



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

**Antibakteriální vlastnosti tenkých vrstev
a biomateriálů**

**Antibacterial Properties of Ag-incorporated
Thin Films**

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor diplomové práce: Klára Ševčíková

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Veronika Vymětalová, PhD.

Kladno 2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Antibakteriální vlastnosti tenkých vrstev“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové 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).

V Kladně 19. 5. 2017

.....

Klára Ševčíková

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat Mgr. Veronice Vymětalové, PhD. za přínosné rady, odborné vedení a podněty při psaní této bakalářské práce a dále rodině a všem akademických i neakademickým pracovníkům, kteří mi pomáhali při psaní bakalářské práce pomáhali.

ABSTRAKT

Antibakteriální vlastnosti tenkých vrstev a biomateriálů

Cílem bakalářské práce bylo navrhnout a realizovat pilotní experiment pro vyhodnocení antibakteriálních vlastností tenkých vrstev dopovaných stříbrem. Po provedení pilotního experimentu stanovit vhodnou limitní teplotu kultivace použité bakterie *Micrococcus luteus* a získané obrázky vyhodnotit pomocí programu Matlab. V závěru provést vyhodnocení vlastního experimentu s vyhodnocením vlivu parametrů použitých přístrojů na výsledky.

Klíčová slova

bakteriální infekce, tenké vrstvy, pulzní laserová depozice

ABSTRACT

Antibacterial Properties of Ag-incorporated Thin Film

The aim of the bachelor thesis was to design and implement a pilot experiment for evaluation of antibacterial properties of Ag-incorporated thin films. After a pilot experiment, determine the appropriate temperature limitation of the *Micrococcus luteus* bacteria and evaluate the obtained images using Matlab. At the end, I perform the evaluation of my own experiment with the evaluation of the influence of the parameters of the used instruments on the results.

Keywords

bacterial infection, thin films, pulsed laser deposition

Obsah

Seznam symbolů a zkratk	9
1 Úvod	11
1.1 Přehled současného stavu.....	11
1.2 Cíle práce.....	12
2 Přehled současného stavu	13
2.1 Biokompatibilní materiály.....	13
2.1.1 Kovy a slitiny kovů	13
2.1.2 Polymery.....	14
2.1.3 Kompozitní materiály.....	15
2.1.4 Keramika a sklo	16
2.2 Tenké vrstvy.....	17
2.2.1 Pulzní laserová depozice	18
2.3 Bakterie a jejich prostředí	19
2.3.1 Bakteriální infekce.....	19
2.3.2 Volné bakterie	22
2.3.3 Bakteriální biofilm.....	22
2.3.4 Vliv teploty na kultivaci bakterií.....	25
2.3.5 Morfologie povrchových vrstev bakterie	27
2.3.6 Zástupci grampozitivních bakterií	29
3 Metody	31
3.1 Příprava kultivačních médií	31
3.2 Laboratorní vybavení	33
3.3 Zaočkování mikroorganismů	35
3.4 Testování citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám	35
3.4.1 Zjišťování počtu mikrobiálních buněk	35
3.4.2 Stanovení buněčné hmoty mikroorganismů.....	38
3.4.3 Zjišťování přibližného množství mikroorganismů na základě jejich biochemické činnosti.....	39
3.5 Vyhodnocení antibakteriální účinnosti – metoda CFU	40
3.6 Experiment určení vhodné limitní kultivační teploty.....	41

3.7	Vyhodnocení obrazů – počítání bakteriálních kolonií v Matlabu	41
3.7.1	Popis navrženého programu v Matlabu	42
4	Výsledky.....	45
4.1	Stanovení limitní teploty	45
4.2	Desková metoda	46
4.3	Diluční metoda	46
5	Diskuse.....	49
6	Závěr	52
	Seznam použité literatury	53
	Příloha A: Zdrojový kód programu Matlab	59
	Příloha B: Fotografie narostlých bakteriálních kolonií	60
	Příloha C: Obsah přiloženého CD.....	64

Seznam symbolů a zkratek

Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
m	cmH ₂ O	Střední distenzní tlak po ustálení přechodového děje
f	Hz	Frekvence vysokofrekvenčních oscilací
P	1/s	Výkon
U	V	Napětí
v	m/s	Rychlost
L	dB	Hladina intenzity zvuku
E	lx	Intenzita osvětlení
V	m ³	Objem
I	A	Elektrický proud
P	W	Hustota mikroorganismů
pH	-	pH látky
c.f.u.	-	Koloniетvorné jednotky (<i>Colony forming unit</i>)
hm.%	%	Hmotnostní procenta

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
DLC	Uhlík podobný diamantu (<i>Diamond-like carbon</i>)
HA	Hydroxyapatit
PC	Polykarbonát
PE	Polyethylen
PET	Polyethylentereftalát
PP	Polypropylen
SR	Syntetický kaučuk
PVC	Polyvinylchlorid
Na ₂ O	Oxid sodný
CaO	Oxid vápenatý
SiO ₂	Oxid křemičitý
PVD	Fyzikální depozice parou (<i>Physical vapor deposition</i>)
CVD	Chemická depozice parou (<i>Chemical vapor deposition</i>)
PECVD	Plazmou vylepšená chemická depozice parou (<i>Plasma-enhanced chemical vapor deposition</i>)
TiO ₂	Oxid titaničitý
PLD	Pulzní laserová depozice
HSP	Teplotně šokové proteiny
Mg ²⁺	Hořečnatý kation
Ca ²⁺	Vápenatý kation
PBP	Protein vázající penicilin (<i>Penicillin binding protein</i>)
UV záření	Ultrafialové záření
AC	Střídavý proud (<i>Alternating current</i>)
ID	Identifikace
LB	LB médium (<i>Lysogeny broth</i>)
MPA	Masopectonový agar
MPN	Stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (<i>Most propable number</i>)
MH agar	Muellerův-Hintonův agar
MIC	Minimální inhibiční koncentrace

pokračování seznamu zkratk

MBK	Minimální baktericidní koncentrace
NaCl	Chlorid sodný
¹⁴ CO ₂	Oxid uhličitý
LAL	Limulus-test
ATP	Adenozintrifosfát
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
ABÚ	Antibakteriální účinnost
CaO/P ₂ O ₅	Poměr oxidu vápenatého a oxidu fosforečného
KRS	Kolonie referenční skupiny
KES	Kolonie experimentální skupiny

1 Úvod

O materiály, které jsou pro biologické prostředí snesitelné, se člověk zajímal již od starověku, ale až ve dvacátém století byla věda na takové úrovni, aby se jimi mohla zabývat detailněji. Už ve starověku některé kultury měly snahu nahradit tvrdé tkáně – kosti, například při poranění lebky. V dnešní době existuje velké množství náhrad z tzv. biokompatibilních materiálů používaných nejen v mnoha medicínských oborech jako chirurgie, zubní chirurgie nebo při léčbě některých kardiovaskulárních chorob, ale i při výrobě a přípravě zdravotnických nástrojů a pomůcek [1].

Biokompatibilní materiály se vyznačují vlastnostmi, které jsou kompatibilní s živými strukturami jako tkáně, kosti a další. Implantologie se zabývá náhradami nefunkčních nebo chybějících tkání a orgánů v lidském těle a aplikací implantátů samotných. Jedním z problémů biokompatibilních materiálů je, aby jejich antibakteriální účinnost byla dostatečná, a zároveň aby tyto materiály nebyly toxické pro lidské buňky. Proto se povrchy implantátů potahují tzv. tenkými vrstvami, které vylepšují jejich vlastnosti, jako jsou antibakteriální účinnost, biokompatibilita a další.

1.1 Přehled současného stavu

Řešení problematiky biokompatibilních materiálů patří v oblasti medicínských aplikací k velmi důležitým úkolům a v dnešní době se jí zabývají vědecké týmy po celém světě. Jako příklady nejrozšířenějších materiálů vhodných k přípravě tenkých vrstev pro potažení implantátů lze uvést uhlík podobný diamantu (diamond-like carbon, DLC), oxid titaničitý a hydroxyapatit (HA). Uvedené materiály jsou vhodné především proto, že lidské tělo obecně velmi dobře snáší uhlík [2]. DLC filmy se v biomedicině uplatňují především tam, kde je vyžadována nízká buněčná adheze [3]. Hydroxyapatit je součástí kostní tkáně, zubní skloviny a zuboviny. Vlastnosti hydroxyapatitu mohou být zlepšeny dopováním stříbrem, hořčíkem, bioaktivním sklem a dalšími. Například povrchová tvrdost hydroxyapatitu je mnohem lepší, když je HA dopovaný než nedopovaný [4].

Tenké vrstvy lze připravit řadou fyzikálních a chemických metod. V této práci se zaměříme na experiment s tenkými vrstvami připravenými pomocí pulzní laserové

depozice. Laserový paprsek o dané energetické hustotě, podle materiálu, je soustředěn do stříbrného terče umístěného ve vakuové depoziční komoře. Materiál je odebrán z terče vyrobeného ze stříbra a slitiny titanu nebo oceli. Substrát je 35 mm od terče a je udržován při pokojové teplotě. Tenké vrstvy jsou připraveny v argonové atmosféře o daném tlaku [5].

