru, jakými jsou například deoxyribonukleová kyselina (DNA), proteiny či buněčná membrána a způsobit tak jejich strukturální změny [133]. Taktéž způsobuje při kontaktu s cytoplazmou blokádu transkripce a translace a redukci syntézy proteinů a stejně tak může docházet k denaturaci DNA a blokování metabolismu cukrů [135].

- c) Tvorba reaktivních forem kyslíku (tzv. reactive oxidative species – ROS) a volných radikálů v důsledku zvýšeného oxidačního stresu způsobeného nanočásticemi stříbra. Superoxidové aniony, hydroxylové radikály, peroxid vodíku a kyselina chlorná jsou přirozené vedlejší produkty buněčného dýchání a jejich intracelulární koncentrace jsou obvykle udržovány na relativně nízké úrovni. Stříbro však může být katalyzátorem pro tvorbu volných radikálů v přítomnosti kyslíku [134]. Nadměrné množství volných radikálů pak způsobuje přímé poškození mitochondriální membrány, destrukci DNA a hyperoxidaci DNA, lipidů a proteinů [135].



Obr. 7: Základní mechanismy antimikrobiálního působení Ag nanočástic (SEM fotografie Rabochová, M., kolorováno v AKVIS Coloriage [10], velikost zorného pole 7,6  $\mu\text{m}$ ).

### 2.3.3 Biosyntéza nanočástic prostřednictvím rostlin a rostlinných extraktů

Obecně jsou nanočástice syntetizovány dvěma přístupy: bottom-up a top-down. V případě bottom-up vznikají nanočástice z jednodušších látek pomocí technik biologické syntézy, technik kapalné či plynné fáze či zvláknování nebo pyrolýzy atd. Při top-down přístupu jsou pak použity destruktivní metody, při nichž se objemný materiál včetně makromolekul rozkládá na menší fragmenty tvořící nanočástice [136]. Mezi tyto metody se řadí fotolitografie, interferenční litografie, litografie elektronovým svazkem [137], iontové naprašování, laserová ablace, pyrolýza atd. [138].

K produkci nanočástic se používá mnoho fyzikálních a chemických metod, které jsou však velmi nákladné a časově náročné. Navíc je pro syntézu třeba dosažení vysokých teplot a tlaku a vyžadují použití toxických chemických látek jakožto prekurzorů kovů a pro stabilizaci. V důsledku tak může být jejich využití k v klinických aplikacích z důvodů toxických sloučenin adsorbovaných na povrch nanočástic a produkci toxického odpadu nevhodné či omezené [139]. Jako vhodná alternativa byla testována produkce nanočástic prostřednictvím mikroorganismů, jakými jsou kvasinky, bakterie či mikromycety [140] [141] [142]. Z důvodu

malé produkce prozatím však nelze uvažovat o průmyslovém využití [139]. Jako vhodná alternativa je pak syntéza z rostlin či rostlinných extraktů. Přehledný systém prostředků pro tvorbu nanočástic lze pak rozdělit do následujících kategorií Tab. 2:

Tab. 2: Syntéza nanočástic [143] [144].

A. Biologické metody	B. Chemické metody	C. Fyzikální metody
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rostlinná syntéza</li> <li>- Mikrobiologická syntéza (bakterie, houby, kvasinky)</li> <li>- Syntéza prostřednictvím mikromořských řas</li> <li>- Syntéza prostřednictvím enzymů a biomolekul</li> <li>- Syntéza z industriálních a zemědělských odpadů</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mikroemulze</li> <li>- Koprecipitace</li> <li>- Chemická redukce kovových solí</li> <li>- Dekompozice (elektrochemická, mikrovlnná, sonochemická, solvotermální, termální)</li> <li>- Mikroemulzní metoda</li> <li>- Fytochemická (ozařovací) metoda atd.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Iontová implantace</li> <li>- Pulsní laserová ablace</li> <li>- Sprejová pyrolýza</li> <li>- Ball milling</li> <li>- Mechanické obrábění</li> <li>- Plasma arc</li> <li>- Parní a plynná fáze</li> <li>- Litografie atd.</li> </ul>

Tab. 3: Charakteristické rysy různých druhů syntézy nanočástic [145].

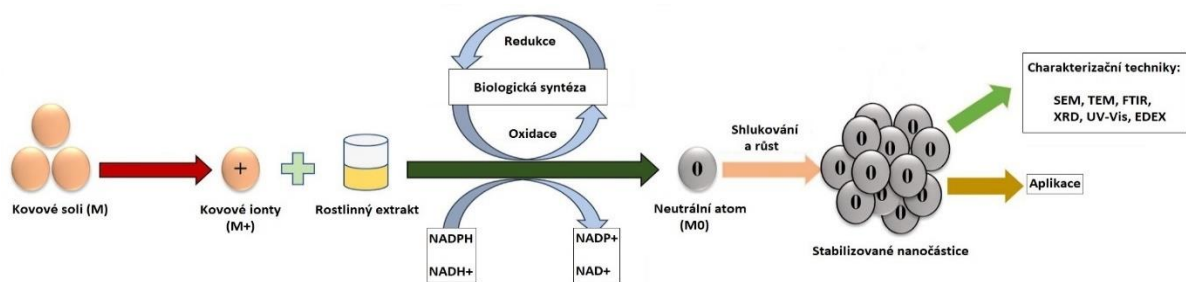
Vlastnosti	Biologické metody	Chemické metody	Fyzikální metody
Produktivita:	Vysoká	Vysoká	Nízká
Toxické chemikálie:	Nepoužívá se	Používá se	Používá se
Produkce:	Velké množství	Malé množství	Velké množství
Velikost a tvar:	Definovatelné	Kontrolovatelné	Obtížně říditelné
Stabilita:	Nízká	Vysoká	Nízká
Energetická náročnost:	Nízká	Vysoká	Vysoká
Náklady	Efektivní	Nízké	Vysoké

Biosyntéza nanočástic prostřednictvím rostlin či rostlinných extraktů (v literatuře ekvivalentně pod pojmem green synthesis) je ve srovnání s fyzikálně-chemickými metodami šetrná k životnímu prostředí, ekonomická a bez toxických odpadních produktů (viz Tab. 3). Nevýhodou pak může být delší doba syntézy, nehomogenita velikostí nanočástic či nedostupnost některých surovin vhodných pro výrobu [146]. Syntéza nanočástic z rostlin či rostlinných extraktů má oproti syntéze z hub nebo bakterií výhodu v rychlejší přípravě (nevyžadují dlouhou inkubační dobu), nepotřebují náročný proces udržování mikrobiálních kultur ani složité purifikační systémy vyžadující několik cyklů vysokorychlostní centrifugace a promývání [147] [148] a zároveň je manipulace s rostlinami bezpečná. Taktéž rostliny obsahují širokou škálu biomolekul a metabolitů, které napomáhají stabilitě a redukci nanočástic. Nanočástice mohou být obecně produkovány zpracováním téměř všech částí rostlin [147].

Metodika biologických syntéz závisí především na typech bioprekurzorů použitých pro stabilizaci a redukci nanočástic [149]. Na jejich základě jsou pak stanoveny další parametry reakce, jakými jsou pH, teplota, tlak a typ rozpouštědla. Například pH je důležitým faktorem,

kteřý ovlivňuje texturu a velikost syntetizovaných nanočástic a jeho úpravou tak lze řídit velikost syntetizovaných nanočástic. Teplota pak určuje povahu nanočástic a typicky pro biosyntézu je  $< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , chemické metody  $< 350\text{ }^{\circ}\text{C}$  a fyzikální metody  $> 350\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Aplikovaný tlak pak také ovlivňuje tvar a velikost nanočástic. Mezi další faktory ovlivňující tvorbu nanočástic lze také zařadit vliv prostředí a délku reakční a inkubační doby [110].

Obecně lze pak shrnout, že biomolekuly (jakými jsou ketony, flavony, aldehydy, karboxylové kyseliny, amidy, fenoly, terpenoidy, kyselina askorbová a další [149]), které jsou obsaženy v rostlinách (potažmo jsou sekretovány bakteriemi či houbami) působí jako redukční činidla redukující kovové ionty ( $M^{+}$ ) na neutrální atomy kovu ( $M^0$ ) prostřednictvím oxidačně-redukčního mechanismu. Redukovaná forma kovů pak agreguje a vytváří shluky nanočástic [150]. Přehledně pak biologickou syntézu shrnuje Obr. 8.



Obr. 8: Biologická syntéza nanočástic [150].

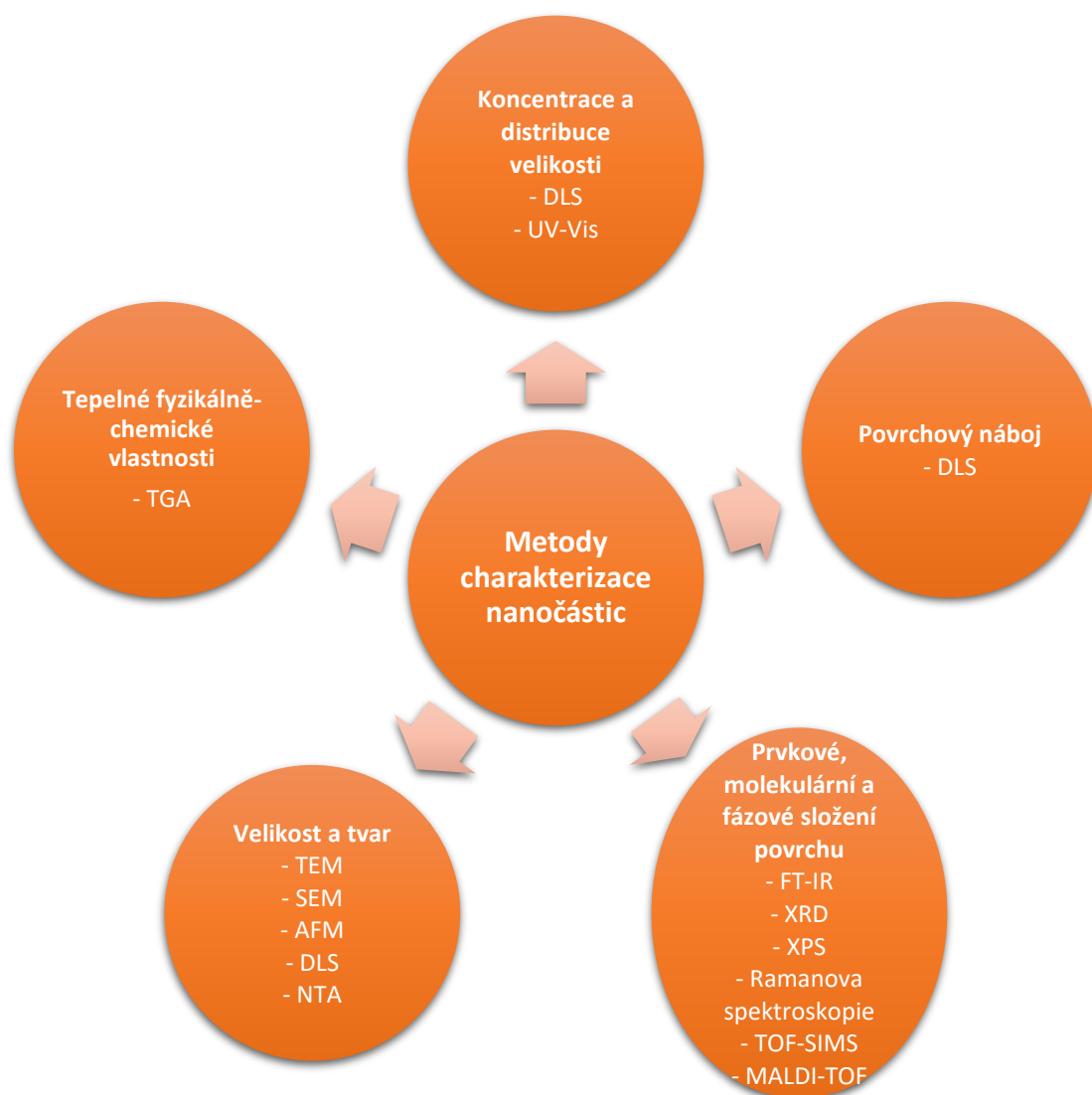
#### 2.3.4 Přehled základních technik charakterizace nanočástic

Povrchové vlastnosti a velikost patří mezi esenciální atributy aplikačního využití nanočástic. Analýza povrchu je často nezbytnou součástí výzkumu a pochopení vlastností syntetizovaných nanočástic. Na základě znalosti parametrů lze usuzovat terapeutickou účinnost, biologickou aktivitu, stabilitu, biokompatibilitu a toxicitu [151]. V případě nanočástic tak lze posuzovat chemické složení, tvar a strukturu povrchu, poréznost, velikost pórů, agregaci, smáčivost, rozpustnost, adsorpční potenciál, zeta potenciál, krystalickou strukturu, velikost reaktivní plochy, distribuci velikosti nanočástic atd. [144]. Ke stanovení parametrů syntetizovaných nanočástic lze použít široké spektrum metod, jakými jsou například SEM [152], TEM [153], time-of-flight hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (TOF-SIMS) [154], AFM [155], hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice (MALDI-TOF) [156], rentgenová difrakce (XRD) [157], UV-Vis spektroskopie [158], rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS) [159], dynamic light scattering (DLS) [160], Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) [161], termogravimetrická analýza (TGA) [162], magnetická rezonance (NMR) [163] a nanoparticle tracking analysis (NTA) [164].

Povrchová analýza nanočástic je klíčová v mnoha ohledech. Nejen, že stabilita nanočástic je přímo spojena s jejich povrchovým nábojem, ale také chemické složení povrchu úzce souvisí s toxicitou, což je pro biologické systémy zásadní. Pro bližší a velmi stručný náhled do problematiky je uveden následující přehled aplikací jednotlivých výše uvedených metod (viz Obr. 9): UV-Vis spektrometrie slouží zejména k identifikaci přítomnosti, koncentrace a průkazu syntézy nanočástic po redukčním procesu [165] prostřednictvím absorpčních spekter. Analýza měří intenzitu světla procházejícího vzorkem, kterou porovná s referenčním

měření dopadajícího záření ze zdroje [166]. Metody elektronové mikroskopie, jakými jsou např. SEM, TEM a mikroskopie se skenující hrotovou sondou, jako například AFM, zpřesňují vizuální charakteristiku nanočástic. TEM poskytuje informaci o distribuci, velikosti, tvaru a morfologii nanočástic prostřednictvím 2D obrazu [167]. TEM získává obraz průchodem elektronového svazku vzorkem, který je nejčastěji umístěn na mřížce z uhlíkové oceli. Poskytuje lepší prostorové rozlišení ve srovnání se SEM a tím umožňuje podrobnější analýzu nanočástic. Ovšem k TEM analýze však patří nároky na velkou pracnost a odbornost obsluhy mikroskopu [168]. SEM pak poskytuje kromě 2D snímků i 3D sekvence, které umožňují studovat morfologii nanočástic. Při zobrazování prostřednictvím SEM, podobně jako v případě TEM, je emitován svazek urychlených elektronů, který je skrze soustavu elektromagnetických cívek fokusován na povrch vzorku [166]. Interakcí elektronů se vzorkem a vhodnou volbou detekce vybraných typů emitovaných částic lze vybrat vhodný zobrazovací mód k získání požadované informace o vzorku. Mezi zobrazovací módy SEM patří SE – detekce sekundárních elektronů – získání topografické informace o vzorku, BSE – detekce zpětně odražených elektronů – zjištění materiálové kontrastu závislé na atomovém čísle, EDS – detekce charakteristického rentgenového záření – použití pro analýzu chemického složení a koncentrace daného prvku a EBSD – detekce difrakce zpětně odražených elektronů – data pro krystalografickou analýzu [169]. Doplnkovým vybavením pak může být detektor STEM-in-SEM, který umožňuje transmisní režim a poskytuje tak detailní informace o morfologii nanočástic. AFM je cílena na 3D analýzy povrchových charakteristik, které mohou dosahovat až atomárního rozlišení. XRD se používá k analýze krystalinity [170] a fázové čistoty struktury a EDS pak ke stanovení prvkového složení materiálu nanočástic. FT-IR slouží k identifikaci funkčních skupin v nanočásticích. Pomocí FT-IR tak lze hodnotit spektrum infračerveného záření, absorpci a Ramanův rozptyl v kapalném, pevném či plynném složení [171]. Rozpoznává funkční skupiny, jakými jsou např. -C dvojná vazba, -N-H, -O-H atd. přítomné v biologických extraktech, které redukují kovové ionty stříbra v roztoku soli (dusičnan stříbrný) na jejich nanokrystalickou formu [172]. TGA je technika, při které je hmotnost vzorku monitorována v závislosti na čase nebo teplotě [173] a pomáhá stanovit fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic [128]. XPS slouží pro charakterizaci prvkového složení nanočástic a chemických vazeb [174]. Metoda NTA umožňuje stanovit velikost nanočástic v suspenzi na bázi bodových rozptylů laseru na nanočásticích pohybujících se Brownovým pohybem [175]. DLS je pak pravděpodobně nejběžnější technikou používanou pro analýzu nanočástic v kapalném roztoku, a to díky rychlosti a jednoduchosti měření. Jejím prostřednictvím lze získat informace o hydrodynamickém průměru nanočástic, rozdělení velikostí a polydispersním indexu [176]. MALDI-TOF je pak považována za zobrazovací hmotnostně spektrometrickou metodu s měkkou ionizací, tedy šetrnou z pohledu ionizovaných fragmentace molekul [177]. Další zobrazovací hmotnostně spektrometrickou metodou je TOF-SIMS [178], který má v porovnání s MALDI vyšší obrazové rozlišení, avšak nízké výtěžky nefragmentovaných molekulárních iontů velkých molekul.





Obr. 9: Přehled metod vhodných pro charakterizaci nanočástic a jejich aplikace (upraveno z [179]).

## 3 Mikroskopie a charakterizace AgNPs a jejich vliv na *Candida albicans*

### 3.1 Metody

V rámci disertační práce byla prostřednictvím SEM, SEM-in-STEM a AFM provedena charakterizace stříbrných nanočástic a vizualizace planktonních buněk. Na pracovišti Ústavu biotechnologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze vedené paní doc. Ing. Olgou Mařátkovou, Ph.D. a paní Ing. Annou Miškovskou byly syntetizovány AgNPs a aplikovány další metody doplňující studii, jako například charakterizace AgNPs prostřednictvím DLS, UV-Vis, XRD, AAS, statistická analýza mikrobiálního růstu a stanovení antimikrobiální aktivity, jejichž motivace, metody a výsledky jsou uvedeny ve společné publikaci [180]. Jako doplněk k disertační práci bylo provedeno skenování topologie povrchu *C. albicans* prostřednictvím mikroskopie atomárních sil. Systematické využití AFM je pak mimo hlavní zaměření práce.

#### 3.1.1 Identifikace stříbrných nanočástic použitých ve studii

Stříbrné nanočástice byly syntetizovány z letorostů bílých a červených odrůd *Vitis vinifera*, konkrétně odrůd Pinot noir, Pinot gris a Ryzlink rýnský sběrem z vinice Grébovka (Praha, vinařská oblast Čechy, Česká republika). Podrobný způsob syntézy monodispersních i polydispersních nanočástic je uveden v [180]. Pro účely studie byly nanočástice biosyntetizovány a dispergovány v různých nosných médiích pro účely zjištění možného synergického antifungicidního účinku rostlinného extraktu s AgNPs (Tab. 4).

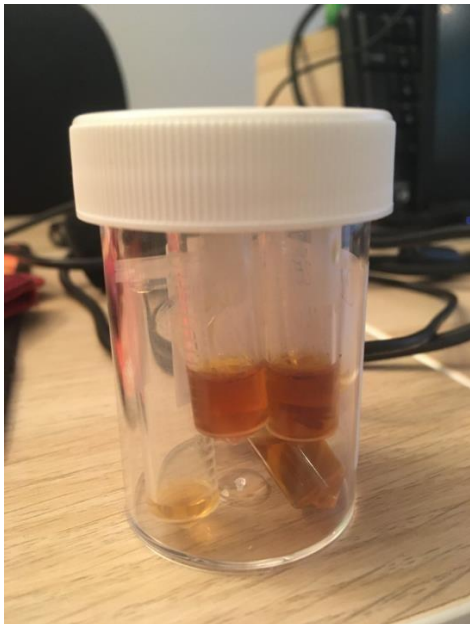
Tab. 4: Testované typy Ag nanočástic.

Zkratka	Typ nanočástic
mAgNPs/e	monodispersní AgNPs s extraktem <i>Vitis vinifera</i>
mAgNPs/w	monodispersní izolované AgNPs resuspendované v ultračisté vodě
pAgNPs/e	polydispersní AgNPs s extraktem <i>Vitis vinifera</i>
pAgNPs/w	polydispersní AgNPs resuspendované v ultračisté vodě

#### 3.1.2 Charakterizace AgNPs prostřednictvím STEM-in-SEM

Zobrazování biosyntetizovaných AgNPs bylo provedeno prostřednictvím SEM s využitím STEM-in-SEM integrovaného v zařízení FIB-SEM. Mikroskopie byla provedena na přístroji verze LYRA3 GMU od společnosti TESCAN ORSAY HOLDING, a.s., Česká republika.

Biosyntetizované nanočástice byly ve formě 2  $\mu$ l roztoku nakápnuty na uhlíkovou blanku transmisní měděné mřížky (Carbon Film Supported Copper Grid, Standard Thickness, 200 mesh, MERCK spol. s r.o.) (Obr. 10, Obr. 11).



Obr. 10: Vzorky roztoků Ag nanočástic (fotografie Rabochová, M.).



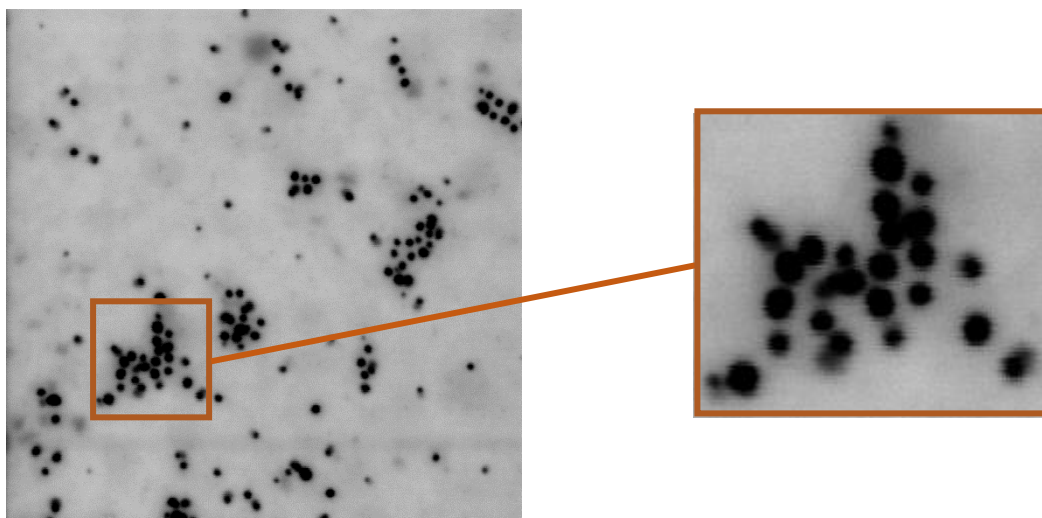
Obr. 11: Ukázka transmisní mřížky použité pro STEM-in-SEM mikroskopii [181].

Vzorky byly analyzovány při energii svazku 30 keV pomocí STEM detektoru v režimu světlého pole (bright field, BF). Režim BF poskytoval vysoce kontrastní snímky AgNPs, které byly následně použity pro charakterizaci nanočástic a stanovení jejich morfologie, včetně rozdělení jejich velikosti a tvaru. V režimu BF je detekován přímo prošlý nerozptýlený elektronový svazek, zatímco rozptýlené elektrony jsou blokovány. Z tohoto důvodu objekty o vysokém atomovém čísle Z na obrázku vypadají tmavě.

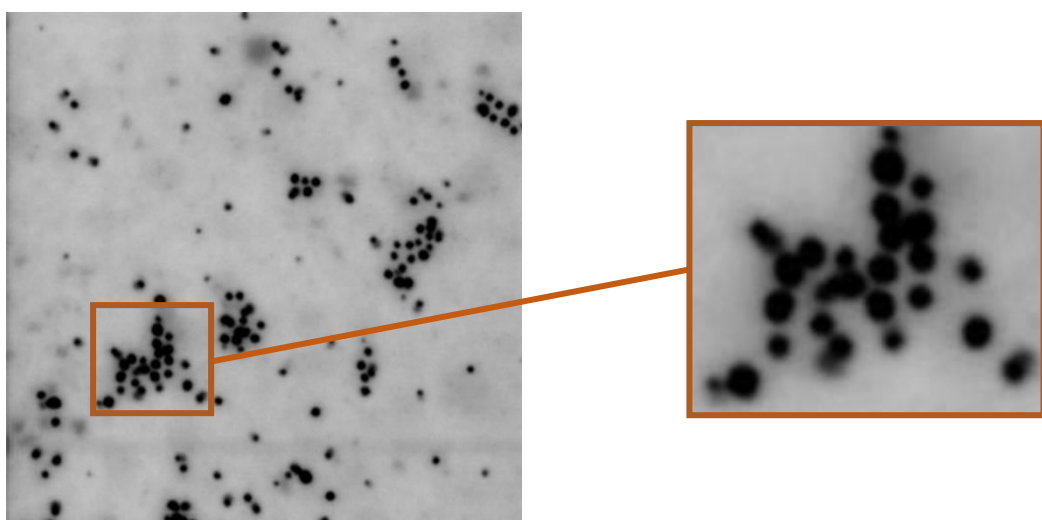
Analýza obrazu byla provedena v programu FIJI/ImageJ [76]. FIJI obsahuje zásuvné moduly (plug-in) pro zpracování obrazu v rámci distribuce ImageJ. Tento software byl vyvinut pro analýzu obrazu zejména pro vědecké aplikace.

Před započítím analýz byl každý snímek kalibrován, převeden na šedotónový (8-bit) a optimálně segmentován (threshold), aby byla získána binární reprezentace hledaných nanočástic (1) na pozadí (0). Pokud vznikly nedokonalé bílé odrazy/díry uvnitř nanočástic, bylo provedeno jejich vyplnění (fill holes). Dále byly odstraněny drobné artefakty v obrazu prostřednictvím jednotlivých morfologických operací (např. Open, Close, atd.). Pokud došlo ke spojení některých sousedících nanočástic, které by se počítaly jako jeden objekt, byly rozděleny buď manuálně anebo byly shluky odděleny prostřednictvím funkce Watershed. Taktéž byla na snímky aplikována rychlá Fourierova transformace (FFT), kdy výstupem transformace je obraz ve frekvenční oblasti, zatímco vstupní obraz je ekvivalentem prostorové domény. Na obrázku ve frekvenční doméně každý bod představuje určitou frekvenci obsaženou v obrázku v prostorové doméně [182]. Frekvenční doména je základem mnoha obrazových filtrů používaných k odstranění šumu, zostření obrazu, analýze opakujících se vzorů nebo extrahování prvků. Ve frekvenční doméně je umístění pixelu reprezentováno jeho x- a y- frekvencemi a jeho hodnota je reprezentována amplitudou. Provedení FFT ve FIJI navíc zachovává všechna původní data. FFT rozloží obraz na sinus a kosinus různých amplitud a fází, což odhalí opakující se vzory v obraze. Nízké frekvence představují postupné variace v obraze; obsahují nejvíce informací, protože určují celkový tvar nebo vzor na obrázku. Vysoké frekvence

odpovídají náhlým změnám obrazu; poskytují více detailů v obraze, ale obsahují více šumu [183]. Z tohoto důvodu byla FFT použita pro odfiltrování šumu na pozadí (viz Obr. 12, Obr. 13).



Obr. 12: Snímek nanočástic ze STEM-in-SEM před FFT.



Obr. 13: Snímek nanočástic ze STEM-in-SEM po FFT.

Nakonec byly provedeny analýzy všech nanočástic ve smyslu získání dat o četnosti, kruhovitosti a hodnot průměru. Do analýzy nebyly zahrnuty nanočástice ležící na kraji snímku, neboť je předpoklad, že nebyly kompletní. Základními parametry, které byly pro každou nanočástici získány, byly plocha  $A$  v jednotkách  $\text{nm}^2$  a obvod  $P$  v jednotkách  $\text{nm}$ . Plocha  $A$  je definována jako projekce tvaru nanočástice v rovině zaostření elektronového svazku. Na základě těchto dvou parametrů byly vypočteny u každé nanočástice hodnoty ekvivalentního průměru kruhové plochy  $d_{ECD}$  a kruhovitost  $f_{CIRC}$ . Hodnota  $d_{ECD}$  je definována jako průměr kruhu, který má stejnou plochu jako detegovaná nanočástice, tj.:

$$d_{ECD} = 2 \sqrt{\frac{A}{\pi}}$$

Hodnota  $f_{CIRC}$  pak představuje poměr plochy nanočástice ku ploše kruhu se stejným obvodem, tj.:

$$f_{CIRC} = 4\pi \frac{A}{P^2}$$

Hodnota kruhovitosti dokonalé kružnice je rovna 1,0, nižší pak indikuje větší odchylku dané nanočástice od dokonalé kružnice. Následně byly připraveny histogramy velikosti  $d_{ECD}$  a  $f_{CIRC}$  distribuce biosyntetizovaných nanočástic. Také byly vypočteny průměrné hodnoty a standardní odchylky.

Počty analyzovaných nanočástic byly následující (Tab. 5):

Tab. 5: Celkové množství analyzovaných nanočástic.

Typ nanočástice	Počet
mAgNPs/e	1157
mAgNPs/w	480
pAgNPs/e	708
pAgNPs/w	558

### 3.1.3 Vizualizace planktonních buněk *Candida albicans* s AgNPs prostřednictvím SEM

Analyzovaným kvasinkovým mikroorganismem byl druh *Candida albicans* ATCC 10231 pocházející z American Type Culture Collection (ATCC). Podrobný způsob kultivace a inkubace mikroorganismu je uveden v [180].

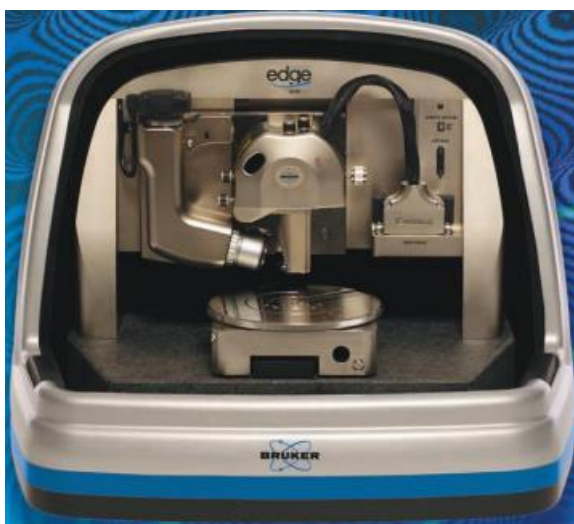
Vzorky byly odebrány z buněčných kultur s a bez přítomnosti nanočástic (kontrola). 24-hodin stará kultura byla odstředěna (10 min, 9 000 × g), dvakrát promyta fyziologickým roztokem a nakonec jedenkrát destilovanou vodou. Následně bylo nakápnuto 10 µl buněčné suspenze na křemíkovou destičku (Sil'tronix Silicon Technologies, Francie). Připravené nakápnuté vzorky byly ponechány volně vyschnout.

Pro SEM zobrazení bylo použito urychlovací napětí elektronového svazku 10 kV. Snímky *Candida albicans* společně s AgNPs byly zobrazeny detektorem SE s důrazem na co nejvyšší kvalitu a rozlišení snímku.

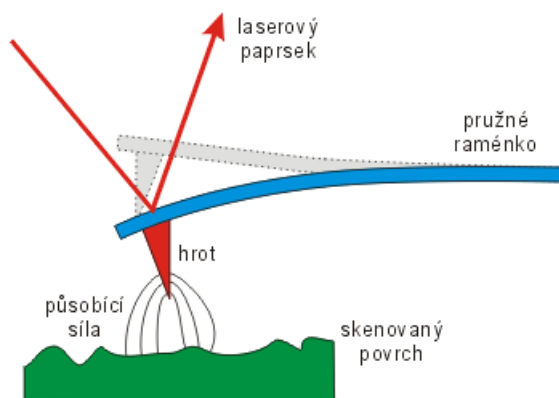
### 3.1.4 Mikroskopie atomárních sil – topologie buněčného povrchu

Zobrazení povrchu buněk bylo realizováno prostřednictvím mikroskopie atomárních sil na přístroji Dimension Edge Scanning Probe Microscop s kontrolním systémem Dimension Edge Control Systém od společnosti Bruker (Obr. 14). Přístroj je navržen ke stanovování struktury povrchu s nanometrovým laterálním rozlišením a až subnanometrovým rozlišením ve směru kolmém k povrchu. Pro skenování byl zvolen semikontaktní či také nazývaný poklepový mód (tzv. tapping mode), kdy hrot osciluje nad vzorkem na frekvenci blízké rezonanci, a dochází k jeho přiblížení k povrchu až do oblasti působení odpudivých sil (Obr. 15). Prostřednictvím změny amplitudy oscilace dochází k detekci změn sil mezi hrotem pružného raménka

kantylévru (cantilever) a povrchem vzorku, čímž je detekován signál a zaznamenána topografie povrchu. Tento režim je, na rozdíl od kontaktního režimu, který by mohl poškodit jemné povrchové struktury, vhodný zejména pro měkké materiály, jako jsou buňky a obecně biologické preparáty. Použitým kantylévrem byl typ TESP-V2-SS od společnosti Bruker o nominálním průměru hrotu 2 nm. Tento typ byl zvolen z hlediska možnosti zobrazení nanočástic na buňkách. Vzorky byly před skenováním v dehydrovaném stavu a jejich příprava byla stejná, jako v případě [180], kde je podrobněji popsána. Skenování probíhalo na vzduchu za teploty ~ 16 °C. Set point byl zvolen na 1,73 V, nastavení obvodů zpětné vazby (tzv. PID charakteristika, proporcionálně-integračně-derivační parametry) byla následující: P = 1,0, I = 1,1, D = 0,0. Rozlišení snímku bylo 1024x1024 pix a skenovací rychlost 4 μm/s.

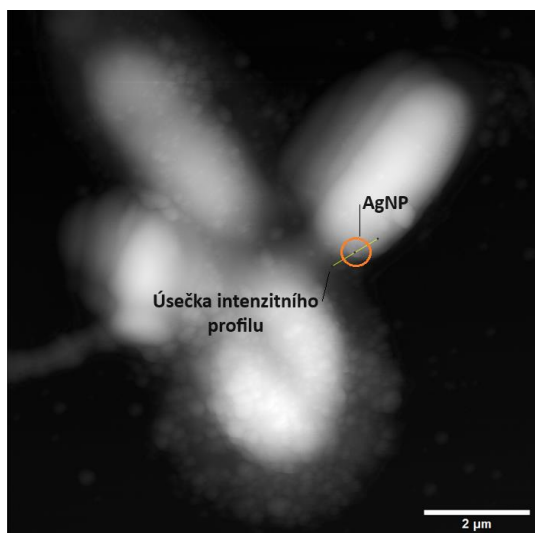


Obr. 14: AFM typ Dimension Edge [184].

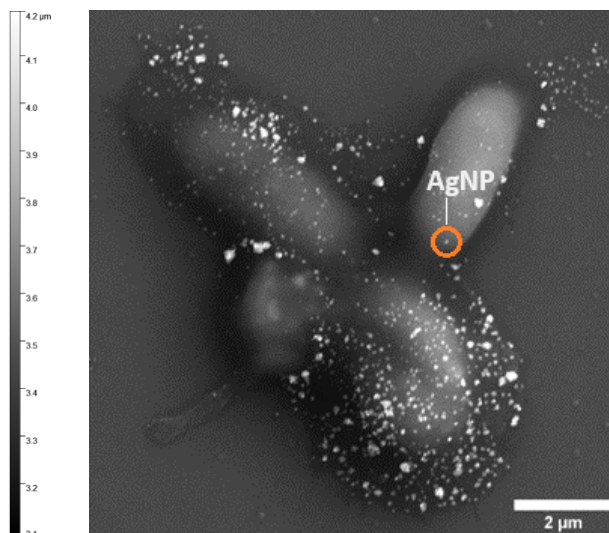


Obr. 15: Schéma semikontaktního módu AFM [185].

Analýza obrazu za účelem stanovení výškového profilu AgNP na AFM snímku vzorku *Candida albicans* pod vlivem AgNPs byla provedena v programu FIJI/ImageJ [76]. Před započítím analýzy byl vybraný AFM snímek včetně intenzitní škály (Obr. 16) kalibrovány a převedeny na šedotónové (8-bit). Na AFM snímku vybrána nanočástice (Obr. 16), která byla identicky detekována na snímku ze SEM (Obr. 17). Následně byl vykreslen profil intenzity pixelů podél úsečky protínající zvolenou nanočásticí. Vzhledem k faktu, že se nanočástice nacházela na šikmém sklonu, tj. na oblém povrchu buňky, bylo třeba provést korekci dat vzhledem k šikmému náklonu. Byla vypočtena rovnice přímky procházející dvěma krajními body povrchu nanočástice (tj. krajními body na průměru AgNP) a vypočtené hodnoty stupňů šedi byly odečteny od originální údajů. Získaná data byla vynesena do grafu profilu intenzit, z něhož byla odečtena maximální hodnota vrcholu úrovně šedi. Na základě porovnání s intenzitní škálou byla stanovena maximální průměrná výška nanočástice.



Obr. 16: AFM snímek s detekovanou nanočásticí pro stanovení její průměrné výšky.