1.2 Cíle práce

Cílem této práce je návrh a realizace pilotního experimentu pro vyhodnocení antibakteriálních vlastností tenkých vrstev dopovaných stříbrem se zaměřením na modifikované kultivační podmínky testovaných gram pozitivních bakterií, konkrétně snížené teploty kultivace – testování změny vlastností bakteriální kultury a možnost vzniku biofilmu. Dále je cílem práce stanovení vhodné limitní teploty kultivace pro růst bakterií s použitím laboratorní třepačky a laboratorního termostatu pro testování vzorků.

Návrh pilotního experimentu je modifikací již existujících a stávajících postupů pro tuto problematiku ve výzkumu. Je potřeba nejprve připravit biologický materiál pro testování tenkých vrstev, připravit tuhá a tekutá kultivační média, následně získat bakteriální kulturu bakterií *Micrococcus luteus* a sledovat proces kultivace a růstu bakterií včetně zaznamenávání kultivačních teplot a sledovat nárůst bakteriálních kultur za zadaných podmínek. Před začátkem kultivace bakteriálních kultur je třeba zvolit vhodnou limitní teplotu pro kultivaci bakteriální kultury. Poté vyhodnotit výsledky sledování procesu kultivace bakteriálních kultur a vlivu jednotlivých laboratorních přístrojů na tento proces, včetně zaznamenání výsledků pomocí fotodokumentace. V posledním kroku z výsledků je třeba vyhodnotit správnost a vhodnost stanovené limitní teploty pro kultivační proces bakterií a pomocí napsaného skriptu v programu Matlab vyhodnotit získané fotografie narostlých bakteriálních kultur.

Následné využití výsledků této práce je v možnosti porovnání antibakteriální účinnosti tenkých vrstev dopovaných stříbrem testovaných s mikroorganismy *E. coli* a *B. subtilis*, které byly prováděny na Fakultě biomedicínského inženýrství Českého vysokého učení technického v Praze pracovní skupinou prof. Jelínka.

2 Přehled současného stavu

2.1 Biokompatibilní materiály

Lidské tělo není dokonalé a je náchylné k infekci. Boj s infekcí zajišťuje lidskému organismu imunitní systém, který je velmi propracovaný, ale také komplikovaný. Primární reakcí imunitního systému lidského těla je odmítnutí a snaha zničit jakékoli cizí částice v organismu. Tato vlastnost ale brání uplatnění implantátů v lidském těle, které se používají například při poškození orgánů nebo při nahrazení chybějících částí těla. Je tedy třeba použít takových materiálů, které nebudou lidskému organismu, resp. imunitnímu systému, cizí, tj. biokompatibilní materiály.

Biokompatibilita není jasně definována, ale obecně lze říci, že je to snášenlivost s živými tkáněmi. Biokompatibilní materiály jsou hodnoceny podle snášenlivosti živými tkáněmi, povrchové kompatibility (fyzikální, chemické a biologické) a strukturální kompatibility [6]. Také se hodnotí toxicita vůči tkáním, alergické reakce na materiál a karcinogenní reakce [6] [7]. Tyto materiály musí být kompatibilní s živými tkáněmi a zároveň nesmí být toxické pro okolní tkáň. Tato hranice je těžko definovatelná, proto existuje mnoho druhů biokompatibilních materiálů a každý je vhodný k jinému použití.

Biomateriály lze rozdělit podle reakce tkáně na ně na biotolerantní, bioinertní a bioaktivní. Biotolerantní materiály uvolňují do tkání látky v koncentracích, které nejsou pro organismus toxické. Příkladem biotolerantního materiálu je nekorodující ocel nebo polymethyl-methacrylát. Bioinertní materiály prokazují jen minimální chemické interakce s tkání. Příkladem bioinertních materiálů oxid hlinitý nebo oxid zirkoničitý [8].

V současnosti jsou hojně využívány bioaktivní materiály. Bioaktivní materiály se vážou na tkáň. Na tomto rozhraní bioaktivní materiály vyvolávají specifickou biologickou odezvu, jejímž výsledkem je napomáhání tvorbě přirozených vazeb [9].

Dalším rozdělením biomateriálů je podle jejich struktury na kovy, polymery, keramiky a kompozitní materiály.

2.1.1 Kovy a slitiny kovů

Kovy jako biomateriály nacházejí medicínské uplatnění především v ortopedii a v ortodencii. Zpevnění, připevnění a spojování zlomených kostí šrouby, pláty a dalšími nástroji je jedno z nejběžnějších využití biomateriálů v dnešní době. Jedná

se také o nejdéle používané biomateriály, protože zlaté struny se našly už v zubech mumií ze starověkého Egypta.

V případě ran, které nejsou ohrožující na životě, se používají kovové svorky. Jsou nejrychlejším řešením a mají za následek více konzistentní léčení ran.

Při redukci, tedy navrácení kosti do správné pozice a tvaru, a při nápravě rozdrčené kosti jsou hojně využívány kovové šrouby. Pláty a intramedulární šrouby jsou vkládány do dlouhých kostí. Pláty jsou používány ve spojení se šrouby. Pro tyto nástroje v ortopedii se používá většinou nekorodující ocel s příměsí chromu a niklu, popřípadě je používán jako legující prvek titan. Je třeba ale dávat pozor na to, aby kontaktní pláty a šrouby neměly odlišné příměsi oceli, jinak by docházelo k tvorbě elektrochemického článku, který by urychlil korozi. [8]

Příkladem kovů využívaných v implantologii je už od pradávna zlato, které našlo uplatnění především v ortodencii. Dalším příkladem je oxid zirkonia, který je hojně využíván jako kloubní náhrada, protože je velmi biokompatibilní a některé z jeho mechanických vlastností jsou lepší než vlastnosti aluminiové keramiky a může tak být použit i pro velký implantát, např. stehenní kosti. [10]

Často zastoupeným biomateriálem-kovem je titan a slitiny titanu jako Ti6Al4V nebo slitiny s niobem, tantalem a zirkoniem. Titan je vhodný zejména pro svou minimální nebo žádnou interakci s tkání. Díky aplikaci oxidu titaničitého na povrch kloubního implantátu je možné urychlit tvorbu funkčního rozhraní kost-implantát, tj. zvýšit osteointegraci a zkrátit dobu vhojování do kosti. [11]

Ve zdravotnictví nejsou však slitiny titanu s niobem, tantalem a zirkoniem zatím dostupné, přestože mají mnohem lepší vlastnosti než čistý titan [12]. Jejich dostupnosti brání nedostatečný výzkum tzv. β slitin titanu [13].

2.1.2 Polymery

Polymery mají mezi biomateriály největší zastoupení a našly své uplatnění jako cévní implantáty a díky objevu polyvinylchloridu, teflonu a poréznímu teflonu bylo umožněno vytvořit vnitřní stěnu implantátu, tj. neointimu, která předchází krevní koagulaci uvnitř implantátu.

Polymery můžeme rozdělit na přírodní a syntetické. Přírodní polymery jsou získávány z rostlin a řadíme mezi ně například celulózu, přírodní kaučuk a škrob. Dále mezi přírodní polymery řadíme polymery vyskytující se u zvířat jako kolagen, chitin, elastin, keratin a další.

Syntetické polymery používané běžně jako biomateriály jsou polykarbonát (PC), polyethylen (PE), polyethyltereftalát (PET), polypropylen (PP), syntetický kaučuk (SR), polyvinylchlorid (PVC) a další.

Polymery mají různé složení a odlišné fyzikální a chemické vlastnosti a díky tomu mohou být vyráběny v různých formách, tvarech a strukturách. Díky velkému množství polymerů je možné vybírat specifické polymery pro dané biomedicínské aplikace. Vlastnosti polymerů závisí na takticitě, tj. postranním uspořádáním substituentů v makromolekule [14], molekulární hmotnosti, krystalinitě a dalších charakteristikách.

Jednou z nevýhod polymerů jsou jejich poměrně slabé mechanické vlastnosti v porovnání s ostatními biomateriály jako kovy nebo keramika. Tyto nedostatky lze vykompenzovat syntézami kompozitů založených na polymerech.

Příkladem polymerů je polyethylen, který je používán jako materiál pro dreny a katétry. Vyznačuje se neobvykle dobrými mechanickými vlastnostmi (pevnost a ohebnost). Dalším z polymerů je polypropylen. Polypropylen je velmi tuhý a má dobrou tahovou pevnost. Běžně je používán při potřebě syntetických a nevstřebatelných stehů. Používá se při kýle a prolapsu v pánevní oblasti. Velmi známým polymerem je polyvinylchlorid, používaným hlavně pro výrobu hadiček sloužících například ke krevní transfuzi, dialýze a krevním zásobníkům. Čistý PVC je tvrdý a křehký. K vylepšení jeho vlastností se syntetizuje se změkčovadly (nejběžněji s ftaláty). [8]

Ve tkáňovém inženýrství našly skvělé uplatnění odbouratelné polymery a vedly k vynálezu skeletu, na kterém mohou růst buněčné kultury či tkáně.

2.1.3 Kompozitní materiály

Kompozitní materiály jsou složeny ze dvou a více odlišných konstrukčních materiálů nebo složek. První složkou je ve většině případů matrice, tj. základní hmota, a dalšími složkami bývají zpevňující vlákna [15]. Důležitou vlastností kompozitního biomateriálu je, že každá ze složek je biokompatibilní a povrch mezi složkami se nemění v kontaktu s přiléhajícími tkáněmi.

Přírodní kompozity mají často hierarchickou strukturu porézních částic. Mezi přirozené biologické kompozity patří plíce, spongiózní kost nebo dřevo.

Kontrolovanou syntézou kompozitních materiálů lze získat širokou škálu vlastností daných kompozitů. Vlastnosti jsou dané příměsí materiálu a objemového podílu složek.

Hlavními tvary příměsí jsou částice, vlákna a krevní destičky, resp. lamina. Příměsí se mohou lišit tvarem a velikostí. Dále se také rozlišuje ve struktuře kompozitu náhodnost a preferovaná orientace příměsí a důležitým faktorem při výplni kompozitů je stupeň přilnavosti materiálů k základní hmotě. [10]

Pro biomedicínskou aplikaci se z kompozitních materiálů používají kompozity pro zubní výplně, kostní části, uhlíková vlákna, polyethylen s extrémně vysokou molekulovou hmotností (UHMWPE), resp. vyztužený kostní cement, a porézní povrch ortopedických implantátů. K docílení větší pevnosti a tuhosti pryže je pryž obvykle plněna velmi jemnou částí křemíku nebo sazí.

Nanočásticové kompozity (průměr < 100 nm) v dnešní době nalézají stále větší uplatnění. Používají se například jako výztuha měkkých i tvrdých tkání. [10]

2.1.4 Keramika a sklo

Keramika, sklo a sklokeramika jsou široce užívány jako biomateriály v medicíně hlavně kvůli jejich nekorozičnosti a pórovitosti, která výrazně zvyšuje a prohlubuje pnutí. Právě na pórovitosti závisí pevnost keramiky a skla. Jejich nevýhodou je ale malá pevnost v tahu a křehkost. Tuto vlastnost lze vylepšit povrchovou kompresí, např. iontovou výměnou, krystalizací povrchu nebo kalením.

I přes vynikající kompatibilitu s tkání nejsou keramika a sklo tak často využívány jako implantáty, protože je velmi obtížné předvídat selhání pevnosti. Mohou se použít na místa s vysokou zátěží, ale jen za předpokladu správné metody předpovídání selhání pevnosti a je třeba, aby se implantát vyhnul stresovým podmínkám v tahu. [10]

Keramické materiály můžeme rozdělit na základě jejich vlastností na bioinertní keramiku a na bioaktivní keramiku. Bioaktivní keramiku lze dále rozdělit na vstřebatelnou a nevstřebatelnou. Tyto keramické materiály jsou vyráběny různými způsoby a v různých formách od pórovitých až po husté. [8]

Bioinertní keramika se nevyznačuje žádnou toxicitou a minimální interakcí s okolní tkání, kvůli čemuž byl tento typ keramiky vyvíjen. Vysoká hustota a velká pórovitost oxidu hlinitého, jako jednoho z příkladů bioinertní keramiky, je využívána pro kyčelní kloubní náhrady kvůli častému opotřebení a nutnosti velké nosnosti kyčelního kloubu. Těchto vlastností se využívá i ve stomatologii. Bioinertní keramika má dobrou biokompatibilitu, vynikající odolnost vůči korozi, velkou pevnost, výjimečnou odolnost proti opotřebení a velmi malý koeficient tření.

Dalším příkladem běžně používané bioinertní keramiky pro kloubní hlavici kyčelního kloubu je oxid zirkonia.

Ostatní oxidy a bioinertní keramiky založené na uhlíku nebo křemíku (uhlíková vlákna, uhlík podobný diamantu) jsou také používány v ortopedii a jako stomatologické implantáty.

Speciální kategorii mezi keramickými biomateriály zaujímá tzv. biosklo. Tento materiál s charakteristickými vlastnostmi má specifické složení – vysoký obsah Na_2O a CaO (> 40 hm.%), nízký obsah SiO_2 (< 60 hm.%) a velký poměr $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$. Biosklo můžeme podle Henche rozdělit na dvě třídy. Třída A má vlastnosti osteokondukcce i osteoprodukce, zatímco třída B pouze osteokondukcce. V této oblasti neustále probíhají výzkumy a vyvíjí se další a další typy bioskla.

Z dalších materiálů na bázi keramiky a skla, které našly své uplatnění v kloubních náhradách, je sklokeramika. Je používána jako nosný materiál v místech tlakového zatížení, např. jako obratlová náhrada.

Fosforečnan vápenatý je významná složka kostní tkáně a syntetické keramiky založené na fosforečnanu vápenatém, jako například hydroxyapatit, jsou často využívány v biomedicíně. Jsou však limitovány svými mechanickými vlastnostmi proti nosnému zatížení. Používají se proto jako povlaky na kovové a další keramické implantáty. [8]

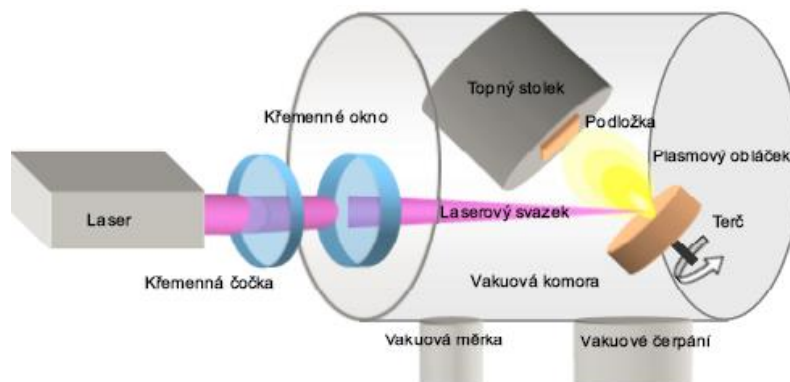
2.2 Tenké vrstvy

Implantáty bez povrchových úprav, pokud jsou implantovány do lidského organismu, mohou vyvolat reakce s tkáněmi těla. Z důvodu interakcí povrchových vrstev implantátů s okolním prostředím, tj. tkáněmi, je snaha implantáty potahovat tzv. tenkými vrstvami, které mají za úkol zabránit právě těmto nežádoucím interakcím. Tenké vrstvy jsou dvoudimenzionální objekty s třetím rozměrem (tloušťkou) – velmi malým, přibližně $1 \mu\text{m}$ až 1nm . Tenké vrstvy modifikují povrch, na který jsou povlakovány. Depozice tenkých vrstev může být fyzikální, kam patří metoda PVD (= physical vapor deposition), nebo chemické, kam spadají metody CVD (= chemical vapor deposition) a PECVD (= plasma-enhanced chemical vapor deposition). Fyzikální depozice dále dělíme na napařování, napařování, iontové plátování, plazmový nástřik a laserovou depozici, která byla použita na přípravu tenkých vrstev, které jsem použila ve svém experimentu.

Tenké vrstvy jsou vytvářeny především proto, aby nedocházelo k tvorbě bakteriálního biofilmu na povrchu implantátů a je snaha se co nejvíce přiblížit složení těla. Mezi biokompatibilní tenké vrstvy patří tenké vrstvy s obsahem titanu, konkrétně titanu Ti6Al4V nebo oxidem titaničitým (TiO_2), obsahem stříbra a dalších prvků [16] [17]. Sledovaným parametrem tenkých vrstev je morfologie jejich povrchu, kterou je možné studovat například pomocí elektronové skenovací mikroskopie (SEM) a mikroskopie atomárních sil (AFM). Rozlišujeme tenké vrstvy s amorfním povrchem a vrstvy krystalické, polykrystalické až monokrystalické.

2.2.1 Pulzní laserová depozice

Pulzní laserová depozice (PLD) je laserová depozice tenkých vrstev. Princip spočívá ve fokusovaném laserovém paprsku, který dopadá na terč. Vysoká hustota záření materiál převede z pevného stavu na plazmový obláček, který poté kondenzuje na podložce umístěné nad terčem. Základní experimentální uspořádání pro laserovou depozici tenkých vrstev se skládá z vakuové depoziční komory, držáku podložek umožňujících ohřev podložek a přesné měření teploty, materiálu terče a laseru (viz obr. 2.1).