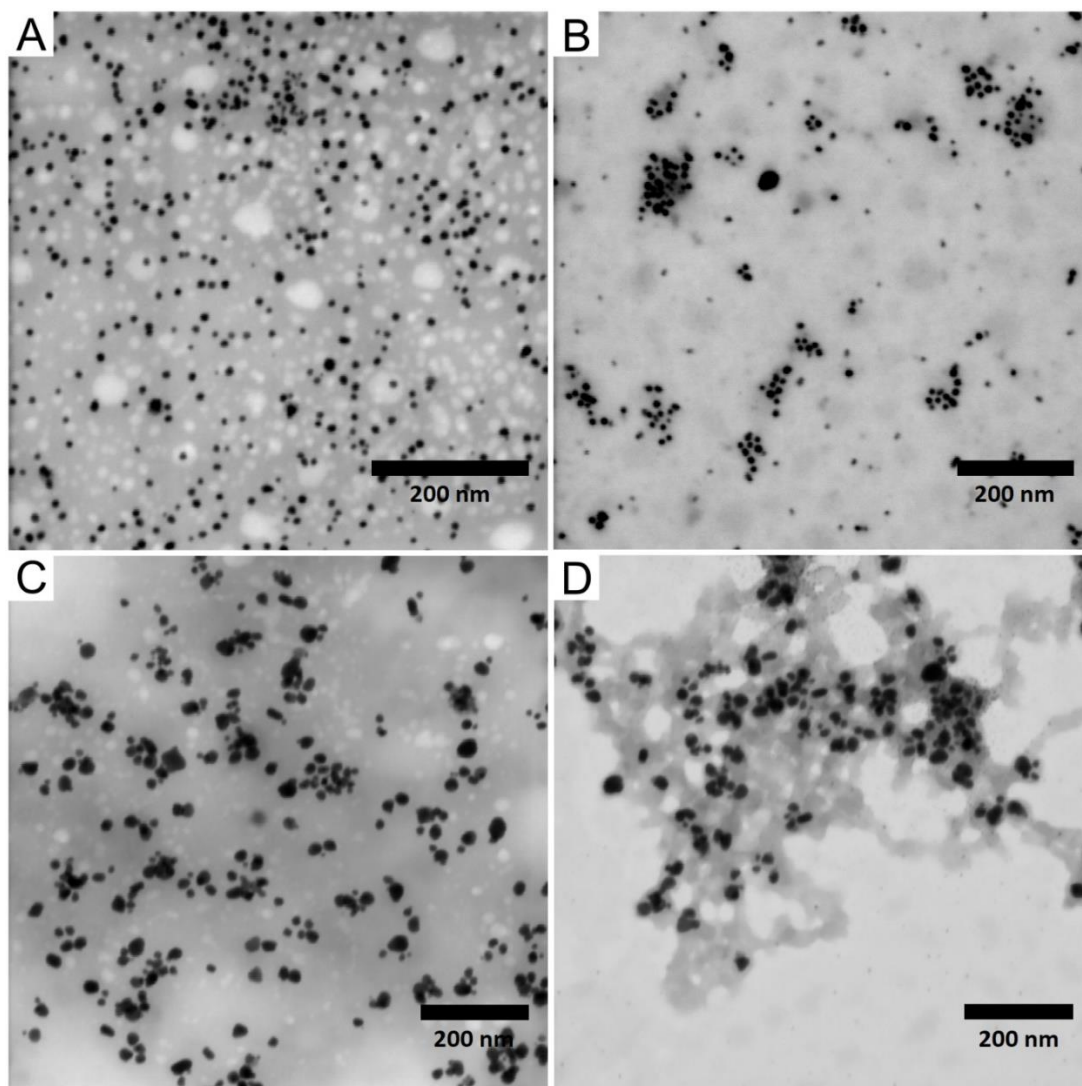
Obr. 17: SEM snímek s identickou detekovanou nanočásticí.

## 3.2 Dílčí výsledky a diskuse

Cílem studie byla charakteristika AgNPs čtyř různých typů mAgNPs/e, mAgNPs/w, pAgNPs/, pAgNPs/w (Tab. 4) lišících se morfologií a distribucí velikosti za účelem získání povědomí o jejich vlastnostech a mikrobiologickém působení na *Candida albicans*. Velikost a kruhovitost biosyntetizovaných AgNPs společně s jejich četnostmi byla stanovena analýzou STEM-in-SEM snímků. Výsledky výzkumu byly publikovány v publikaci [180].

### 3.2.1 Charakterizace AgNPs prostřednictvím STEM-in-SEM

Zobrazování biosyntetizovaných nanočástic bylo provedeno pomocí detektoru STEM-in-SEM. V Tab. 4 jsou uvedeny všechny čtyři druhy biosyntetizovaných stříbrných nanočástic. Tytéž snímky (společně s dalšími nasnímanými fotografiemi stejného charakteru) byly použity pro zpracování obrazu a získání výsledných dat o četnostech, kruhovitosti a průměru nanočástic. Monodispersní nanočástice (Obr. 18 A, B) jsou menších rozměrů, velikostně uniformní a netvořící velké shluky. Oproti tomu polydisperzní nanočástice jsou větších rozměrů, obsahují větší variabilitu různých velikostí, a ačkoliv jsou kruhové, popř. oválné, tak tvarově nejsou tak uniformní (Obr. 18 C, D).



Obr. 18: STEM-in-SEM fotografie analyzovaných biosyntetizovaných Ag nanočástic (A-monodisperzní AgNPs s extraktem, B-monodisperzní AgNPs v ultračisté vodě, C-polydisperzní AgNPs s extraktem, D-polydisperzní AgNPs v ultračisté vodě) [180].

Střední průměr a kruhovitosť biosyntetizovaných stříbrných nanočástic jsou uvedeny v Tab. 6 a Tab. 7. Monodisperzní nanočástice obsahovaly malé částice s úzkým rozsahem velikosti. Tvarově byly uniformní, tj. téměř 90 % mAgNPs leží v intervalu kruhovitosti 0,85 – 1,0. Oproti tomu polydisperzní nanočástice byly větší a 30 % pAgNPs spadalo do rozsahu kruhovitosti nižší než 0,85, tedy méně kruhovité. Výsledky uvedené v Tab. 6 také poskytují informace o průměru a průměrné kruhovitosti všech čtyř skupin sledovaných nanočástic.

Tab. 6: Hodnoty průměrného průměru a průměrné kruhovitosti biosyntetizovaných AgNPs [180].

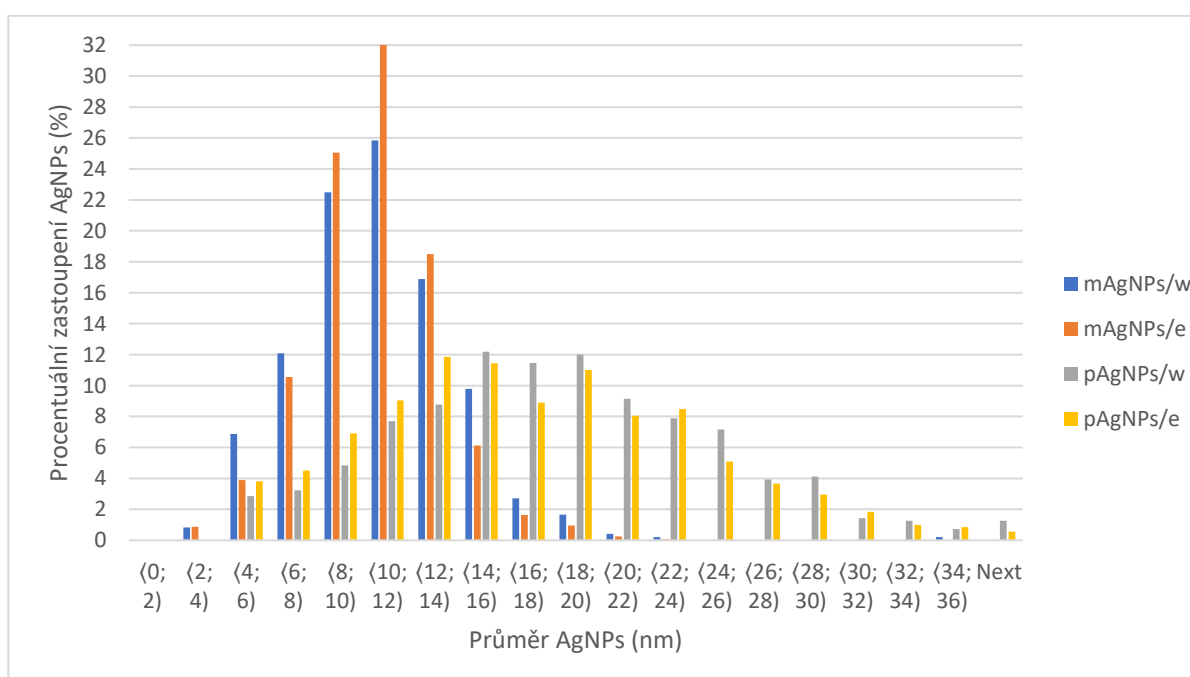
Typ nanočástice	Průměrný průměr AgNPs (nm)	Průměrná kruhovitosť AgNPs (-)
mAgNPs/e	$10,6 \pm 2,7$	$0,92 \pm 0,06$
mAgNPs/w	$10,8 \pm 3,4$	$0,93 \pm 0,06$
pAgNPs/e	$17,2 \pm 6,9$	$0,89 \pm 0,09$
pAgNPs/w	$18,3 \pm 6,9$	$0,87 \pm 0,09$



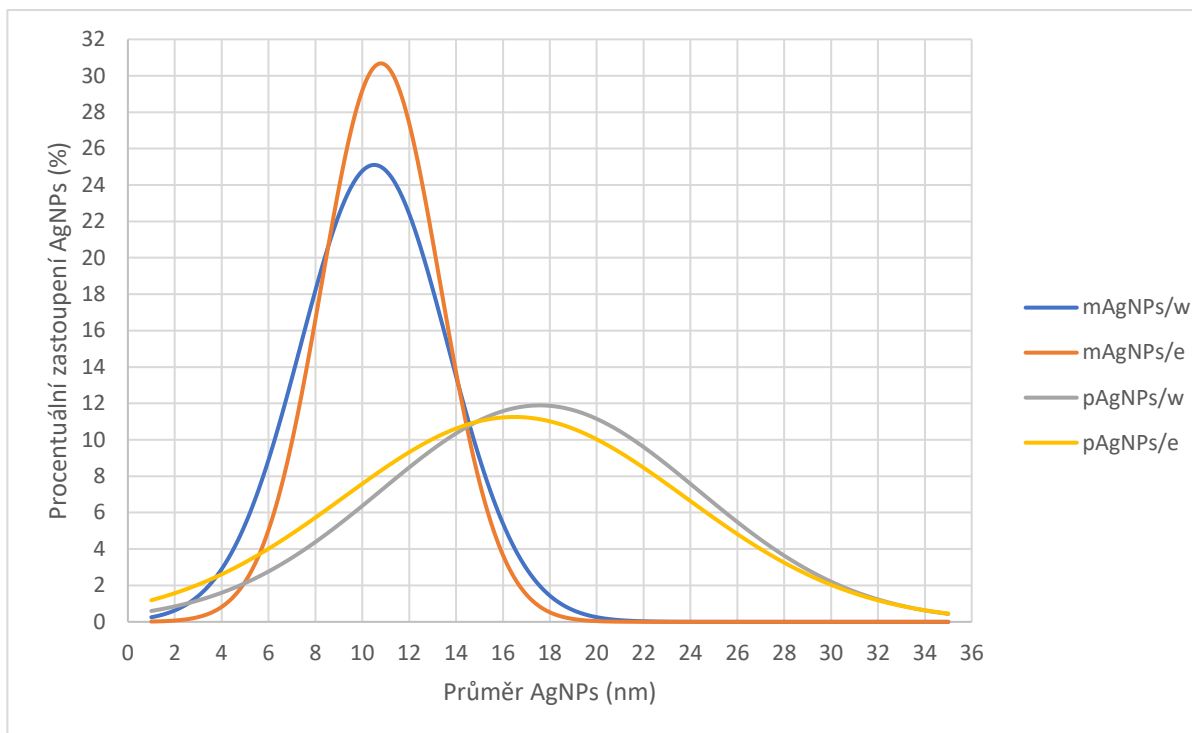
Tab. 7: Procentuální zastoupení kruhovitosti biosyntetizovaných AgNPs [180].

Procentuální zastoupení nanočástic jednotlivých typů (%)				
Interval kruhovitosti (-)	mAgNPs/e	mAgNPs/w	pAgNPs/e	pAgNPs/w
<0.00; 0.70)	0,9	0,4	3,4	5,2
<0.70; 0.75)	1,4	1,9	3,4	3,4
<0.75; 0.80)	2,9	2,9	7,1	9,3
<0.80; 0.85)	5,9	6,5	12,9	16,1
<0.85; 0.90)	17,9	17,1	22,6	26,9
<0.90; 0.95)	44,9	30,8	28,7	24,0
<0.95; 1.00)	26,2	40,4	22,0	15,1

Na Graf. 1 a Graf. 2 jsou zobrazeny histogramy distribuce velikosti částic biosyntetizovaných nanočástic s použitím extraktu z třtiny *Vitis vinifera*.



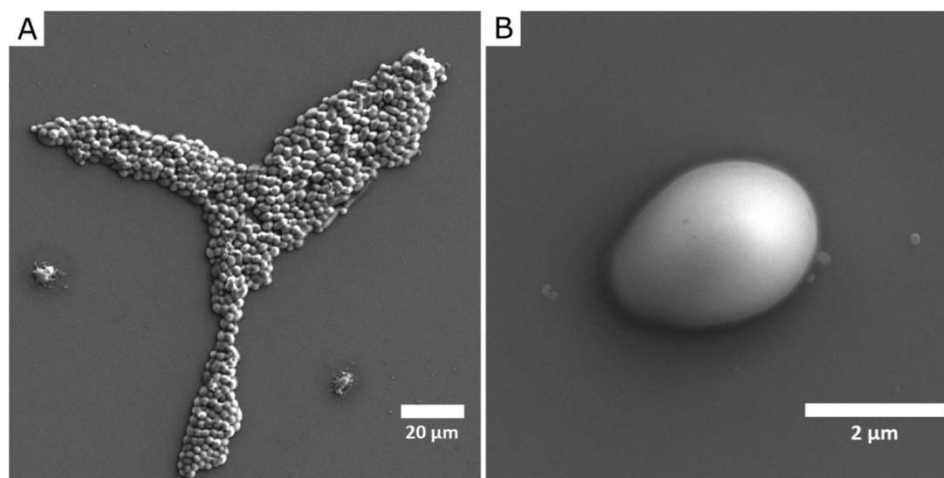
Graf. 1: Histogram distribuce velikosti AgNPs [180].



Graf. 2: Fit Gaussova rozdělení distribuce velikosti AgNPs<sup>2</sup>.

### 3.2.2 Vizualizace interakce buňka-AgNPs prostřednictvím SEM

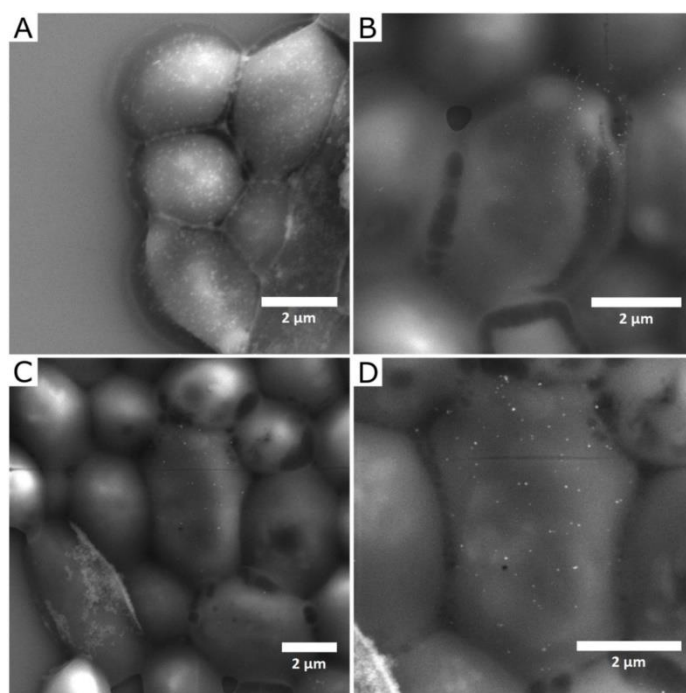
Interakce nanočástic a buněk *Candida albicans* byly vizualizovány pomocí SEM. V této studii byla studována interakce nanočástic s buněčným povrchem *Candida albicans*. Bylo patrné, že po aplikaci monodisperzních i polydisperzních nanočástic došlo k interakci s buněčnou stěnou mikroorganismů ve formě přilnutí nanočástic na buněčný povrch. Buňky *Candida albicans* v kontrolní skupině bez přítomnosti nanočástic vykazovaly typický oválný tvar s hladkými buněčnými stěnami (Obr. 19). Po aplikaci nanočástic je patrné poškození buněčných stěn a těsný kontakt nanočástic s povrchem buněk (Obr. 20, Obr. 21).



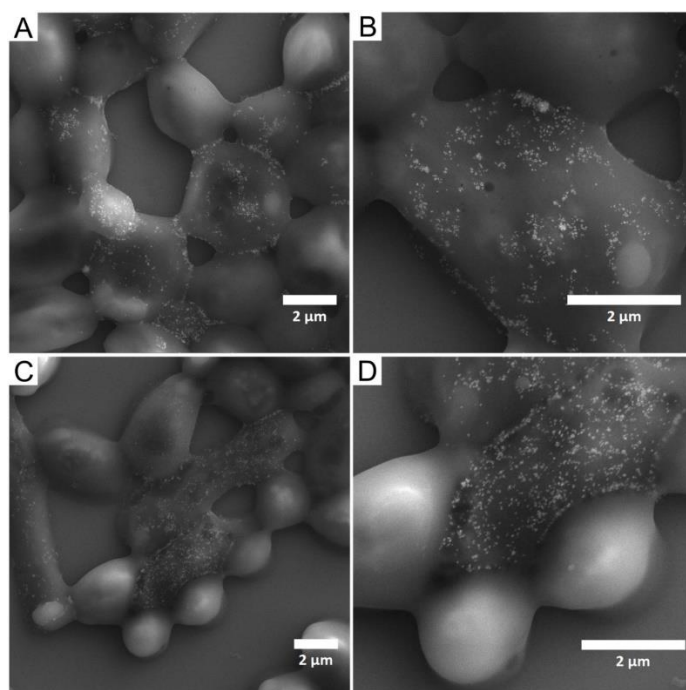
Obr. 19: SEM fotografie planktonních buněk *Candida albicans* (bez AgNPs) [180].

<sup>2</sup> Data byla získána z obrazové analýzy FIJI/ImageJ (Rabočová, M.) a fitována v programu Origin (Lorinčík, J.)

Buňky vlivem přítomnosti monodisperzních stříbrných nanočástic (mAgNPs/e) měly nanočástice přilnuté k buněčnému povrchu (Obr. 20). Struktura buněčné stěny však nebyla tak zásadně ovlivněna jako v případě aplikace monodisperzních stříbrných nanočástic v ultračisté vodě (mAgNPs/w) (Obr. 20) a polydisperzních stříbrných nanočástic (AgNPs) (Obr. 21). Bylo zjištěno, že nanočásticemi ošetřené buňky změnilly charakteristický oválný tvar a došlo k jejich zmenšení. Na snímcích jsou patrné velmi poškozené buňky vlivem nanočástic, ovšem též jsou přítomny buňky bez znatelné degenerace (např. Obr. 20 A). Existuje tedy předpoklad, že po aplikaci stříbrných nanočástic ve vzorku mohly zůstat životaschopné buňky. Z tohoto závěru vyplývá, že účinek působení extrahovaných nanočástic v dané koncentraci je fungistatický.



Obr. 20: SEM fotografie buněk *Candida albicans* s mAgNPs (5 mg/L) (na snímcích A, B jsou mAgNPs/e, na snímcích C, D mAgNPs/w) [180].

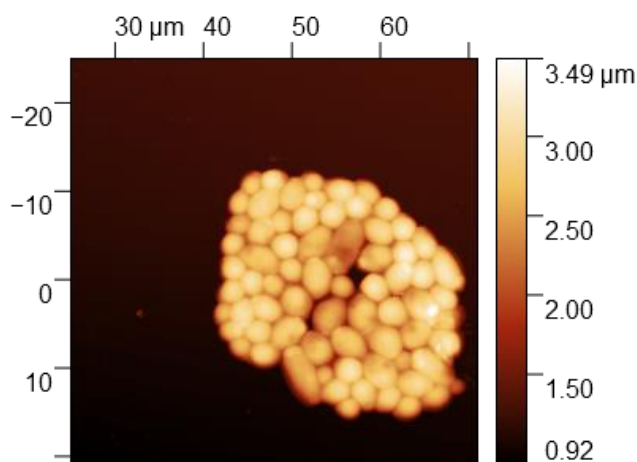


Obr. 21: SEM fotografie buněk *Candida albicans* s pAgNPs (5 mg/L) (na snímcích A, B jsou pAgNPs/e, na snímcích C, D pAgNPs/w) [180].

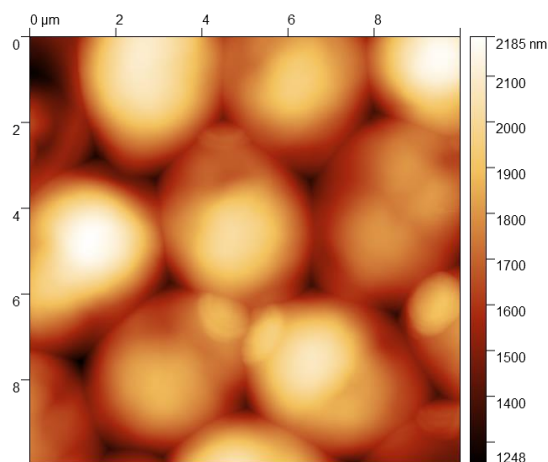
### 3.2.3 Vizualizace buněčného povrchu *Candida albicans* prostřednictvím AFM

Topografie povrchu buněk *Candida albicans* byla provedena prostřednictvím metody mikroskopie atomárních sil. Cílem mikroskopie bylo získání informace, zda jsou stříbrné nanočástice detekovatelné na povrchu buňky tak, jak bylo předpokládáno ze snímků SEM. Ovšem snímky SEM mohou poskytovat i informace z malé hloubky pod povrchem buňky, a tak bylo třeba metodou AFM předpoklad potvrdit.

Buňky bez přítomnosti nanočástic vykazovaly typický oválný tvar s hladkým povrchem (Obr. 22, Obr. 23), jako tomu bylo v případě snímků ze SEM (Obr. 19).

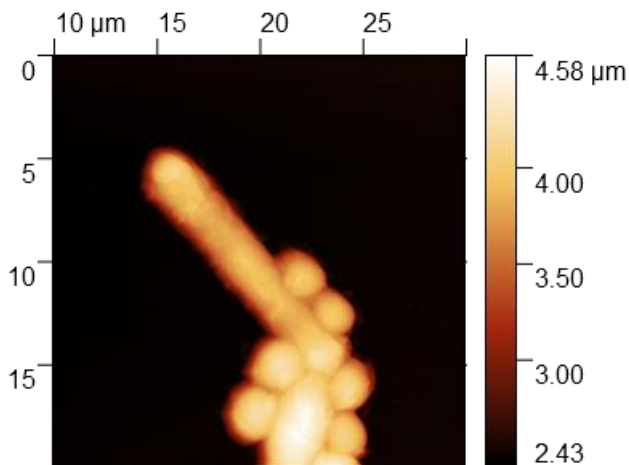


Obr. 22: AFM snímek *C. albicans* bez AgNPs.



Obr. 23: AFM snímek *C. albicans* bez AgNPs.

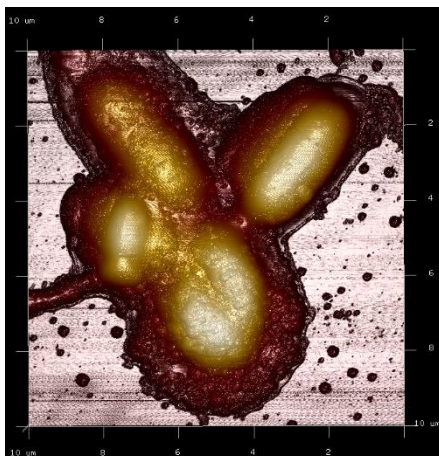
Poté byly prostřednictvím AFM zobrazeny buňky po aplikaci AgNPs. Na Obr. 24 jsou patrné buňky *C. albicans* přilehlé k podlouhlé hyfě, na které jsou patrné stříbrné nanočástice. Snímek téhož uskupení buněk byl pořízen i ve optickém mikroskopu Nikon LV100ND (Obr. 25). Dále byl pořízen AFM snímek buněk *C. albicans* s AgNPs (Obr. 28), přičemž ze stejného místa byl získán snímek ze SEM (Obr. 29). Na obou snímcích jsou patrné nanočástice přisedlé k povrchu buněk, což podporuje předpoklad, že nanočástice jsou přilnuty k buněčnému povrchu. Snímky jsou doplněny o 3D topologii povrchu buněk, která je získána na základě reálných naměřených dat z AFM (Obr. 26, Obr. 27).



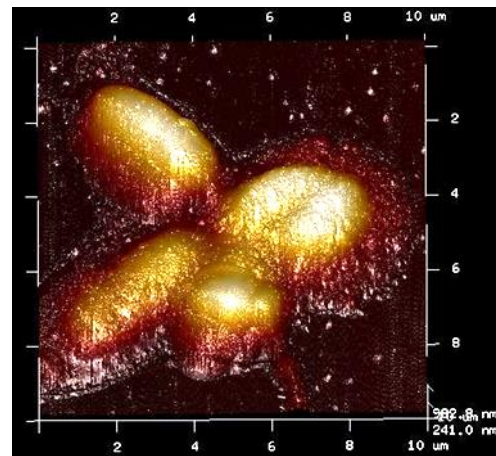
Obr. 24: AFM snímek *C. albicans* a hyfy s AgNPs.



Obr. 25: Snímek z optického mikroskopu *C. albicans* a hyfy s AgNPs.



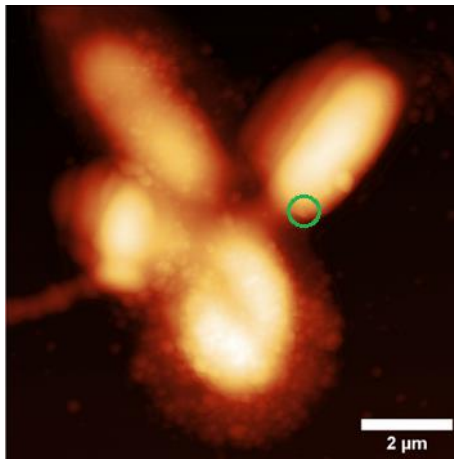
Obr. 26: 3D AFM snímek topologie *C. albicans* s AgNPs – pohled shora.



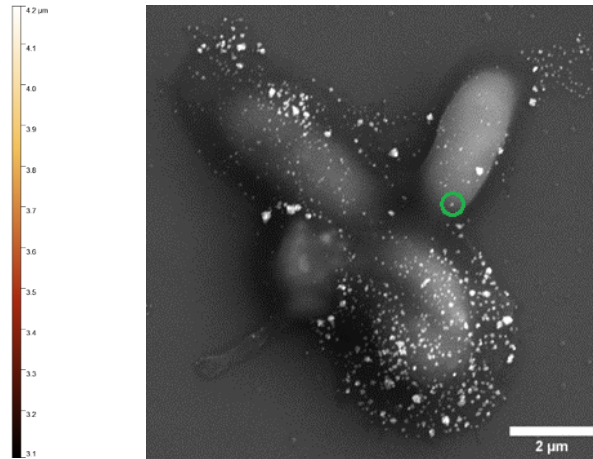
Obr. 27: 3D AFM snímek topologie *C. albicans* s AgNPs – pohled zleva.

Korelací snímků Obr. 28 a Obr. 29 byla zvolena identická nanočástice na obou snímcích za účelem stanovení výšky nanočástice v datech z AFM a prokázání výskytu AgNPs na povrchu buněčné stěny *Candida albicans*. Na základě analýzy obrazu snímku Obr. 28 byla stanoven profil intenzity pixelů ve stupních šedi (Graf. 3). Vzhledem k přilnutí nanočástice k šikmému povrchu, tj. oblému povrchu buňky, bylo třeba provést korekci dat vzhledem k šikmému

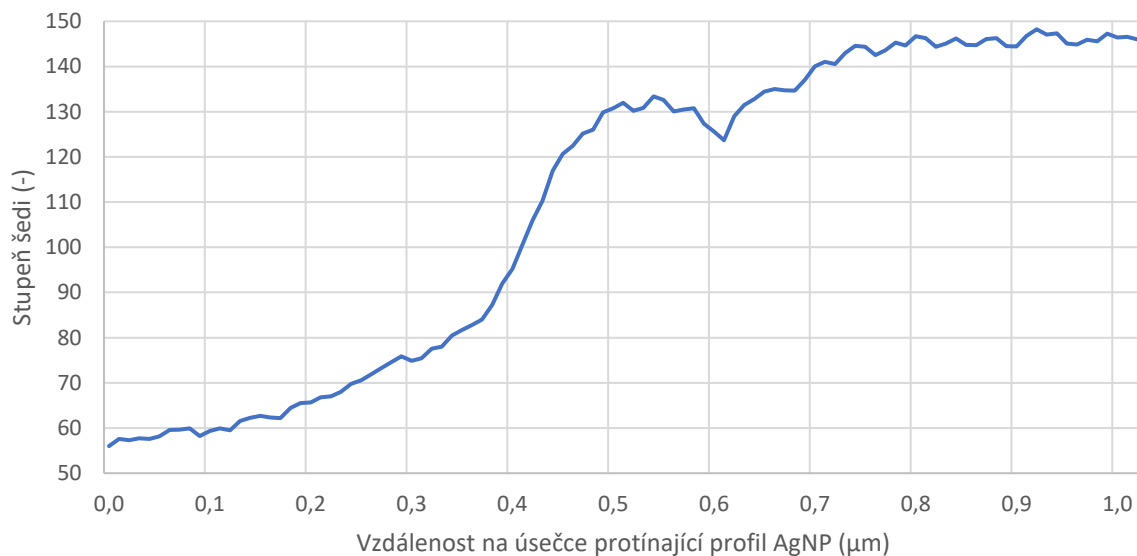
náklonu (Obr. 30). Získaná data byla vynesena do Graf. 4, na jehož základě porovnáním s kalibrovanou intenzitní škálou stupňů šedi (napravo od Obr. 16 a Obr. 28) byla zjištěna průměrná výška nanočástice  $0,12 \pm 0,002 \mu\text{m}$ . Jde o jednoznačný důkaz, že se nanočástice stříbra vyskytují na povrchu *Candida albicans*.



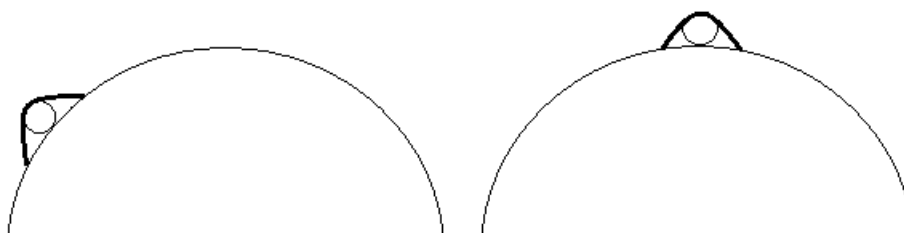
Obr. 28: AFM snímek *C. albicans* s AgNPs a vyznačenou analyzovanou AgNP.



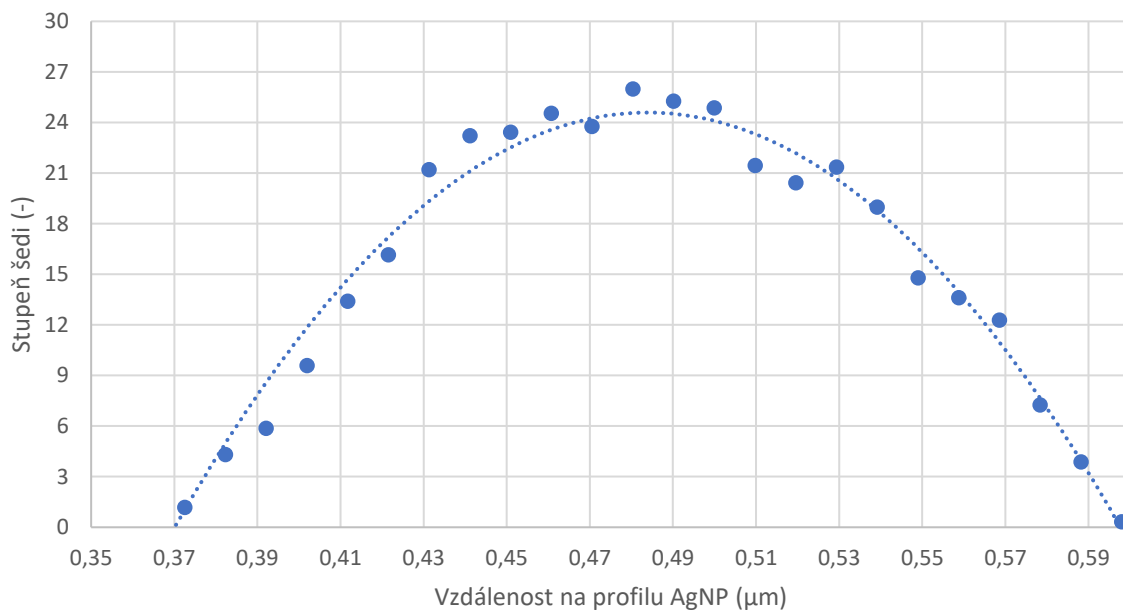
Obr. 29: SEM snímek *C. albicans* s AgNPs a vyznačenou analyzovanou AgNP.



Graf. 3: Profil intenzit pixelů úsečky protínající nanočástici (viz Obr. 16).

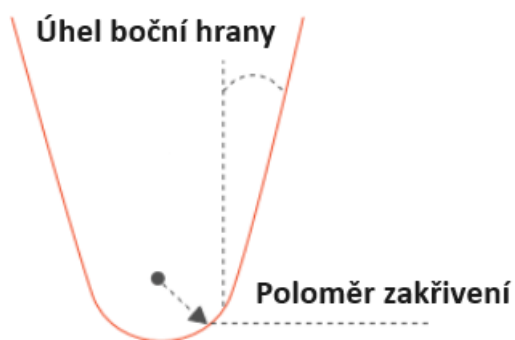


Obr. 30: Demonstrace tvaru intenzitní křivky pro NP umístěnou na šikmé ploše buněčné stěny (viz. porovnání s Graf. 3) vs. na vrcholu buňky.

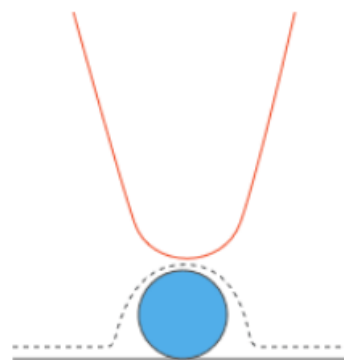


Graf. 4: Profil intenzity profilu nanočástice s proložením polynomicou křivkou.

Porovnáním AFM a SEM snímků vyplývá, že částice zobrazená v AFM má přibližně dvojnásobný průměr oproti SEM. Zatímco v AFM je její průměr  $\sim 0,2 \mu\text{m}$ , v SEM je zobrazena o průměru  $\sim 0,1 \mu\text{m}$ . Značný význam na výsledek zobrazení v AFM má vliv geometrie hrotu. Snímky jsou výsledkem konvoluce hrotu AFM a povrchu. Čím menší jsou rysy povrchu ve srovnání s rozměry hrotu AFM, tím méně přesný je výsledný snímek vzorku. Dva nejvýznamnější faktory ovlivňující kvalitu snímků jsou poloměr zakřivení hrotu a úhly bočních hran hrotu (Obr. 31). Poloměr hrotu má vliv na výsledné rozlišení snímku, zatímco úhly bočních hran mají dopad na zobrazení ostrých a strmých přechodů na povrchu vzorku. Přechody mezi povrchem buňky a značně vyšší nanočásticí se tak mohou jevit v důsledku skenování jako bočně rozšířené (Obr. 32). Čím širší je AFM hrot, tím je tento efekt výraznější [186]. Použitý hrot TESPA-V2-SS (Bruker) disponuje vysoce kvalitním obdélníkovým hrotem z leptaného křemíku určeným pro tapping mode a další nekontaktní módy AFM. Nominální poloměr zakřivení hrotu je 2 nm, maximální 5 nm, čelní úhel hrotu je  $25,0^\circ$ , zadní úhel  $17,5^\circ$  a boční úhel  $20,0^\circ$  [187].



Obr. 31: Nejdůležitější parametry hrotu AFM (upraveno z [187]).



Obr. 32: Vliv hrotu na zobrazení AFM [187].

Dalším faktorem, který rozdílné zobrazení AgNP může ovlivnit je přítomnost organických látek, v nichž jsou biosyntetizované nanočástice obaleny a společně s nimi přilnuty k povrchu buňky. Hrot pak detekuje AgNP včetně její organické obálky, což vede ke zdánlivému zvětšení velikosti nanočástice. V zobrazení SEM pak tato vrstva nemusí být patrná, neboť ji elektronový svazek prostoupí, aniž by byla na snímku viditelná.



## II. Aplikace pokročilých mikroskopických metod na identifikaci morfologických změn buněčných povrchů vybraných mikromycetných spor a jejich biofilmů vlivem působení nízkoteplotního plazmatu

### 4 Přehled současného stavu řešení problematiky vlivu nízkoteplotního plazmatu v mikrobiologii

#### 4.1 Nízkoteplotní plazma pro abiotické aplikace

Netermální plazma (NTP) vykazuje velmi slibné výsledky při abiotickém působení na mikroorganismy [188] [189]. V současné době je tato metoda rozvíjena pro živé buňky a tkáně a představuje inovativní prostředek v medicíně pro aplikace v rámci hojení ran, sterilizace, srážlivosti krve nebo léčby rakoviny [190] [191]. Klinickými studiemi bylo zjištěno, že nízká dávka NTP indukuje proliferaci buněk, zatímco vysoká dávka způsobuje apoptózu [190]. Jedná se o ionizovaný plyn obsahující nabitě částice ve formě kladných a záporných iontů, elektronů, volných radikálů, fotonů a neutrálních molekul plynu [192] o nízké teplotě, který vzniká působením elektrického pole, přičemž volné ionty reagují s ozařovaným materiálem a oxidují jej. Například po interakci s molekulárním kyslíkem  $O_2$  dochází ke vzniku ozonu  $O_3$ , který se projevuje jako silný oxidant [193]. Vliv NTP má negativní degenerativní účinky jak na vegetativní buňky, tak i bakteriální endospory a mikromycety vlivem reaktivních forem kyslíku – kyslíkových radikálů a dusíku – dusíkové radikály [194] [192]. Studie prokázaly účinnost NTP při inaktivaci virů, mikroorganismů i biomolekul (např. DNA) [195]. Působení NTP na mikromyceta byl zdokumentován pro některé druhy, jakými jsou *Aspergillus brasiliensis* [196], *A. oryzae* [197], *A. flavus* a *A. parasiticus* [198], *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* a *Solanum lycopersicum* [199], *Nurospora crassa* [200] nebo například mikromyceta uvedená v souhrnné studii [201].

#### 4.2 Úvod do mikromycet použitých ve studii a netermálního plazmatu

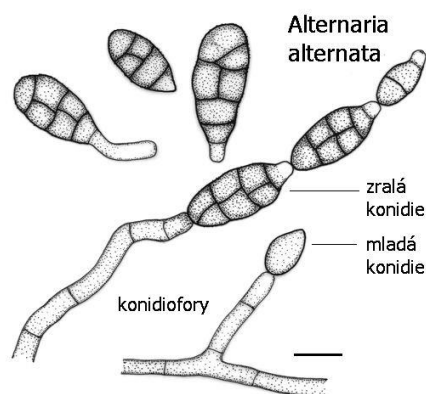
##### 4.2.1 *Alternaria alternata*

*Alternaria* sp. je jedním z nejrozšířenějších rodů na světě, zejména pro svou schopnost růstu na téměř jakémkoliv substrátu [202]. Některé druhy tohoto rodu jsou fytopatogeny a jsou příčinou chorob rostlin, jiné kolonizují dozrávající plodiny jako oportunní saprofyty a působí

kažení plodin po sklizni a při jejich skladování [203]. Další jsou považovány za mykotoxiny a způsobují u lidí i zvířat patologické stavy známé jako mykotoxikózy [203] [204].

Jeden z nejběžnějších druhů patogenů – *Alternaria alternata* – patří do čeledi černě pigmentovaných hub. Díky produkci melaninu může být zbarvena až do olivově zelené či hnědé. Vytváří rychle rostoucí kolonie. Hnědě septované hyfy (Obr. 33) tvoří konidiofory se septy [205]. Spory, tzv. konidie, tvoří obvykle jednoduché nebo větvené řetězky s hladkými nebo verukózními stěnami. Vznikají blastickou ontogenezí jako výrůstky protoplazmy a po odloučení může být patrná jizva [202].

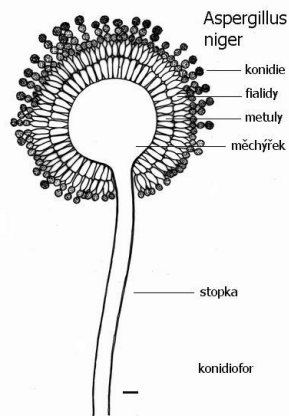
Onemocnění způsobené *A. alternata* se vyskytuje u širokého spektra rostlin včetně ovoce, zeleniny, obilovin a semen [206]. Tento všudypřítomný druh hub je běžnou součástí půdní mikroflory a ovzduší po celém světě [203]. Vzhledem k zemědělským činnostem je v ovzduší přítomen organický prach, který, roznášen větrem, vytváří optimální podmínky pro inhalaci spor [207] a může tím docházet k vyvolání alergické reakce a alergického astmatu [205]. *A. alternata* produkuje celou řadu mykotoxinů jako například alternarioly, které poškozují DNA a chromozomy buněk savců [208], altenuen, tentoxin a kyselinu tenuazonovou [209].



Obr. 33: Nákres *Alternaria alternata* (úsečka na nákresu znázorňuje vzdálenost 10 µm) [210].

#### 4.2.2 *Aspergillus niger*

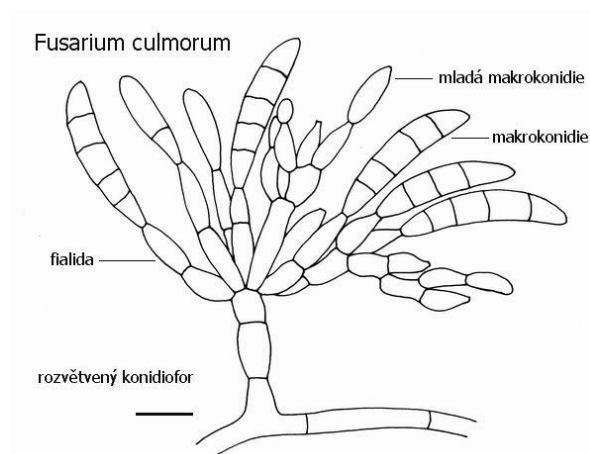
*A. niger* – haploidní vláknitá houba s velkým průmyslovým potenciálem. Ve značné míře se používá díky své schopnosti vylučovat organické kyseliny a proteiny [211] při výrobě kyseliny citronové, při produkci enzymů, jako jsou například amylázy, pektinázy a proteázy [212] či nakládání s odpady a pro biotransformace [213]. Používá se zejména v potravinářském a nápojovém průmyslu, při výrobě čisticích prostředků, léčiv, krmiva pro zvířata a pro čištění kovů. Jako saprotrof se nejčastěji vyskytuje v rozkládající se vegetaci, v půdě nebo rostlinách. Jedná se o jednu z nejrozšířenějších hub [213]. Vytváří vláknité hyfy a hladké konidie a konidiofory ze septovaných a hyalinních hyf [214]. Měchýřek je kulovitý, pokrytý po celém povrchu vrstvou metul a fialid s paprscitou konidiální hlavicí (Obr. 34).



Obr. 34: *Aspergillus niger* (úsečka na nákrese znázorňuje vzdálenost 10  $\mu\text{m}$ ) [210].

#### 4.2.3 *Fusarium culmorum*

Rod *Fusarium* zahrnuje některé z nejvýznamnějších rostlinných patogenů, které mají značný dopad na kvalitu a výnosnost plodin. Produkuje mykotoxiny jako například aflatoxiny, ochratoxin, zearalenon, doxynivalenol a fumonisiny. V závislosti na použité koncentraci mohou některé druhy, obdobně jako u rodu *Aspergillus*, vyvolat nádorové bujení [215], potlačovat imunitu a v případě akutní toxicity i smrt. U hospodářských zvířat pak dochází k útlumu jejich růstu a ke snížení snůšky vajec a produkce mléka [209]. *F. culmorum* je morfoloogicky podobné *F. graminearum*. Stejně jako *F. graminearum*, je známé jako patogen způsobující padlí a hnilobu klasu obilovin, kukuřice [216], ale i rýže [217]. Z hlediska morfologie tvoří *F. culmorum* větvené konidiofory s krátkými fialidy (Obr. 35) a zakřiveně větvenými makrokonidii [210].

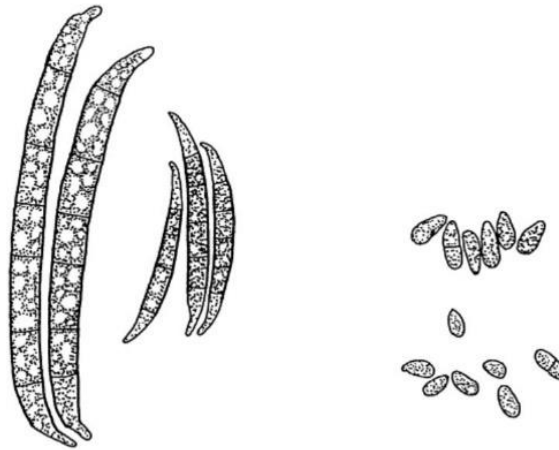


Obr. 35: *Fusarium culmorum* (úsečka na nákrese znázorňuje vzdálenost 10  $\mu\text{m}$ ) [210].

#### 4.2.4 *Fusarium graminearum*

Askomycetní houba *F. graminearum* je významným rostlinným patogenem. Způsobuje fuzariózu pšenice a ječmene [218], padlí obilovin a hnilobu klasů kukuřice [219]. Téměř všechny druhy rodu *Fusarium* jsou schopny produkovat mykotoxiny jako například

fumonisy, zearalenon, doxynivalenol a trichotheceny [220]. *Fusarium* infikuje rostliny prostřednictvím nepohlavních konidií, popřípadě pohlavně vzniklých askospor. Tyto spory se na rostliny přenesou větrem či deštěm a způsobují u plodin infekci [218]. *Fusarium* se vyznačuje také rychle rostoucími koloniemi s plstnatým nebo vločkovitým vzdušným myceliem. Pigmentace je světlá, růžová, vínová nebo modrofialová. Konidie jsou srostlé vícebuněčné (Obr. 36) s příčnými septy [221].



Obr. 36: Makro- a mikrokonidie typická pro rod *Fusarium* [222]. Průměrná délka 4,5-5,0  $\mu\text{m}$  [223].

# 5 SEM mikroskopie biofilmů a spor mikromycet po ozáření nízkoteplotním plazmatem

## 5.1 Metody

Cílem výzkumu bylo zobrazení a analýza morfologických změn vlivem nízkoteplotního plazmatu (NTP) na biofilm mikromycet druhů *A. alternata*, *A. niger*, *F. graminearum* a *F. culmorum* prostřednictvím skenovací elektronové mikroskopie.

Jednotlivé druhy mikromycet, tedy *A. alternata* DBM 4004, *A. niger* DBM 4054, *F. culmorum* DBM 4044 a *F. graminearum* DBM 4344, pocházely ze sbírky kvasinek a průmyslových mikroorganismů Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. V rámci přípravy byly inokulovány na dextrózový agar s délkou kultivace 5 dní při teplotě 26 °C. Následně byly skladovány při teplotě 4 °C. Metodika kultivace, popis generátoru nízkoteplotního plazmatu a způsob ozařování včetně přípravy pro transport na SEM, které byly provedeny VŠCHT, jsou uvedeny v publikacích (224), [225] a [226].

Vzorky biofilmu mikromycet byly fixovány na Si destičky nebo Ti žetony a v dehydrovaném stavu pokoveny v naprašovacím přístroji Leica EM ACE600 Microsystems. Jako naprašovací médium byla zvolena platina kvůli vyšší jemnosti naprašovaných částic ve srovnání se zlatem. Pracovní režim byl nastaven na výkon 80 W, naprašování probíhalo při tlaku  $7 \times 10^{-5}$  mbar v komoře a pracovní vzdálenost nastavena na 150 mm. Spory mikromycet byly pokoveny repetitivním způsobem, ovšem některé vzorky spor byly skenovány v SEM bez pokovení.

Zobrazování prostřednictvím SEM v případě biofilmů mikromycet bylo provedeno elektronovým svazkem při napětí 20 kV, resp. 10 – 15 kV pro spory. Pracovní vzdálenost byla nastavena na 9 mm.

Sekundární elektrony byly snímány detektorem typu Everhard-Thornly. Snímky byly pořízeny při dwell time 32  $\mu$ s/pix s rozlišením 1024x1024 pix.

Výsledky výzkumu byly publikovány v publikacích [225], [226], (224).

## 5.2 Dílčí výsledky a diskuse

### 5.2.1 Dílčí výsledky SEM zobrazování biofilmů

Pro hodnocení vlivu NTP na biofilmy mikromycet byly pořízeny snímky kontrolních vzorků před ošetřením biofilmů NTP ve srovnání se vzorky ošetřenými NTP. Byly pořízeny snímky se zaměřením na morfologii biofilmu a jednotlivých vláken hyf za účelem zobrazení předpokládaných strukturních změn vlivem působení NTP.

Ve všech případech kontrolních vzorků biofilmů byly pozorovány hutné spletené struktury biofilmu s hustým nárůstem mycelia a hladkými buněčnými stěnami hyf se značným

množstvím exopolysacharidových struktur (EPS): *A. alternata* - Obr. 37, *A. niger* - Obr. 39, *F. culmorum* - Obr. 41 a *F. graminearum* - Obr. 43.

Ošetření NTP u *A. alternata* ovlivnilo celkový růst biofilmu, který vykazoval výrazně řidší nárůst. U hyf bylo pozorováno ztenčení jejich průměru a v některých částech bobtnání a bulkovatění buněčných stěn (Obr. 38), zároveň došlo k masivní redukci tvorby EPS.

U *A. niger* po ošetření NTP došlo k redukci množství nárůstu biofilmu a místy k poškození vazeb hyf a jejich strukturálním změnám (Obr. 40).

Biofilm *F. culmorum* opět po aplikaci NTP vykazoval snížený nárůst mycelia. Hyfy byly viditelně poškozené, působily dehydrovaně a lokálně byl vytlačen cytoplazmatický obsah (Obr. 42).

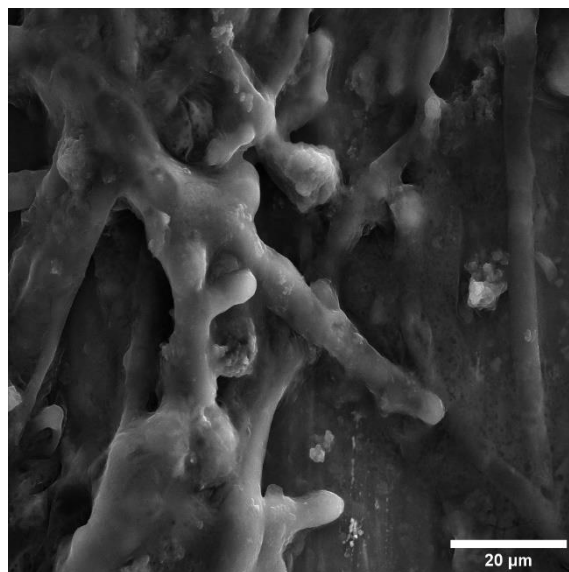
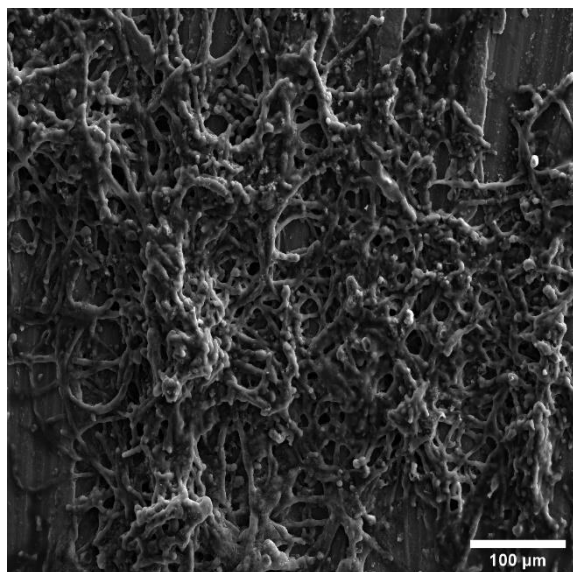
Nejvýraznější snížení nárůstu biofilmu po ošetření NTP bylo pozorováno *F. graminearum*. Hyfy byly abnormálně zkolabovány, pokrouceny a poškozeny a jejich buněčné stěny vykazovaly deformity (Obr. 44).

Na základě rešerše dostupné literatury jsou podrobné informace o principu působení NTP na biofilmy mikromycet druhů *A. alternata*, *A. niger*, *F. culmorum* a *F. graminearum* nedostatečné. Ačkoliv je výzkum v tomto ohledu stále rozvíjen, stále chybí komplexní poznání o působení NTP na co nejširší rozsah mikromycet. Neboť mikrobiální inaktivace a její mechanismy závisí nejen na parametrech NTP, ale zásadní vliv má druh a vlastnosti ošetřovaných mikroorganismů a faktory prostředí. Přehledová databáze týkající se vlivu NTP na různé druhy mikromycet včetně údajů o nastavení NTP, jeho parametrech a intenzitách [46] by velmi pomohla pro rozšíření této metody. Z toho důvodu byly pořízeny snímky kontrolních skupin bez ošetření NTP a skupin po působení NTP za účelem vizualizace jeho vlivu na výše uvedené druhy mikromycet. Byly tak optimalizovány parametry přípravy vzorku pro SEM a také snímání biofilmů i zobrazení mycelií a mikrostruktur hyf v dostatečném rozlišení a měřítku, aby bylo možná komparace snímků.

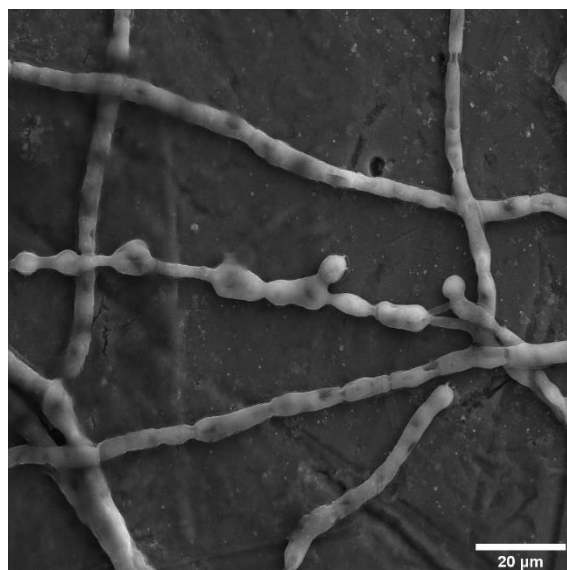
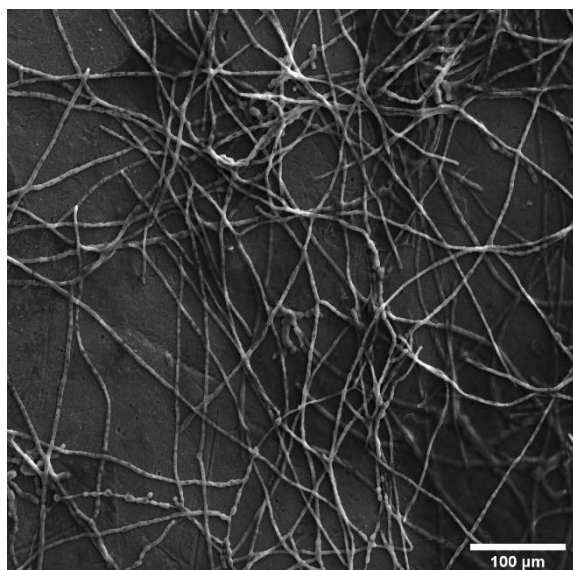
Souhrnně lze říci, že bylo prokázáno poškození buněčných struktur biofilmů uvedených druhů mikromycet vlivem působení NTP. U kontrolních vzorků neošetřených biofilmů tvořily biofilmy hustou, souvislou a soudržnou síť hyf, zatímco u vzorků ošetřených NTP byl zřetelný úbytek nárůstu biofilmu a hyfy byly oddělené, samostatně rozlišitelné a často jevila jednotlivá vlákna znaky poškození buněčného povrchu. NTP bylo prokázáno jako účinná metoda eliminace mikromycetních biofilmů u druhů *A. alternata*, *A. niger*, *F. culmorum* a *F. graminearum*.

Podrobnější diskuse nad vlivem NTP z biologického hlediska, úvaha nad povahou působení NTP a nastavení NTP jsou uvedeny v publikacích [225] a (224) včetně experimentů změny v metabolické aktivitě vláknitých hub, a tedy úspěšnosti NTP provedených kolegy z Ústavu biotechnologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze vedené paní doc. Ing. Irenou Jarošovou Kolouchovou, Ph.D. a paní Ing. Markétou Kulišovou.

***Alternaria alternata***



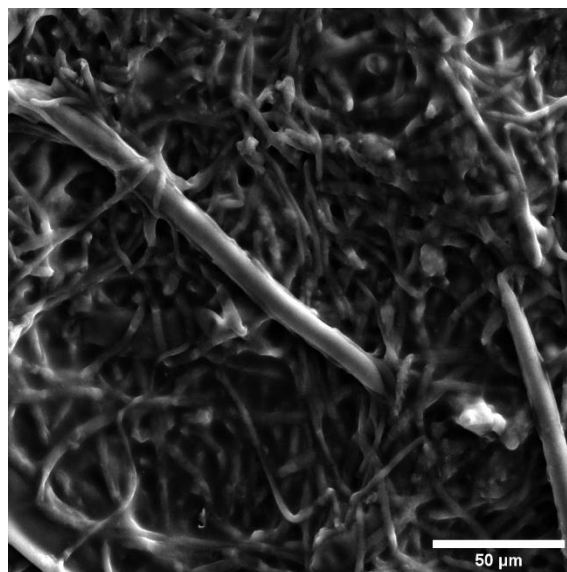
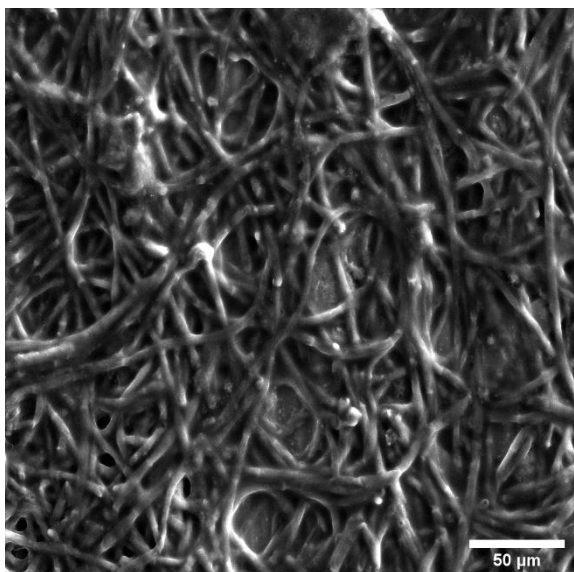
Obr. 37: Biofilm *A. alternata* před ošetřením NTP na substrátu Ti žetonu<sup>3</sup>.



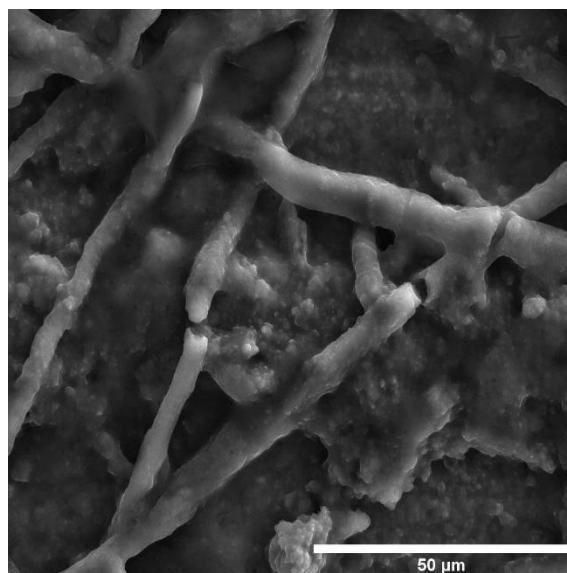
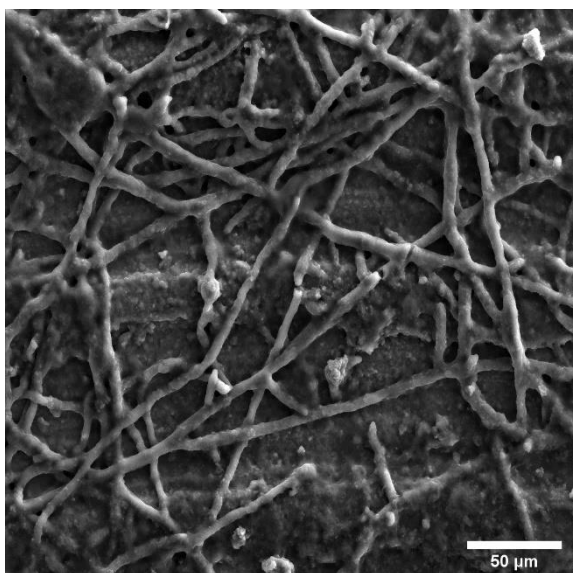
Obr. 38: Biofilm *A. alternata* po ošetření NTP na substrátu Si destičky [225].

<sup>3</sup> Povrch Ti žetonu je zvlňný, což způsobuje zdánlivé uspořádání biofilmů do vertikálních proužků.

**Aspergillus niger**



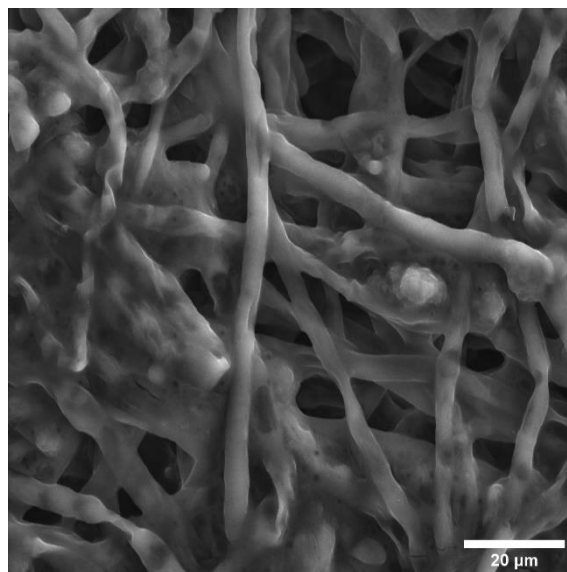
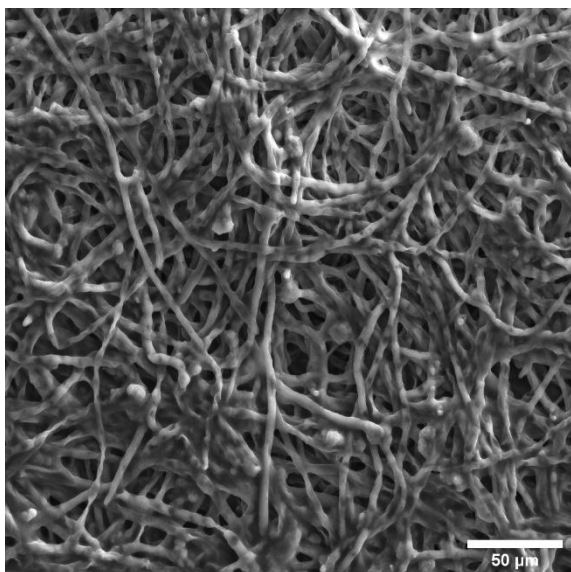
*Obr. 39: Biofilm A. niger před ošetřením NTP na substrátu Si destičky (224).*



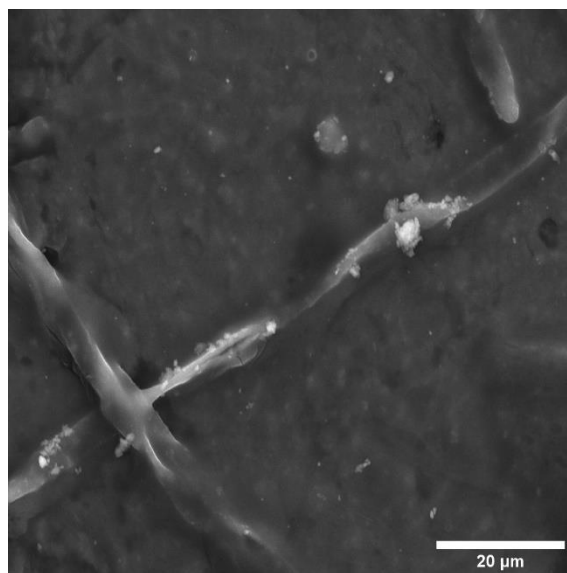
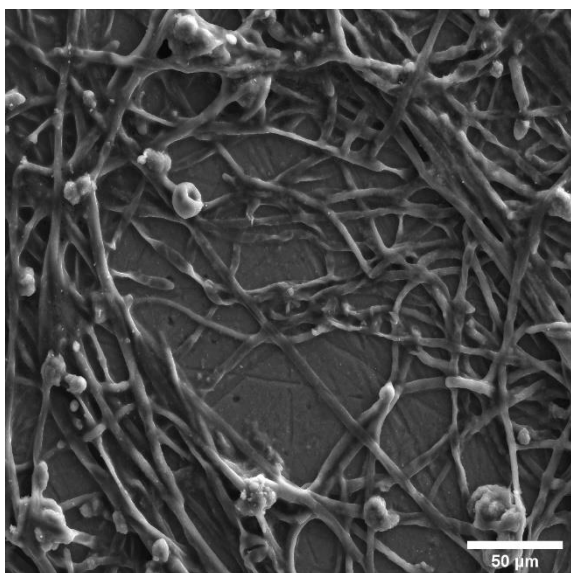
*Obr. 40: Biofilm A. niger po ošetření NTP na substrátu Ti žetonu [225].*



***Fusarium culmorum***

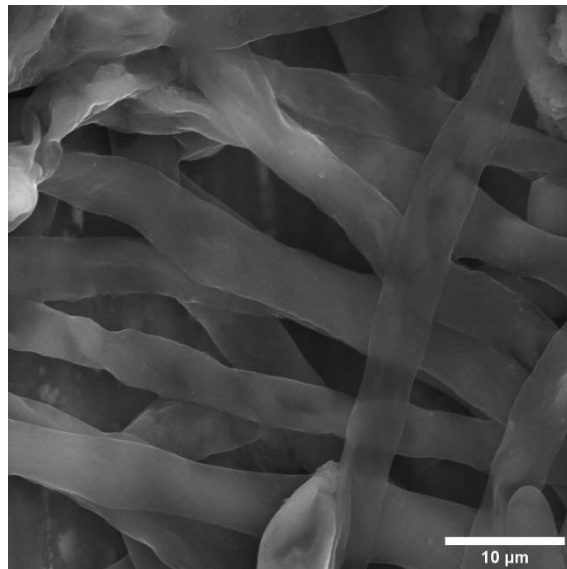
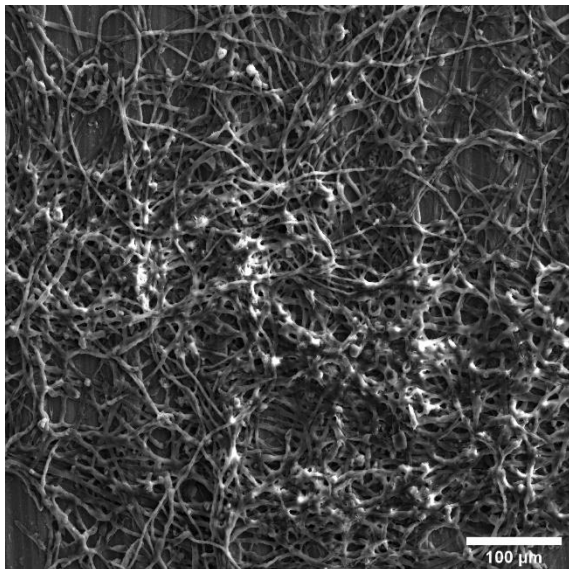


Obr. 41: Biofilm *F. culmorum* před ošetřením NTP na substrátu Si destičky (224).

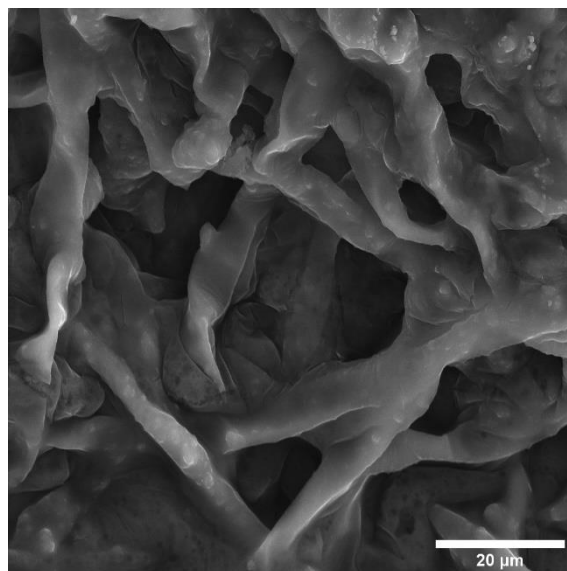
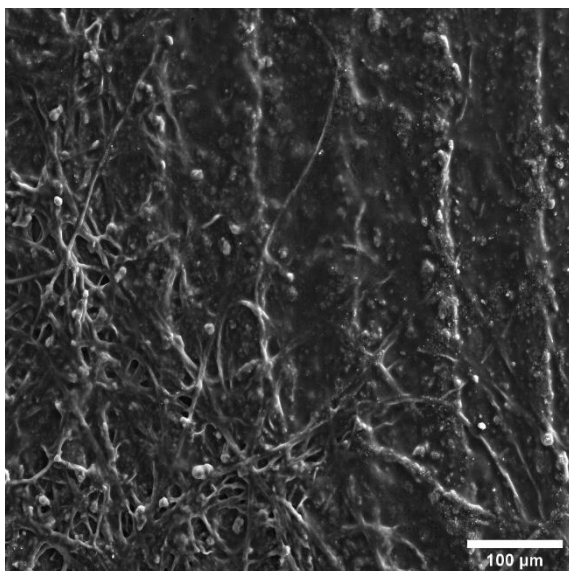


Obr. 42: Biofilm *F. culmorum* po ošetření NTP na substrátu Si destičky (224) [225].

***Fusarium graminearum***



Obr. 43: Biofilm *F. graminearum* před ošetřením NTP na substrátu Ti žetonu [225].



Obr. 44: Biofilm *F. graminearum* po ošetření NTP na substrátu Ti žetonu [225].

### 5.2.2 Dílčí výsledky SEM spor mikromycet

V kontrolní skupině *A. alternata* před ošetřením NTP lze pozorovat, že spory jsou hladké, vejčitého nebo oválného tvaru se zřetelnými oblinami identifikujícími jednotlivá septa. Mohou být přímé či zakřivené, většinou podlouhlé, o délce 15 – 30  $\mu\text{m}$  a šířce 10- 15  $\mu\text{m}$ . Spory měly variabilní množství příčných sept, většinou v rozmezí 1 – 5. Na konci spor mohou být patrné jizvy. Snímky z kontrolní skupiny jsou uvedeny na Obr. 45 a Obr. 46. Po ošetření NTP byla patrná poškození buněčných stěn spor, jejich zhroucení a místy i viditelné propady stěn do prostor mezi septy. Povrch byl sraštělý a místy nekompaktní, viz Obr. 47 a Obr. 48.

V případě *A. niger* byly v kontrolní skupině pozorovány spory kulatého tvaru o průměru 2 – 4  $\mu\text{m}$  s jasně patrnými bodlinovitými výčnělky (Obr. 49). Aplikací NTP došlo k poškození struktury buněčné stěny, v některých případech došlo k jejímu kolapsu dovnitř spory. U neošetřených spor patrné výčnělky byly redukovány či vymizely úplně, viz Obr. 50.

*F. culmorum* před NTP vykazovalo podlouhlý válcovitý tvar s hladkým povrchem stěn a výrazným septováním (Obr. 51). Ošetřením NTP došlo k poškození stěn spor a místy jejich propadu do vnitřku sept. Stěny byly zvrásněné a rýhovitě.

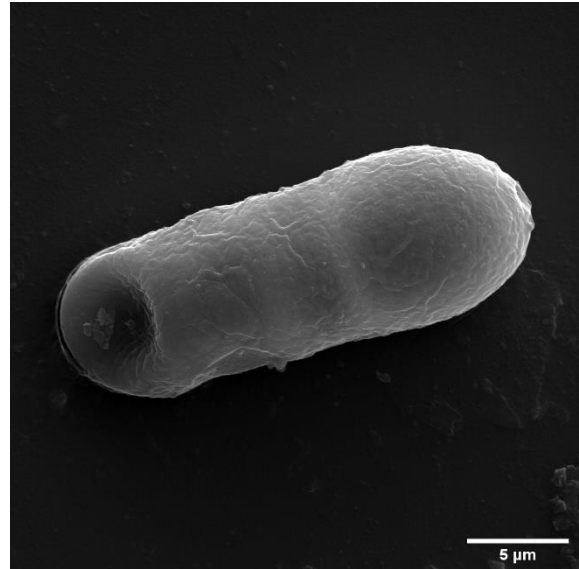
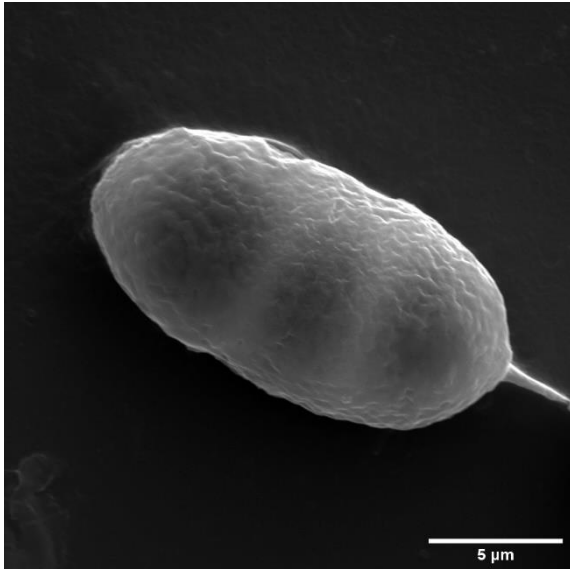
Spory *F. graminearum* před ošetřením NTP byly podobné *F. culmorum*. Oválný tvar spor s hladkými stěnami doplňovaly zřetelné přehrádky sept (Obr. 53). Vlivem NTP byla pozorována narušení buněčné stěny spor a její zvrásnění. Spory byly místy zkolabované do prostoru mezi přepážkami (Obr. 54).

Pro studii vlivu NTP na spory mikromycet druhů *A. alternata*, *A. niger*, *F. culmorum* a *F. graminearum* a informaci o morfologických změnách bylo provedeno snímkování prostřednictvím SEM. Za tímto účelem byla optimalizována metodika zobrazování spor, aby bylo možné porovnat snímky z neošetřené skupiny a po vlivu NTP a ve velmi detailním přiblížení detekovat strukturní změny tímto působením dotčené.

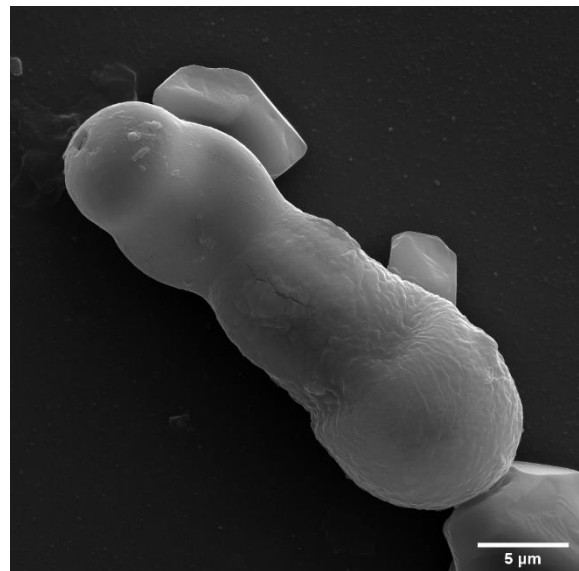
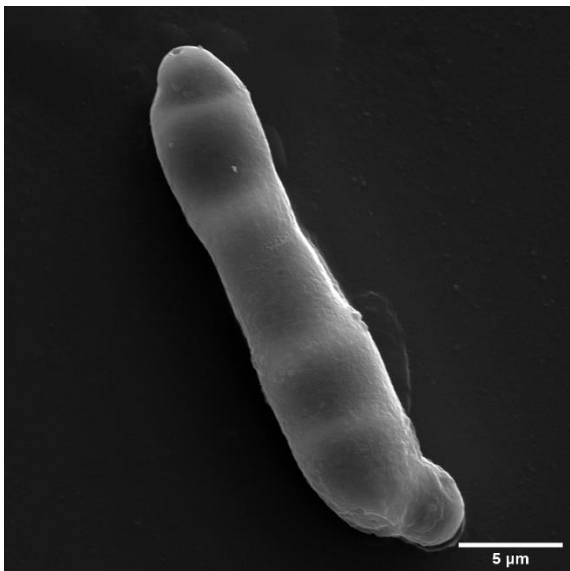
Souhrnně lze říci, že působením NTP došlo k značné degradaci buněčných povrchů spor testovaných mikromycet. Zatímco spory kontrolních skupin bez ošetření vykazovaly očekávaný soudržný tvar, u spor po ošetření NTP byly pozorovány strukturní změny, a to zejména narušení buněčných stěn a místy došlo ke kolapsu stěny do prostoru mezi septy. NTP narušilo celistvost buněčných stěn, a tedy došlo k porušení její ochranné funkce. Výsledky prokazují úspěšnost vlivu NTP při inaktivaci spor mikromycet druhů *A. alternata*, *A. niger*, *F. culmorum* a *F. graminearum*.

Bližší informace o biologických účincích působení NTP jsou objasněny v publikacích [225] a [226] se spoluautory z Ústavu biotechnologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze vedené paní doc. Ing. Irenou Jarošovou Kolouchovou, Ph.D. a paní Ing. Markétou Kulišovou.