Obr. 2.1: Princip pulzní laserové depozice [16]

Existují depoziční parametry ovlivňující růst, tloušťku, plochu a kvalitu deponovaných vrstev, které dělíme na parametry laseru, interakce laserového záření s terčem, interakce plazmového plumu s plynným prostředím a s podložkou, parametry podložky a režim růstu vrstvy (viz tabulka 2.1). [17]

Výhodami PLD jsou stechiometrická depozice i vícesložkových materiálů, což v praxi znamená aplikaci materiálů, které obsahují více složek a tenká vrstva tak může mít díky tomu lepší vlastnosti; vysoká rychlost depozice, laser je umístěn vně vakuové komory a dochází tak pouze k místnímu ohřátí; jednoduchost této metody,

relativně nízká cena systému, malá spotřeba materiálu, možnost vytváření vrstev a multivrstevných struktur různých a vícesložkových materiálů a v PLD procesu dochází k rychlému a čistému lokálnímu ohřevu povrchu terče, což minimalizuje kontaminaci vytváření vrstev. Problémem je homogenní pokrytí velké plochy z důvodu úzkého úhlového rozložení částic emitovaných z terče a možné znehodnocení povrchu deponované vrstvy přítomností kuliček materiálu.

Tabulka 2.1: Depoziční parametry ovlivňující deponované vrstvy [17]

Kategorie Depozičních parametrů	Depoziční parametry
Parametry laseru	vlnová délka délka impulsu opakovací frekvence ovlivňující nukleaci
Interakce laserového záření s terčem	hustota výkonu laserového svazku velikost laserového svazku materiálové vlastnosti terče velikost laserového svazku
Interakce plasmového plumu s plynným prostředím a s podložkou	tlak a výběr plynu v depoziční komoře vzdálenost terč-podložka
Parametry podložky	mřížkové parametry tepelná vodivost koeficient tepelné roztažnosti teplota podložky
Režim růstu vrstvy	depoziční rychlost frekvence opakování pulsů tloušťka vrstvy

PLD je možné také použít jako hybridní systém například s magnetronovým naprašováním a radiofrekvenčními výboji. Koncentrace stříbra byla v rozmezí od 0 at% až po 9,34 at% pro Ag-DLC. Obsah kyslíku se pohyboval v rozmezí asi od 5 at% do 8 at% v návaznosti na zvyšující se obsah stříbra. Obsah stříbra byl zvolen s ohledem na předchozí zkušenosti týmu prof. Jelinka s vrstvami dopovanými stříbrem. [4] [5]

2.3 Bakterie a jejich prostředí

2.3.1 Bakteriální infekce

Infekce obecně, neboli nákaza, je průnik choroboplodného zárodku (např. bakterie, viru, parazita aj.) do lidského organismu, způsobí reakci lidského těla v závislosti na imunitním systému. Bakterie jsou na Zemi 3,5 miliardy let a v současnosti tvoří nejhojnější formu života na Zemi. I díky tomu patří bakteriální infekce mezi nejčastější příčinu onemocnění na světě, a přestože se jedná o velmi malé a nenápadné organizmy, dokáží způsobit velké zdravotní problémy. [18] [19]

Přirozeně se bakterie v lidském těle nevyskytují ve svalech, mozku, krvi, a vnitřních orgánech. Naopak běžně je můžeme najít na kůži, na sliznicích gastrointestinálního traktu, pochvy, nosu, nosohltanu a spojivky v očích, kde se vyskytují ve formě bakteriálního mikrobiomu. Koexistenci bakterií v lidském těle můžeme rozdělit na čtyři základní kategorie – symbionty, komenzály, saprofyty a patogenní mikroorganismy.

Symbiotické bakterie člověku prospívají a bakterie z tohoto vztahu profitují. Tento mikrobiom chrání organismus před patogeny, má význam pro aktivitu a vývoj imunitního systému, především v prvních měsících života a podílí se také na tvorbě nutričních faktorů, konkrétně na tvorbě vitamínu K. Komenzálové mají ze soužití potravní prospěch a hostitele nijak neovlivňují. Příkladem takové bakterie je *Escherichia coli* v tlustém střevě u savců. Třetí kategorií tvoří saprofyti, kteří se také mohou vyskytovat v lidském těle. Tyto mikroorganismy na sebe s lidským tělem vzájemně nepůsobí. Živí se zplodinami buněk organismu [20]. Poslední kategorií jsou patogeny. Patogeny jsou mikroorganismy škodící lidskému tělu přímo nebo produkcí toxických látek. Jedním z nejběžnějších patogenů v lidském těle je *Streptococcus pyogenes*, který je bakteriálním původcem angíny. [21] [22]

Bakteriální infekce je velmi běžná, protože se bakterie vyskytují téměř všude. Celý proces bakteriální nákazy lze rozdělit do několika kroků. Každý krok rozhoduje o tom, zda k nákaze dojde či nikoli, případně jak se projeví či jaké budou následky.

Dále můžeme bakterie obecně dle patogenity pro člověka rozdělit na bakterie, které onemocnění způsobí vždy a na ty, které onemocnění běžně nezpůsobují. Do první skupiny řadíme například patogenní bakterie *Mycobacterium tuberculosis* a *Yersinia pestis* apod. Do druhé skupiny zařazujeme bakterie, které jsou součástí mikroflóry lidského organismu jako *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* aj. V případě bakterií z druhé skupiny dochází k infekci, pokud je lidský organismus oslaben nebo se bakterie dostanou z prostředí výskytu části organismu, kde se vyskytují, např. střeva, do soustavy vylučovací, konkrétně močových cest.

Důležitým faktorem ovlivňujícím vznik bakteriální nákazy je odolnost bakterií vůči prostředí. Méně odolné bakterie na přenos se proto přenášejí jen pohlavním stykem, kdy je kontakt nejtěsnější. O něco odolnější bakterie jsou schopné přežít přenos vzduchem, dotekem či jídlem. Existují však i zástupci bakterií, kteří jsou schopni v určitém prostředí přežít celá staletí, jako původce tetanu *Clostridium tetani* [23]. Další skupinou jsou bakterie, které jsou přenášeny členovci jako komár, klíště a další.

V tomto případě se bakterie do těla dostávají nejčastěji kůží nebo ještě lépe poraněnou kůží, dále nosní sliznicí, sliznicí hltanu, uchem, okem či pohlavními orgány. Obecně lze tedy říci, že se bakterie dostávají do těla obvykle v oblastech, které jsou v kontaktu se zevním prostředím.

Bakterie jsou často tkáňově specifické. Jako příklad je možné uvést chlamydie, jejichž vstupní bránou do těla je většinou močová trubice nebo spojivka. Bakterie mají čtyři základní mechanizmy bakteriální patogenity – invazivita, toxicita, stimulace zánětlivé reakce a indukce imunopatologických reakcí (tj. indukce reakcí analogických fyziologickým reakcím lidského organismu, které jsou původně používány k eliminaci patogenů v těle, ale za určitých okolností vedou k poškození vlastních tkání) [24]. Při invazi bakterie jsou schopny kolonizovat tkáň díky produkci extracelulárních substancí, které usnadňují invazi. Jsou také schopny ochrany před defenzivními mechanizmy hostitele. Skupina bakterií, které používají mechanismus toxicity, jsou schopné produkovat exotoxiny, tedy exogenní látky toxické pro hostitele, nebo endotoxiny, tedy endogenní látky uvolňované při rozpad bakterií nebo v malém množství aktivně během života bakterie. Velkým problémem tohoto mechanismu je, že toxiny mohou být přepravovány krví nebo lymfou do vzdálených míst a působit tam. Při stimulaci zánětlivých reakcí bakterie podporují a rozvíjejí zánět ve tkáni a komplikují tak jeho léčbu.

Úspěšnost průniku bakterií do lidského organismu závisí na momentálním stavu imunitního systému organismu. Fyziologicky se obranný systém aktivuje ihned po vniknutí do těla a zahajuje obranné mechanismy potřebné k boji s patogenem. Jak se bude vyvíjet boj s patogenem, záleží na stavu organismu, protože pokud je organismus v dobrém stavu, k projevení příznaků nemusí vůbec dojít. Pokud ovšem organismus není v dobré kondici nebo se s daným onemocněním ještě nesešel, vytvoření obranných mechanismů trvá delší dobu v závislosti na typu patogenu a příznaky zánětu se projeví naplno. Příznaky mohou být lehké, ale nemusí. Do bakteriálních onemocnění patří i některá smrtelná onemocnění jako například mor.

Prevenčí bakteriálních onemocnění je vyhýbat se setkání s patogenem, ale jak bylo řečeno výše, bakterie jsou téměř všude, a tak se můžeme vyhýbat pouze prostředím s vyšší koncentrací patogenů, než je obvyklé. Dále je důležité posilovat obranyschopnost organismu, popřípadě se nechat očkovat proti některým bakteriím, proti kterým očkování existuje. V dnešní době máme k dispozici očkování proti běžným onemocněním, jako je infekce bakterií *Haemophilus influenzae b*. V České republice je

zaveden systém preventivního očkování proti nebezpečným chorobám, které v minulosti byly velmi rozšířené, a dnes jsou na našem území díky systematickému očkování téměř vymýceny. Zástupcem těchto onemocnění je záškrt, tetanus a černý kašel [25]. Dále existují dobrovolná očkování, kterými můžeme posílit svou obranyschopnost, a zabránit tak bakteriální infekci v našem organismu. Mezi tato onemocnění, proti kterým se lze dobrovolně nechat očkovat, patří například pneumokoková infekce. Jedním z dalších opatření proti bakteriální infekci jsou speciální nátěrové hmoty s částicemi stříbra nebo oxidu titaničitého, které vykazují antibakteriální účinky. Používají se v místnostech, kde se vyskytuje větší množství lidí a je tam větší riziko nákazy, jako dětské školky, popř. potřeba sterilního prostředí, jako nemocnice a další zdravotnická zařízení. Příkladem může být interiérová malba THERMOWELL s antialergenní a bakteriální odolností a odolností vůči plísním [32]. Ve zdravotnictví se také při stavbě nebo renovaci místností nepoužívají ostré rohy, ale rohy s radiem, aby se zabránilo patogenním organismům zdržovat se v ostrých rozích, které jsou špatně dostupné při čištění a úklidu.

2.3.2 Volné bakterie

Rozlišujeme dvě formy mikrobiálního růstu. První formou je forma planktonická a druhou formu označujeme jako tzv. bakteriální biofilm.

Mikrobiální růst v planktonické formě jsou navzájem izolované mikrobiální buňky, které se volně vznášejí v tekutém prostředí. Planktonická forma je velmi běžná v laboratorním prostředí. Naopak v přirozeném prostředí je poměrně vzácná.

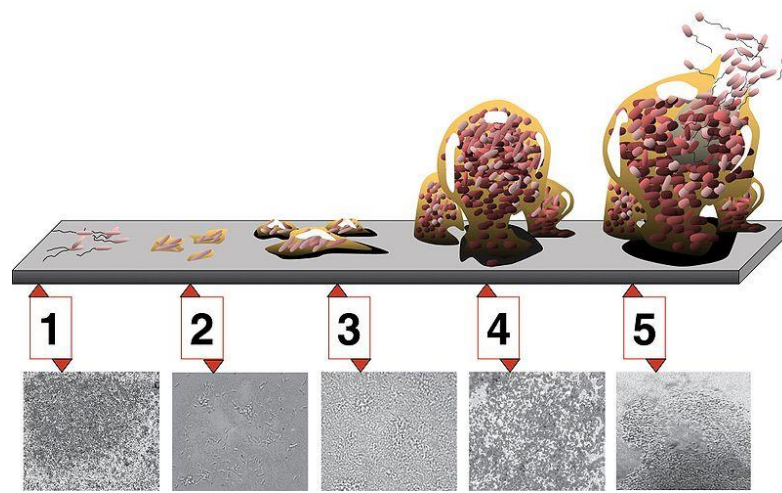
Mikrobiální buňky v planktonické formě se mohou vyskytovat v této formě trvale nebo jsou přitahováni k povrchu či rozhraní fází, tj. atrakce, a podílejí se na tvorbě bakteriálního biofilmu. Proces atrakce je nápadný například u pohyblivých bakterií s bičíky. [26]

2.3.3 Bakteriální biofilm

Bakteriální biofilm je mikrobiální společenství nevratně přichycených buněk k podložce nebo k okolním buňkám, usazených v polymerní mimobuněčné hmotě, kterou samy produkují, a mají změněný fenotyp [27].

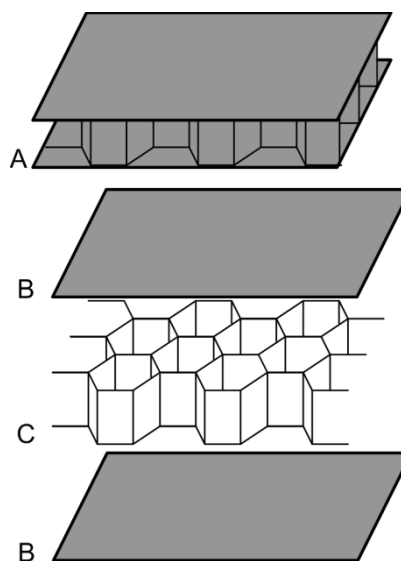
Mechanismus vzniku bakteriálního biofilmu začíná iniciálním přilnutím bakterií k povrchu (viz obr. 2.2) pomocí adhezínů. Adheziny jsou bílkoviny aktivní v patogenezi, resp. antigeny umožňující invazi, lokalizaci bakterií do endozomu a jeho

následné rozrušení, šíření bakterií na další buňky a další regulační mechanismy. Po přilnutí změny adheziny své chování a fenotyp. Začnou produkovat velké množství lepivého polysacharidu podobného škrobu. Z polysacharidu se začne vytvářet hlenová matrice, která je pro buňky voštinovým lešením (viz obr. 2.3) a drží je pohromadě. Zároveň se buňky ve voštinovém lešení množí, tvoří se tak mikrokolonie a spleť kanálků. Buňky v kolonii zrají ve dvou stádiích a pak se na určitý impuls odlučují, přecházejí do planktonického stavu, odplouvají a mohou kolonizovat další části povrchu. [27]



Obr. 2.2: Fáze vzniku biofilmu [28]

Bakteriální biofilm není homogenní. Skládá se z hluků buněk, které tvoří různé bakteriální druhy, a četných dutin propojených kanálky. Tloušťka bakteriálního biofilmu je v čase různá – od několika μm do stovky μm v závislosti na dostupnosti živin.



Obr. 2.3: Schéma konstrukce sendviče s voštinovým jádrem [29]

Tvorba bakteriálního biofilmu a vlastnosti buněk jsou důležitou studovanou problematikou při patogenezi některých infekčních onemocnění. Významnou roli hraje u infekcí, kdy se patogenní bakterie usadí na sliznici nebo uvnitř tkáně. Příkladem je nejdéle známý bakteriální biofilm – zubní plak, který vzniká přirozeně. Je odstranitelný, ale vzniká znovu. Dalším typickým příkladem je endokarditida neboli srdeční zánět způsobený bakteriemi. Biofilm se vytváří na srdečních chlopních a toto onemocnění se velmi špatně léčí. Mezi další časté infekční onemocnění patří záněty v dutině ústní.

Bakterie tvoří biofilm velmi často také na implantátech a zdravotnických zařízeních zavedených do tělních tekutin a tkání. Pokud je bakteriální biofilm objemný, mohou se jeho části odtrhnout a způsobit další záněty v těle. Bakterie tvoří biofilm i na místech, kde je těleso zcela izolováno od vnějšího prostředí, například na kovových kloubních náhradách. U těchto kovových kloubních náhrad je nutné, aby byly povlakovány tenkými vrstvami s antibakteriálními účinky a nedocházelo tak k bakteriální infekci.

Bakteriální biofilm je nejčastěji tvořen bakteriemi ze skupiny stafylokoků, pseudomonáz, bakterií *Escherichia coli* a někdy bakteriemi ze skupiny streptokoků nebo aktinomycet.

Do dnešní doby není známa spolehlivá metoda úplného odstranění bakteriálního biofilmu. Buňky biofilmu jsou velmi rezistentní k antimikrobním látkám a dezinfekcím. Jejich rezistence je až tisíckrát větší než rezistence planktonických buněk, což znamená, že nestačí ani vysoké dávky antibiotik k vyléčení. Problém tak vysoké rezistence spočívá ve fenotypovém podmínění a ne genetickém. Pokud se pokusíme zničit bakteriální biofilm pomocí antibiotik, můžeme použít širokospektrá antibiotika, ale nelze pokrýt všechny druhy bakterií a také nemáme k dispozici taková antibiotika, která by pokryla i všechny fenotypy jednoho druhu bakterie. Proto je velmi náročné bakteriální biofilm jakkoli zničit. Z tohoto důvodu jsou v současné době neustále vyvíjeny tzv. tenké vrstvy, kterými se např. implantáty povlakuje. Tyto tenké vrstvy jsou vytvářeny tak, aby zabránily vzniku bakteriálnímu biofilmu v okolním prostředí implantátu. Antibakteriálních účinků tenkých vrstev se dosahuje pomocí částic stříbra a oxidu titaničitého obsažených v tenkých vrstvách, které disponují antibakteriálními účinky.

2.3.4 Vliv teploty na kultivaci bakterií

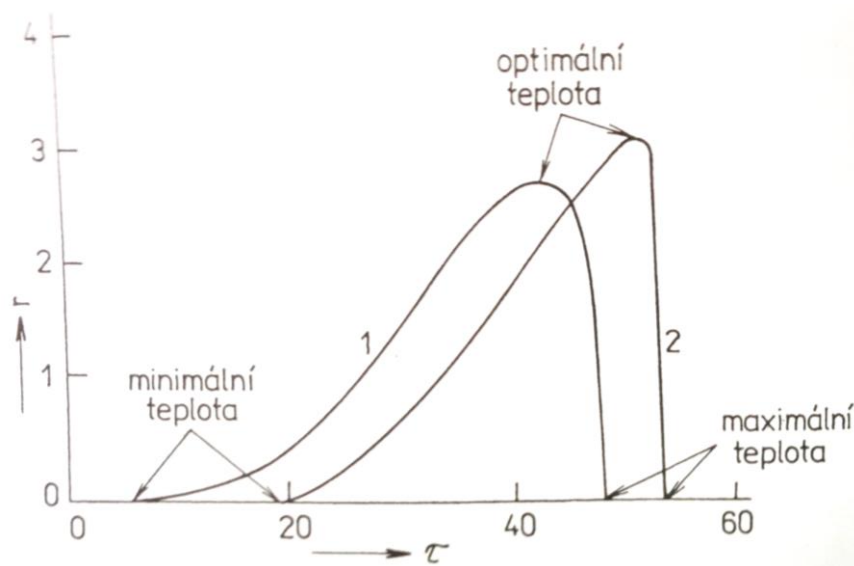
Rychlost rozmnožování mikroorganismů ovlivňuje několik faktorů. Jedním z hlavních faktorů je teplota vnějšího prostředí. Každý mikroorganismus má tři základní body teploty vnějšího prostředí, které znatelně ovlivňují rychlost rozmnožování. Minimální teplota je teplota vnějšího prostředí, při níž se daný druh mikroorganismu rozmnožuje ještě zjistitelnou rychlostí. Při optimální teplotě se mikroorganismus rozmnožuje největší rychlostí a maximální teplota je nejvyšší teplota vnějšího prostředí, při které je mikroorganismus schopný se ještě rozmnožovat. Optimální teplota pro rozmnožování se ale ne vždy shoduje s optimální teplotou pro ostatní životní procesy buňky.