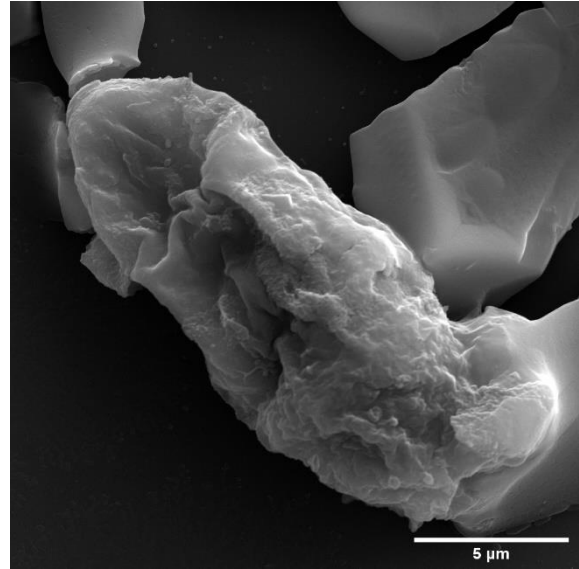
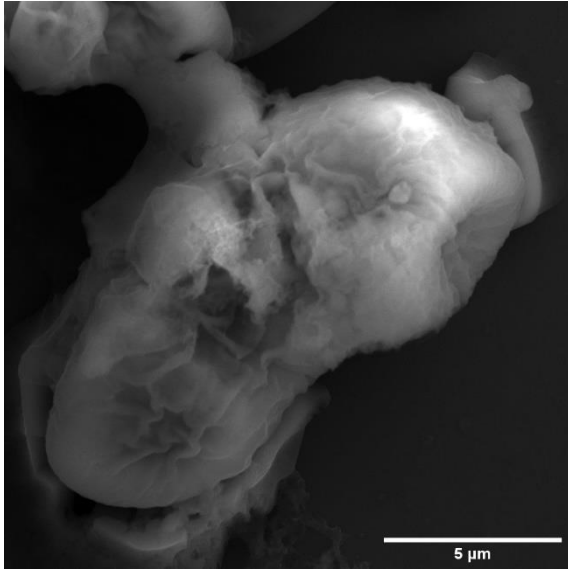
***Alternaria alternata***



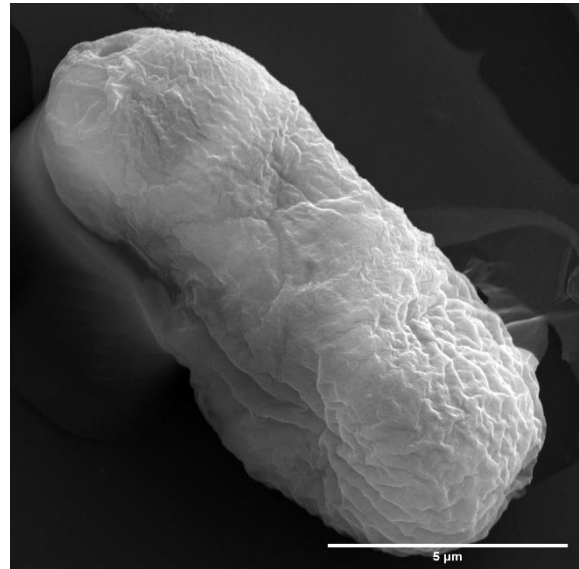
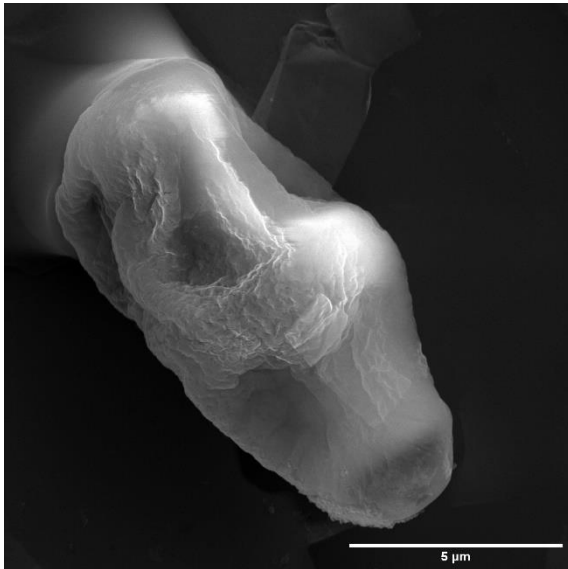
*Obr. 45: Spory A. alternata před ošetřením NTP.*



*Obr. 46: Spory A. alternata před ošetřením NTP [225] [226].*

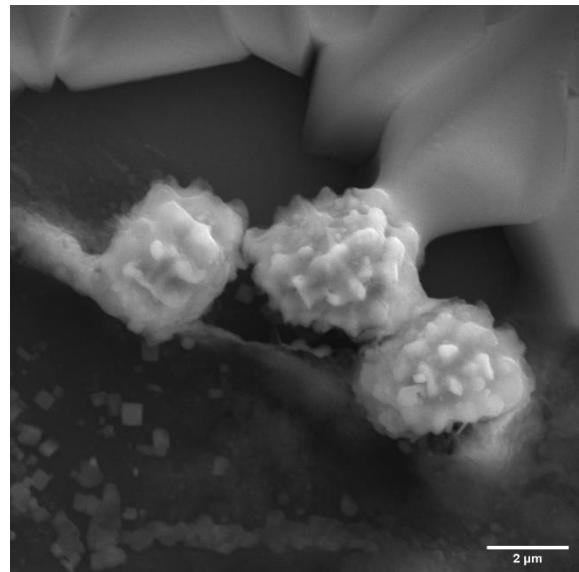
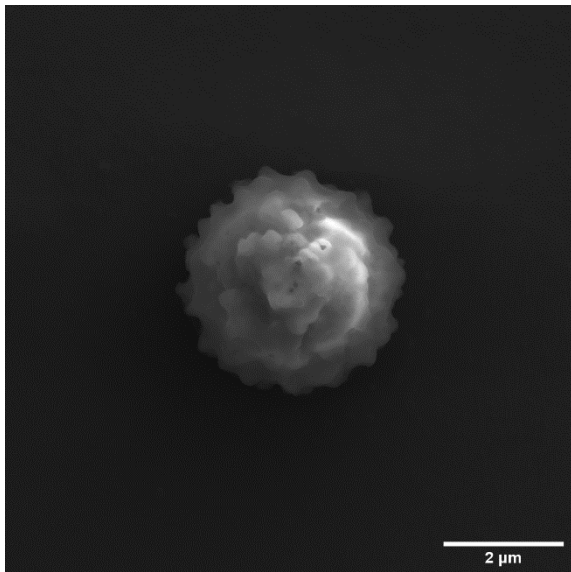


Obr. 47: Spory *A. alternata* po ošetření NTP [225], [226].

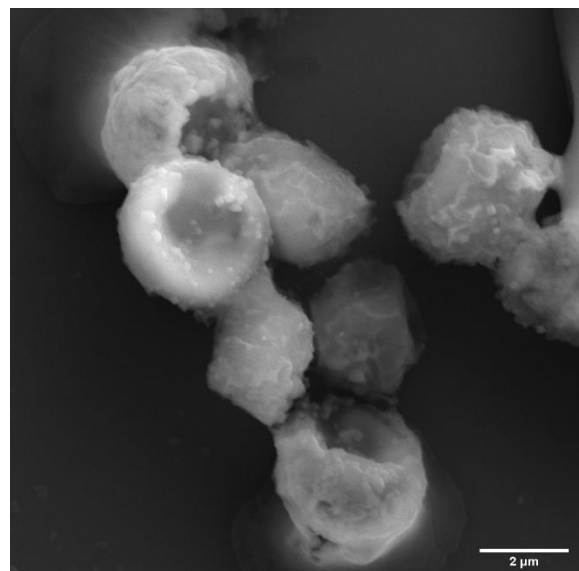
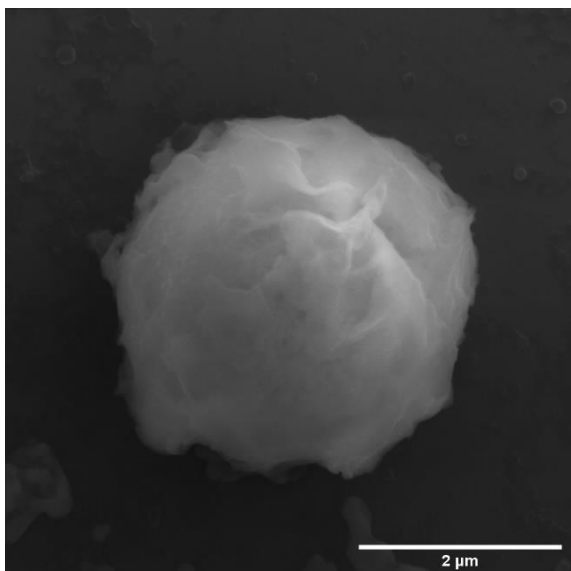


Obr. 48: Spory *A. alternata* po ošetření NTP.

**Aspergillus niger**

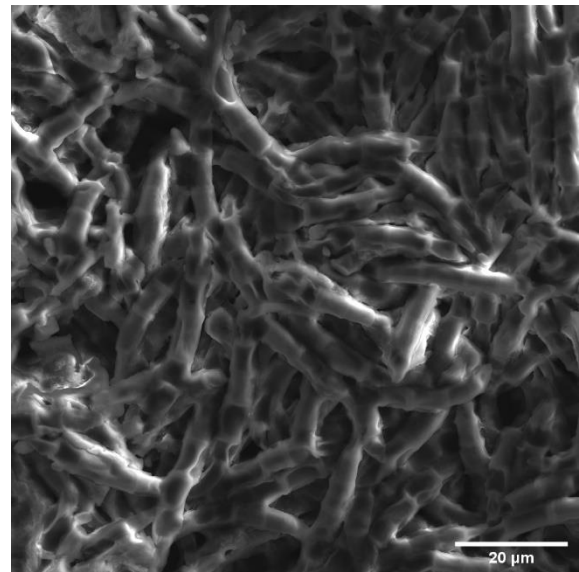
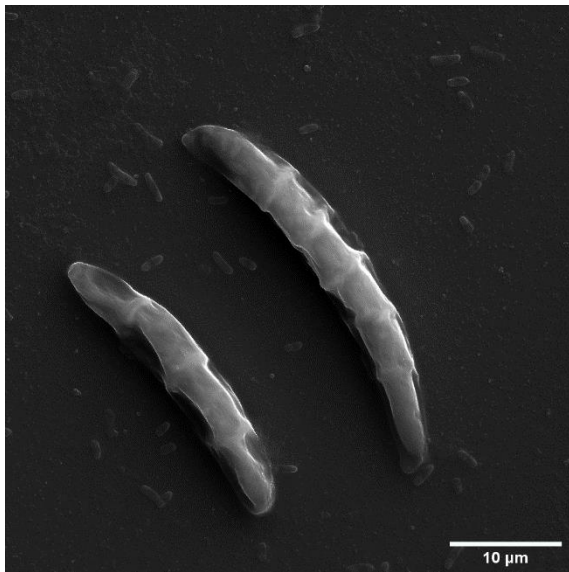


*Obr. 49: Spory A. Niger před ošetřením NTP.*

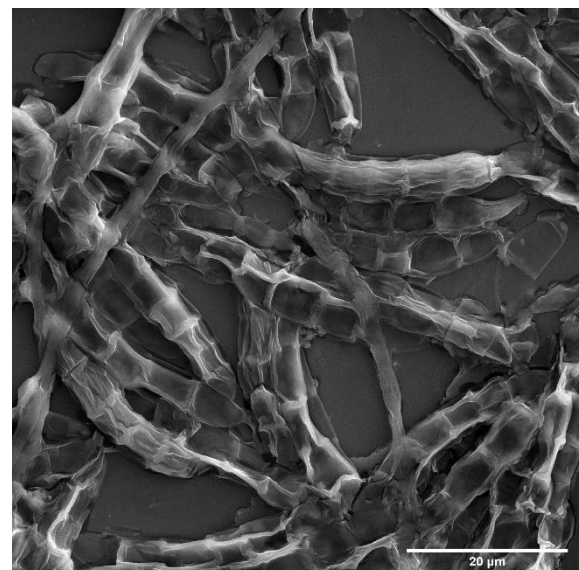
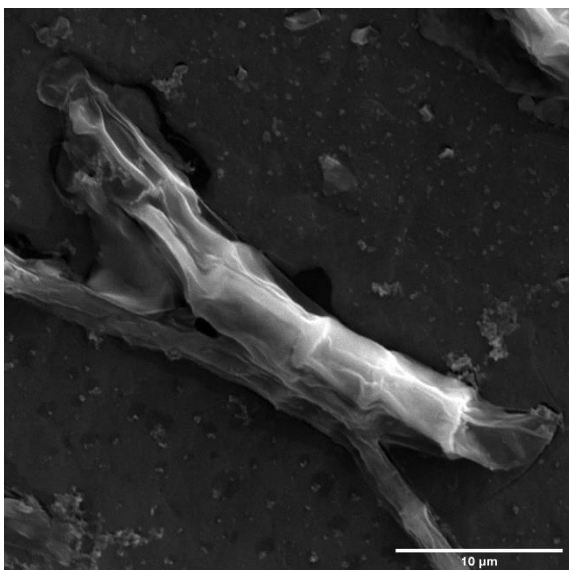


*Obr. 50: Spory A. Niger po ošetření NTP.*

**Fusarium culmorum**

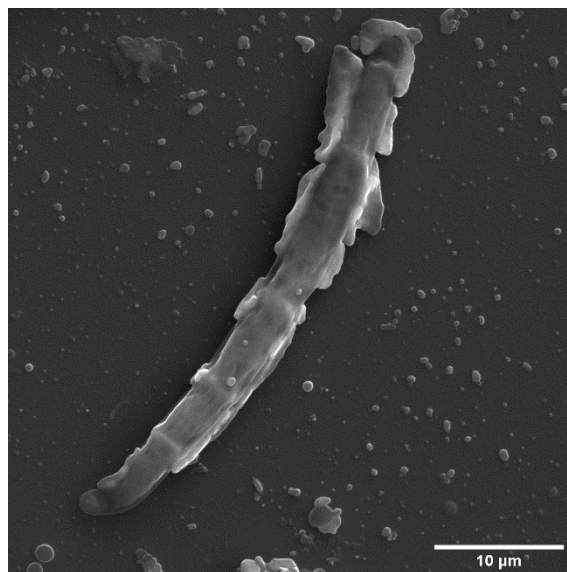
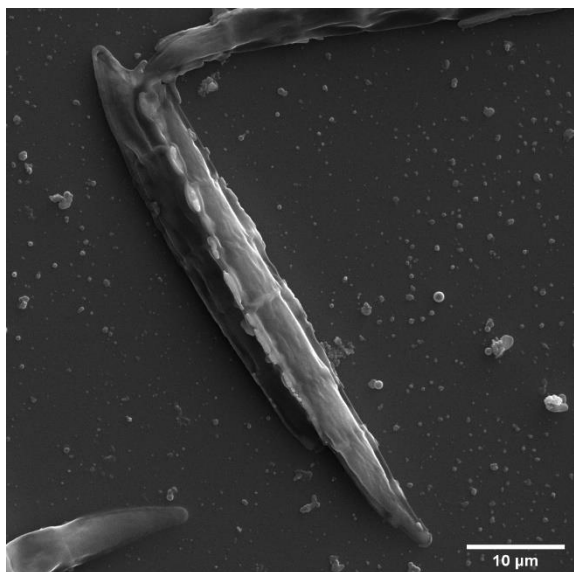


*Obr. 51: Spora F. culmorum před ošetřením NTP.*

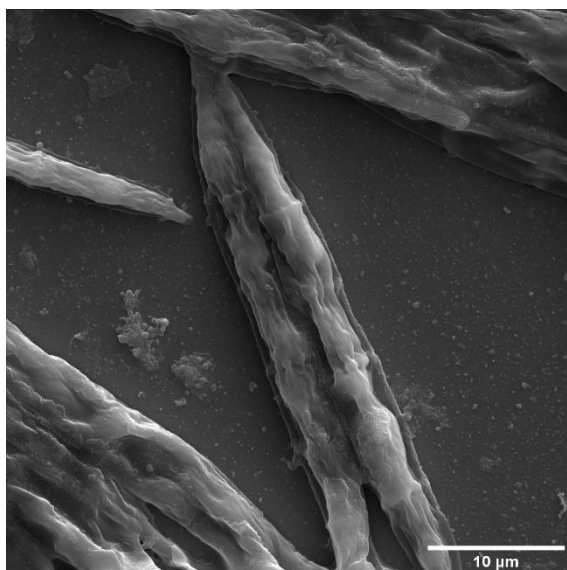
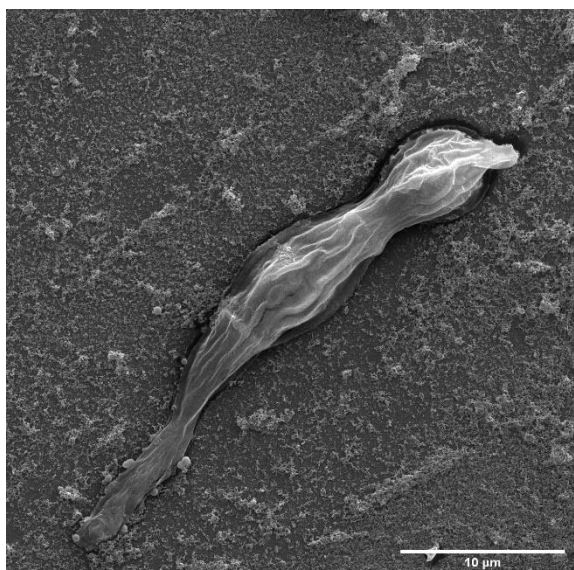


*Obr. 52: Spora F. culmorum po ošetření NTP.*

### *Fusarium graminearum*



Obr. 53: Spora *F. graminearum* před ošetřením NTP.



Obr. 54: Spora *F. graminearum* po ošetření NTP [226].

### 5.2.3 Vliv pokovení na biologické vzorky

Pro získání kvalitního snímku je u některých vzorků vhodné provést jeho pokovení. Vytvořením vodivé vrstvy na povrchu vzorku minimalizuje jeho nabíjení při skenování, snižuje poškození povrchu vlivem tepla vznikajícího dopadajícími primárními elektrony na povrch, dochází ke zvýšení výtěžnosti detekovaného signálu sekundárních elektronů [227] a může být dosaženo zlepšení poměru signál/šum [228]. Pokovení také může zvýšit kontrast u zobrazovaných vzorků. Kontrast zde souvisí s fyzikálními důsledky rozdílu atomového čísla pozorovaného objektu a atomového čísla kovu pokrývajícího daný objekt v tenké vrstvě. Detekce SE, která byla pro snímkování zvolena, je pak defacto z místa dopadu a velmi malé hloubky, díky čemuž je možné zobrazit zejména topografii vzorku [229].

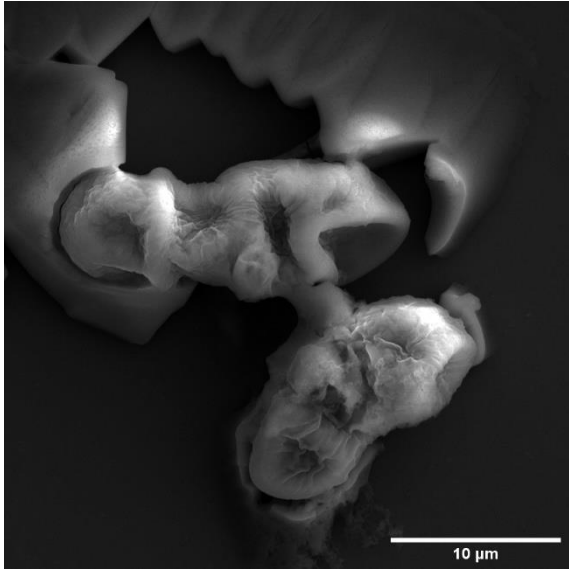


Zobrazování nepokovených biologických vzorků je velmi choulostivá záležitost. V obecném rámci jsou dehydrované biologické vzorky na SEM zobrazování bez pokovení obtížné pro svou citlivost na poškození elektronovým svazkem, nevodivost a nízkou výtěžnost SE [230]. V případě buněčných stěn hrozí při nevhodném nastavení skenovacích parametrů destrukce a tím znehodnocení snímané oblasti. Toto tzv. radiační poškození vznikající ionizací způsobuje porušení chemických vazeb ve vzorku vedoucí k jeho degradaci a je závislé na intenzitě svazku [231]. Kromě příliš vysoké intenzity je nutné brát na zřetel také další faktory, jako například časově náročnou fokusaci nebo příliš dlouhou dobu pořizování snímku. Také může docházet ke kontaminaci vzorku vlivem interakce elektronového svazku s reziduálními plyny v komoře mikroskopu a uhlovodíky na povrchu vzorku, a i přes pokovení je nutné vyhnout se možnému nabíjení vzorku. Pokovením tedy dochází ke zlepšení vodivosti zejména u dehydrovaných vzorků, omezení možného nabíjení, omezení tepelného/radiačního poškození a zlepšení emise SE a BSE [232]. I přes tyto nesporné benefity bylo jedním ze snah této studie zobrazení spor mikromycet v dehydrovaném nepokoveném stavu. Motivací bylo zobrazení buněčné struktury studovaných spor pro aplikace, kde pokovení nemusí být žádoucí. Cílem bylo tak najít optimalizaci skenovacího procesu vůči stabilitě vzorku s důrazem na co nejlepší kvalitu snímku.

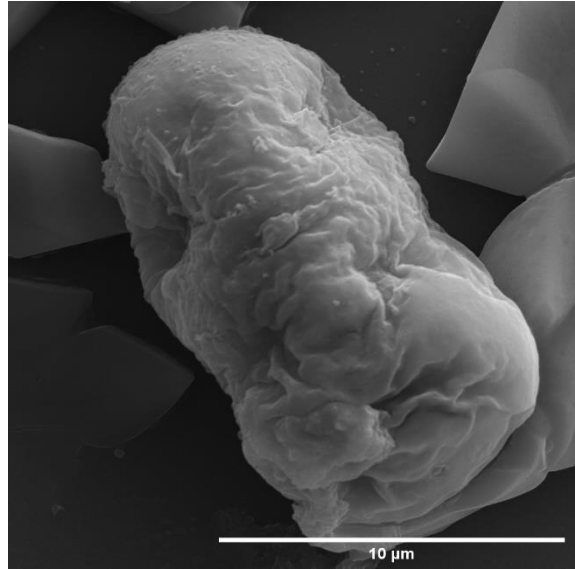
#### 5.2.4 Snímkování nepokovených vs. pokovených spor mikromycet

Zobrazování biologických vzorků pro většinu aplikací vyžaduje vzhledem k citlivosti na radiační poškození nízké hodnoty napětí [233]. Na základě experimentálních dat mikroskopie spor mikroskopických hub, které byly získány v rámci této disertační práce, dochází při vysokých hodnotách napětí k destruktivnímu poškození buněčných struktur a zároveň je pozorování obtížné vzhledem k nedostatečné rychlosti odvodu elektrického náboje z povrchu vzorku, neboť dehydrované buňky mají nízkou nebo téměř žádnou vodivost. Z tohoto důvodu bylo zvoleno napětí 10 - 15 kV jako optimum. Při napětí 3 kV byl detekován nízký kontrast a ostrost zobrazovaných struktur. Při hodnotách vyšších jak 15 kV docházelo k poškození povrchu spor. Doba elektronového setrvání svazku (dwell time) na jednom místě (pixelu) byla o stupeň vyšší na hodnotě 10  $\mu\text{s}/\text{px}$ , aby nedocházelo k poškození vzorku a zároveň byla zachována kvalita obrazu vzhledem k šumu. Navíc finální fokusace a optimalizace elektronového svazku před snímkováním daného objektu byla provedena mimo cílový snímaný objekt, aby objekt nebyl příliš dlouho exponován a namáhán. Velikost stopy svazku (spot size) pak byla 6,9 nm a proud svazku (specimen current) se pohyboval v rozmezí 268 - 387 pA.

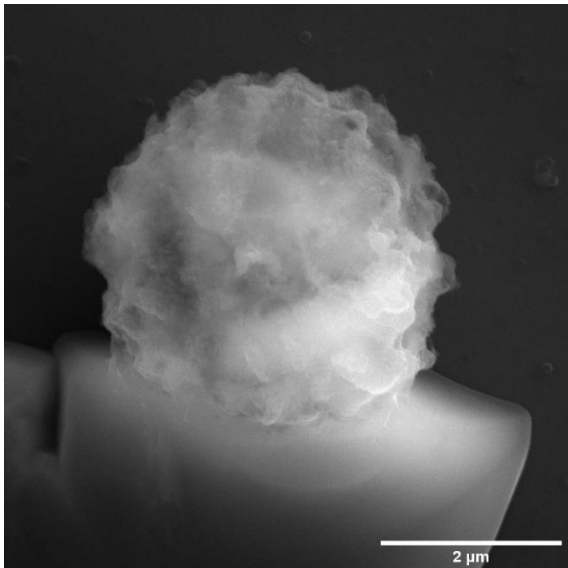
Tímto způsobem bylo nalezeno vhodné přednastavení (preset) pro zobrazení uvedených mikromycetných spor, které jsou odolné vůči poškození vlivem svazku a nabíjení, a je tak možné je zobrazit bez nutnosti pokovení, pokud je to z nějakého důvodu nutné. Je možné dosáhnout dostatečně dobrého zobrazení spor mikromycet. V porovnání s pokovenými vzorky jsou snímky uvedeny na Obr. 55 - Obr. 62. Proto je v případě uvedených spor vhodná její aplikace zejména v případech, kde není pokovení možné či dostupné.



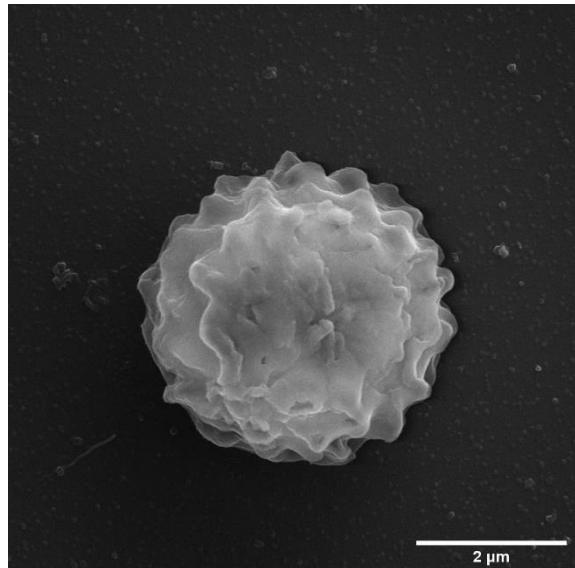
Obr. 55: Spora *A. alternata* bez pokovení.



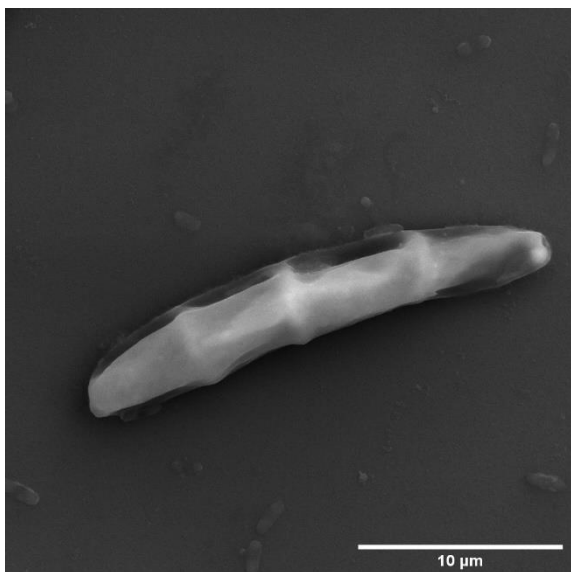
Obr. 56: Spora *A. alternata* s pokovením.



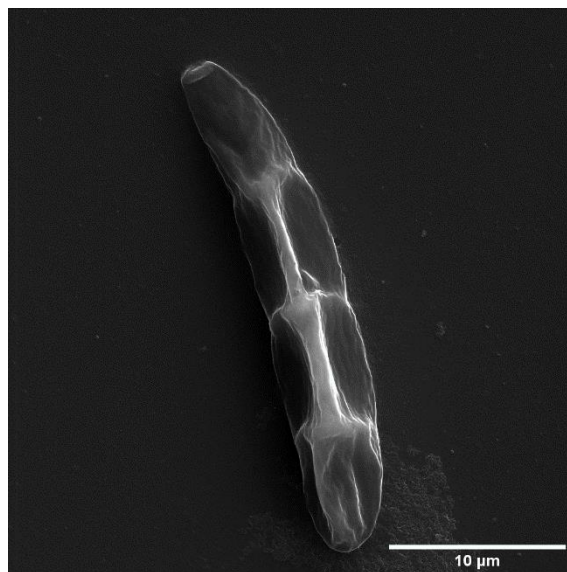
Obr. 57: Spora *A. niger* bez pokovení [226].



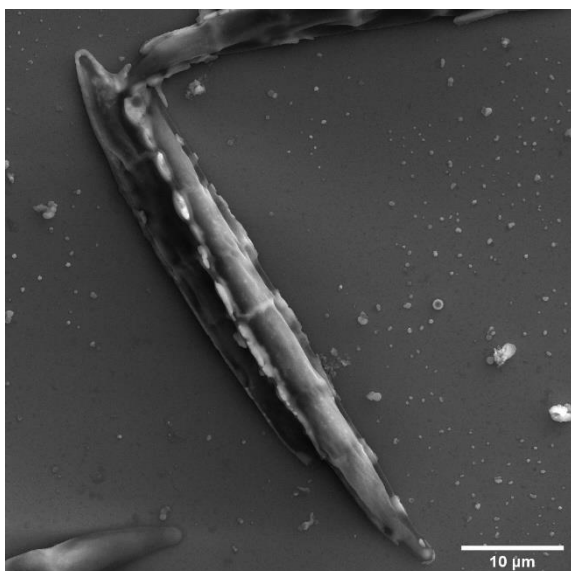
Obr. 58: Spora *A. niger* s pokovením.



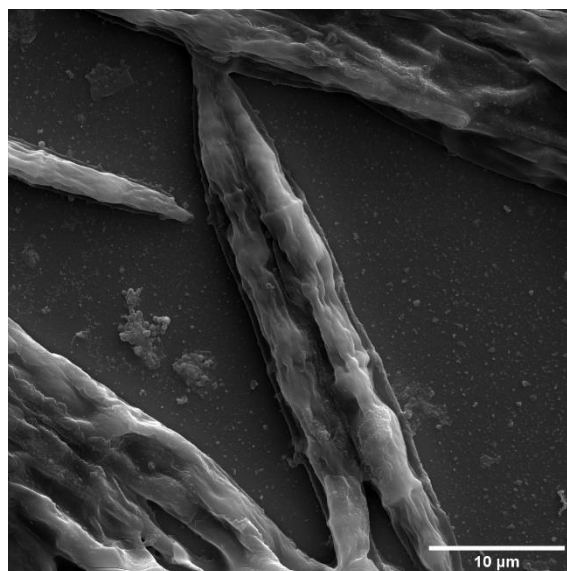
Obr. 59: Spora *F. culmorum* bez pokovení.



Obr. 60: Spora *F. culmorum* s pokovením.



Obr. 61: Spora *F. graminearum* bez pokovení.

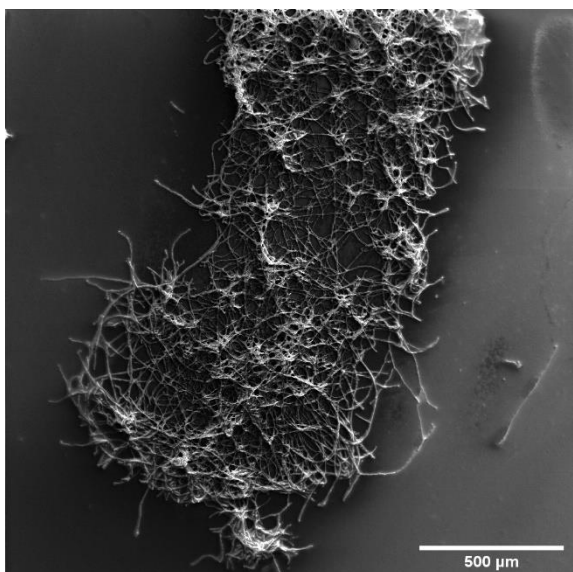


Obr. 62: Spora *F. graminearum* s pokovením [226].

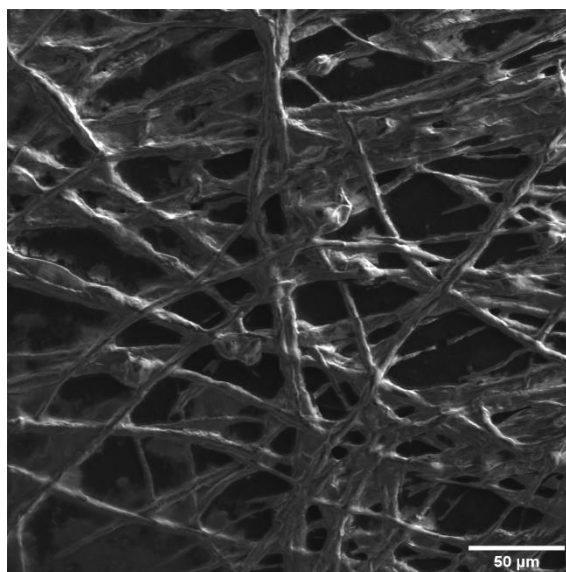
### 5.2.5 Snímkování nepokovených biofilmů mikromycet

Biofilmy tvoří rozsáhlé trojrozměrné struktury buněčné hmoty. Na základě provedených experimentů a získaných dat zobrazení nepokovených vzorků byly snímky zatíženy tak významnými artefakty v důsledku nedostatečného odvodu elektrického náboje z povrchu vzorku, že se nedařilo získat kvalitní obraz (Obr. 63 a Obr. 64). Zatímco u spor mikromycet je možným důvodem izolovanost jednotlivých objektů, a tedy odvod náboje alespoň částečně díky přímému kontaktu buňky s vodivým povrchem podkladní matrice, u biofilmů je toto znemožněno velmi omezenou prostupností přes několik vrstev biologického materiálu, který je navíc propojen EPS. Pokud byl současně aplikován režim rychlého skenování, např. rychlost 1  $\mu\text{s}/\text{px}$ , výsledkem byly snímky s vysokým podílem šumu a nízkým kontrastem. V případě

studovaných biofilmů tak byla jako vhodná příprava vzorku pro zobrazování preferováno pokovení.



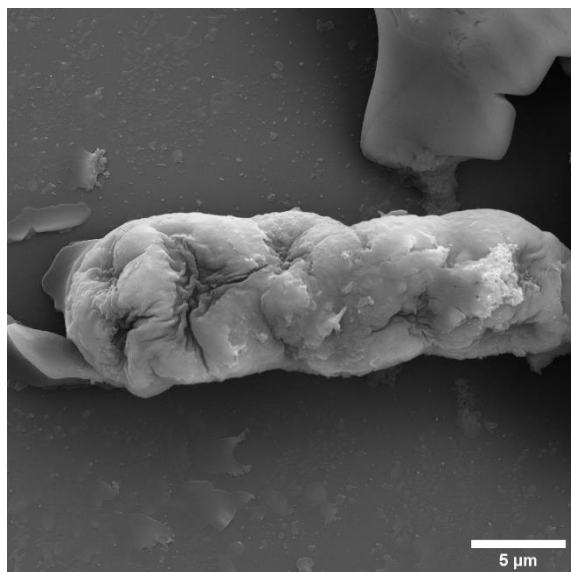
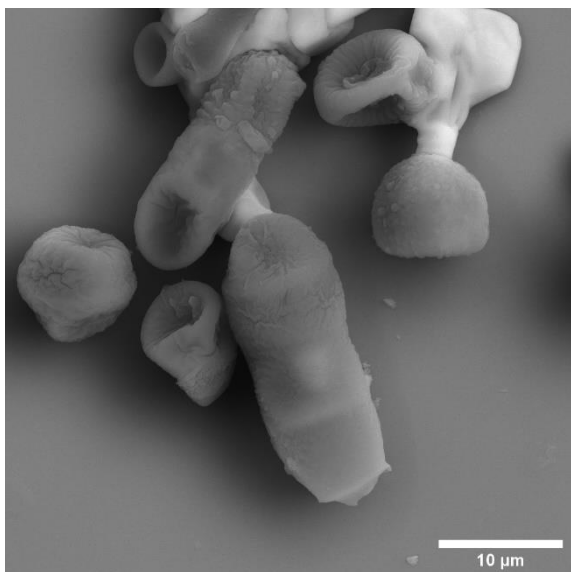
Obr. 63: Biofilm *A. alternata* bez pokovení.



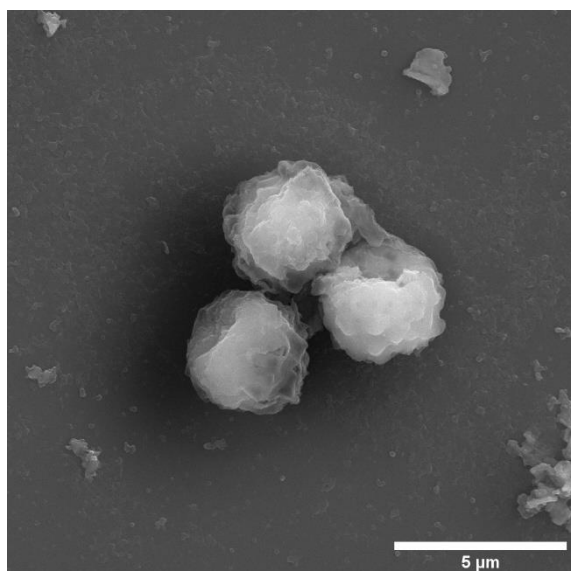
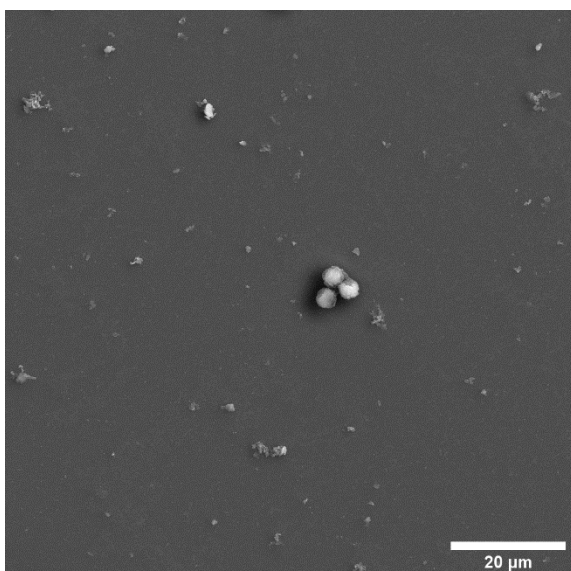
Obr. 64: Biofilm *F. graminearum* bez pokovení.