Stanovit minimální teplotu je značně obtížné, protože s klesající teplotou klesá postupně i rychlost rozmnožování mikroorganismů. Z tohoto důvodu je obtížné minimální teplotu vnějšího prostředí pro rozmnožování určit. Zatímco teplota optimální je v průměru asi o 30 °C vyšší než teplota minimální, maximální teplota je jen o 5-10 °C nižší než optimální teplota. Z toho lze jednoduše odvodit, že při překročení optimální teploty prudce klesá rychlost rozmnožování mikroorganismů (viz obr. 2.4), a to z důvodu denaturace některých enzymů potřebných k růstu mikroorganismů. Pokud je zvýšení teploty malé, denaturace je reverzibilní. Pokud však dojde k většímu růstu teploty, denaturace je ireverzibilní. Dalším zvýšením teploty dojde k usmrcení buněk.

Pokud krátkodobě zvýšíme teplotu nad maximální teplotu, vyvoláme tím teplotní šok, který způsobuje různé výkyvy metabolismu v mikroorganismu. Při tomto ději se syntetizují tzv. teplotně šokové proteiny (HSP), které řadíme mezi tzv. stresové proteiny. Těmito proteiny mikroorganismus rozpoznává anomální proteiny, které se tvoří ve stresu, a zajišťuje jejich rychlé odbourávání.

Výše uvedené základní teplotní body různých mikroorganismů se značně liší. Pro některé je to 20 °C, pro jiné 55 °C. Důvodem těchto rozdílů je adaptace mikroorganismů, která byla umožněna přirozenou selekcí nejrychleji se rozmnožujících jedinců v určitém prostředí. Minimální teplotu růstu určuje enzym, jehož aktivita je nejcitlivější na nízké teploty. V teplotním rozmezí minimální a optimální teploty se zvyšuje rychlost všech procesů v buňce, včetně rychlosti rozmnožování, se vzrůstající teplotou. Vliv denaturačních procesů se začíná uplatňovat již při teplotách blízkých se optimální teplotě a při maximální teplotě růstu je vliv denaturačních procesů díky vysokým teplotám tak velký, že růst buňky se zastavuje. Obecně lze říci, že u prokaryotních mikroorganismů je maximální teplota vyšší (obvykle 45-70 °C)

než u eukaryotních mikroorganismů, kde se hodnoty maximální teploty pohybují kolem 38-50 °C. [20]



Obr. 2.4: Vliv teploty na rychlost rozmnožování mikroorganismů [30]
1. *Escherichia coli*, 2. *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*
 τ – teplota (°C), r – počet generací za hodinu

Základní teplotní body mikroorganismu lze změnit, pokud změníme genetickou informaci mikroorganismu. Tímto způsobem byly vytvořeny mutanty senzitivní k teplotě, tzv. ts-mutanty, které mají výrazně nižší maximální, popř. i optimální, teplotu. Tato genetická úprava způsobuje mnohem větší termolabilitu některým nezbytným enzymům, než mají nezmutované kmeny.

Podle vztahu a tolerance k teplotě rozlišujeme 3 skupiny mikroorganismů – psychofilní, mezofilní a termofilní. Psychofilní organizmy mikroorganismy se vyznačují optimální teplotou nižší než 20 °C a dobře rostou při teplotách okolo 0-5 °C. Jejich generační doba se pohybuje za těchto podmínek okolo 48 hodin či méně. Některé mikroorganismy z této skupiny jsou schopné růst i při -10 °C. Do této skupiny patří i psychotrofní mikroorganismy, které se rozmnožují celkem rychle při teplotách 0-10 °C bez ohledu na jejich optimální teplotu. K psychotrofním mikroorganismům řadíme bakterie z rodů *Pseudomonas*, *Micrococcus* aj. Najdeme je hlavně v půdě a ve vodě. Způsobují rozklad masa, mléčných výrobků a jiných potravin uchovávaných při nízkých teplotách. Druhou skupinou jsou mezofilní mikroorganismy, které mají minimální teplotu vyšší než 5 °C a optimální teplotu pod 45 °C. Do této skupiny řadíme většinu mikroorganismů. U bakterií je optimální teplota kolem 37 °C. Třetí skupinou jsou termofilní mikroorganismy, které mají optimální teplotu růstu 45 °C a vyšší. Jejich

optimální teploty jsou různé, ale všechny mikroorganismy z této skupiny mají společné to, že za těchto teplot mají mimořádně vysokou metabolickou aktivitu vysokou rychlost růstu. Tento jev je způsoben odlišným složením bílkovinných složek buněčných enzymů. [30]

Teploty nižší než minimální teplota růstu přežívá většina mikroorganismů celkem dlouhou dobu. Jestliže jsou intenzivně se rozmnožující buňky některých bakterií vystaveny teplotám blízkým 0 °C (resp. přeneseny z optimální teploty do nízkých teplot), dochází u nich k tzv. chladovému šoku. Jeho projevem je ztráta životnosti velké části populace bakterií. Citlivost různých druhů bakterií k nízkým teplotám je odlišná. Některé bakterie jsou poměrně rezistentní, některé jsou dost citlivé na jakékoli teplotní výkyvy a po vystavení takovýmto teplotám dochází k zániku až 95 % populace. U jiných bakterií naproti tomu dochází k vymírání buněk, jen pokud jsou vystaveny těmto teplotám po delší dobu. Po kratším vystavení těmto teplotám se určitá část populace zregeneruje. Buňky podrobené chladovému šoku jsou také citlivější k nepříznivým podmínkám. [30]

2.3.5 Morfologie povrchových vrstev bakterie

Z morfologického hlediska bakterie v diagnostice studujeme a určujeme pozorováním obarvených usmrcených bakterií. v praxi se hojně využívá Gramova barvení. To nám zajišťuje pozorování a znázornění tvaru bakterií a jejich charakteru. Bakterie při tomto barvení rozlišujeme na grampozitivní a gramnegativní. Tyto dvě skupiny se od sebe liší strukturou buněčné stěny a jinými vlastnostmi, včetně mechanismu infekce. [27]

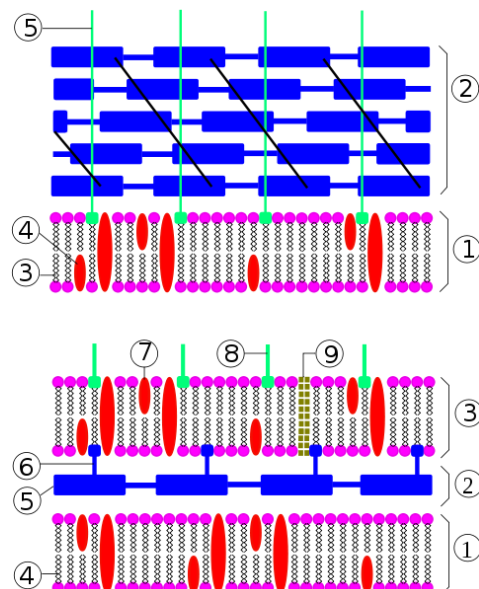
U většiny bakterií nacházíme společné povrchové vrstvy – cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu.

Cytoplazmatická membrána je velmi jemné struktury. Obsahuje enzymy, které selektují a transportují látky, resp. živiny, dovnitř buňky a katabolity ven z buňky. Také se na jejím povrchu nachází enzymy, které syntetizují buněčnou stěnu.

Na cytoplazmatickou membránu naléhá buněčná stěna, která je tuhá. Buněčná stěna určuje tvar buňky a mechanicky ochraňuje bakterii zvnějšku. Buněčná stěna je pevná a silná asi kolem 20 nm. Základní složkou jsou řetězové molekuly peptidoglykanu, které jsou síťovitě pospojovány oligopeptidy. Právě tato struktura způsobuje pevnost, tuhost a omezenou elasticitu buněčné stěny. Detailnější struktura buněčné stěny se potom u grampozitivních a gramnegativních bakterií liší.