#### 5.2.6 Snímkování spor mikromycet detekcí BSE

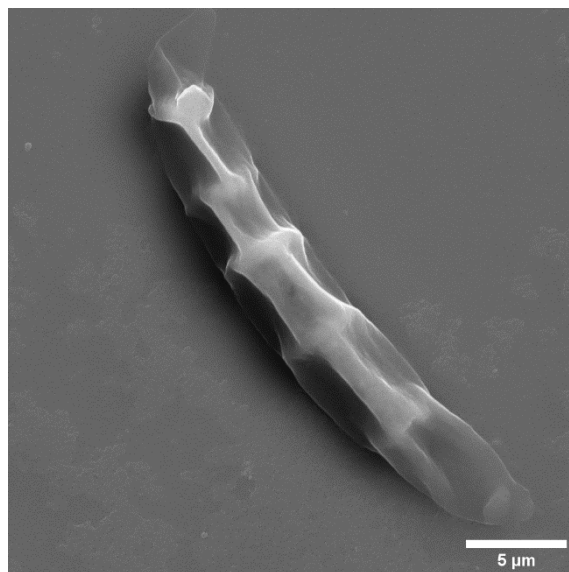
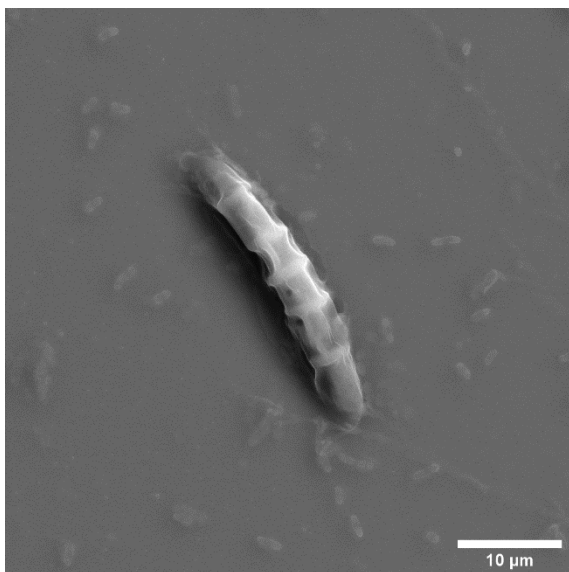
Kromě detekce „pravých“ sekundárních elektronů (SE) byly provedeny experimenty zobrazení zpětně odražených elektronů (BSE). BSE jsou produkovány elastickým rozptylem na atomových jádrech ve skenovaném vzorku a jejich energie tak závisí na lokálně zprůměrovaném atomovém čísle  $Z$ . Díky této interakci se těžší prvky budou jevit na snímku jako světlejší, zatímco lehčí prvky tmavší, jedná se o tzv.  $Z$ -kontrast nebo také materiálový kontrast. BSE elektrony jsou také vzhledem k vyšší energii méně ovlivněny nabíjením povrchu. Je možné i kombinovat detekci SE a BSE a získat tak snímky z fúze obou metod (Obr. 65 - Obr. 68). Urychlovací napětí elektronového svazku bylo 15 – 20 kV. Dwell time byl 32  $\mu$ s/pix, digitální rozlišení 1024x1024 pixelů, velikost stopy svazku pak 5,6 nm a proud na povrchu vzorku 394 - 411 pA.



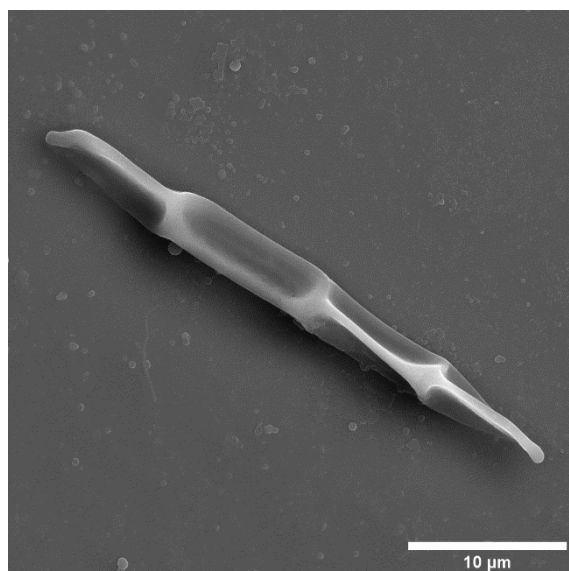
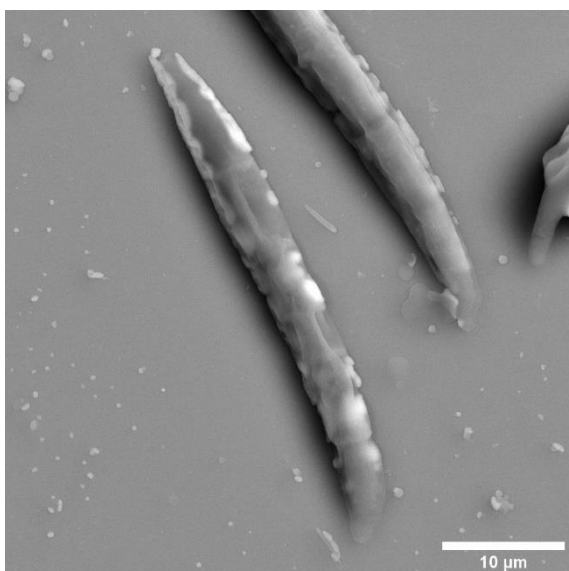
Obr. 65: Spory *A. alternata* bez ošetření NTP, detektor BSE (vlevo) a po ošetření NTP, detektor BSE+SE (vpravo).



Obr. 66: Spory *A. niger* bez ošetření NTP, detektor BSE+SE.



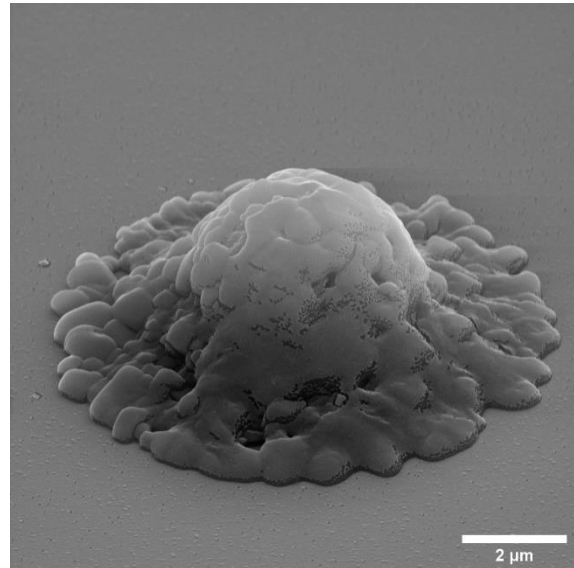
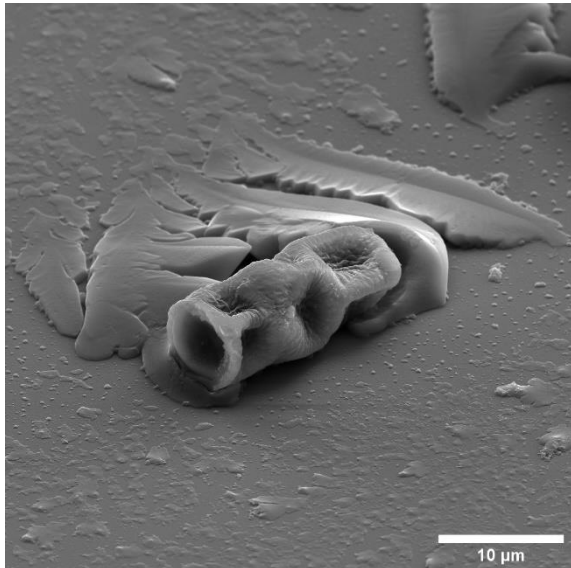
Obr. 67: Spory *F. culmorum* bez ošetření NTP, detektor BSE+SE.



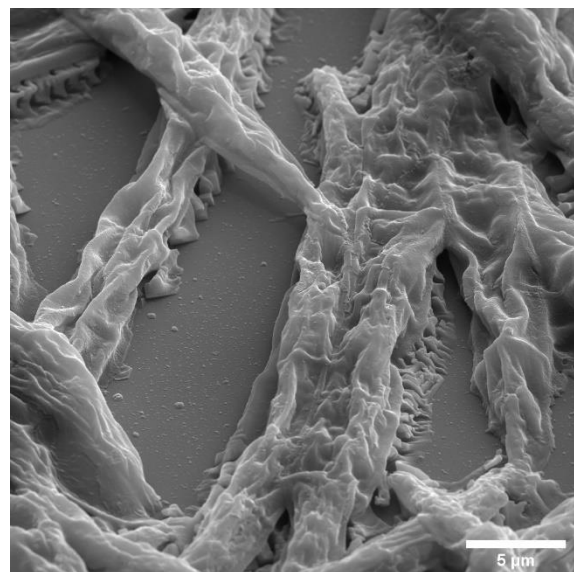
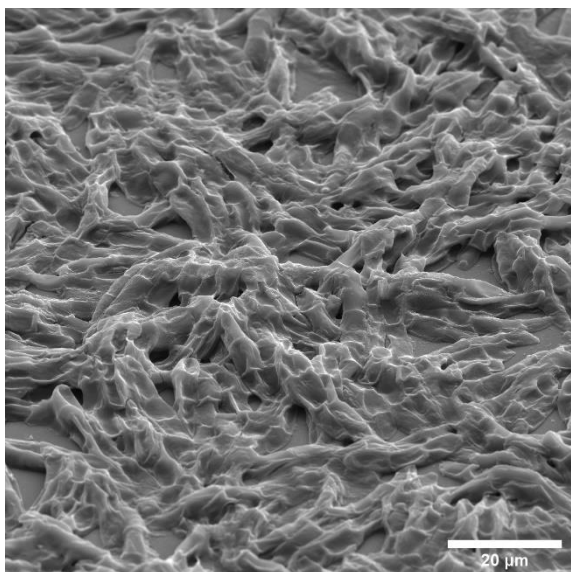
Obr. 68: Spory *F. graminearum* bez ošetření NTP detektor BSE (vlevo) a detektor BSE+SE (vpravo)

### 5.2.7 Snímky spor mikromycet v náklonu

Pro rozšíření perspektivy snímkaných mikromycet byly pořízeny též snímky při nakloněném experimentálním stolku fixujícím vzorky vůči detektoru (Obr. 69 a Obr. 70). Snímky tak poskytují přesnější vizuální představu o rozměru hloubky obrazů.



Obr. 69: Spora *A. alternata* (vpravo) a *A. niger* (vlevo) po ošetření NTP v náklonu.



Obr. 70: Spory *F. culmorum* (vpravo) a *F. graminearum* (vlevo) po ošetření NTP v náklonu.

### III. Aplikace pokročilých mikroskopických metod na identifikaci změn vnitřních struktur vybraných mikromycetních spor a *Candida albicans* vlivem působení antifungálních prostředků

## 6 Přehled současného stavu problematiky zobrazování vnitřních struktur buněk

Transmisní elektronová mikroskopie, která je pro biologii používána od počátku 40. let 20. století, se díky zobrazování ultratenkých řezů buněk stala důležitým nástrojem pro zobrazování vnitřních buněčných struktur [234]. V současné době představuje velmi rychle se rozvíjející technologii pro zobrazení vnitřních struktur buněk především kryo-elektronová tomografie, zejména pro možnost velmi vysokého rozlišení hydratovaných zmražených buněk [235] [236].

Světelná, potažmo průlomová superrozlišovací mikroskopie (Super-resolution microscopy) stala významným a často klíčovým nástrojem pro buněčný výzkum. Umožňuje pozorovat objekty s rozlišením vyšším, než je difrakční limit v optické mikroskopii, identifikovat pomocí fluorescenčních barviv různé typy organel a je minimálně invazivní [237].

Do nitra buněk se lze podívat pomocí trojrozměrného zobrazování. 3D informaci poskytuje v omezené míře metoda SEM, ovšem snímky jsou pouze pseudotrojdimenzionální. Zdání hloubky topografie povrchu je charakterizováno rozdílnými intenzitami detekovaných sekundárních elektronů pocházejících z určitého objemu v závislosti na daném nastavení mikroskopu a vlastnostech pozorovaného materiálu [238]. Výsledný obraz této metody je ovšem vždy dvoudimenzionální. Existuje však také metoda snímání objektů z různých úhlů, kdy následně dochází ke složení mnoha takových obrazů do 3D obrazu (3D SEM tomografie).

Mezi prvními metodami, které byly použity pro 3D pohled do nitra biologických objektů, je provedení sériových mikrotomových řezů. Vzorky je nutné fixovat, aby bylo možné řezy provést. Pevného stavu vzorku lze dosáhnout zalitím do epoxidových nebo metakrylátových pryskyřic, vosků na bázi parafínu, popřípadě zmrazit [239]. Sériové mikrotomové řezy však vyžadují složitou přípravu, z čehož plyne i značná časová náročnost [240].

Proto bylo po rozšíření FIB-SEM přístrojů nasnadě jejich použití v biologii, a to zejména buněčné. Iontový svazek lze použít zejména k provedení řezu buňkou [241] [242], tkání [243] [244] či kostí [245] [246] za účelem zobrazení jejich vnitřních struktur či ke studiu interakce buňka/vnitřní prostředí organismu [247] [248] nebo buňka/substrát [249] [250].



## 6.1 FIB-SEM tomografie v biologii

S rozvojem výzkumu buněčné biologie vyvstala potřeba trojrozměrného zobrazení buněčných struktur. Doposud využívané metody byly v tomto ohledu limitovány. Přesné trojrozměrné zobrazování může pomoci porozumět mikroskopickým detailům buněčné biologie a FIB-SEM tomografie tak představuje velmi zajímavou metodu pro 3D-rekonstrukci biologických vzorků s vysokým rozlišením [251]. Oproti tomu mezi překážky, které brání širšímu rozšíření FIB-SEM, může patřit pro některé aplikace nízká rychlost zobrazování a nedostatečná dlouhodobá stabilita systému, která omezuje maximální možný objem snímání [251]. FIB-SEM tomografie umožňuje komplexní vizualizaci celých buněk.

Metoda FIB-SEM je založena na použití iontových zdrojů typu FIB, které poskytují intenzivní iontový svazek s malou stopou. První dokumentace k metodě FIB využívající ionty kapalných kovů (Liquid Metal Ion Source, LMIS) byla zveřejněna již v roce 1961 a jejím obsahem byl vývoj trysek využívajících nabitých kovových kapek pro použití pro vesmírné aplikace. LMIS byl poté sporadicky provozován v 60. a 70. letech po celém světě, ovšem k systematické práci byl rozšířen až v 80. letech 20. století a v tomtéž období také byl uveden na trh první komerčně dostupný FIB [252]. V současné době je jeho uplatnění v široké škále aplikací materiálových věd včetně biomateriálů, polovodičů, mikroelektroniky a v mnoha dalších odvětvích. Pro studium vnitřních charakteristik buněk v rámci této studie byl zvolen FIB-SEM, který představuje alternativu k mikrotomovým řezům. Níže je uveden stručný přehled o metodě FIB.

## 6.2 Stručný přehled FIB systému – konstrukce FIB

Nejjednodušší konstrukci FIB aparatury lze ilustrovat na Obr. 71. Sestava je složena ze dvou čoček, kondenzor a objektiv), které jsou určeny pro fokusaci iontového svazku na vzorek. Vzhledem k tomu, že schopnost elektrostatické čočky zaostřit svazek nezávisí na hmotnosti částice, jsou v případě FIBu používány elektrostatické čočky jako výhodnější konstrukční řešení. Z podstaty porovnání hmotnosti elektronu vs. iontu by konstrukce běžně používaná pro elektronické mikroskopy sestávající se z elektromagnetických čoček mohla kvůli mocnosti elektromagnetu vážit tisíce kilogramů, aby vytvořila dostatečnou intenzitu pole, což by bylo dosti těžkopádné řešení [253]. Proud svazku je regulován prostřednictvím soustavy aperturních clon o různém průměru. Vztah mezi průměrem clony a proudem je lineární, tj. pokud má clona větší průměr, pak skrze ní projde více iontů, a tedy dosahuje se většího proudu, s čímž souvisí i větší průměr iontového svazku. Při urychlovacím napětí 30 kV je pak charakteristický typický rozsah proudů u FIB s galiovým iontovým svazkem 1 pA – 60 nA [254]. Pro pohyb svazku přes vzorek (skenování) slouží elektrostatický vychylovací systém. Kruhový tvar iontového svazku pak zajišťuje osmipólový stigmátor [253].



Obr. 71: Schéma elektronového mikroskopu [253].

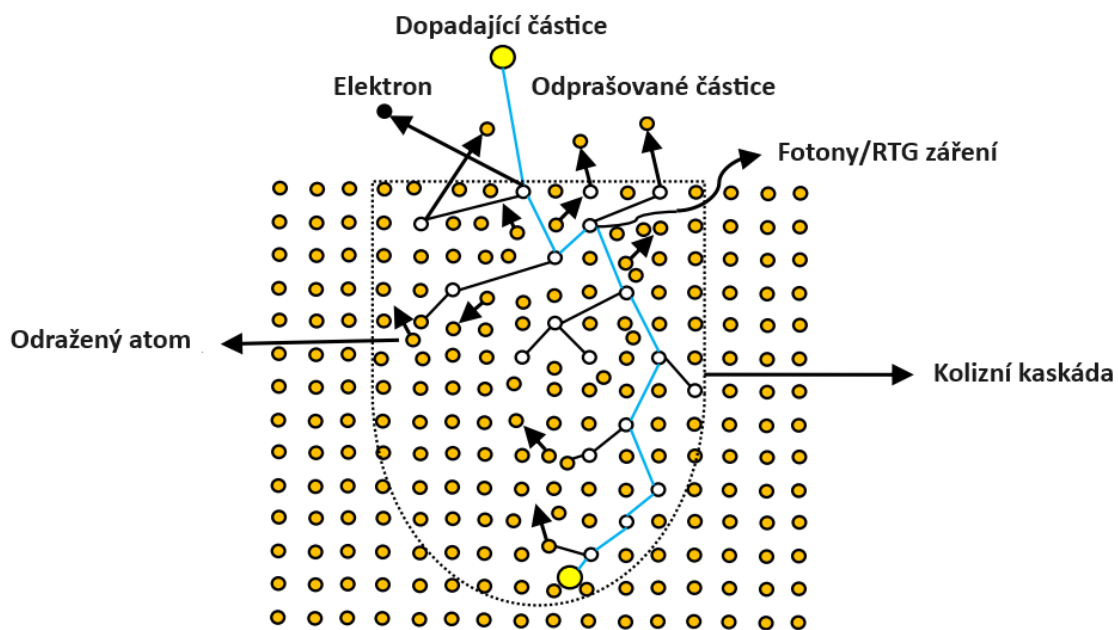
Princip zdroje iontů na bázi kapalného kovu spočívá odpařování kapalného kovu a zároveň jeho ionizaci v silném elektrostatickém poli. Zásobník kapalného kovu je ohříván bombardováním elektrony o kilovoltových energiích emitovaných ze žhaveného vlákna. Kapalným kovem smáčí povrch wolframového hrotu a v silném elektrostatickém poli vytvoří Taylorův kužel. V okolí vrcholu kužele je intenzita elektrostatického pole natolik silná, že umožňuje odpařování atomárních částic (atomů) a tunelování elektronů do hrotu a tím ionizaci unikajících odpařených atomů. Vzhledem k malému poloměru vrcholu Taylorova kužele a charakteristikám kvantově mechanického tunelování má tento zdroj velkou brilanci (jas)  $\sim 10^6$  A/cm<sup>2</sup>sr [255] a lze jej zfokusovat na nanometrové stopy a dosahovat proudových hustot  $10^8$  A/cm<sup>2</sup> [256].

Moderní zařízení FIB používají jako zdroj iontů kapalným kovem, nejčastěji galium (Ga) a to zejména pro své vhodné fyzikální vlastnosti, kterými jsou nízká teplota tání přibližně 29,3 °C [257], nízká těkavost, dobré emisní vlastnosti [258], kompatibilita s vysokým vakuem, vysoká hustota umožňující dlouhou provozuschopnost zdroje [259] a vysoká hmotnost iontů [256]. Přehledný seznam typů iontů pro nanoobrábění a implantaci prostřednictvím FIB je dále uveden v literatuře [260]. Nutno dodat, že tyto další FIB zdroje tvořené slitinami kovů se vyskytují minoritně a většinou pouze v základním výzkumu [260]. Komplikací pro jejich širší využití představuje nutnost zařazení hmotnostního separátoru do sestavy za účelem eliminace částic o různých hmotnostech i nábojích v iontovém svazku [254].

### 6.3 Stručný přehled FIB systému – interakce iontů s pevnou látkou

Dopadem iontů na pevnou látku dochází ke ztrátám jejich kinetické energie v důsledku interakce s atomy vzorku. Lze je z hlediska povahy interakce rozdělit do dvou typů: ztráta energie iontů na jádrech atomu vzorku a ztráta energie na elektronech v elektronovém obalu atomu vzorku [261]. V prvním případě dochází k předání hybnosti a kinetické energie ve

srážkám s atomy vzorku, které může vést k poškození vzorku následkem posunu jeho atomů z výchozích pozic či k emisi atomů terče, jevu, který se nazývá odprašování [253]. Tento jev převládá při relativně nízkých energiích svazku v řádech  $10^2$ - $10^4$  keV. Při druhém případě se jedná o neelastické srážky, při níž dochází k excitacím či ionizaci atomů vzorku a následné produkci rentgenova záření nebo sekundárních elektronů. Tento proces převládá při vyšších energiích svazku v řádech stovky keV - MeV [261]. Pokud je předaná energie dostatečně vysoká, dochází k dalším sekundárním, terciálním atp. srážkám, které jsou demonstrovány na modelu srážkové kaskády Obr. 72. Kaskáda tedy popisuje model pro interakci iontů s pevnou látkou skrze nezávislé binární srážky iontu s atomy vzorku a je možné ji modelovat pro různé typy materiálů a svazků metodou Monte Carlo v programu SRIM – The Stopping and Range of Ions in Matter [262].



Obr. 72: Model srážkové kaskády (upraveno z [263]).

Souhrnně tak v důsledku předávání hybnosti a kinetické energie iontů atomům terče dochází k následujícím procesům: implantace dopadajících iontů, emise sekundárních elektronů, která umožňuje zobrazování povrchu vzorku, odprašování [264], které umožňuje nanostrukturovat povrch, emise sekundárních iontů (204), které umožňuje chemickou analýzu a emise elektromagnetického záření. K odprašování povrchových atomů vzorku dochází v případě, že tyto atomy v rámci srážkové kaskády mají směr pohybu ven z terče a jejich kinetická energie je dostatečná k překonání vazebné energie atomů povrchu materiálu. Dopadající iont předá energii řádově jednotky nebo desítky keV stovkám až tisícům atomů ve srážkové kaskádě, přičemž většina rozkmitaných atomů (recoils) má energii setin, desetin eV, menší část jednotek eV, výjimečně desítky až stovky eV. Tyto atomy (recoils), pak překonávají povrchovou energetickou bariéru (povrchovou vazebnou energii) a dochází k odprašování.

## 6.4 Stručný přehled FIB systému – aplikace FIB

Aplikace FIB jsou zaměřeny zejména na procesy obrábění odprašováním, depozice a zobrazování. Při použití vysokých energií a nejmenší pracovní vzdálenosti lze dosáhnout nejmenšího průměru iontového svazku, což s sebou přináší nejlepší rozlišení pro zobrazovací mód. Zároveň na energii závisí volba metody odprašování či depozice, které zároveň vyžadují větší pracovní vzdálenost. Laděním hlavních charakteristik iontového svazku, jakými jsou urychlovací napětí, proud a průměr svazku dopadajícího na vzorek lze modifikovat účel použití FIB [255].

Z hlediska zobrazování FIB je intuitivně podobný skenovacímu elektronovému mikroskopu, ovšem namísto použití elektronového svazku je zde svazek iontový. Sekundární elektrony pak vznikají interakcí iontového svazku s povrchem vzorku a je tak možné získat obraz jeho povrchu [253]. Fokusaný svazek iontů je rastrován přes povrch vzorku a sekundární elektrony jsou detekovány ve stejném typu detektoru jako SE vybuzené elektronovým svazkem, tj. v Everhardt-Thornly (ET) detektoru. Napětí na mřížce ET detektoru lze nastavit i tak, aby bylo možné detegovat i kladně nabitě atomární částice, tj. hmotnostně neseperované sekundární ionty. V současné době jsou komerčně dostupné kompaktní hmotnostní spektrometry, které lze integrovat do systému FIB-SEM a tím lze získat hmotnostní spektroskopii sekundárních iontů (SIMS) jako komplementární doplnění k chemické analýze EDS, která je standardní součástí SEM systémů. Pro zobrazovací režim jsou používány různé proudy svazku, které mají vliv jak na rychlost odprašování, tak na obrazové rozlišení. Mezi proudem ve svazku a velikostí stopy (rozlišením) existuje přímá úměra. Nízké proudy jsou používány zejména z důvodu vysokého rozlišení. Při použití vysokých proudů je nutné aplikovat rychlý jednorázový sken, aby nedošlo k přílišnému odprašení povrchu vzorku při jeho zobrazování. Naopak u malých proudů je možné skenovat pomaleji či kumulovat rychlé skeny.

Iontový svazek je využíván zejména k mikro/nano strukturním úpravám povrchů. Rychlost odprašování je přímo úměrná koeficientu odprašování a proudové hustotě a nepřímo úměrná atomární hustotě materiálu. Koeficient odprašování závisí složitým způsobem na poměru hmotností atomů projektilu a terče, je přímo úměrný brzdné síle (nuclear stopping power) a úhlu dopadu projektilu na terč a je nepřímo úměrný povrchové vazebné energii. Brzdná síla pak závisí na energii primární částice a interakčních potenciálech. Základním konceptem jsou tzv. lineární srážkové kaskády, které nastávají při typických energiích  $10^2$ - $10^4$  keV a zároveň pokud se nejedná o extrémní rozdíly v hmotnostech projektilu a terče. V případech odprašování velmi lehkými prvky jako H, He, Li dochází k tzv. řídkým srážkovým kaskádám a velmi malému výtěžku odprašování. V případech vysokohustotních terčů a dopadu těžších projektilů dojde k tzv. srážkovému klínu (collision spike), který má atributy podobné lokalizovanému plazmatu.

FIB v kombinaci s pracovním plynem umožňuje i depozici tenkých vrstev nebo vytváření nanoobjektů materiálů na povrch vzorku. Existují tři základní metody nanášení cílového materiálu – prostřednictvím iontů (Ion Beam Induced Deposition, IBID), které lokálně indukují rozpad molekul pracovního plynu na povrchu substrátu tím, že dodávají energii pro přerušování a znovuvytváření nových chemických vazeb anebo prostřednictvím elektronů (Electron Beam Deposition, EBD) či metodou nanosení fotorezistu mimo FIB-SEM, vytvoření struktury ve fotorezistu pomocí FIB a jeho následné odstranění z exponovaných míst mimo

SEM. Na povrch vzorku je adsorbován pracovní plyn - nejčastěji organometalická molekula, která se lokálně rozkládá v místě dopadu iontového nebo elektronového svazku. Část fragmentů té molekuly obsahujících kovový atom vytvoří nové vazby a zůstává na povrchu a část je emitována ze vzorku, a nakonec může být odčerpána z komory přes vakuový čerpací systém. Takto přirůstají další části vrstvy až do požadované velikosti nebo tvaru. Dochází i k konkurenčnímu jevu a tím je odprašování a také dochází k implantaci, a tedy rostoucí tenká vrstva může mít komplikované složení. Rozdílů mezi metodami IBID a EBD je vícero, například rychlost depozice při daném proudu svazku, kdy je metoda IBID výrazně rychlejší [265], dále čistota, tj. u EBID nedochází k implantaci Ga. Další je poškození původního povrchu materiálu (např. membrány buňky), kde opět EBID nepoškozuje povrch anebo mnohem méně než v případě metody IBID.

FIB může být samostatné zařízení, avšak nejčastěji je integrován se SEM, kdy potom vytváří tzv. dvousvazkový systém. Další časté metody, které bývají integrovány v SEM jsou například detektor difrakce zpětně odražených elektronů (Electron BackScatter Diffraction, EBSD) nebo detektor energiově dispersní rentgenové spektroskopie (EDS).

## 7 FIB-SEM tomografie spor mikromycet

### 7.1 Metody

FIB-SEM tomografie se sestává z následujících kroků: a) příprava iontového a elektronového svazku na zobrazování a odprašování, b) lokalizace zájmové oblasti na vzorku a její zobrazení, c) sesouhlasení iontového a elektronového svazku, tj. oba svazky se zaostří a skenují ve stejné rovině a skeny se překrývají, d) příprava parametrů pro FIB i SEM pro tomografii, popřípadě příprava referenční značky pro korekci driftu pro automatický režim, e) samotný proces odprašování a snímkování, f) rekonstrukce snímaných řezů buňkami a kompletace snímků. Tomografické snímky byly pořízeny na pokovených dehydrovaných sporách fixovaných na podkladu Si destičky/waferu. Snímkování bylo provedeno ve skenovacím módu resolution při napětí 15 kV a při pracovní vzdálenosti 9 mm. Pracovní stolek se vzorky bylo nutné naklonit na 55 ° kvůli umístění FIB v komoře a kolmému dopadu iontů na povrch. FIB byl v nastavení napětí 30 kV s emisí 2  $\mu\text{A}$  a zvoleným přednastavením pro jemné odprašování, leštění (fine milling, polishing). Snímkování bylo provedeno ve dvou režimech: automatickém a manuálním.

Po lokalizaci místa zájmu a sesouhlasení elektronového (SEM) a iontového svazku (FIB) bylo v případě automatického režimu nejprve nutno vytvořit referenční značku o hloubce 10 – 15  $\mu\text{m}$  v blízkosti snímkaného objektu. Tato značka, v případě této studie byl zvolen kříž, pak sloužila pro korekci driftu pro FIB i SEM zobrazení. Poté byly nastaveny přednastavení odprašovacích parametrů pro FIB (presets), nadefinován objem vzorku a nastavena volba průběhu odprašování. Hloubka jednotlivých řezů byla nastavena na 3  $\mu\text{m}$  a dwell time 32  $\mu\text{s}/\text{pix}$ . Velikost stopy svazku byla 4,4 – 6,9 nm a proud na povrchu svazku v rozmezí 52 – 257 pA. Požadovaný počet snímků byl volen v závislosti na typu a velikosti vzorku vzhledem k předpokládané stabilitě driftu. Prostřednictvím automatizace bylo provedeny jednotlivé řezy pomocí FIBu a pořizování snímků s využitím SEM.

Ruční režim pak byl proveden jednotlivými samostatně provedenými navazujícími řezy. Délka řezů byla přizpůsobována aktuální šířce řezané plochy, přičemž šířka řezu zůstávala konstantní. Tímto se docílilo zkrácení času řezů, protože nebylo nutné odprašovat nepotřebná místa v případě stočených nebo ohnutých vzorků a bylo tak možné snáze kopírovat tvar spory. Hloubka řezů byla stanovena na 3  $\mu\text{m}$  a dwell time 32  $\mu\text{s}/\text{pix}$ . Velikost stopy svazku byla 4,4 – 6,9 nm a proud na povrchu svazku pak v rozmezí 60 - 224 pA.

Výsledky výzkumu jsou publikovány v publikaci [226].

### 7.2 Dílčí výsledky a diskuse

Tomografické FIB-SEM řezy přináší informaci o profilu zkoumaného objektu. Bezespornou výhodou je možnost vizualizace každého z řezů samostatně a volba potřebného počtu řezů

jednoho a toho samého objektu. Je tak možné pozorovat změny struktury prostupem objektu stejně, jako je tomu v případě medicínské tomografie.

V případě automatického režimu je možné pořizovat časově velmi náročná měření bez nutnosti přímé asistence operátora mikroskopu, kdy je požadován velký počet řezů. Důležitým aspektem je ovšem zamezení driftu obrazu, k čemuž může docházet velmi často. Proto je nejen důležité zvolit vhodný tvar referenční značky, ale také vybrat dostatečně rozsáhlé zobrazovací okolí značky, aby byla značka viditelná pro FIB i SEM po celou dobu měření. V opačném případě dojde po určité době snímkování ke ztrátě zaostření na řezaný objekt.

Ruční režim je oproti automatickému režimu vhodný pro menší počet řezů ovšem umožňuje jemnější práci s jednotlivými řezy a možnost korekce snímku na daném řezu, zejména úpravu jasu a kontrastu tak, aby byly viditelné požadované struktury. Velkou výhodou je také možnost řezů přesně podle aktuálního tvaru buňky, což s sebou přináší časovou úsporu, neboť není nutné řezat pouze přednastaveném nejčastěji obdélníkovém tvaru, při kterém dochází k řezu i místy, kde se zkoumaná buňka nenachází. Zejména u větších objektů je úspora času značná.

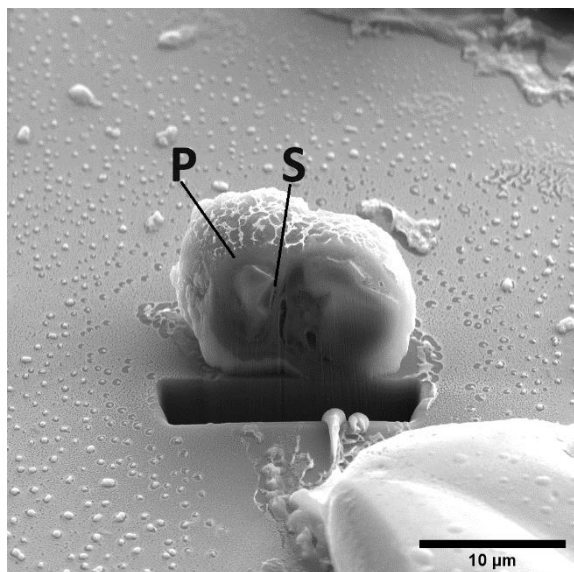
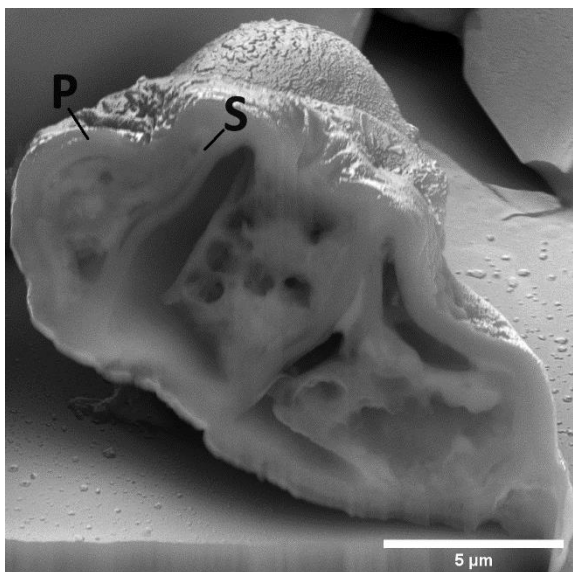
Pro tomografické řezy byla zvolena spora mikromycety druhu *A. alternata* zejména pro svou velikost, neboť je největší ze vzorků použitých pro tuto studii. V této studii byly vzorky pro SEM mikroskopii připraveny pomalou dehydratací bez nutnosti náročných metod jiných druhů fixace. Buňky si udržely svůj tvar a nekolabovaly vlivem vakua uvnitř mikroskopu, což bylo prokázáno srovnáním snímků z optické mikroskopie a SEM. Buňky byly tvarově stabilní se zachovanou jemnou vnitřní strukturou i při jednotlivých řezech.

Na snímcích jsou dobře viditelné zejména pevná buněčná stěna a soustava buněčných přepážek, tzv. septum.

Spory *A. alternaria* vznikají enterblastickou tretickou konidiogenezí [266]. Konidie se formuje dříve, než je oddělena přepážkou od konidiogenní buňky, přičemž vnější stěna se protrhne a konidii utváří vnitřní vrstva. U tretické konidiogeneze vznikají vícebuněčné konidie, tzv. porokonidie často s výraznou jizvou na konidiogenní buňce [267], jako je tomu patrné na Obr. 73 a dalších uvedených v této studii.

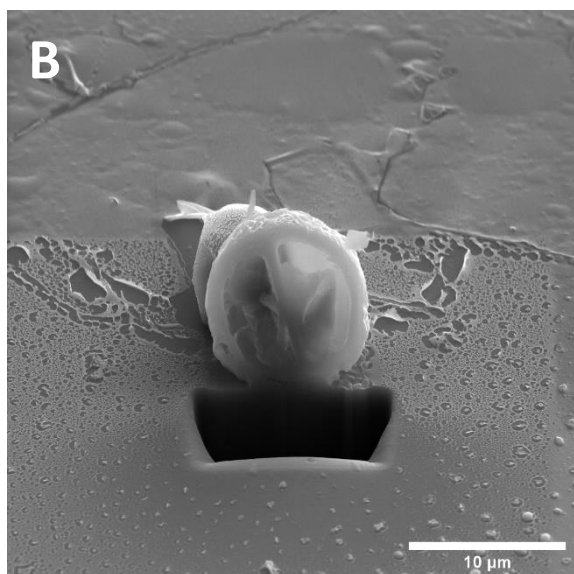
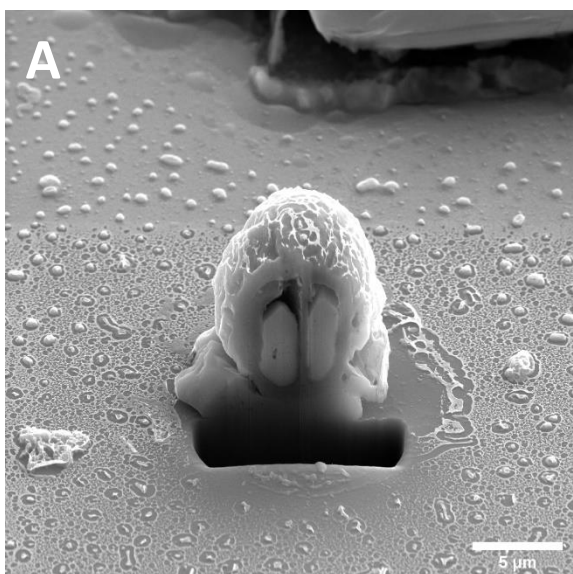
Zralá spora je vícebuněčná, příčně i podélně septovaná, kyjovitého, hruškovitého či válcovitého tvaru na vrcholu se často zužujícího, jako je tomu např. na Obr. 73. Je obklopena dvojitou buněčnou stěnou, přičemž první stěna obsahuje pigment a vnitřní stěna je hyalinní (čirá). Primární stěna (vnější) je vytvořena z původní stěny vyvíjející se spory. Sekundární stěna (vnitřní) obklopuje jednotlivé buňky uvnitř spory. Jednotlivé přepážky septa přiléhají přímo k primární stěně [268].

Cílem tomografie NTP buněk byla studie poškození vnitřních struktur buněk vlivem NTP. Z experimentálních tomografických snímků je patrná silná buněčná stěna. Primární a sekundární buněčné stěny jsou odlišitelné zejména na Obr. 73. V ostatních případech není rozdíl mezi nimi výrazný. Výraznější rozlišitelnosti primární a sekundární stěny je možné dosáhnout přidáním barviva do preparátu, např. uranylacetátu, a zobrazením ultratenkých řezů na TEM, jako je tomu dle [268]. Zároveň byla výrazně patná jednotlivá příčná i podélná septa zralých spor ohraničující jednotlivé buňky ve všech snímcích zralých spor.



Obr. 73: FIB řezy sporami *A. alternata* ošetřených NTP v manuálním režimu; P – primární buněčná stěna, S – sekundární buněčná stěna [226].

Buňky jsou v normálním hydratovaném stavu vyplněny buněčnými organelami, glykogenem a kapičkami lipidů [269]. U NTP ošetřených buněk je patrná kondenzace vnitrobuněčného obsahu do kompaktní hmoty Obr. 74 A, podobně jako v práci ([270], Obr. 2D), kde byl použit TEM, až do úplného kolapsu obsahu Obr. 74 B v rámci každé buňky oddělené septem.

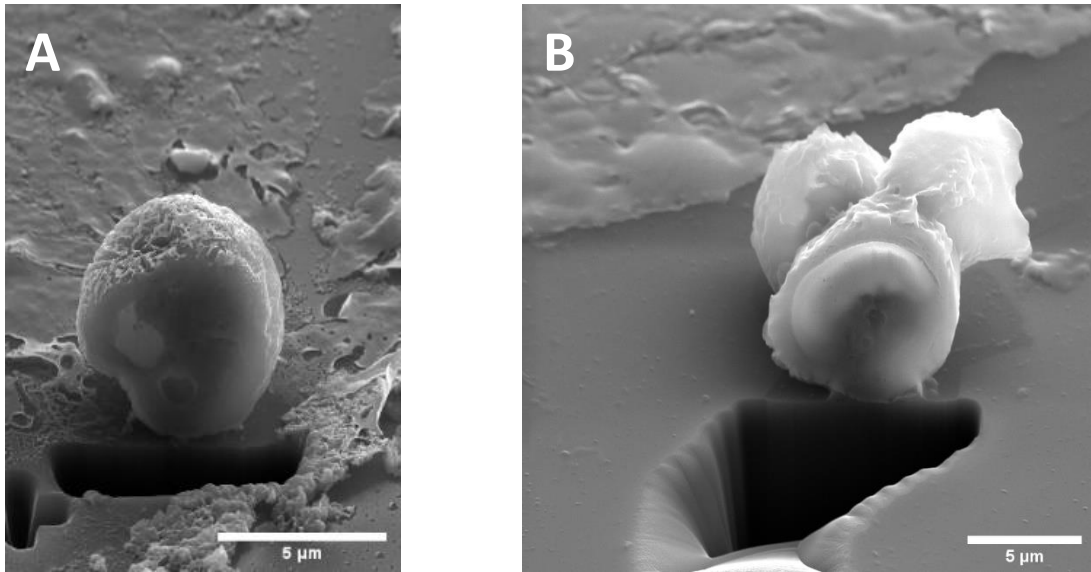


Obr. 74: FIB řezy sporami *A. alternata* ošetřených NTP v manuálním režimu s kondenzací vnitrobuněčného obsahu (A) a zkolabovaným vnitrobuněčným obsahem (B).

Rozlišitelnost jednotlivých organel po ošetření NTP nebyla pozorována. Na snímcích Obr. 75 je viditelný z kondenzovaný vnitrobuněčný obsah ovšem jsou patrná i místa, kde se buněčný obsah liší v kontrastu jednotlivých částí. To by mohlo naznačovat, že šlo o některou z kompaktních organel. Podobné rozdíly jsou uvedeny v práci [271], kde byly vzorky pro markantní zvýšení kontrastu jednotlivých organel obarveny uranylacetátem a citrátem olovnatým nebo také v práci [272] pro *Alternaria eichhorniae*. Obě práce jsou ovšem snímkovány prostřednictvím TEM, nikoliv SEM jako v případě této práce. V této studii byla

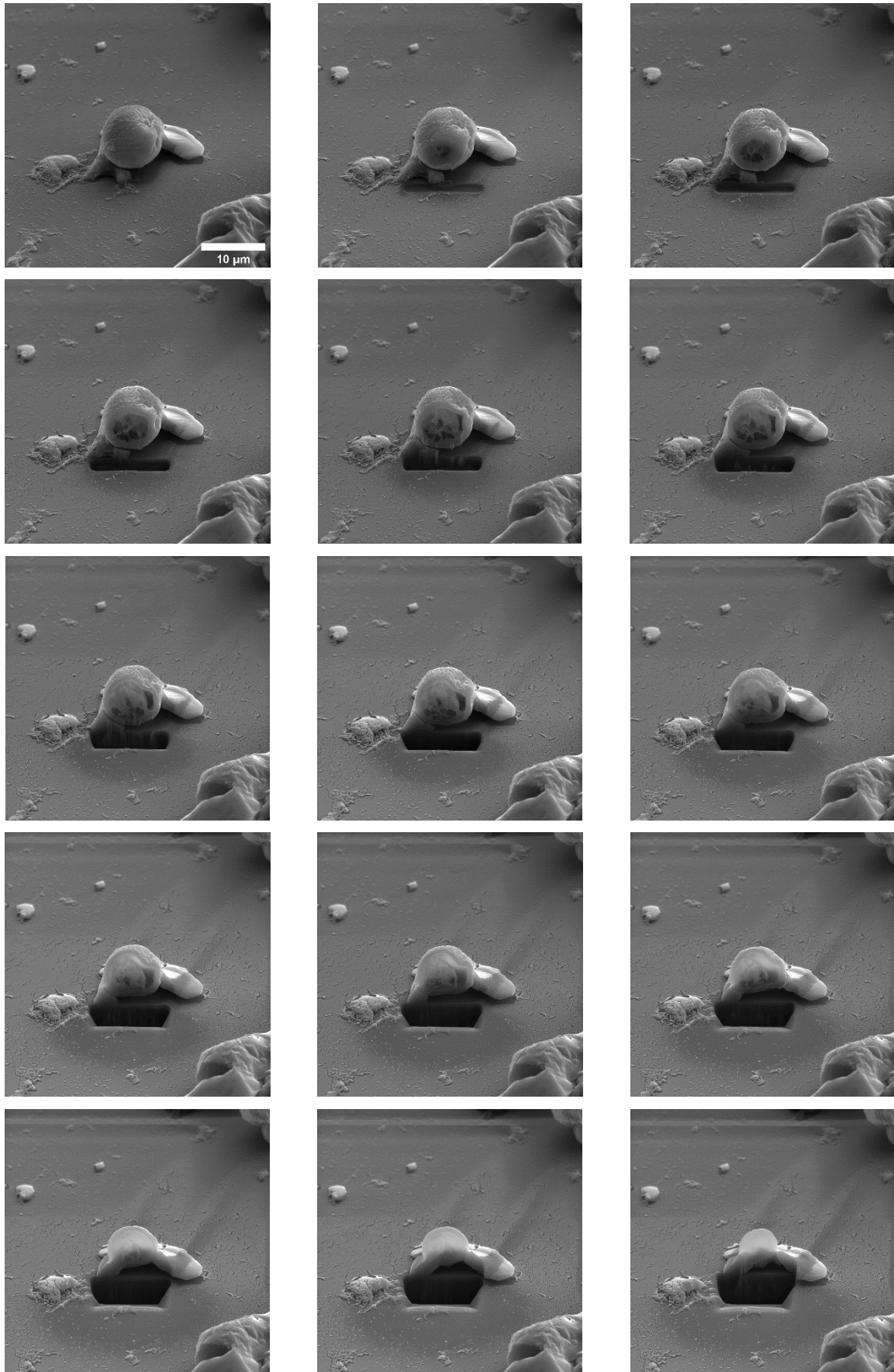


ovšem preferována metoda bez obarvení za účelem možností vizualizace spor v přirozeném stavu bez aditiv.

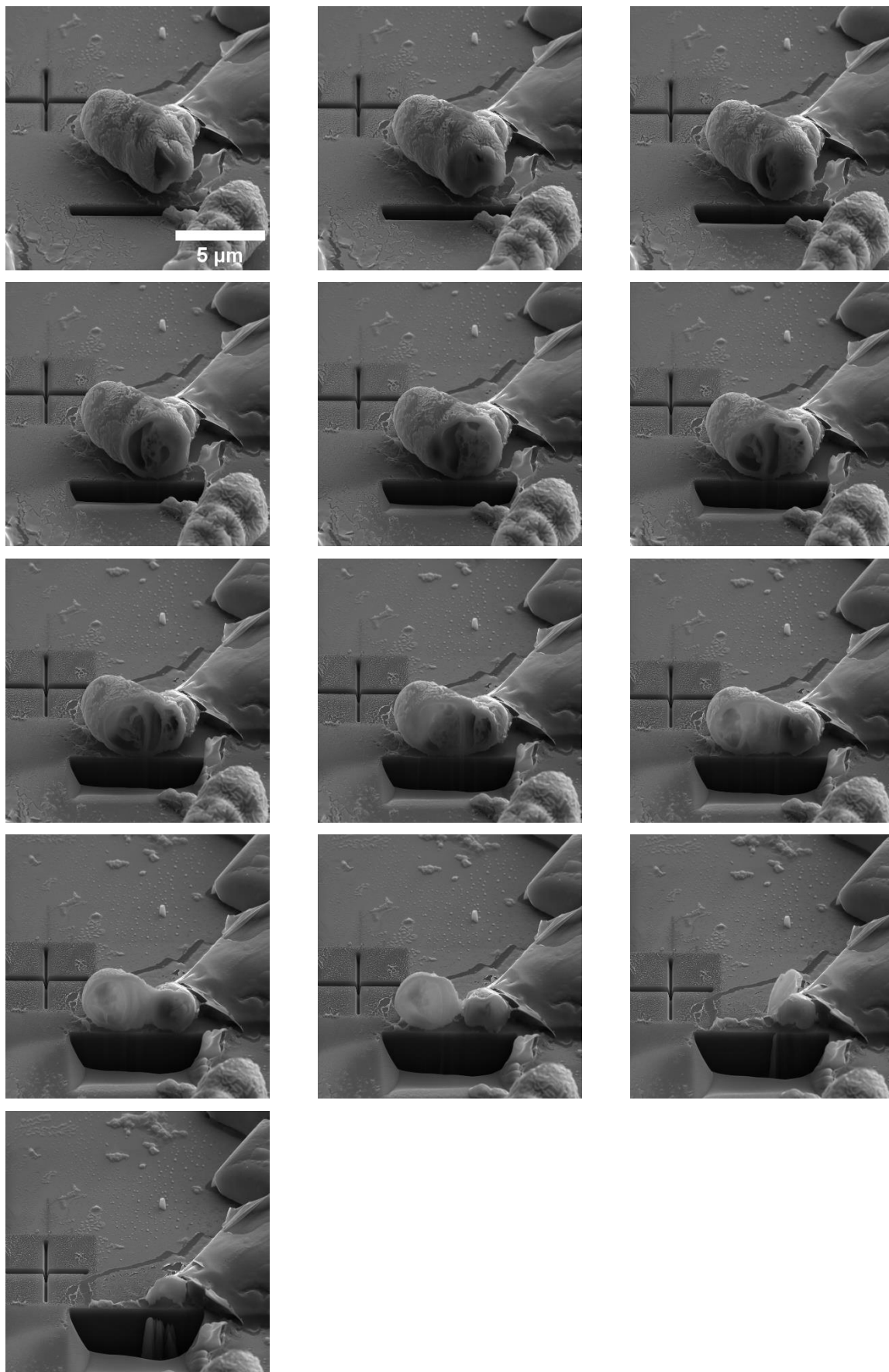


Obr. 75: FIB řezy sporami *A. alternata* po NTP v automatickém (A) a manuálním (B) režimu.

Následující snímky Obr. 76, Obr. 77 a Obr. 78 představují rozfázované tomografické řezy sporami *A. alternata*. Obr. 76 je tomografie mladé spory o jedné buňce, zatímco Obr. 77 a Obr. 78 jsou snímky tomografie zralých septovaných spor. Vzorky byly ošetřeny NTP, a tak je zcela patrné zhroucení a poškození vnitrobuněčného obsahu. Dobře pozorovatelné jsou pevné buněčné stěny a septa jednotlivých buněk.



Obr. 76: Tomografie mladé spory *Alternaria alternata* v manuálním režimu.

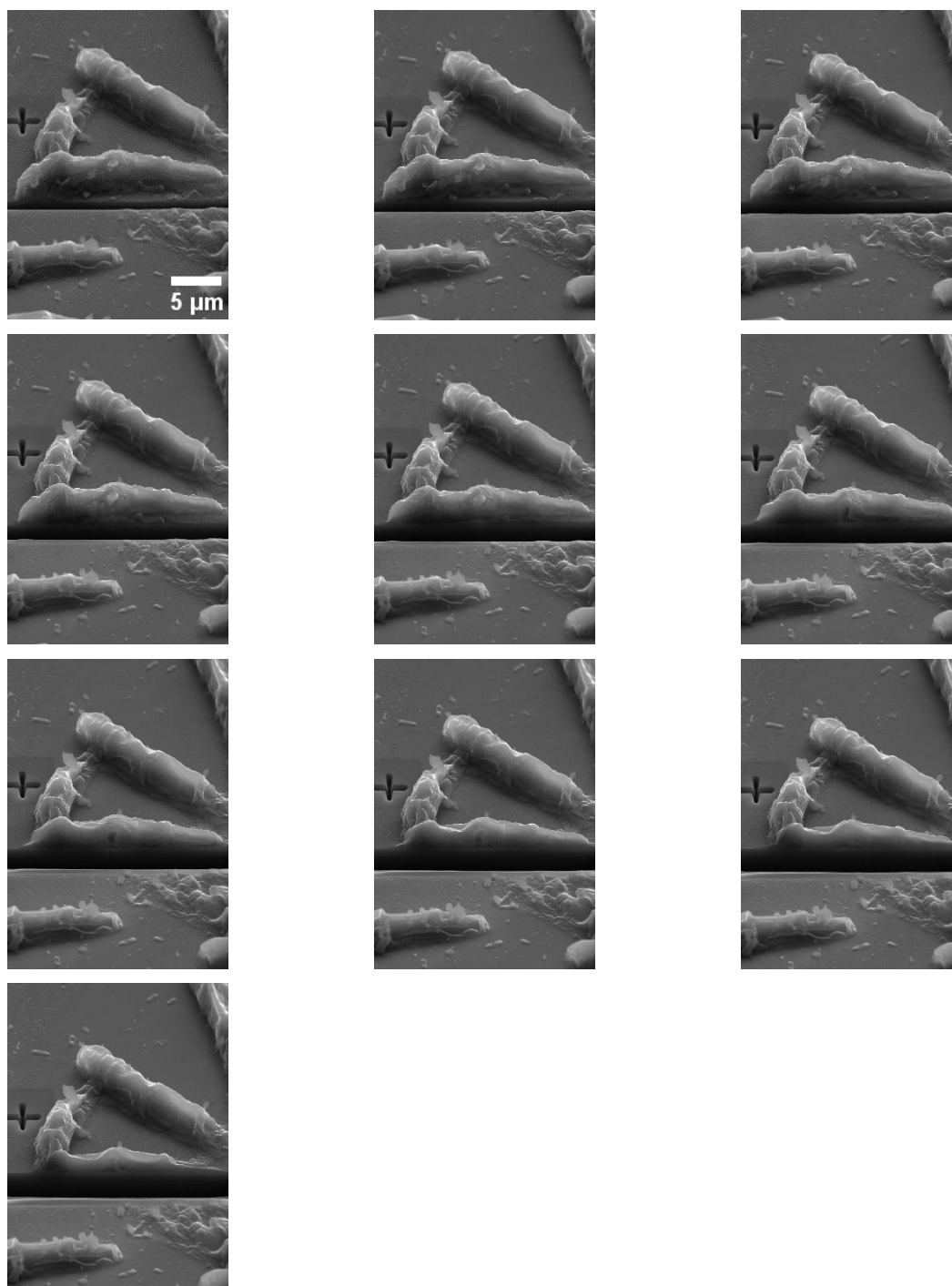


Obr. 77: Tomografie zralé spory *Alternaria alternata* – příčný řez v automatickém režimu.

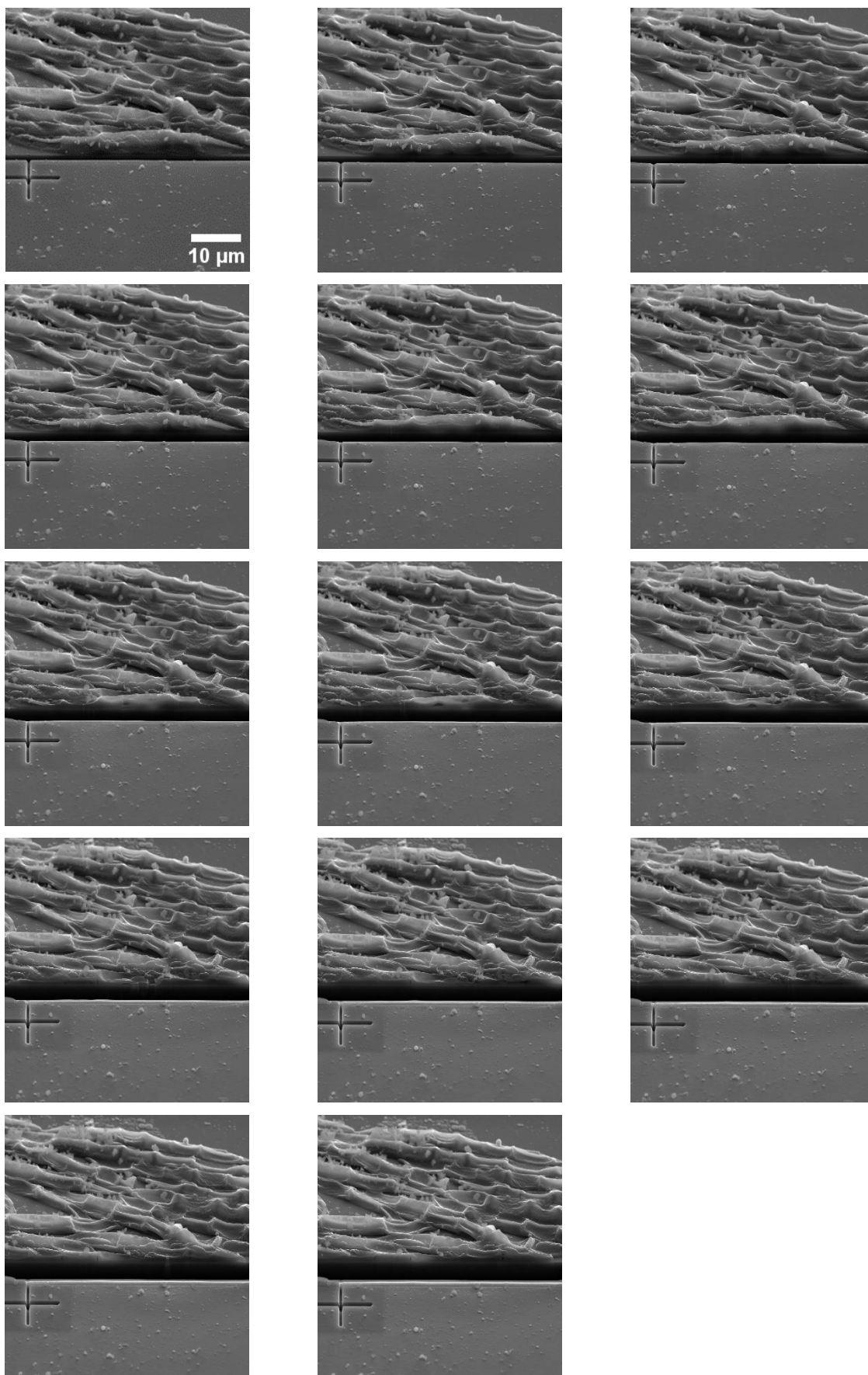


Obr. 78: Tomografie zralé spory *Alternaria alternata* – podélný řez v automatickém režimu [226].

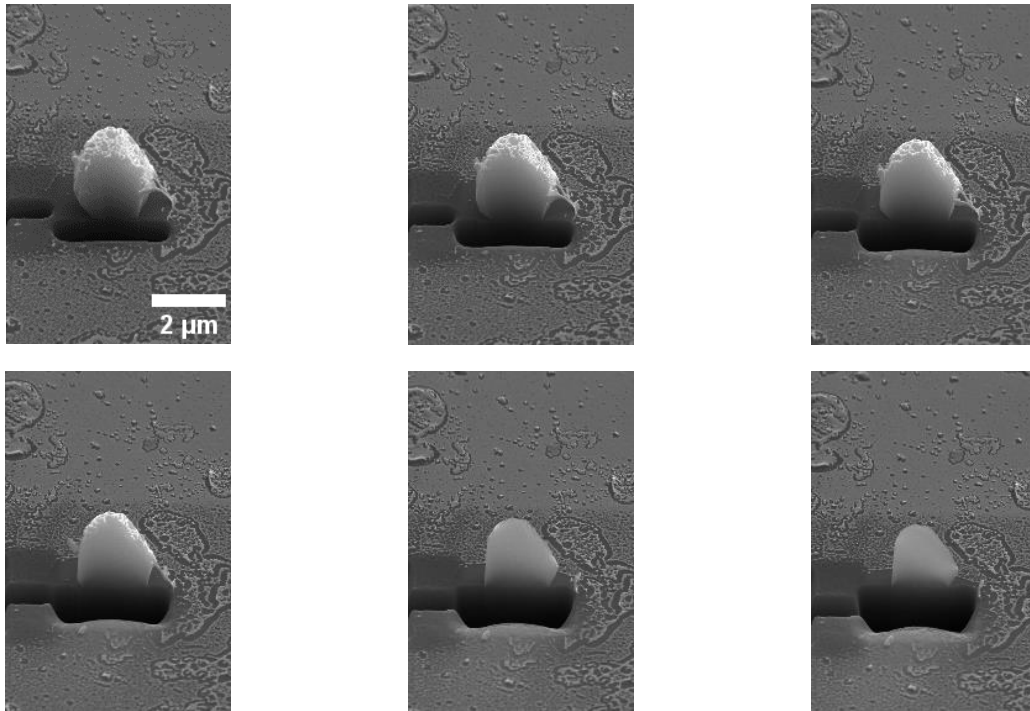
Provedena byla také tomografie spor *A. niger*, *F. culmorum* a *F. graminearum*. V případě *F. culmorum* byla vnitřní struktura patrná, ovšem identifikace jednotlivých částí nebyla možná (Obr. 79). U *F. graminearum* byly výsledky tomografie bez viditelné struktury (Obr. 80), stejně jako *A. niger* nebyly viditelné žádné vnitřní struktury či buněčná stěna (Obr. 81).



Obr. 79: Tomografie spory *Fusarium culmorum* – podélný řez v automatickém režimu.



Obr. 80: Tomografie spor *Fusarium graminearum* v automatickém režimu.



Obr. 81: Tomografie spor *Aspergillus niger* v automatickém režimu.

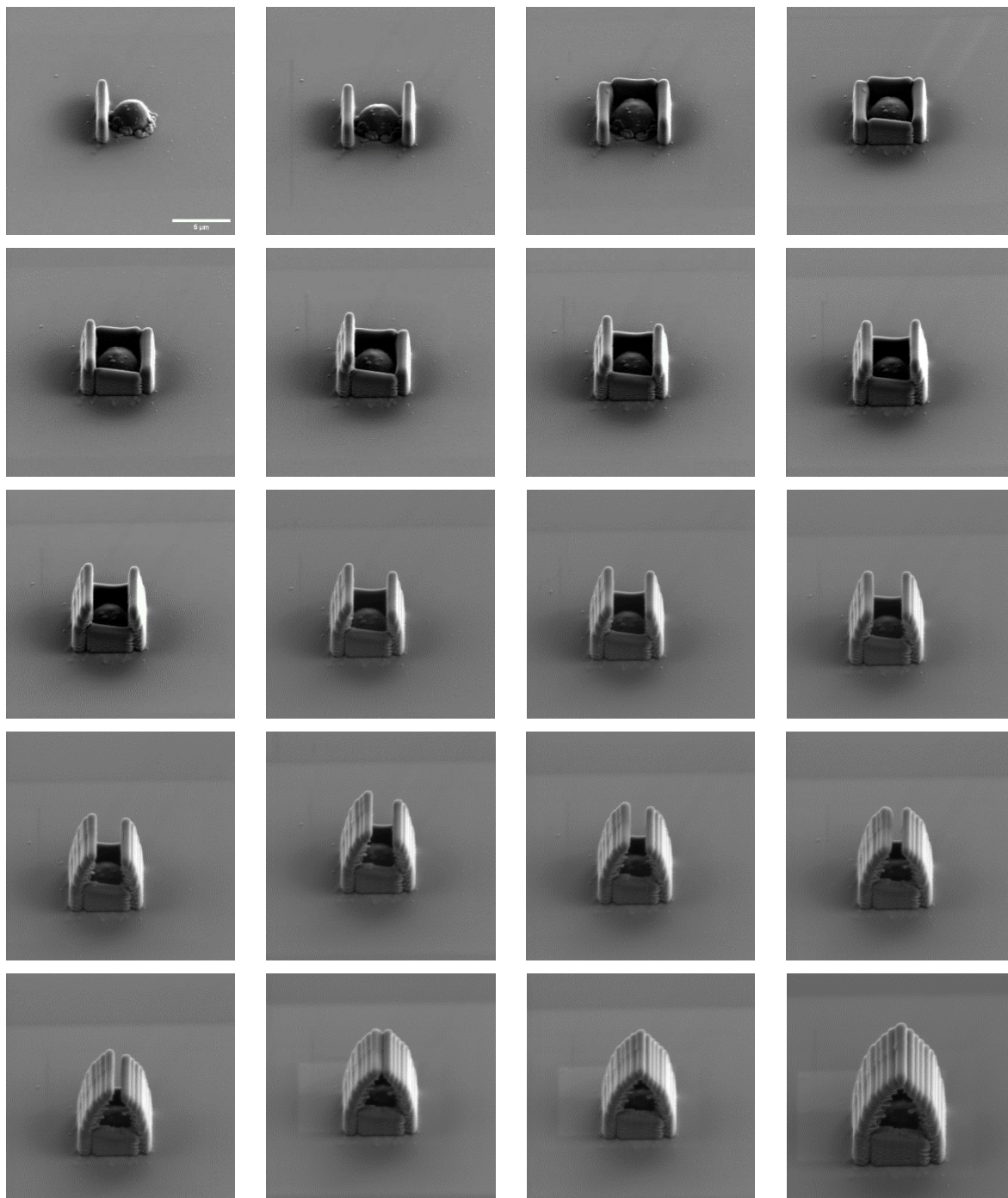
Spory druhu *A. alternata* vykazují vlastnosti vysoce stabilní mikroskopické houby pro tomografické snímání prostřednictvím FIB-SEM. Bylo v nich také možné nejlépe detekovat vnitřní strukturu buněk. Oproti tomu *A. niger*, *F. culmorum* a *F. graminearum* v rámci tomografie nevykazovaly výraznou vnitřní strukturu. Jde ovšem o velmi drobné mikroskopické objekty s velmi jemnou a křehkou strukturou. Cílem studie bylo zobrazení vzorků v dehydrovaném stavu s co nejmenší zátěží dodatečných úprav. Lze předpokládat, že v případě možné aplikace barviva by bylo možné vydekorovat některé z vnitřních struktur buněk.

## 8 FIB-SEM tomografie *Candida albicans*

### 8.1 Metody

V rámci disertační práce byly také provedeny experimenty s tomografií na *Candida albicans*. Nejprve byly provedeny řezy na dehydrovaných nebarvených vzorcích buněk. Jak bylo experimentálně zjištěno, mikroorganismus je však oproti mikromicetům *A. alternata*, *A. niger*, *F. culmorum* a *F. graminearum* výrazně citlivější na poškození elektronovým i iontovým svazkem. Vlivem delšího působení iontového svazku tak při experimentech docházelo k poškození povrchu buněk, jejich bobtnání a „vypalování“. Proto byly uvažovány a následně realizovány ochranné obálky představující bariéru expozici iontového a elektronového svazku na aktuálně nesnímané a neřezané plochy. Ochranné obálky byly vytvořeny prostřednictvím metody IBID (viz. text v kap. 6.4), která umožňuje vytváření struktur a objektů iontově asistovanou depozicí z plynné fáze. V případě experimentů byl pracovním plynem (prekurzorem) Fenanthren, pomocí kterého byl v místě expozice FIB svazkem deponován uhlík. Po experimentech s přímým pokrytím buněk bylo pro lepší ochranu zvolen útvar ve tvaru domku, neboť byl pro buňky bezkontaktní a buňky tak nebyly ovlivněny přímým stykem s iontovým svazkem. Příklady sekvencí přípravy ochranných schránek jsou uvedeny na Obr. 82 a Obr. 83. FIB-SEM tomografické řezy byly pak provedeny v manuálním režimu stejně, jako v kapitole 7.1.





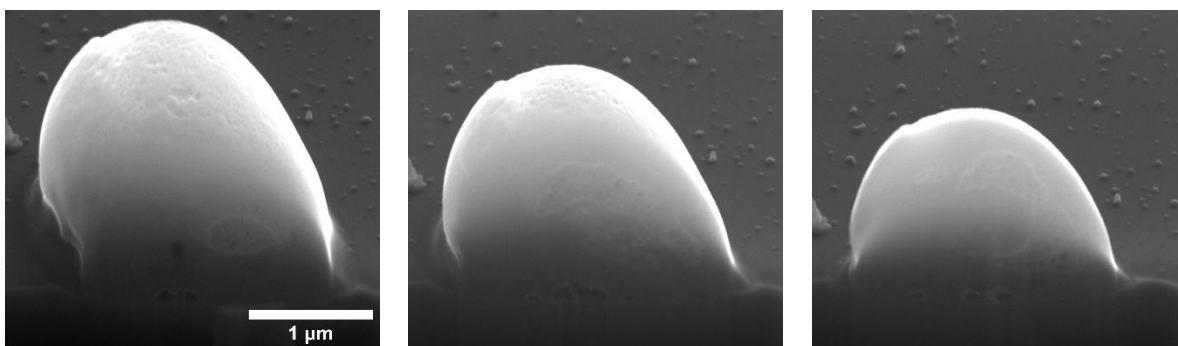
Obr. 82: GIS příprava ochranných schránek pro FIB tomografii buňky *Candida albicans*.



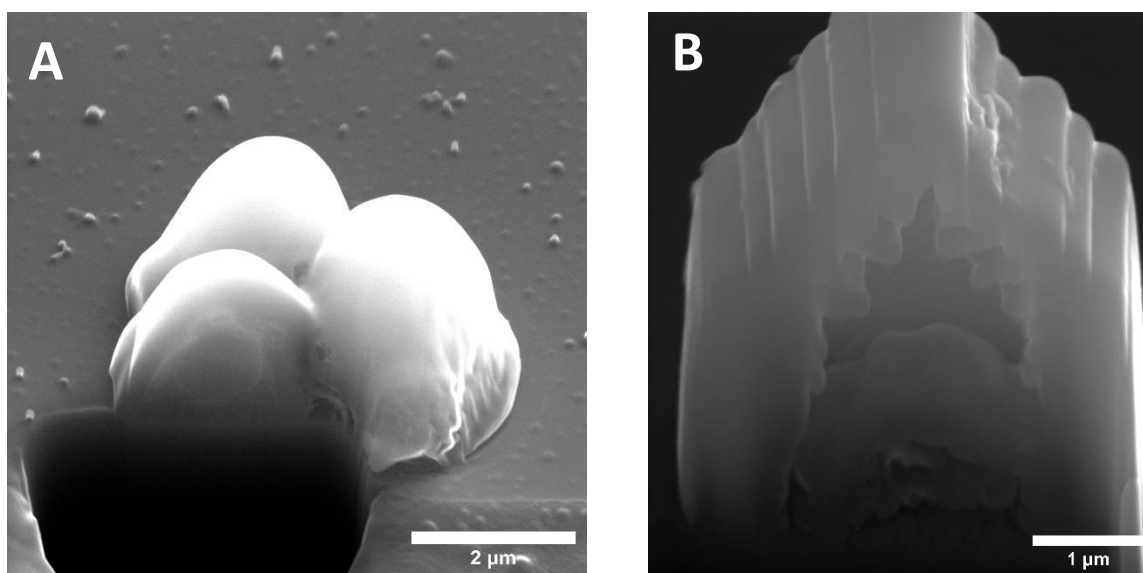
Obr. 83: GIS příprava ochranných schránek pro FIB tomografii buňky *Candida albicans*.

## 8.2 Dílčí výsledky a diskuse

Buňky byly pro zachování stavu co nejbližšího přirozenému dehydrovány a jejich struktura byla neobarvena žádnými aditivními látkami. Provedením tomografických řezů buňkami *Candida albicans* byly získány snímky, které v uvedených případech vykazují náznaky organel. Ovšem vzhledem k nízkému kontrastu mezi jednotlivými strukturami nelze s jistotou detekovat, o které organely se jedná. Bylo tomu tak v případě řezů buňkami bez ochranných obálek (Obr. 84, Obr. 85 A), tak buněk v ochranných obálkách (Obr. 85 B). Uvedené jsou snímky, u kterých byly viditelné neidentifikovatelné vnitřní struktury. V převládající skupině provedených případů nebyl vnitřní obsah viditelný a kontrast jednotlivých organel nebyl dostatečný k vizualizaci vnitřních struktur.



Obr. 84: Tomografie *C. albicans* bez ochranné obálky.



Obr. 85: Tomografický řez *C. albicans* bez ochranné obálky (A) a s ochrannou obálkou (B).

## 9 Přínos studie pro biomedicínské inženýrství

Předložená práce přináší unikátní data o, v současné době nedostatečně prozkoumané, problematice vizualizace deformit a dopadů vlivu působení účinku stříbrných nanočástic biosyntetizovaných inovativní metodou z extraktu letorostů *V. vinifera* na mikroorganismus *Candida albicans* a reprodukovatelně první data o účincích nízkoteplotního plazmatu na mikromyceta druhů *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* a *Fusarium graminearum*. Z pohledu použitých experimentálních metod je disertační práce založena na kombinaci mikroskopických metod SEM, STEM-in-SEM, AFM a FIB-SEM.

- Přínosem mikroskopických metod SEM, STEM-in-SEM a AFM je získání informací o morfologii nově biosyntetizovaných nanočástic, které nebyly doposud známy ani publikovány a přispěly k výběru vhodného účinného typu polydisperzních nanočástic, jehož výzkum působení na *C. albicans* v současné době pokračuje s aplikačním cílem v nemocničním prostředí (léčiva, antifungální obvazy, nátěry a úpravy povrchů).
- Přínos metody SEM pro detailní hodnocení dopadu NTP na hyfální strukturu biofilmů a spor mikromycet druhů *A. alternata*, *A. niger*, *F. culmorum* a *F. graminearum* napomáhá v hodnocení účinnosti NTP. Konkrétně experimentálně zjištěná účinnost NTP je využitelná pro veterinární i humánní léčbu fungálních onemocnění kůže a zároveň je využitelná pro sterilizaci a dekontaminaci povrchů, kde, jak bylo zjištěno ve spolupráci s Ústavem biotechnologie při VŠCHT, je běžně využívané UV záření zcela neúčinné (224), [226]. Součástí disertační práce je také zhodnocení vlivu pokovení na mikroskopii uvedených mikromycet na základě experimentálních zkušeností, které mohou přinést poznatky o způsobu přípravy těchto typů vzorků pro další experimenty.
- Přínosem FIB-SEM tomografie provedené v ručním i automatickém režimu je zobrazení vnitrobuněčných struktur a stanovení dopadů NTP na vnitřní uspořádání spor vybraných mikromycet. V případě tomografických řezů *C. albicans* pak byly provedeny experimenty s aplikací ochranných obálek za účelem možnosti vizualizace jejich vnitřních struktur bez poškození vnější membrány iontovým svazkem a přináší poznatky pro budoucí reprodukovatelnost tohoto typu experimentů.

## 10 Závěr

Hlavním cílem předkládané disertační práce bylo rozšířit poznání vlivu antimikrobiálních a antifungicidních metod na různé typy lidských patogenů prostřednictvím získání dat ze skenovací elektronové mikroskopie a dalších mikroskopických metod, jakými jsou mikroskopie atomárních sil. Experimentální část byla rozdělena do tří hlavních tematických celků:

V první části byly na základě snímků pořízených metodou SEM a STEM-in-SEM a následného zpracování analýzy obrazu v programu FIJI/ImageJ charakterizovány biosyntetizované stříbrné nanočástice dispergované v různých nosných médiích. **Byly získány informace o kruhovitosti, průměru i distribuci velikosti syntetizovaných nanočástic.** Dále byly pozorovány metodou SEM důsledky interakce nanočástic s vybraným patogenem druhu *C. albicans*. **Byl prokázán fungistatický účinek uvedených nanočástic** včetně vlivu na buněčné kultury. Jedním z důležitých výsledků této studie je **zjištění vyšší fungistatické účinnosti polydisperzních biosyntetizovaných nanočástic v porovnání s monodisperzními.** Z pohledu mikroskopie biologických objektů bylo dosaženo nalezení nastavení SEM, při kterém bylo možné zobrazovat stříbrné nanočástice na kvasinkách *C. albicans* bez nutnosti pokovení či nanesení vrstvy uhlíku. Mikroskopie SEM byla doplněna metodou AFM, kde **byl prokázán výskyt stříbrných nanočástic na povrchu buněk *C. albicans*.**

Druhá část byla věnována studiu důsledků vlivu nízkoteplotního plazmatu na mikromycetní biofilmy a spory *A. alternata*, *A. niger*, *F. culmorum* a *F. graminearum* prostřednictvím SEM. **Výsledky ukazují, že NTP představuje novou a účinnou alternativu k v současné době používaným metodám antifungálních přípravků nejen biofilmů, ale zejména velmi odolných mikromycetních spor.** Dále byl studován vliv pokovení studovaných vzorků mikromycet na kvalitu SEM zobrazení těchto typů vzorků. Taktéž byly snímky mikromycet v BSE režimu porovnány s, v této práci dominantní, SE detekcí. Současně byla prokázána odolnost buněčných obalů mikromycetních spor vůči Ga-FIB. **Bylo tedy možné pracovat s FIB bez nutnosti nanesení ochranných obálek prosycených implantovaným Ga.** Tyto výsledky jsou metodickým přínosem pro SEM zobrazování mikromycet.

Třetí část přináší tomografické snímky spor mikromycet *A. alternata*, *A. niger*, *F. culmorum* a *F. graminearum*. Získané snímky metodou FIB-SEM tomografie v manuálním a automatickém režimu přináší informace o působení NTP na vnitřní struktury buněk. Zejména u druhu *A. alternata* je dobře patrné vnitřní uspořádání buněčné struktury včetně členění sept. Buňky byly snímány v dehydrovaném stavu bez přidání barviv zvýrazňujících organely, aby byly zachovány v co nejpřirozenějším stavu. **Získané informace rozšiřují představy o vnitřním uspořádání spor mikromycet uvedených druhů a dokládají rozsah působení NTP nejen na povrch buněčných obalů, ale také na jejich vnitřní strukturu.** Dále byla aplikována metodika IBID přípravy ochranných obálek buněk *Candida albicans*, které jsou velmi citlivé na delší expozici elektronovým a iontovým svazkem. Tomografické řezy, které byly provedeny, však neumožňují s jistotou identifikovat jednotlivé organely vnitřního uspořádání buněk.

Nicméně metodika může poskytnout námět pro další experimentální zkoumání vnitřků buněk metodou FIB-SEM.

Data získaná v disertační práci dále potvrdila antimikrobiální působení uvedených typů nového typu biosyntetizovaných stříbrných nanočástic na *C. albicans* a fungicidní efekt NTP na mikromycetní druhy *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* a *Fusarium graminearum* včetně vizualizace důsledků jeho aplikace. **Prokázání účinnosti těchto metod posouvá znalosti výzkumu a vývoje efektivních prostředků v boji proti rezistentním patogenům, jejichž prostředky k eliminaci jsou v současné době omezené.**

## Seznam prací disertanta vztahujících se k disertaci

Rabočová, M., Kulišová, M., Lorinčík, J., et al. Assessing the antimicrobial efficacy of nonthermal plasma treatment on filamentous fungi spores and biofilms. *Food Control*. 2024, 163. ISSN 0956-7135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2024.110522.