Gramnegativní bakterie mají svou buněčnou stěnu tenčí než grampozitivní bakterie a její stavba je komplikovanější. Skládá se z tenké vrstvy peptidoglykanu a vnější membrány. Vnější membrána je složena z dvojvrstvy fosfolipidů a bílkoviny. S peptidoglykanem je spojena pomocí lipoproteinů. Vnější membrána bakterii zajišťuje obranu proti chemickým látkám a lytickým účinkům některých látek, tj. rozkladu. Na zevní straně této membrány se také nachází specifický polysacharid, který je nositelem antigenicity, tj. nositelem antigenu, a způsobuje virulenci bakterie. Mezi vnější membránou a peptidoglykanem gramnegativní bakterie je periplasmatický prostor (viz obr. 2.5), kde se nachází vyloučené metabolity a enzymy s různými funkcemi. Gramovým barvením se buněčná stěna gramnegativních bakterií zbarví safraninovým roztokem do růžova. [27]

Grampozitivní bakterie mají jednodušší stavbu než gramnegativní bakterie. Mají silnou vrstvu peptidoglykanu (viz obr. 2.5). Buněčná stěna je prostoupena kyselinou teichoovou, která je hlavním povrchovým antigenem a váže Mg^{2+} a Ca^{2+} kationty. Výjimečně obsahuje také lipidy. Jejich buněčná stěna neobsahuje bílkoviny, až na bakterie rodu *Streptococcus*. Buněčná stěna je syntetizována enzymy transpeptidázy, které mohou na sebe také navázat penicilin (PBP – penicillin binding proteins) a tím být inaktivovány. Gramovým barvením se buněčná stěna těchto bakterií zbarvuje krystalovou violetí modrofialově. [27]



Obr. 2.5: Stavba buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií -
Grampozitivní bakterie (nahore) 1. Cytoplasmatická membrána, 2. Peptidoglykan, 3. Fosfolipidy, 4. Membránové proteiny, 5. Kys. lipoteichoová. Gramnegativní bakterie (dole)
 1. Cytoplasmatická membrána (vnitřní membrána), 2. Periplasmatický prostor, 3. Vnější membrána, 4. Fosfolipidy, 5. Peptidoglykan, 6. Lipoprotein, 7. Proteiny, 8. Lipopolysacharidy, 9. Pór [31]

Polymerní hmota na povrchu bakterie je glykolax. Tato hmota je produkována jen za určitých podmínek. Může tvořit pouzdro nebo neorganizovanou hlenovou vrstvu. Podílí se také tvorbě bakteriálního biofilmu, protože zajišťuje přichycení bakterie na pevný povrch, např. sliznice.

Na povrchu některých bakterií se také vyskytuje pouzdro, které může dosahovat tloušťky až 1 μm , a chrání buňku před nepříznivými vlivy prostředí a zabraňuje fagocytóze, tj. pohlcení leukocyty. [27]

2.3.6 Zástupci grampozitivních bakterií

Bacillus subtilis

Bakterie *Bacillus subtilis* patří do skupiny grampozitivních bakterií rodu *Bacillus*. Její velikost se pohybuje mezi 2-3 μm . Vyskytuje se ve formě tyček (viz obr. 2.6), které se spojují do řetězců, ale jsou stále pohyblivé. Jedná se o aerobní bakterie a její způsob výživy je chemoorganotrofní, tj. živiny získává z chemických látek organického původu. Optimální teplota kultivace je 30 $^{\circ}\text{C}$. Její kultura roste při 50 $^{\circ}\text{C}$, ale při 55 $^{\circ}\text{C}$ se její růst zastavuje. Vyskytuje se hlavně v půdě, ve vodě a v potravinách. [32]



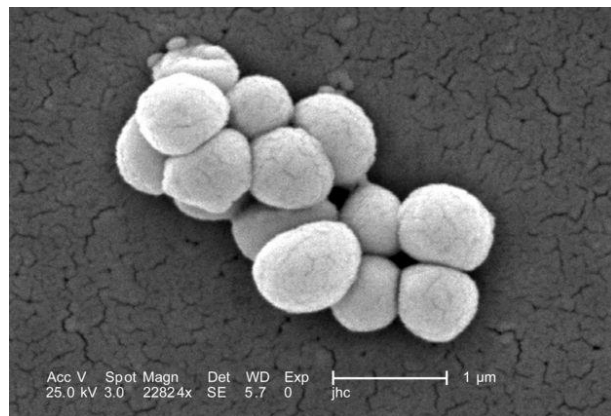
Obr. 2.6: Bakterie *Bacillus subtilis* [33]

Micrococcus luteus

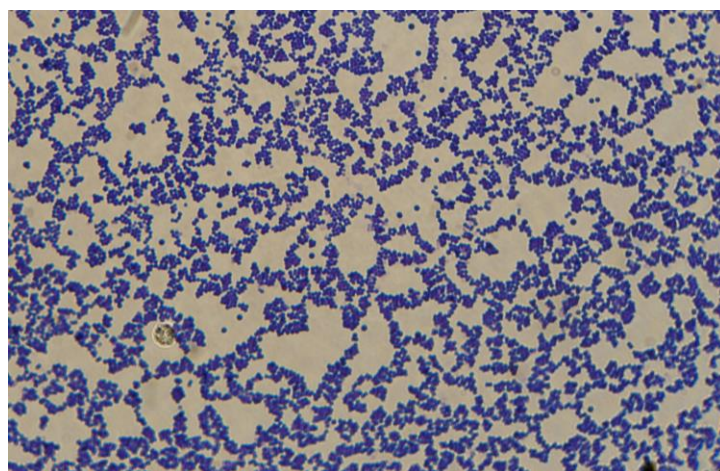
Zástupce rodu *Micrococcaceae*, *Micrococcus luteus*, je grampozitivní bakterie velikosti 0,9-1,8 μm (viz obr. 2.7). Vyskytuje se ve formě kulovitých buněk – koků – a spojuje se do tetrad či baliček. Jedná se o nepohyblivou striktně aerobní nesporulující bakterii, která se živí chemickými látkami organického původu. Optimální kultivační

teplota této bakterie je 25-37 °C a bakteriální kultura je zbarvená pomocí pigmentů do žluta. Roste však i při 10 °C. Neroste ale už při 45 °C, nesnáší kyselé prostředí a je halotolerantní (tj. schopné růst v určitých koncentracích; v tomto případě 10-15% NaCl). Vyskytuje se primárně na pokožce savců a sekundárně v mase, půdě a ve vodě [34]. Na lidské kůži se podílí na rozkladu při pocení a výsledné produkty této reakce způsobují zápach. [35]

Pro člověka je většinou neškodná, ale jsou zaznamenány případy bakteriální infekce člověka, zejména u lidí, kteří jsou HIV pozitivní. Tato bakterie jim způsobuje bolestivé vředy a často je zaměňována s bakterií *Staphylococcus aureus*. *M. luteus* může produkovat barviva jako karotenoidy, tedy žluté a oranžové barvivo, které slouží jako ochrana před UV zářením. Díky tomu má schopnost toto záření absorbovat, a to díky pigmentům, které absorbují dlouhovlnné záření. Tato schopnost je předmětem zájmu mnoha kosmetických společností, které zkoumají využití této bakterie v krémech na ochranu pokožky před škodlivým UV zářením. [36]



Obr. 2.7: Bakterie *Micrococcus luteus* [37]



Obr. 2.8: Barvená bakteriální kultura dle Grama [-]

3 Metody

Při experimentu byla použita bakterie z rodu *Micrococcus* - *Micrococcus luteus* (viz obr. 3.1). Tento mikroorganismus se běžně vyskytuje na lidské kůži, ve vodě a v půdě. Je vhodný pro experiment zejména proto, že nejsou až na výjimky známy případy vzniku bakteriální infekce u člověka. Výjimečně je příčinou vředů u HIV pozitivních lidí. Dobře se rozmnožuje v prostředí s malým množstvím vody nebo v prostředí s vysokou koncentrací soli. Jeho optimální teplota růstu je 37 °C a dobře roste na dusíkatém agaru nebo na Simmonsově citrátovém agaru. [36]



Obr. 3.1: Bakterie *Micrococcus luteus* na tuhém agaru [-]

3.1 Příprava kultivačních médií

Pro kultivaci bakterie bylo použito pevných a tekutých kultivačních médií. Chemikálie, které byly použity, jsou v tabulce 3.1, a z laboratorního vybavení byl použit běžný laboratorní materiál (kádinka, odměrný válec, Erlenmeyerovy baňky o objemu 250 ml a 100 ml, lžička).