Kulišová, M., Rabočová, M., Lorinčík, J., et al. Exploring non-thermal plasma and UV radiation as biofilm 2 control strategies against foodborne filamentous fungal contaminants. *Foods*. 2024, 13 (7). DOI: 10.3390/foods13071054.

Miškovská, A., Rabočová, M., Michailidu, J. et. al. 2022. Antibiofilm activity of silver nanoparticles biosynthesized using viticultural waste. *PLOS ONE*. 2022, 17 (8). DOI: 10.1371/journal.pone.0272844.

Kulišová, M., Rabočová, M., Lorinčík, J., et al. Comparative assessment of UV radiation and non-thermal plasma for elimination of foodborne fungal spores. *RSC Advances*. Submitted 3/2024.

## Reference

1. Malik, S., Kishore, S., Kumar, S. A., et al. Chapter 12 - Role of bacteria in biological removal of environmental pollutants. [autor knihy] M. P., Vyas, B. R. M. Shah. *Emerging Technologies in Applied and Environmental Microbiology, A volume in Developments in Applied Microbiology and Biotechnology*. místo neznámé : Academic Press, 2023.
2. Richardson, J. P. *Candida albicans: A Major Fungal Pathogen of Humans*. *Pathogens*. 2022, Sv. 4, 11.
3. Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., et al. Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018, 4.
4. Bullerman, L. B. Mycotoxins, Classification. [autor knihy] R. K. Robinson. *Encyclopedia of Food Microbiology*. místo neznámé : Academic Press, 1999.
5. Pitt, J. I. Chapter 30 - Mycotoxins. [autor knihy] J. G., Potter, M. E. Morris. *Foodborne Infections and Intoxications, A volume in Food Science and Technology*. místo neznámé : Academic Press, 2013.
6. World Health Organization. Mycotoxins. *World Health Organization*. [Online] 2. 9 2023. [Citace: 31. 3 2024.] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>.
7. Bertero, A., Moretti, A., Spicer, L. J., et al. Fusarium Molds and Mycotoxins: Potential Species-Specific Effects. *Toxins*. 2018, Sv. 6, 10.
8. Ostrý, V. Mikromycety, mykotoxiny a zdraví člověka. *Odborný časopis Časopis lékařů českých*. 1999, Sv. 17, 138.
9. Seneviratne, Ch. J., Rosa, E. A. R. Editorial: Antifungal Drug Discovery: New Theories and New Therapies. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7.
10. Software company AKVIS. AKVIS Coloriage. [Online] 2022. [www.akvis.com](http://www.akvis.com).
11. Kernien, J. F., Snarr, B. D., Sheppard, D. C., et al. The Interface between Fungal Biofilms and Innate Immunity. *Frontiers in Immunology*. 2018, 8.
12. Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., et al. Fungal Biofilm Resistance. *International Journal of Microbiology*. 2012, Sv. 2012.
13. Kungwani, N., Shukla, S. K., Rao, T. S., et al. Chapter 28 - Biofilm-mediated bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current status and future perspectives. [autor knihy] D., Dash, H. R. Surajit. *Microbial Biodegradation and Bioremediation, Techniques and Case Studies for Environmental Pollution*. 2. místo neznámé : Elsevier, 2022, stránky 547-570.



14. Samreen, Roy, D. N., Ahmad, I. Chapter 4 - Combating biofilm of ESKAPE pathogens from ancient plant-based therapy to modern nanotechnological combinations. [autor knihy] R. Dijendra. *A Complete Guidebook on Biofilm Study*. místo neznámé : Academic Press, 2022, stránky 59-94.
15. Garipov, M. R., Sabirova, A. E., Pavelyev, R. S., et al. Targeting pathogenic fungi, bacteria and fungal-bacterial biofilms by newly synthesized quaternary ammonium derivative of pyridoxine and terbinafine with dual action profile. *Bioorganic Chemistry*. 2020, Sv. 104.
16. Di Domenico, E. G., Cavallo, I., Caitanio, B., et al. Staphylococcus aureus and the Cutaneous Microbiota Biofilms in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Microorganisms*. 2019, Sv. 7, 9.
17. Biosvert, A. A., Cheng, M. P., Sheppard, D. C., et al. Microbial Biofilms in Pulmonary and Critical Care Diseases. *Annals of the American Thoracic Society*. 2016, Sv. 13, 9, stránky 1615-1623.
18. Høiby, N., Ciofu, O., Bjarnsholt, T. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology*. 2010, Sv. 5, 11, stránky 1663-1674.
19. Motta, J., P., Wallace, J., L., Buret, A. G., et al. Gastrointestinal biofilms in health and disease. *Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2021, Sv. 18, 5, stránky 314-334.
20. Frost, L. R., Cheng, J. K. J., Unnikrishnan, M. Clostridioides difficile biofilms: A mechanism of persistence in the gut? *PLOS Pathogens*. 2021, Sv. 17, 3.
21. Frédéric, L., Michel, B., Selena, T. Oral Microbes, Biofilms and Their Role in Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Materials*. 2018, Sv. 11, 10.
22. Lila Abu, A. S., Rajab, A. A. H., Abdallah, M. H., et al. Biofilm Lifestyle in Recurrent Urinary Tract Infections. *Life (Basel)*. 2023, Sv. 13, 1.
23. Brady, R. A., Leid, J. G., Calhoun, J. H., et al. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2008, Sv. 52, 1, stránky 13-22.
24. Niedzielski, A., Chmielik, L. P., Stankiewicz, T. The Formation of Biofilm and Bacteriology in Otitis Media with Effusion in Children: A Prospective Cross-Sectional Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021, Sv. 18, 7.
25. Fastenberg, J. H., Hsueh, W. D., Mustafa, A., et al. Biofilms in chronic rhinosinusitis: Pathophysiology and therapeutic strategies. *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2016, Sv. 2, 4, stránky 219-229.
26. Yi, K., Rasmussen, A. W., Gudlavalleti, S. K., Stephens, D. S., et al. Biofilm Formation by Neisseria meningitidis. *Infection and Immunity*. 2004, Sv. 72, 10.
27. Tapia, G., Yee, J. Biofilm: Its Relevance In Kidney Disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*. 2006, Sv. 13, 3, stránky 215-224.
28. Yadav, M., K., Vidal, J. E., Song, J-J. Chapter 2 - Microbial biofilms on medical indwelling devices. [autor knihy] M. K., Singh, B. P. Yadav. *New and Future Developments in Microbial*

*Biotechnology and Bioengineering, Microbial Biofilms: Current Research and Future Trends.* místo neznámé : Elsevier, 2020, stránky 15-28.

29. Raja, N. S. Epidemiology, risk factors, treatment and outcome of Candida bloodstream infections because of Candida albicans and Candida non-albicans in two district general hospitals in the United Kingdom. *International Journal of Clinical Practice.* Sv. 75, 1.

30. Organization, World Health. *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.* místo neznámé : World Health Organization, 2022. 978-92-4-006024-1.

31. Lord, A. K., Vyas, J. M. 29 - Host Defenses to Fungal Pathogens. [autor knihy] R. R., Shearer, W. T., Frew, A. J., et al. Rich. *Clinical Immunology, Principles and Practice.* místo neznámé : Elsevier, 2019, stránky 413-424.e1.

32. Bouz, G., Doležal, M. Advances in Antifungal Drug Development: An Up-To-Date Mini Review. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021, Sv. 14, 12.

33. Scorzoni, L., de Paula e Silva, A. C. A., Marcos, C. M., et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Frontiers in Microbiology.* 2017, 08.

34. Zhai, S-Y., Kong, M. G., Xia, Y-m. Cold Atmospheric Plasma Ameliorates Skin Diseases Involving Reactive Oxygen/Nitrogen Species-Mediated Functions. *Frontiers in Immunology.* 2022, Sv. 13.

35. Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., et al. Candida albicans—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of Fungi.* 2021, Sv. 7, 2.

36. Costa-de-Oliveira, S., Rodrigues, A. G. Candida albicans Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. *Microorganisms.* 2020, Sv. 8, 2.

37. Fonseca do Carmo, P. H., Garcia, M. T., Figueiredo-Godoi, L. M. A., et al. Metal Nanoparticles to Combat Candida albicans Infections: An Update. *Microorganisms.* 2023, Sv. 1, 11.

38. Bhattacharya, S., Sae-Tia, S., Fries, B. C. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics.* 2020, Sv. 9, 6.

39. Raza, S., Ansari, A., Siddiqui, N. N., et al. Biosynthesis of silver nanoparticles for the fabrication of non cytotoxic and antibacterial metallic polymer based nanocomposite system. *Scientific Reports.* 2021, 11.

40. Rajoriya, P., Barcelos, M. C. S., Ferreira, D. C. M., et al. Green Silver Nanoparticles: Recent Trends and Technological Developments. *Journal of Polymers and the Environment.* 2021, Sv. 29, stránky 2711-2737.

41. Gherasim, O., Puiu, R. A., Bîrcă, A. C., et al. An Updated Review on Silver Nanoparticles in Biomedicine. *Nanomaterials.* 2020, Sv. 10, 11.

42. Burdusel, A-C., Gherasim, O., Grumezescu, A. M., et al. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials (Basel)*. 2018, Sv. 8, 9.
43. Murtaza, B., Wang, L., Li, X., et al. Cold plasma: A success road to mycotoxins mitigation and food value edition. *Food Chemistry*. 2024, Sv. 445.
44. Veerana, M., Yu, N., Ketya, W., et al. Application of Non-Thermal Plasma to Fungal Resources. *Journal of Fungi (Basel)*. 2022, Sv. 2, 8.
45. Hoppanová, L., Kryštofová, S. Nonthermal Plasma Effects on Fungi: Applications, Fungal Responses, and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, Sv. 19, 23.
46. Mravlje, J., Kobla, T., Regyar, M., et al. The Sensitivity of Fungi Colonising Buckwheat Grains to Cold Plasma Is Species Specific. *Journal of Fungi (Basel)*. 2023, Sv. 6, 9.
47. Stukenbrock, E., Gurr, S. Fungal infections of crops threaten global food security. *Max Planck Institute for Evolutionary Biology*. [Online] 3. 5 2023. [Citace: 29. 3 2024.] <https://www.evolbio.mpg.de/3677241/fungal-infections-of-crops-threaten-global-food-security>.
48. Baliukoniene, V., Bakutis, B., Stankevicius, H. Mycological and mycotoxicological evaluation of grain. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. [Online] 2023. [Citace: 29. 3 2024.] <https://www.aaem.pl/pdf-72844-24882?filename=Mycological%20and.pdf.1232-1966>.
49. Bennett, J. W., Klich, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003, Sv. 3, 16, stránky 497-516.
50. Moszczyńska, J., Roszek, K., Wiśniewski, M. Non-Thermal Plasma Application in Medicine—Focus on Reactive Species Involvement. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, Sv. 16, 24.
51. Scholtz, V., Vaňková, E., Kašparová, P., et al. Non-thermal Plasma Treatment of ESKAPE Pathogens: A Review. *Frontiers in Microbiology*. 2021, 12.
52. Polčic, P., Machala, Z. Effects of Non-Thermal Plasma on Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, Sv. 5, 22.
53. Gupta, T. T., Ayan, H. Application of Non-Thermal Plasma on Biofilm: A Review. *Applied Sciences*. 2019, Sv. 9, 17.
54. Allen, T. D., Goldberg, M. W. Scanning Electron Microscopy in Cell Biology. *Encyclopedia of Cell Biology*. 2016, stránky 14-21.
55. Cooper, C., Thompson, A. R. C., Clode, P. L. Investigating parasites in three dimensions: trends in volume microscopy. *Trends in Parasitology*. 2023, Sv. 39, 8.
56. Caffrey, B., Subramaniam, S. Imaging Cellular Architecture in Three Dimensions Through Electron Microscopy. *Encyclopedia of Cell Biology (Second Edition)*. 2023, stránky 51-60.

57. Hughes, L. Issues with biological samples. *Biological Electron Microscopy*. [Online] 2011. [Citace: 11. 12 2023.] <https://www.biologicalelectronmicroscopy.com/biological-sample-preparation-overview.html>.
58. Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Echlin, P., et al. Coating Techniques for SEM and Microanalysis. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Boston : Springer, 1981, stránky 461-494.
59. Hughes, L. Oxford Instruments. *Optimising data acquisition for biological SEM*. [Online] 6. 10 2021. [Citace: 11. 12 2023.] <https://www.oxinst.com/blogs/optimising-data-acquisition-for-biological-sem>.
60. Murtey, M. D., Ramasamy, P. Preparations for Scanning Electron Microscopy – Life Sciences. *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences*. 2016, Sv. 30, 2.
61. Griffin, B. J. Variable Pressure and Environmental Scanning Electron Microscopy. *Electron Microscopy*. 2007, stránky 467-495.
62. Egerton, R. F., Li, P., Malac, M. Radiation damage in the TEM and SEM. *Micron*. 2004, Sv. 35, 6, stránky 399-409.
63. Cosslett, V. E. Radiation damage in the high resolution electron microscopy of biological materials: A review. *Journal of Microscopy*. 1978, Sv. 113, 2, stránky 113-129.
64. Egerton, R. F. Control of radiation damage in the TEM. *Ultramicroscopy*. 2013, Sv. 127, stránky 100-108.
65. Liu, B., Li, X., Hua, Y. et al. Chapter 2 - Electron beam radiation and its impacts to failure analysis in semiconductor industry. [autor knihy] A. S. H., Aliofkhazraei, M. Makhlof. *Handbook of Materials Failure Analysis With Case Studies from the Electronic and Textile Industries*. místo neznámé : Butterworth-Heinemann, 2020, stránky 19-69.
66. Blach, P. S. Electron Beam Damage of Biological Specimens in Liquid-Phase Electron Microscopy. *Dissertation zur Erlangung des Grades der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultäten der Universität des Saarlandes*. [Online] 2022. [Citace: 11. 12 2023.] [https://opus.bsz-bw.de/inmdok/frontdoor/deliver/index/docId/531/file/Scidok\\_2022\\_Blach\\_compressed.pdf](https://opus.bsz-bw.de/inmdok/frontdoor/deliver/index/docId/531/file/Scidok_2022_Blach_compressed.pdf).
67. Marks, S. Oxford Instruments. *Carbon Contamination – What is that black mark on my sample and how do I remove it?* [Online] 29. 11 2023. [Citace: 11. 12 2023.] <https://www.oxinst.com/blogs/how-to-reduce-carbon-contamination-when-working-at-low-kv>.
68. Soong, Ch., Woo, P., Hoyle, D. Contamination cleaning of TEM/SEM samples with the ZONE cleaner. *Microscopy Today*. 2012, Sv. 20, 6, stránky 44-48.
69. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022*. World Health Organization and the European Centre for Disease Prevention and Control. Copenhagen : WHO Regional Office for Europe, 2022. 978-92-890-5668-7.

70. World Health Organization - Departmental news. Lack of innovation set to undermine antibiotic performance and health gains. [Online] WHO, 22. 6 2022. [Citace: 19. 7 2022.] <https://www.who.int/news/item/22-06-2022-22-06-2022-lack-of-innovation-set-to-undermine-antibiotic-performance-and-health-gains>.
71. Vokurka, H., Hugo, J. *Velký lékařský slovník*. Praha : Maxdorf, 2015. 978-80-7345-456-2.
72. Kocmanová, I. Invazivní mykotické infekce. *Onkologie*. 2014, Sv. 8, 4.
73. Li, Y., Yang, J., Li, X. et. al. The effect of Ginkgolide B combined with fluconazole against drug-resistant *Candida albicans* fluconazole against drug-resistant *Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2020, Sv. 56, 2.
74. Tichý, J. Invazivní mykotické infekce na jednotkách intenzivní péče. *Medical Tribune*. 2009, 4/2009.
75. Haber, J., Ráčil, Z., Mallátová, N. et. al. Léčba invazivní kandidózy - doporučení odborných společností. *Vnitřní lékařství*. 2008, Sv. 54, 12.
76. FIJI/ImageJ. Java 1.8.0\_66 (64-bit). místo neznámé : Property rights: Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, USA.
77. Vokurka, H., Hugo, J. et. al. *Velký lékařský slovník*. Praha : Maxdorf s.r.o., 2005. 80-7345-058-5.
78. McCarty, T. P., Pappas, P. G. Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2016, Sv. 30, 1.
79. Walker, G. M. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. místo neznámé : Academic Press, 2009. 9780123739445.
80. Mba, I. E., Nweze, E. I., Eze, E. A. Genome plasticity in *Candida albicans*: A cutting-edge strategy for evolution, adaptation, and survival. *Infection, Genetics and Evolution*. 2022, Sv. 99.
81. Evans, B. A., Pickerill, E. S., Vyas, V. K. et. al. CRISPR-mediated Genome Editing of the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Journal of visualized experiments*. 2019, 141.
82. Evans, B. A., Bernstein, D. A. SpRY Cas9 Can Utilize a Variety of Protospacer Adjacent Motif Site Sequences To Edit the *Candida albicans* Genome. *MSPHERE*. 2021, Sv. 6, 3.
83. Marton, T., Maufrais, C., D'Enfert, C. et. al. Use of CRISPR-Cas9 To Target Homologous Recombination Limits Transformation-Induced Genomic Changes in *Candida albicans*. *MSPHERE*. 2020, Sv. 5, 5.
84. Roman, E., Coman, I., Prieto, D. et. al. Implementation of a CRISPR-Based System for Gene Regulation in *Candida albicans*. *MSPHERE*. 2019, Sv. 4, 1.
85. Rollenhagen, C., Agyeman, H., Eszterhas, S. et. al. *Candida albicans* ENT2 Contributes to Efficient Endocytosis, Cell Wall Integrity, Filamentation, and Virulence. *MSPHERE*. 2021, Sv. 6, 5.

86. Halder, V., Porter, C. B. M., Chavez, A. et. al. Design, execution, and analysis of CRISPR-Cas9-based deletions and genetic interaction networks in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Nature Protocols*. 2019, Sv. 14, 3.
87. Abdulghami, M., Iram, R., Childrawar, P. et. al. Proteomic profile of *Candida albicans* biofilm. *Journal of Proteomics*. 2022, Sv. 256.
88. Sayuri Arita, G., Vincenzi Conrado, P. C., Mayumi Sakita, K. et. al. Serial systemic candidiasis alters *Candida albicans* macromorphology associated with enhancement of virulence attributes. *Microbial Pathogenesis*. 2022, Sv. 164.
89. Gharaghani, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Hardani, A. K. et. al. Pediatric candiduria, epidemiology, genotype distribution and virulence factors of *Candida albicans*. *Microbial Pathogenesis*. 2021, Sv. 160.
90. Gulati, M., Clarissa, J. N. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*. 2016, Sv. 18, 5.
91. Kvasničková, E. Biofilmy: Život mikroorganismů v jednotném společenství. [Online] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 31. 10 2016. <https://www.vscht.cz/popularizace/doktorandi-pisou/biofilmy>.
92. Kvasničková, E., Mařátková, O., Čejková, A. et. al. Evaluation of baicalein, chitosan and usnic acid effect on *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* biofilm using a Cellavista device. *Journal of Microbiological Methods*. 2015, Sv. 118.
93. Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D. et. al. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. 2018, Sv. 16, 1.
94. Rapala-Kozik, M., Zawrotniak, M., Gogol, M. et. al. Interactions of *Candida albicans* Cells with Aerobic and Anaerobic Bacteria during Formation of Mixed Biofilms in the Oral Cavity. [autor knihy] D. Sandai. *Candida Albicans*. London : IntechOpen, 2018.
95. Biazi de Lapena, S. A., Terra-Garcia, M., Araújo da Costa Ward, R. et. al. Enhancing effect of chitosan on methylene blue-mediated photodynamic therapy against *C. albicans*: A study in planktonic growth, biofilms, and persister cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2022, Sv. 38.
96. Bor-Sen, Ch. Chapter 6 - Global screening of potential *Candida albicans* biofilm-related transcription factors by network comparison via big database mining and genome-wide microarray data identification. *Systems Immunology and Infection Microbiology*. místo neznámé : Academic Press, 2021, stránky 135-155.
97. Sakuma de Oliveira, C., Colombo, A. L., Francisco, E. C. et. al. Clinical and epidemiological aspects of Candidemia in eight medical centers in the state of Parana, Brazil: Parana Candidemia Network. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2021, Sv. 25, 1.
98. Svobodová, L. *Diferenciace lékařsky významných kvasinek druhu *Candida pelliculosa*, *Candida utilis* a *Candida fabianii**. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Disertační práce (Ph.D.), 2016.

99. Kullberg, B. J., Arendrup, M. Invasive Candidiasis. *The New England Journal of Medicine*. 2015, Sv. 373, 15.
100. Koehler, P., Stecher, M., Cornely, O. A. et. al. Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019, Sv. 25, 10.
101. Vannini, M., Emery, S., Lieutier-Colas, F., et. al. Epidemiology of candidemia in NICE area, France: A five-year study of antifungal susceptibility and mortality. *Journal of Medical Mycology*. 2022, Sv. 32, 1.
102. Xiao, Z., Wang, Q., Zhu, F., et. al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and mortality risk factors of candidemia among critically ill patients: a retrospective study from 2011 to 2017 in a teaching hospital in China. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2019, Sv. 8, 1.
103. Papadimitriou-Olivergeris, M., Kolonitsiou, F., Kefala, S. et. al. Increased incidence of candidemia in critically ill patients during the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pandemic. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2022, Sv. 26, 2.
104. Görkem, A., Sav, H., Kaan, Ö. et. al. Coronavirus disease and candidemia infection: A case report. *Journal of Medical Mycology*. 2021, Sv. 31, 3.
105. Borman, A. M., Fountain, H., Guy, R. et. al. Increased mortality in COVID-19 patients with fungal co- and secondary infections admitted to intensive care or high dependency units in NHS hospitals in England. *Journal of Infection*. 2022, Sv. 84, 4.
106. Ayalon, O., Cohen, M. J., Orenbuch-Harroch, E. et. al. Invasive fungal infections in critically ill COVID-19 patients in a large tertiary university hospital in Israel. *Journal of Critical Care*. 2022, Sv. 69.
107. Camargo Martins, A., Molina Psaltikidis, E., Cristiano de Lima, T. et. al. COVID-19 and invasive fungal coinfections: A case series at a Brazilian referral hospital. *Journal of Medical Mycology*. 2021, Sv. 31, 4.
108. Sánchez Martín, C., Maderid Martínez, E., González Pellicer, R., et. al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute respiratory syndrome by COVID-19. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación (English Edition)*. 2022, Sv. 69, 1.
109. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. ČSN P CEN ISO/TS 27687. *Nanotechnologie - Termíny a definice nanoobjektů - Nanočástice, nanovlákná a nanodeska*. Praha : autor neznámý, 2011. 012011.
110. Kumar, J. A., Krithiga, T., Manigandan, S. et. al. A focus to green synthesis of metal/metal based oxide nanoparticles: Various mechanisms and applications towards ecological approach. *Journal of Cleaner Production*. 2021, Sv. 324.
111. Li, L., Zeng, Y., Liu, G. Metal-based nanoparticles for cardiovascular disease diagnosis and therapy. *Particuology*. 2023, Sv. 72.

112. Jiang, X., He, Ch., Wenbin, L. Supramolecular metal-based nanoparticles for drug delivery and cancer therapy. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2021, Sv. 61.
113. Wang, F., Zhang, H., Zhang, Z. et. al. Carbonized wood membrane decorated with AuPd alloy nanoparticles as an efficient self-supported electrode for electrocatalytic CO<sub>2</sub> reduction. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2022, Sv. 607.
114. Binandeh, M. Performance of unique magnetic nanoparticles in biomedicine. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 2022, Sv. 6.
115. Chou, W., Fang, P., Chiang, W. et. al. Room temperature ferromagnetism in Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle-embedded polymer semiconductors. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 2022, Sv. 167.
116. Mahato, R. Multifunctional Micro- and Nanoparticles. *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices*. 2017.
117. Voráčková, I. Nanotechnologie v bioanalýze, nanočástice vykazující luminiscenci a jejich využití v analytické chemii. *Trendy v analytické chemii*. Brno : Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., 2013.
118. Bajorowicz, B., Kobylański, M. P., Gołębiewska, A. et. al. Quantum dot-decorated semiconductor micro- and nanoparticles: A review of their synthesis, characterization and application in photocatalysis. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2018, Sv. 256.
119. Bigaj-Józefowska, M. J., Grześkowiak, B. F. Polymeric nanoparticles wrapped in biological membranes for targeted anticancer treatment. *European Polymer Journal*. 2022, Sv. 176.
120. Farokhzad, O. C., Langer, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*. 2009, Sv. 3, 1.
121. Guerrero Correa, M., Martínez, F. B., Vidal, C. P. et. al. Antimicrobial metal-based nanoparticles: a review on their synthesis, types and antimicrobial action. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2020, 11.
122. Mishra, A., Pradhan, D., Hlader, J. et. al. Metal nanoparticles against multi-drug-resistance bacteria. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2022.
123. Abdoli, M., Mohammadi, G., Mansouri, K. et. al. A review on anticancer, antibacterial and photo catalytic activity of various nanoparticles synthesized by probiotics. *Journal of Biotechnology*. 2022, Sv. 354.
124. Calabrese, C., La Parola, V., Testa, M. L. et. al. Antifouling and antimicrobial activity of Ag, Cu and Fe nanoparticles supported on silica and titania. *Inorganica Chimica Acta*. 2022, Sv. 529.
125. Lu, L., Sun, R. W., Chen, R. et. al. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral Therapy*. 2008, Sv. 13, 2.



126. García-Serradialla, M., Risco, C. Light and electron microscopy imaging unveils new aspects of the antiviral capacity of silver nanoparticles in bunyavirus-infected cells. *Virus Research*. 2021, Sv. 302.
127. Lara, H. H., Ayala-Nuñez, N. V., Ixtepan-Turrent, L. et. al. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*. 2010, Sv. 8.
128. Rajkumar, G., Sundar, R. Biogenic one-step synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using an aqueous extract of *Persea americana* seed: Characterization, phytochemical screening, antibacterial, antifungal and antioxidant activities. *Inorganic Chemistry Communications*. 2022, Sv. 143.
129. Al-Otibi, F., Alfuzan, S. A., Alharbi, R. I. et. al. Comparative study of antifungal activity of two preparations of green silver nanoparticles from *Portulaca oleracea* extract. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2022, Sv. 29, 4.
130. Ajaz, S., Ahmed, T., Shahid, M. et. al. Bioinspired green synthesis of silver nanoparticles by using a native *Bacillus* sp. strain AW1-2: Characterization and antifungal activity against *Colletotrichum falcatum* Went. *Enzyme and Microbial Technology*. 2021, Sv. 144.
131. Alavi, A., Pragathi, K., McClements, D. J. et. al. Metal and metal oxide-based antiviral nanoparticles: Properties, mechanisms of action, and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2022, Sv. 306.
132. Nizamov, S., Sazdovska Dimchevska, S., Mirsky, V. M. A review of optical methods for ultrasensitive detection and characterization of nanoparticles in liquid media with a focus on the wide field surface plasmon microscopy. *Analytica Chimica Acta*. 2022, Sv. 1204.
133. Begum, T., Follett, P. A., Mahmud, J. et. al. Silver nanoparticles-essential oils combined treatments to enhance the antibacterial and antifungal properties against foodborne pathogens and spoilage microorganisms. *Microbial Pathogenesis*. 2022, Sv. 164.
134. Crisan, C. M., Mocan, T., Manolea, M. et. al. Review on Silver Nanoparticles as a Novel Class of Antibacterial Solutions. *Applied Sciences*. 2021, Sv. 11, 3.
135. Tang, S., Zheng, J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. *Advanced Healthcare Materials*. 2018, Sv. 7, 13.
136. Yang, Y., Waterhouse, G. I. N., Chen, Y., et. al. Microbial-enabled green biosynthesis of nanomaterials: Current status and future prospects. *Biotechnology Advances*. 2022, Sv. 55.
137. Fu, X., Cai, J., Zhang, X. et. al. Top-down fabrication of shape-controlled, monodisperse nanoparticles for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018, Sv. 132.
138. Bommakanti, V., Banerjee, M., Shah, D., et. al. An overview of synthesis, characterization, applications and associated adverse effects of bioactive nanoparticles. *Environmental Research*. 2022, Sv. 214.

139. Aljelehawy, Q., Karimi, N., Alavi, M. Comparison of antibacterial and cytotoxic activities of phytosynthesized ZnONPs by leaves extract of *Daphne mucronata* at different salt sources. *Materials Technology*. 2020, Sv. 36, 12.
140. Hassabo, A. A., Ibrahim, E. I., Ali, B. A. et. al. Anticancer effects of biosynthesized Cu<sub>2</sub>O nanoparticles using marine yeast. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2022, Sv. 39.
141. Shankar, A., Kaushik, N. K., Kumar, A. et. al. Sporotrichum thermophile culture extract-mediated greener synthesis of silver nanoparticles: Eco-friendly functional group transformation and anti-bacterial study. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 2020, Sv. 3.
142. Qiu, R., Xiong, W., Hua, W. et. al. A biosynthesized gold nanoparticle from *Staphylococcus aureus* – as a functional factor in muscle tissue engineering. *Applied Materials Today*. 2021, Sv. 22.
143. Mařátková, O., Michailidu, J., Miřkovská, A., et. al. Antimicrobial properties and applications of metal nanoparticles biosynthesized by green methods. *Biotechnology Advances*. 2022, Sv. 58.
144. Patra, J. K., Baek, K.-H. Green Nanobiotechnology: Factors Affecting Synthesis and Characterization Techniques. *Journal of Nanomaterials*. 2014, Sv. 2014.
145. Khan, A. R., Mamun, M. S. A., Ara, M. H. Review on platinum nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications. *Microchemical Journal*. 2021, Sv. 171.
146. Ying, S., Guan, Z., Ofoegbu, P. C. et. al. Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. *Environmental Technology & Innovation*. 2022, Sv. 26.
147. Taha, R. H. Green synthesis of silver and gold nanoparticles and their potential applications as therapeutics in cancer therapy; a review. *Inorganic Chemistry Communications*. 2022, Sv. 143.
148. Singh, P., Mijakovic, I. Green synthesis and antibacterial applications of gold and silver nanoparticles from *Ligustrum vulgare* berries. *Scientific Reports*. 2022, Sv. 12.
149. Kshtriya, V., Koshti, B., Gour, N. Chapter Four - Green synthesized nanoparticles: Classification, synthesis, characterization, and applications. *Comprehensve Analytical Chemistry*. 2021, Sv. 94.
150. Qamar, S. U. R., Ahmad, J. N. Nanoparticles: Mechanism of biosynthesis using plant extracts, bacteria, fungi, and their applications. *Journal of Molecular Liquids*. 2021, Sv. 334.
151. Patil, R. M., Deshpande, P. P., Aalhate, M. et. al. An Update on Sophisticated and Advanced Analytical Tools for Surface Characterization of Nanoparticles. *Surfaces and Interfaces*. 2022, Sv. 33.
152. Nigam, A., Kala, S. Structural and bioactive properties of iron sulfide nanoparticles synthesized by Green-route. *Materials Today: Proceedings*. 2022.

153. Wilkson, B. K., Prud'homme, R. K. Nanoparticle size distribution quantification from transmission electron microscopy (TEM) of ruthenium tetroxide stained polymeric nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2021, Sv. 604.
154. Kumar, P., Mathpal, M. Ch., Ghosh, S. et. al. Plasmonic Au nanoparticles embedded in glass: Study of TOF-SIMS, XPS and its enhanced antimicrobial activities. *Journal of Alloys and Compounds*. 2022, Sv. 909.
155. Choi, J., Bastatas, L., Lee, E. et. al. Mechanical characterization of multi-layered lipid nanoparticles using high-resolution AFM force spectroscopy. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2022, Sv. 113.
156. Hasan, N., Ahmad, F., Wu, H-F. Monitoring the heat stress response of Escherichia coli via NiO nanoparticle assisted MALDI-TOF mass spectrometry. *Talanta*. 2013, Sv. 103.
157. Thakar, M. A., Jha, S. S., Phasinam, K. et. al. X ray diffraction (XRD) analysis and evaluation of antioxidant activity of copper oxide nanoparticles synthesized from leaf extract of *Cissus vitiginea*. *Materials Today: Proceedings*. 2022, Sv. 51.
158. Recio-Sánchez, G., Segura, A., Benito-Gómez, N., et. al. Composite thin films of nanoporous silicon/green synthesized silver nanoparticles as antibacterial surface. *Materials Letters*. 2022, Sv. 324.
159. Desalegn, B., Megharaj, M., Chen, Z. et. al. Green synthesis of zero valent iron nanoparticle using mango peel extract and surface characterization using XPS and GC-MS. *Heliyon*. 2019, Sv. 5, 5.
160. Guo, Q., Ding, L., Li, Y. et. al. Covalent organic framework-gold nanoparticle heterostructures amplified dynamic light scattering immunosensor for ultrasensitive detection of NT-proBNP in whole blood. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2022, Sv. 364.
161. Abutalib, M. M., Rajeh, A. Influence of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles on the optical, magnetic and electrical properties of PMMA/PEO composites: Combined FT-IR/DFT for electrochemical applications. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2020, Sv. 920.
162. Rami, J. M., Patel, C. D., Patel, C. M. et. al. Thermogravimetric analysis (TGA) of some synthesized metal oxide nanoparticles. *Materials Today: Proceedings*. 2021, Sv. 43.
163. Sedinkin, S. L., An, Y., Naik, P. et. al. An organogel library for solution NMR analysis of nanoparticle suspensions in non-aqueous samples. *Journal of Magnetic Resonance*. 2020, Sv. 321.
164. Formenan-Ortiz, I., Ma, T. F., Hoover, B. M. et. al. Nanoparticle tracking analysis and statistical mixture distribution analysis to quantify nanoparticle-vesicle binding. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2022, Sv. 615.
165. Nasri, N., Rusli, A., Teramoto, N. et. al. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles by using turmeric extract and chitosan mixture. *Materials Today: Proceedings*. 2022.

166. Alharbi, N. S., Alsubhi, N. S., Felimban, A. I. Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2022, Sv. 15, 3.
167. Lava, M. B., Muddapur, U. M., Basavegowda, N. et. al. Characterization, anticancer, antibacterial, anti-diabetic and anti-inflammatory activities of green synthesized silver nanoparticles using *Justica wynaadensis* leaves extract. *Materials Today: Proceedings*. 2021, Sv. 46, 13.
168. Alharbi, N. S., Alsubhi, N. S., Felimban, A. I. Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2022, Sv. 15, 3.
169. Němeček, J. Metody skenovací elektronové mikroskopie SEM a analytické techniky. *Mikromechanika a popis mikrostruktury materiálů - přednáška*. místo neznámé : ČVUT Praha, 2018.
170. Khare, S., Singh, R. K., Prakash, O. Green synthesis, characterization and biocompatibility evaluation of silver nanoparticles using radish seeds. *Results in Chemistry*. 2022, Sv. 4.
171. Fan, N., Li, P., Wang, J. et. al. Novel formulation, characterization, cytotoxicity, antioxidant, and anti-lung cancer activities of silver nanoparticles green-formulated by plant extract. *Inorganic Chemistry Communications*. 2022, Sv. 143.
172. Khan, S. A., Jain, M., Pandey, A. et. al. Leveraging the potential of silver nanoparticles-based materials towards sustainable water treatment. *Journal of Environmental Management*. 2022, Sv. 319.
173. Groenewoud, W. M. Chapter 2 - Thermogravimetry. *Characterisation of Polymers by Thermal Analysis*. místo neznámé : Elsevier Science B.V., 2001.
174. Weng, X., Yang, K., Owens, G., et. al. Biosynthesis of silver nanoparticles using three different fruit extracts: Characterization, formation mechanism and estrogen removal. *Journal of Environmental Management*. 2022, Sv. 316.
175. Kharat, S. N., Medhulkar, V. D. "Synthesis, characterization and studies on antioxidant activity of silver nanoparticles using *Elephantopus scaber* leaf extract". *Materials Science and Engineering: C*. 2016, Sv. 62.
176. de la Calle, I., Menta, M., Klein, M. et. al. Screening of TiO<sub>2</sub> and Au nanoparticles in cosmetics and determination of elemental impurities by multiple techniques (DLS, SP-ICP-MS, ICP-MS and ICP-OES). *Talanta*. 2017, Sv. 171.
177. Pryshchepa, O., Pomastowski, P., Buszewski, B. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2020, Sv. 284.

178. Inoue, M., Murase, A., Yamamoto, M. et. al. Analysis of volatile nanoparticles emitted from diesel engine using TOF-SIMS and metal-assisted SIMS (MetA-SIMS). *Applied Surface Science*. 2006, Sv. 252, 19.
179. Kumar, S. S. D., Abrahamse, H. Advancement of Nanobiomaterials to Deliver Natural Compounds for Tissue Engineering Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, Sv. 21.
180. Miškovská, A., Rabochová, M., Michailidu, J. et. al. Antibiofilm activity of silver nanoparticles biosynthesized using viticultural waste. *PLOS ONE*. 2022, Sv. 17, 8.
181. Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. Carbon Film Supported Copper Grid. *Merck*. [Online] Merck KGaA, 2022.  
<https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/temcf200cu50>.
182. Haque, M. N., Uddin, M. S. Accelerating Fast Fourier Transformation for Image Processing using Graphics Processing Unit. *Journal of Emerging Trends in Computing and Information Science*. 2011, Sv. 2, 8.
183. Exelis Visual Information Solutions, Inc. Fast Fourier Transform (FFT) Background. *Image Analysis*. [Online] 2012.  
<https://www.iryia.unam.mx/computo/sites/manuales/IDL/Content/GuideMe/ImageProcessing/BackgroundFastFourierTransform.html>.
184. Bruker Nano Surfaces Division. Dimension Edge with ScanAsyst. *Blue-Scientific*. [Online] 2013. [Citace: 13. 2 2024.] [https://blue-scientific.com/wp-content/uploads/Brochure\\_-\\_B074\\_-\\_RevC2\\_-\\_Dimension\\_Edge-min.pdf](https://blue-scientific.com/wp-content/uploads/Brochure_-_B074_-_RevC2_-_Dimension_Edge-min.pdf).
185. Břeň, D., Kulhánek, P. Pikoškály aneb jak uvidět atom. *Aldebaran Bulletin*. 2004, 27.
186. NanoAndMore USA. AFM Tip Shape Effects. #1 *AFM Tips Shop Worldwide - NanoAndMore*. [Online] 2024. [Citace: 11. 4 2024.] [https://www.nanoandmore.com/afm-tip-shape-effects?gad\\_source=1&gclid=CjwKCAjw8diwBhAbEiwA7i\\_sJeugp9Algl-Tejb6Q4wOz5Zk6ZqzKglv18RQrfZ8sjM4Te\\_obRujbxoC4YYQAvD\\_BwE](https://www.nanoandmore.com/afm-tip-shape-effects?gad_source=1&gclid=CjwKCAjw8diwBhAbEiwA7i_sJeugp9Algl-Tejb6Q4wOz5Zk6ZqzKglv18RQrfZ8sjM4Te_obRujbxoC4YYQAvD_BwE).
187. BRUKER AFM Probes. TESPA-V2-SS. *AFM Probes, Tips and Cantilevers*. [Online] 2024. [Citace: 11. 4 2024.] <https://www.brukerafmprobes.com/p-4063-tespa-v2-ss.aspx>.
188. Kašparová, P., Vaňková, E., Paldrychová, M., et al. Non-thermal plasma causes *Pseudomonas aeruginosa* biofilm release to planktonic form and inhibits production of Las-B elastase, protease and pyocyanin. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022, Sv. 12.
189. Julák, J., Scholtz, V., Vaňková, E. Medically important biofilms and non-thermal plasma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018, Sv. 34, 12.
190. Chapter 3 - Plasma Biological Science in Various Species. [autor knihy] S., Ikehara, Y., Kikkawa, F., et al. Toyokuni. *Plasma Medical Science*. místo neznámé : Academic Press, 2018, stránky 109-171.

191. Chapter 7 - Safety and Standardization Toward Clinical Applications. [autor knihy] S., Ikehara, Y., Kikkawa, F. Toyokuni. *Plasma Medical Science*. místo neznámé : Academic Press, 2019, stránky 385-418.
192. Chen, P., Deng, S., Cheng, Y., et al. 1 - Non-thermal food pasteurization processes: an introduction. [autor knihy] Ch. J., Kustin, K., Feeherry, F. Doona. *Case Studies in Novel Food Processing Technologies; Innovations in Processing, Packaging, and Predictive Modelling; A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. místo neznámé : Woodhead Publishing, 2010, stránky 1-18.
193. O'Neill, T., Rynk, R., Black, G., et al. Chapter 12 - Odor management and community relations. [autor knihy] R. Rynk. *The Composting Handbook; A how-to and why manual for farm, municipal, institutional and commercial composters*. místo neznámé : Academic Press, 2022, stránky 549-625.
194. Hoppanová, L., Kryštofová, S. Nonthermal Plasma Effects on Fungi: Applications, Fungal Responses, and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, Sv. 23, 19.
195. Kvam, E., Davis, B., Mondello, F., et al. Nonthermal Atmospheric Plasma Rapidly Disinfects Multidrug-Resistant Microbes by Inducing Cell Surface Damage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012, Sv. 56, 4, stránky 2028-2036.
196. Ki, S., H., Noh, H., Ahn, G. R. Influence of Nonthermal Atmospheric Plasma-Activated Water on the Structural, Optical, and Biological Properties of *Aspergillus brasiliensis* Spores. *Applied Sciences*. 2020, Sv. 10, 18.
197. Veerana, M., Choi, E. H., Park, G. Influence of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Jet on Extracellular Activity of  $\alpha$ -Amylase in *Aspergillus oryzae*. *Applied Sciences*. 2021, Sv. 11, 2.
198. Dasan, B. G., Boyaci, I. H., Mutlu, M. Nonthermal plasma treatment of *Aspergillus* spp. spores on hazelnuts in an atmospheric pressure fluidized bed plasma system: Impact of process parameters and surveillance of the residual viability of spores. *Journal of Food Engineering*. 2017, Sv. 196, stránky 139-149.
199. Panngom, K., Lee, S. H., Park, D. H., et al. Non-Thermal Plasma Treatment Diminishes Fungal Viability and Up-Regulates Resistance Genes in a Plant Host. *Plos One*. 2014, Sv. 9, 6.
200. Kang, M. H., Hong, Y. J., Attri, P., et al. Analysis of the antimicrobial effects of nonthermal plasma on fungal spores in ionic solutions. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014, Sv. 72, stránky 191-199.
201. Veerana, M., Yu, N., Ketya, W., et al. Application of Non-Thermal Plasma to Fungal Resources. *Journal of Fungi (Basel)*. 2022, Sv. 8, 2.
202. Lopez, S. E., Cabral, D. *Alternaria*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 1999, stránky 42-49.
203. Patriarca, A., Pinto, F. *Alternaria*. *Reference Module in Food Science*. 2018.

204. Gil-Serna, J., Vázquez, C., Patiño, B. Mycotoxins | Toxicology. místo neznámé : Elsevier, 2019.
205. Kustrzeba-Wójcicka, I., Siwak, E., Terlecki, G., et al. Alternaria alternata and Its Allergens: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2014, Sv. 47, 3, stránky 353-365.
206. Barkai-Golan, R., Follett, P. A. Irradiation Effects on Mycotoxin Accumulation. *Irradiation for Quality Improvement, Microbial Safety and Phytosanitation of Fresh Produce*. 2017, stránky 41-46.
207. Sousa, P., Viegas, C. Fungal Exposure in Agricultural Environments – A Review. [autor knihy] Ó., Casadevall, A. Zaragoza. *Encyclopedia of Mycology*. místo neznámé : Elsevier, 2021, stránky 113-124.
208. Bondy, G. S., Voss, K. A., Haschek, W. M. Chapter 6 - Mycotoxins. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, Volume 3: Environmental Toxicologic Pathology and Selected Toxicant Classes*. 2023, Sv. 3.
209. Bianchini, A., Bullerman, L. B. Mycotoxins | Classification. [autor knihy] C. A., Tortorello, M. L. Batt. *Encyclopedia of Food Microbiology*. místo neznámé : Academic Press, 2014.
210. Kolektiv autorů VŠCHT. Alternaria alternata. [Online] Vysoká škola chemicko technologická v Praze. [Citace: 16. 11 2023.] <https://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/alt.htm>.
211. Upton, D. J., McQueen-Mason, S. J., Wood, A. J. An accurate description of Aspergillus niger organic acid batch fermentation through dynamic metabolic modelling. *Biotechnology for Biofuels*. 2017, Sv. 10, 1.
212. Nierman, W. C., Nelson, K. Genomics for Applied Microbiology - G. Industrial microbial production and biotechnology. *Advances in Applied Microbiology*. 2002, Sv. 51, stránky 201-245, 246e-248e.
213. Nadumane, V. K., Venkatachalam, P., Gajaraj, B. Chapter 19 - Aspergillus Applications in Cancer Research. [autor knihy] V. K. Gupta. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, Aspergillus System Properties and Applications*. místo neznámé : Elsevier, 2016, stránky 243-255.
214. Aryal, S. Aspergillus niger- An Overview. *Microbe Notes*. [Online] 29. 4 2021. [Citace: 16. 11 2023.] <https://microbenotes.com/aspergillus-niger/>.
215. Tirmenstein, M. A., Mangipudy, R. Aflatoxin. [autor knihy] P. Wexler. *Encyclopedia of Toxicology*. místo neznámé : Academic Press, 2014.
216. Kant, P., Reinprecht, Y., Martin, C. J., et al. 4.65 - Disease Resistance. [autor knihy] M. Moo-Young. *Comprehensive Biotechnology*. 2019.

217. Rubio-Armendáriz, C., Revert, C., Paz-Montelongo, S., et al. Mycotoxins. [autor knihy] P. J. Wexler. *Encyclopedia of Toxicology*. místo neznámé : Academic Press, 2023, Sv. 6, stránky 581-592.
218. Seong, K. Y., Zhao, X., Xu, J. R., et al. Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*. 2008, Sv. 45, 4, stránky 389-399.
219. Kant, P., Reinprecht, Y., Martin, C. J., et al. Disease Resistance. *Reference Module in Life Sciences*. 2017.
220. Thrane, U. *Fusarium*. [autor knihy] C. A., Tortorello, M. L. Batt. *Encyclopedia of Food Microbiology*. místo neznámé : Academic Press, 2014, stránky 76-81.
221. —. *Fusarium*. [autor knihy] R. K. Robinson. *Encyclopedia of Food Microbiology*. místo neznámé : Academic Press, 1999, stránky 901-906.
222. Bullerman, L. B. Spoilage | Fungi in Food – An Overview. [autor knihy] B. Caballero. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. místo neznámé : Academic Press, 2003, stránky 5511-5522.
223. Starkey, D. E., Ward, T., Aoki, T., et al. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology*. 2007.
224. Kulišová, M., Rabochová, M., Lorinčík, J., et al. Exploring non-thermal plasma and UV radiation as biofilm 2 control strategies against foodborne filamentous fungal con-3 taminants. *Foods*. 2024, Sv. 7, 13.
225. Rabochová, M., Kulišová, M., Lorinčík, J., et al. Assessing the antimicrobial efficacy of nonthermal plasma treatment on filamentous fungi spores and biofilms. *Food Control*. Submitted 10/2023.
226. Kulišová, M., Rabochová, M., Lorinčík, J., et al. Comparative assessment of UV radiation and non-thermal plasma for elimination of foodborne fungal spores. *RSC Advances*. Submitted 3/2023.
227. Höflinger, G. Brief Introduction to Coating Technology for Electron Microscopy. *Leica Microsystems*. [Online] 28. 7 2013. [Citace: 22. 11 2023.] <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/life-science/brief-introduction-to-coating-technology-for-electron-microscopy/>.
228. Luyk, E. Sputter Coating for SEM: How This Sample Preparation Technique Assists Your Imaging. *ThermoFisher*. [Online] 26. 12 2019. [Citace: 22. 11 2023.] <https://www.thermofisher.com/blog/materials/sputter-coating-for-sem-how-this-sample-preparation-technique-assists-your-imaging/>.
229. Nanakoudis, A. SEM: Types of Electrons and the Information They Provide. *ThermoFisher Scientific*. [Online] 21. 11 2019. [Citace: 22. 11 2023.] <https://www.thermofisher.com/blog/materials/sem-signal-types-electrons-and-the-information-they-provide/>.



230. Pawley, J. B., Erlandsen, S. L. The case for low voltage high resolution scanning electron microscopy of biological samples. *Scanning Microscopy Supplement*. 1989, 3, stránky 163-178.
231. Kohl, H., Reimer, L. Series in Optical Sciences. *Transmission Electron Microscopy - Physics of Image Formation*. místo neznámé : Springer, 2008.
232. Nebesářová, J. Specimen preparation for SEM. [Online] 2023. [Citace: 25. 11 2023.] [https://web.natur.cuni.cz/sekce-bi/VMCF/wp-content/uploads/2023/10/SEM\\_preparation\\_Nebesarova.pdf](https://web.natur.cuni.cz/sekce-bi/VMCF/wp-content/uploads/2023/10/SEM_preparation_Nebesarova.pdf).
233. Egerton, R. F. Choice of operating voltage for a transmission electron microscope. *Ultramicroscopy*. 2014, Sv. 145, stránky 85-93.
234. Wineya, M., Meehla, J. B., O'Toole, E. T. et al. Conventional transmission electron microscopy. *Molecular Biology of the Cell*. 2014, Sv. 25, 3, stránky 319-323.
235. Hayles, M. F., Matthijs de Winter, D. A., Schneijdenberg, Ch. T. W. M., et al. The making of frozen-hydrated, vitreous lamellas from cells for cryo-electron microscopy. *Journal of Structural Biology*. 2010, Sv. 172, 2, stránky 180-190.
236. Guaita, M., Watters, S. C., Loerch, S. Recent advances and current trends in cryo-electron microscopy. *Current Opinion in Structural Biology*. 2022, Sv. 77.
237. Han, R., Li, Z., Fan, Y. et al. Recent Advances in Super-Resolution Fluorescence Imaging and Its Applications in Biology. *Journal of Genetics and Genomics*. 2013, Sv. 40, 12.
238. Kozikowski, P. Extracting Three-dimensional Information from SEM Images by Means of Photogrammetry. *Micron*. 2020, Sv. 134.
239. Rolls, G. An Introduction to Specimen Preparation. *Leica Biosystems*. [Online] 2023. [Citace: 9. 11 2023.] <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/an-introduction-to-specimen-preparation/>.
240. Kizilyaprak, C., Bittermann, A. G., Darapase, J. et al. FIB-SEM tomography in biology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2014.
241. Lee, Ch-W., Kuo, Ch-Ch., Liang, Ch-J., et al. Effects of the media conditioned by various macrophage subtypes derived from THP-1 cells on tunneling nanotube formation in pancreatic cancer cells. *BMC Molecular and Cell Biology*. 2022, Sv. 23, 1.
242. van Donselaar, E. G., Dorresteyn, B., Popov-Celeketic, D., et al. Extremely thin layer plastification for focused-ion beam scanning electron microscopy: an improved method to study cell surfaces and organelles of cultured cells: EXTREMELY THIN LAYER PLASTIFICATION. *Journal of Microscopy*. 2018, Sv. 270, 3.
243. Steyer, A. M., Schertel, A., Nardis, C., et al. FIB-SEM of mouse nervous tissue: Fast and slow sample preparation. *Methods in Cell Biology*. 2019.
244. Lešer, V., Milani, M., Tatti, F., et al. Focused ion beam (FIB)/scanning electron microscopy (SEM) in tissue structural research. *Protoplasma*. 2010, Sv. 246.

245. Buss, D. J., Reznikov, N., McKee, M. D. Crossfibrillar mineral tessellation in normal and Hyp mouse bone as revealed by 3D FIB-SEM microscopy. *Journal of Structural Biology*. 2020, Sv. 212, 2.
246. Ibrahim, J., Rechav, K., Boaretto, E., et al. Three dimensional structures of the inner and outer pig petrous bone using FIB-SEM: Implications for development and ancient DNA preservation. *Journal of Structural Biology*. 2023, Sv. 215, 3.
247. Müller, A., Schmidt, D., Xu, S. S., et al. 3D FIB-SEM reconstruction of microtubule-organelle interaction in whole primary mouse  $\beta$  cells. *Journal of Cell Biology*. 2021, Sv. 220, 2.
248. Parlanti, P., Pal-Ghosh, S., Williams, A., et al. Axonal debris accumulates in corneal epithelial cells after intraepithelial corneal nerves are damaged: A focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM) study. *Experimental Eye Research*. 2020, Sv. 194.
249. Palmquist, A., Emanuelson, L., Sjövall, P. Chemical and structural analysis of the bone-implant interface by TOF-SIMS, SEM, FIB and TEM: Experimental study in animal. *Applied Surface Science*. 2012, Sv. 258, 17, stránky 6485–6494.
250. Wierzbicki, F., Købler, C., Jensen, M. R. B., et al. Mapping the Complex Morphology of Cell Interactions with Nanowire Substrates Using FIB-SEM. *PLoS ONE*. 2013, Sv. 8, 1.
251. Xu, C. S., Hayworth, K. J., Lu, Z., et al. Enhanced FIB-SEM systems for large-volume 3D imaging. *eLife*. 2017, 6.
252. Phaneuf, M. W. Applications of focused ion beam microscopy to materials science specimens. *Micron*. 1999, Sv. 30, 3, stránky 277-288.
253. Volkert, C. A., Minor, A. M. Focused Ion Beam Microscopy and Micromachining. *MRS Bulletin*. 2007, Sv. 32, 5, stránky 389–399.
254. Jäger, A. Mikroobrábění fokusovaným iontovým svazkem. *Fyzikální ústav Akademie věd České republiky*. [Online] 8. 9 2017. [Citace: 26. 10 2023.] <https://www.fzu.cz/aktuality/mikroobrabeni-fokusovany-m-iontovym-svazkem>.
255. Utke, I., Hoffmann, P., Mlengailis, J. Gas-assisted focused electron beam and ion beam processing and fabrication. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*. 2008, Sv. 26, 4.
256. Yao, N. Introduction to the focused ion beam system. *Focused Ion Beam Systems*. New York : United States of America by Cambridge University Press, 2007, 1.2, str. 7.
257. Valencia-Rodríguez, J., Barriero-Rodríguez, G., Licea-Panduro, D. The melting point of gallium under calorimetric conditions. *Thermochimica Acta*. 1996, Sv. 278, stránky 71-76.
258. Wolff, A. Focused ion beams: An overview of the technology and its capabilities. *Wiley Analytical Science*. [Online] 29. 5 2020. [Citace: 26. 10 2023.] <https://analyticalscience.wiley.com/content/article-do/focused-ion-beams-overview-technology-and-its-capabilities>.

259. Asadi, N., Varshney, N. Focused Ion Beam (FIB). *Herbert Wertheim College of Engineering Faculty Websites*. [Online] University of Florida, 2021. [Citace: 26. 10 2023.] <https://faculty.eng.ufl.edu/navid-asadi/wp-content/uploads/sites/84/2021/09/Lecture-13-FIB-Principle.pdf>.
260. Bischoff, L., Mazarov, P., Bruchhaus, L. et al. Liquid metal alloy ion sources—An alternative for focussed ion beam technology. *Applied Physics Reviews*. 2016, Sv. 3, 2.
261. Rajput, N., Luo, X. FIB Micro-/Nano-fabrication. *Engineering and Technology*. 2015, stránky 61-80.
262. Ziegler, J. F. SRIM - The Stopping and Range of Ions in Matter. *Interactions of ions with matter*. [Online] 2013. [Citace: 31. 10 2023.] <http://www.srim.org/>.
263. Tong, Z., Jiang, X. Q., Luo, X. et al. Review on FIB-Induced Damage in Diamond Materials. *Current Nanoscience*. 2016, Sv. 12, 6, stránky 685-695.
264. Reyntjens, S., Puers, R. A review of focused ion beam applications in microsystem technology. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 2001, Sv. 11, 4.
265. ThermoFisher Scientific. Chemical Surface Modification with SEM, FIB and DualBeam. *ThermoFisher Scientific - Application note*. [Online] 2023. [Citace: 2. 11 2023.] <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Application-Notes/gis-beam-chemistries-appnote.pdf>.
266. Laichmanová, M. Mirkoskopické houby (Bi6620), Ascomycota, anamorfa, konidiogeneze. *Masarykova univerzita*. [Online] 8. 10 2016. [Citace: 30. 11 2023.] [https://is.muni.cz/el/sci/podzim2016/Bi6620/um/Prednaska\\_4\\_-\\_mikroskopicke\\_houby\\_ascomycota\\_anamorfa.pdf](https://is.muni.cz/el/sci/podzim2016/Bi6620/um/Prednaska_4_-_mikroskopicke_houby_ascomycota_anamorfa.pdf).
267. M., Laichmanová. Bi7535 Obecná mykologie. *Masarykova univerzita*. [Online] 9. 5 2017. [Citace: 30. 11 2023.] [https://is.muni.cz/el/sci/jaro2017/Bi7525/um/Mikroskopicke\\_houby\\_pracovni\\_\\_postupy.pdf](https://is.muni.cz/el/sci/jaro2017/Bi7525/um/Mikroskopicke_houby_pracovni__postupy.pdf).
268. Carzaniga, R. Fiocco, D., Bowyer, P., et al. Localization of Melanin in Conidia of *Alternaria alternata* Using Phage Display Antibodies. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2002, Sv. 15, 3, stránky 216-224.
269. Kim, K. H., Cho, Y., La Rota, M., et al. Functional analysis of the *Alternaria brassicicola* non-ribosomal peptide synthetase gene AbNPS2 reveals a role in conidial cell wall construction. *Molecular Plant Pathology*. Sv. 8, 1, stránky 23-39.
270. PC, W., YK, Chen, Ji, Y., et al. Peroxisomes Implicated in the Biosynthesis of Siderophores and Biotin, Cell Wall Integrity, Autophagy, and Response to Hydrogen Peroxide in the Citrus Pathogenic Fungus *Alternaria alternata*. *Frontiers in Microbiology*. 2021, 12:645792.
271. Yago, J. I. Proper Functions of Peroxisomes Are Vital for Pathogenesis of Citrus Brown Spot Disease Caused by *Alternaria alternata*. *Journal of Fungi*. 2020, Sv. 6, 248.

272. Shabana, Y. M., Baka, Z. A. M., Abdel-Fattah, A. *Alternaria eichhorniae*, a biological control agent for waterhyacinth: mycoherbicidal formulation and physiological and ultrastructural host responses. *European Journal of Plant Pathology*. 103, stránky 99-111.
273. *Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis*. World Health Organization - Antimicrobial Resistance Division. Geneva : WHO, 2017. 978-92-4-002643-8.
274. Ahmad, S., Munir, S., Zeb, N. et. al. Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles — an ecofriendly approach. *International Journal of Nanomedicine*. 2019, Sv. 14.
275. Rollová, M., Gharwalova, L., Krmela, A. et. al. Grapevine extracts and their effect on selected gut-associated microbiota: In vitro study. *Czech Journal of Food Sciences*. 2020, Sv. 38, 3.
276. Microtrac Retsch GmbH. Měření zeta potenciálu. *Microtrac MRB*. [Online] 2022. <https://www.microtrac.cz/cz/produkty/potencial-zeta/>.
277. Serra, E., Hidalgo-Bastida, L. A., Verran, J. et. al. Antifungal activity of commercial essential oils and biocides against *Candida albicans*. *Pathogens*. 2018, Sv. 7, 1.
278. Vaňková, E., Kašparová, P., Dulíčková, N. et. al. Combined effect of lasioglossin LL-III derivative with azoles against *Candida albicans* virulence factors: biofilm formation, phospholipases, proteases and hemolytic activity. *FEMS yeast research*. 2020, Sv. 20, 3.
279. Khan, I., Saeed, K., Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*. 2019, Sv. 12, 9.
280. nanoComposix. Silver Nanoparticles: Optical Properties. *nanocomposix.com*. [Online] nanoComposix, 4878 Ronson Ct Ste J, San Diego, CA 92111, 2022. <https://nanocomposix.com/pages/silver-nanoparticles-optical-properties#toc>.
281. Alsammarraie, F. K., Wang, W., Zhou, P., et. al. Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and investigation of their antibacterial activities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018.
282. Mukherji, S., Shukla, G., Mukherji, S. Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles. *Metallic Nanomaterials (Part B)*. 2018.
283. Shnoudeh, A. J., Hamad, I., Abdo, R. W. et. al. Synthesis, characterization, and applications of metal nanoparticles. *Biomaterials and bionanotechnology*. 2019.
284. Forbes, N. A., Yuan, T. T., DeSilva, M. N. Silver Nanoparticle Storage Stability in Aqueous and Biological Media. *Naval Medical Research Unit San Antonio, Joint Base San Antonio, Fort Sam, Houston United States*. 2015.

285. Saravanadevi, K., Kvitha, M., Karpagavinayagam, P. et. al. Biosynthesis of ZnO and Ag doped ZnO nanoparticles from *Vitis vinifera* leaf for antibacterial, photocatalytic application. *Materials Today: Proceedings*. 2022, Sv. 48/2.
286. Nirmala, J. G., Akila, S., Narendhirakannan, R. T. et. al. *Vitis vinifera* peel polyphenols stabilized gold nanoparticles induce cytotoxicity and apoptotic cell death in A431 skin cancer cell lines. *Advanced Powder Technology*. 2017, Sv. 28, 4.
287. Kong, Ch., Cheong, S., Tilley, R. D. 2.15 - Recent Development in Focused Ion Beam Nanofabrication. *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology (Second Edition)*. 2019, stránky 327-356.
288. Kant, K., Losic, D. Focused Ion Beam (FIB) Technology for Micro- and Nanoscale Fabrications. *Lecture notes in Nanoscale Science and Technology*. 2013.
289. Bischoff, L., Akhamadaliev, Ch. An alloy liquid metal ion source for lithium. *Journal of Physics D Applied Physics*. 2008, Sv. 41, 5.
290. Ward, B. W., Notte, J. A., Economou, N. P. Helium ion microscope: A new tool for nanoscale microscopy and metrology. *Journal of Vacuum Science & Technology B Microelectronics Processing and Phenomena*. 2006, Sv. 24, 6.
291. Langford, R. M., Nellen, P. M., Gierak, J. et al. Focused Ion Beam Micro- and Nanoengineering. *MRS Bulletin*. 2007, Sv. 32, 5.
292. Mazarov, P., Melnikov, A., Wernhardt, R. et al. Long-life bismuth liquid metal ion source for focussed ion beam micromachining application. *Applied Surface Science*. 2008, Sv. 254, 22, stránky 7401–7404.
293. Hesse, E., Bischoff, L., Teichert, J. Development of a cobalt liquid alloy ion source. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 1994, Sv. 27, 2, stránky 427-428.
294. Driesel, W., Dietzsch, Ch., Muhle, R. Tip-shape investigation of a Au-Si alloy liquid metal ion source using a high voltage transmission electron microscope. *Journal of Physics D Applied Physics*. 1999, Sv. 28, 4.
295. Reyntjens, S., Puers, R. A review of focused ion beam applications in microsystem technology. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 2001, Sv. 11, 4, stránky 287-300.
296. Ohring, M. Discharges, Plasmas, and Ion-Surface Interactions. *Materials Science of Thin Films*. 2002, stránky 145-202.
297. Gu, L., Wang, N., Xu, T. et al. Application of FIB-SEM Techniques for the Advanced Characterization of Earth and Planetary Materials. *Scanning*. 2020.
298. Simon, A. H. Sputter Processing. *Handbook of Thin Film Deposition*. 2012, stránky 55-88.
299. Stout, D. A., Durmus, N. G., Webster, T. J. Synthesis of carbon based nanomaterials for tissue engineering applications. *Nanomaterials in Tissue Engineering*. 2013, stránky 119-157.

300. JEOL. Glossaries of Electron Microscope Terms - Glossary of SEM Terms. *JEOL*. [Online] 2023. [Citace: 2. 11 2023.] <https://www.jeol.com/words/semterms/20121024.024259.php#gsc.tab=0>.
301. Luyk, E. Backscattered Electrons in SEM Imaging. *Thermo Fisher Scientific*. [Online] 20. 12 2019. [Citace: 28. 11 2023.] <https://www.thermofisher.com/blog/materials/backscattered-electrons-in-sem-imaging/>.
302. de Aguiar Cordeiro, R., Aguiar, A. L. R., Nascimento da Silva, B., et al. Trichosporon asahii and Trichosporon inkin Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021, Sv. 11.
303. World Health Organization. World Health Organization. *Antimicrobial resistance*. [Online] WHO, 21. 11 2023. [Citace: 20. 3 2024.] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
304. Akram, F., Imtiaz, M., Hag, ul I. Emergent crisis of antibiotic resistance: A silent pandemic threat to 21st century. *Microbial Pathogenesis*. 2023, Sv. 174.
305. Walsh, T. R., Gales, A. C., Laxminarayan, R., et al. Antimicrobial Resistance: Addressing a Global Threat to Humanity. *PLOS Medicine*. 2023, Sv. 7, 20.
306. Chaturvedi, V. K., Sharma, B., Tripathi, A. D., et al. Biosynthesized nanoparticles: a novel approach for cancer therapeutics. *Frontiers in Medical Technology*. 2023, Sv. 5.
307. Sousa, F., Ferreira, D., Reis, S., et al. Current Insights on Antifungal Therapy: Novel Nanotechnology Approaches for Drug Delivery Systems and New Drugs from Natural Sources. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020, Sv. 9, 13.
308. Veerana, M., Yu, N-N., Ketya, W., et al. Application of Non-Thermal Plasma to Fungal Resources. *Journal of Fungi*. 2022, Sv. 2, 8.
309. Gibała, A., Żeliszewska, P., Gosiewski, T., et al. Antibacterial and Antifungal Properties of Silver Nanoparticles—Effect of a Surface-Stabilizing Agent. *Biomolecules*. 2021, Sv. 10, 11.
310. Górka, K., Kubiński, K. Antifungal Activity against Human and Plant Mycopathogens, and Green Synthesis of Silver Nanoparticles Exhibiting Such Activity. *Applied Sciences*. 2024, Sv. 1, 14.
311. Álvarez-Chimal, R., Arenas-Alatorre, J. Á. Green Synthesis of Nanoparticles: A Biological Approach. [autor knihy] K. Shan. *Green Chemistry for Environmental Sustainability - Prevention-Assurance-Sustainability (P-A-S) Approach*. místo neznámé : IntechOpen, 2023.
312. Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., et al. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. [autor knihy] R. K. Tekade. *Basic Fundamentals of Drug Delivery, A volume in Advances in Pharmaceutical Product Development and Research*. místo neznámé : Academic Press, 2019.

313. Xu, C. S., Hess, H. FIB-SEM: A new way to comprehensively visualize whole cells and tissues. *The American Society for Cell Biology*. [Online] 19. 1 2021. [Citace: 20. 3 2023.] <https://www.ascb.org/publications-columns/newsletter-feature/fib-sem-a-new-way-to-comprehensively-visualize-whole-cells-and-tissues/>.

314. Kizilyaprak, C., Stierhof, Y-D., Humbel, B. M. Volume microscopy in biology: FIB-SEM tomography. *Tissue and Cell*. 2019, Sv. 57, stránky 123-128.

## Seznam tabulek

Tab. 1: Celková mortalita pacientů s onemocněním způsobeným mikromycetním patogenem dle WHO .....	14
Tab. 2: Syntéza nanočástic [143] [144]. .....	30
Tab. 3: Charakteristické rysy různých druhů syntézy nanočástic [145]. .....	30
Tab. 4: Testované typy Ag nanočástic. ....	34
Tab. 5: Celkové množství analyzovaných nanočástic. ....	37
Tab. 6: Hodnoty průměrného průměru a průměrné kruhovitosti biosyntetizovaných AgNPs [180]. ....	40
Tab. 7: Procentuální zastoupení kruhovitosti biosyntetizovaných AgNPs [180]. ....	41

## Seznam obrázků

Obr. 1: Mikromyceta (SEM fotografie Rabochová, M., kolorováno v AKVIS Coloriage [10]). .....	11
Obr. 2: Seznam nejvýznamnějších druhů mikromycetních patogenů podle míry rizika dle WHO (upraveno z [30]). .....	13
Obr. 3: Skenovací elektronový mikroskop Centra výzkumu Řež s.r.o. (fotografie CVŘ). .....	19
Obr. 4: Staphylococcus aureus na titanovém žetonu před testy antibakteriálních látek (SEM fotografie Rabochová, M., kolorováno v AKVIS Coloriage [10], velikost zorného pole 33 $\mu\text{m}$ ). .....	22
Obr. 5: Cyklus tvorby biofilmu Candida albicans [93]. .....	25
Obr. 6: Diferenciace rodu Candida prostřednictvím populačních studií. Studie jsou označeny jménem prvního autora, časopisem a rokem vydání. Seřazeno chronologicky podle mediánu studovaného období zleva doprava [100]. .....	26
Obr. 7: Základní mechanismy antimikrobiálního působení Ag nanočástic (SEM fotografie Rabochová, M., kolorováno v AKVIS Coloriage [10], velikost zorného pole 7,6 $\mu\text{m}$ ). .....	29
Obr. 8: Biologická syntéza nanočástic [150]. .....	31
Obr. 9: Přehled metod vhodných pro charakterizaci nanočástic a jejich aplikace (upraveno z [179]). ..	33
Obr. 10: Vzorky roztoků Ag nanočástic (fotografie Rabochová, M.). .....	35
Obr. 11: Ukázka transmisní mřížky použité pro STEM-in-SEM mikroskopii [181]. .....	35
Obr. 12: Snímek nanočástic ze STEM-in-SEM před FFT. ....	36
Obr. 13: Snímek nanočástic ze STEM-in-SEM po FFT. ....	36
Obr. 14: AFM typ Dimension Edge [184]. .....	38
Obr. 15: Schéma semikontaktního módu AFM [185]. .....	38
Obr. 16: AFM snímek s detekovanou nanočásticí pro stanovení její průměrné výšky. ....	39
Obr. 17: SEM snímek s identickou detekovanou nanočásticí. ....	39
Obr. 18: STEM-in-SEM fotografie analyzovaných biosyntetizovaných Ag nanočástic (A-monodisperzní AgNPs s extraktem, B-monodisperzní AgNPs v ultračisté vodě, C-polydisperzní AgNPs s extraktem, D-polydisperzní AgNPs v ultračisté vodě) [180]. .....	40
Obr. 19: SEM fotografie planktonních buněk Candida albicans (bez AgNPs) [180]. .....	42
Obr. 20: SEM fotografie buněk Candida albicans s mAgNPs (5 mg/L) (na snímcích A, B jsou mAgNPs/e, na snímcích C, D mAgNPs/w) [180]. .....	43
Obr. 21: SEM fotografie buněk Candida albicans s pAgNPs (5 mg/L) (na snímcích A, B jsou pAgNPs/e, na snímcích C, D pAgNPs/w) [180]. .....	44
Obr. 22: AFM snímek C. albicans bez AgNPs. ....	44
Obr. 23: AFM snímek C. albicans bez AgNPs. ....	44



Obr. 24: AFM snímek <i>C. albicans</i> a hyfy s AgNPs. ....	45
Obr. 25: Snímek z optického mikroskopu <i>C. albicans</i> a hyfy s AgNPs.....	45
Obr. 26: 3D AFM snímek topologie <i>C. albicans</i> s AgNPs – pohled shora.....	45
Obr. 27: 3D AFM snímek topologie <i>C. albicans</i> s AgNPs – pohled zleva.....	45
Obr. 28: AFM snímek <i>C. albicans</i> s AgNPs a vyznačenou analyzovanou AgNP. ....	46
Obr. 29: SEM snímek <i>C. albicans</i> s AgNPs a vyznačenou analyzovanou AgNP. ....	46
Obr. 30: Demonstrace tvaru intenzitní křivky pro NP umístěnou na šikmé ploše buněčné stěny (viz. porovnání s Graf. 3) vs. na vrcholu buňky. ....	46
Obr. 31: Nejdůležitější parametry hrotu AFM (upraveno z [187])......	47
Obr. 32: Vliv hrotu na zobrazení AFM [187]. ....	47
Obr. 33: Náskres <i>Alternaria alternata</i> (úsečka na nákrese znázorňuje vzdálenost 10 $\mu\text{m}$ ) [210]. ....	50
Obr. 34: <i>Aspergillus niger</i> (úsečka na nákrese znázorňuje vzdálenost 10 $\mu\text{m}$ ) [210]. ....	51
Obr. 35: <i>Fusarium culmorum</i> (úsečka na nákrese znázorňuje vzdálenost 10 $\mu\text{m}$ ) [210]. ....	51
Obr. 36: Makro- a mikrokoniemie typická pro rod <i>Fusarium</i> [222]. Průměrná délka 4,5-5,0 $\mu\text{m}$ [223]. .	52
Obr. 37: Biofilm <i>A. alternata</i> před ošetřením NTP na substrátu Ti žetonu.....	55
Obr. 38: Biofilm <i>A. alternata</i> po ošetření NTP na substrátu Si destičky [225]......	55
Obr. 39: Biofilm <i>A. niger</i> před ošetřením NTP na substrátu Si destičky (224). ....	56
Obr. 40: Biofilm <i>A. niger</i> po ošetření NTP na substrátu Ti žetonu [225]......	56
Obr. 41: Biofilm <i>F. culmorum</i> před ošetřením NTP na substrátu Si destičky (224).....	57
Obr. 42: Biofilm <i>F. culmorum</i> po ošetření NTP na substrátu Si destičky (224) [225]......	57
Obr. 43: Biofilm <i>F. graminearum</i> před ošetřením NTP na substrátu Ti žetonu [225]......	58
Obr. 44: Biofilm <i>F. graminearum</i> po ošetření NTP na substrátu Ti žetonu [225]. ....	58
Obr. 45: Spory <i>A. alternata</i> před ošetřením NTP. ....	60
Obr. 46: Spory <i>A. alternata</i> před ošetřením NTP [225] [226]. ....	60
Obr. 47: Spory <i>A. alternata</i> po ošetření NTP [225], [226]. ....	61
Obr. 48: Spory <i>A. alternata</i> po ošetření NTP. ....	61
Obr. 49: Spory <i>A. Niger</i> před ošetřením NTP. ....	62
Obr. 50: Spory <i>A. Niger</i> po ošetření NTP.....	62
Obr. 51: Spora <i>F. culmorum</i> před ošetřením NTP.....	63
Obr. 52: Spora <i>F. culmorum</i> po ošetření NTP. ....	63
Obr. 53: Spora <i>F. graminearum</i> před ošetřením NTP. ....	64
Obr. 54: Spora <i>F. graminearum</i> po ošetření NTP [226]. ....	64
Obr. 55: Spora <i>A. alternata</i> bez pokovení.....	66
Obr. 56: Spora <i>A. alternata</i> s pokovením. ....	66
Obr. 57: Spora <i>A. niger</i> bez pokovení [226]......	66
Obr. 58: Spora <i>A. niger</i> s pokovením. ....	66
Obr. 59: Spora <i>F. culmorum</i> bez pokovení.....	67
Obr. 60: Spora <i>F. culmorum</i> s pokovením. ....	67
Obr. 61: Spora <i>F. graminearum</i> bez pokovení. ....	67
Obr. 62: Spora <i>F. graminearum</i> s pokovením [226]. ....	67
Obr. 63: Biofilm <i>A. alternata</i> bez pokovení. ....	68
Obr. 64: Biofilm <i>F. graminearum</i> bez pokovení. ....	68
Obr. 65: Spory <i>A. alternata</i> bez ošetřením NTP, detektor BSE (vlevo) a po ošetření NTP, detektor BSE+SE (vpravo).....	69
Obr. 66: Spory <i>A. niger</i> bez ošetření NTP, detektor BSE+SE. ....	69
Obr. 67: Spory <i>F. culmorum</i> bez ošetření NTP, detektor BSE+SE.....	70
Obr. 68: Spory <i>F. graminearum</i> bez ošetření NTP detektor BSE (vlevo) a detektor BSE+SE (vpravo)....	70
Obr. 69: Spora <i>A. alternata</i> (vpravo) a <i>A. niger</i> (vlevo) po ošetření NTP v náklonu. ....	71

<i>Obr. 70: Spory F. culmorum (vpravo) a F. graminearum (vlevo) po ošetření NTP v náklonu.</i>	71
<i>Obr. 71: Schéma elektronového mikroskopu [253].</i>	74
<i>Obr. 72: Model srážkové kaskády (upraveno z [263]).</i>	75
<i>Obr. 73: FIB řezy sporami A. alternata ošetřených NTP v manuálním režimu; P – primární buněčná stěna, S – sekundární buněčná stěna [226].</i>	80
<i>Obr. 74: FIB řezy sporami A. alternata ošetřených NTP v manuálním režimu s kondenzací vnitrobuněčného obsahu (A) a zkolabovaným vnitrobuněčným obsahem (B).</i>	80
<i>Obr. 75: FIB řezy sporami A. alternata po NTP v automatickém (A) a manuálním (B) režimu.</i>	81
<i>Obr. 76: Tomografie mladé spory Alternaria alternata v manuálním režimu.</i>	82
<i>Obr. 77: Tomografie zralé spory Alternaria alternata – příčný řez v automatickém režimu.</i>	83
<i>Obr. 78: Tomografie zralé spory Alternaria alternata – podélný řez v automatickém režimu [226].</i>	84
<i>Obr. 79: Tomografie spory Fusarium culmorum – podélný řez v automatickém režimu.</i>	85
<i>Obr. 80: Tomografie spor Fusarium graminearum v automatickém režimu.</i>	86
<i>Obr. 81: Tomografie spor Aspergillus niger v automatickém režimu.</i>	87
<i>Obr. 82: GIS příprava ochranných schránek pro FIB tomografii buňky Candida albicans.</i>	89
<i>Obr. 83: GIS příprava ochranných schránek pro FIB tomografii buňky Candida albicans.</i>	90
<i>Obr. 84: Tomografie C. albicans bez ochranné obálky.</i>	91
<i>Obr. 85: Tomografický řez C. albicans bez ochranné obálky (A) a s ochrannou obálkou (B).</i>	91

## Seznam grafů

<i>Graf. 1: Histogram distribuce velikosti AgNPs [180].</i>	41
<i>Graf. 2: Fit Gaussova rozdělení distribuce velikosti AgNPs.</i>	42
<i>Graf. 3: Profil intenzit pixelů úsečky protínající nanočástici (viz Obr. 16).</i>	46
<i>Graf. 4: Profil intenzity profilu nanočástice s proložením polynomickou křivkou.</i>	47