Tabulka 3.1: Použité chemikálie pro výrobu LB kultivačních médií

Kultivační médium	Chemikálie	Výrobce	Množství
Pevné médium (250 ml)	Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG	2,50 g
	Kvasničný extrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG	1,25 g
	Chlorid sodný	Lach-Ner s.r.o.	1,25 g
	Agarová řasa	F-DENTÁL Hodonín s.r.o.	5,00 g
	Destilovaná voda	-	250 ml
Tekuté médium (100 ml)	Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG	1,00 g
	Kvasničný extrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG	0,50 g
	Chlorid sodný	Lach-Ner s.r.o.	0,50 g
	Destilovaná voda	-	100 ml

Na přípravu pevného média o objemu 250 ml bylo použito chemikálie pepton, kvasničný extrakt, chlorid sodný a agarovou řasu. Po navážení jednotlivých chemikálií do Erlenmeyerovy baňky o objemu 250 ml byl přidán navážený agar a 250 ml destilované vody. Médium bylo následně vysterilizováno. Na laboratorní přípravu tekutého kultivačního média o objemu 100 ml bylo použito totožných chemikálií jako na výrobu pevného média (s výjimkou agarové řasy), ale v odpovídajících poměrech (viz tabulka 3.1) a bylo postupováno stejným způsobem.

Následně byly všechny Erlenmeyerovy baňky s kultivačními médii dány na sterilizaci. Po sterilizaci a vychladnutí kultivačních médií byl zapnut laminární box, vloženy Petriho misky do laminárního boxu, a poté bylo pevné kultivační médium postupně naléváno do Petriho misek. Na každý experiment bylo připraveno cca 30 ks pevných agarů. Následně bylo kultivační médium necháno v Petriho miskách vychladnout a ztuhnout a cca 2 dny odkondenzovat.

V našem experimentu bylo zvoleno v první části LB kultivační médium, na základě předchozích prováděných experimentů s tenkými vrstvami. Po zaočkování připravených Petriho misek s kultivačním médiem bylo zjištěno, že na Petriho miskách nedošlo k téměř žádnému nárůstu bakteriálních kolonií. Proto bylo použito jiné kultivační médium s masovým extraktem – MPA kultivační médium. MPA médium bylo připraveno dle [38]. Jednotlivé složky kultivačního média jsou v tabulce 3.2.

Tabulka 3.2: Použité chemikálie pro výrobu MPA kultivačních médií

Kultivační médium	Chemikálie	Výrobce	Množství
Pevné médium (250 ml)	Masový extrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG	2,5 g
	Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG	1,25 g
	Chlorid sodný	Lach-Ner s.r.o.	1,25 g
	Agarová řasa	F-DENTÁL Hodonín s.r.o.	5,00 g
	Destilovaná voda	-	250 ml
Tekuté médium (100 ml)	Masový extrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG	1,00 g
	Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG	0,50 g
	Chlorid sodný	Lach-Ner s.r.o.	0,50 g
	Destilovaná voda	-	100 ml

3.2 Laboratorní vybavení

V experimentu bylo použito běžné laboratorní vybavení. Všechna zařízení a jejich vlastnosti jsou v tabulce 3.3.

Tabulka 3.3: Použité laboratorní přístroje [39] [40] [41] [42]

Přístroj	Výrobce	Základní vlastnosti
Laboratorní váha Ohaus PA2102C	Ohaus	<ul style="list-style-type: none"> - váživost: 2100 g - přesnost: 0,01 g - napájení: AC adaptér - LCD displej - komunikace RS232 rozhraní pro zaslání údajů o ID váhy a hmotnosti vzorku
Mikrobiologický bezpečnostní box MB-120	LABOX spol. s.r.o.	<ul style="list-style-type: none"> - napájecí napětí: 230 V/50 Hz/500 W - el. zařízení třídy I - rychlost proudění vzduchu v pracovním prostoru: $0,40 \pm 0,08$ m/s - průměrná rychlost proudění vzduchu v pracovním otvoru: min 0,40 m/s - hluk vyzařovaný do okolí: 57 dB (A) - regulovatelná intenzita osvětlení na pracovní ploše: max 1300 lx - plně automatizovaný provoz řízený mikroprocesorem - sledování zanesení filtrů - indikace počtu pracovních hodin germicidního zářiče a filtrů a počtu dnů do kalibrace MSC
Laboratorní inkubátor INCUCCELL 55-Standard	BMT Medical Technology s.r.o.	<ul style="list-style-type: none"> - objem komory: 55 l - teplotní rozsah: 5-99,9 °C nad okolní teplotou - mikroprocesorový řídicí systém Fuzzy-Logic - odchylky teploty podle DIN 12 880 díl 2 od pracovní teploty při uzavření odvětrávací klapky a dveří: časově $\pm 0,2$ °C, prostorově $\pm 0,5$ °C - doba náběhu na teplotu 37 stupňů při uzavření klapky a napětí 230 V: 49 min - tepelné ztráty při 37 °C: 30 W - el. parametry pro síť 50/60 Hz: maximální příkon 0,3 kW, napětí 230 V, proud 1,3 A, příkon v pohotovostním stavu 5 W
<p><i>Pozn.: Všechny technické údaje se vztahují na prázdnou komoru 22 °C okolní teploty a ± 10 % kolísání napětí (není-li uvedeno jinak) rychlost ventilátoru 100 %, odtávání vypnuto, osvětlení vypnuto.</i></p>		
Třepačka Bühler KS 15 control	Bühler	<ul style="list-style-type: none"> - napájení: 230(115) V/50 Hz - rozsah kmitů: 30-420/min, amplituda 17 mm - tepelné vyzařování: 5-10 W

Pro zjištění vlivu přístrojového vybavení na inkubaci a inokulaci bakteriální kultury byly vybrány laminární box a inkubátor, které mohou mít největší vliv vzhledem k tomu, že jejich pracovní prostor je poměrně velký a prostředí by mělo být homogenní. Častým používáním a stárnutím přístroje může ale docházet ke ztrátě homogenity tohoto prostředí. Pokud po porovnání přístrojů použitých v experimentech a přístrojů jiných výrobců můžeme konstatovat, že přístroje mají stejné nebo srovnatelné parametry, vliv přístrojů použitých při experimentech je zanedbatelný.

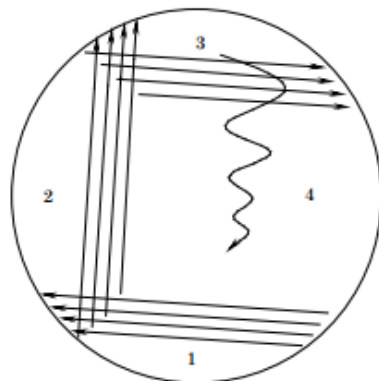
Pro porovnání byl vybrán laminární box od firmy EuroClone, model Aura Mini, a inkubátor firmy BINDER, model BD series. Jejich vlastnosti byly vyneseny do tabulky 3.4.

Tabulka 3.4: Vlastnosti porovnávaných přístrojů [43] [44]

Přístroj	Výrobce	Základní vlastnosti
Laminární box Aura Mini	EuroClone	<ul style="list-style-type: none"> - napájecí napětí: 220/240 V – 50 Hz/200 W - hluk vyzařovaný do okolí: < 52 dB (A) - intenzita osvětlení: 1200 lx - HEPA filtr se sběrnou efektivitou 99,995 % na 0,1–0,2 μm částic - rychlost proudění v pracovním prostoru: 0,45 m/s - třída 100 - možnosti dvou mechanických operací (vnitřní a vnější), předního zavíracího panelu a UV lampy
Mikrobiologický inkubátor	BINDER	<ul style="list-style-type: none"> - rozsah okolní teploty 5-100 °C - digitální nastavení teploty s přesností 0,1 °C - nezávislé zařízení na měření teploty třídy 3.1 s vizuálním alarmem - RS 422 rozhraní pro APT-COM DataControlSystem (software) - dezinfekce při 100 °C - energeticky nenáročný (hermetické uzavření, malý odvod tepla během hodinové izolace) - napájecí napětí: 230 V AC/400 W - spotřeba energie při 37 °C: 11 (Wh/h) - alarm pro přehřívání - možnost přídavného teplotního senzoru - certifikát kalibrace - objem komory: 53 l

3.3 Zaočkování mikroorganismů

Na připravené pevné agary byl přeočkován použitý mikroorganismus ve sterilním prostředí laminárního boxu. Pomocí laboratorní kličky byl použitý mikroorganismus přenesen na pevný agar podle schématu na obr. 3.2. Petriho misky byly umístěny do inkubátoru (viz obr. 3.3). Po nárůstu byla tato bakteriální kultura použita na zaočkování tekutého média (viz obr. 3.4). Tekuté médium s bakteriální kulturou bylo použito v experimentu s tenkými vrstvami.



Obr. 3.2: Způsob zaočkování pevného agaru – křížový roztěr [45]



Obr. 3.3: Mikrobiologický bezpečnostní box MB-120 [-]



Obr. 3.4: Petriho misky v inkubátoru INCUCELL 55-Standard [-]

3.4 Testování citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám

3.4.1 Zjišťování počtu mikrobiálních buněk

Stanovení počtu mikrobiálních buněk je důležité v mnoha oborech, a proto bylo vypracováno mnoho metod a lze si zvolit pro daný účel nejvhodnější metodu. Používá se jednak přímé nebo nepřímé počítání buněk, stanovení buněčné hmoty přítomných mikroorganismů a metod sledujících intenzitu biochemické činnosti přítomných mikrobů. Mezi nejpresnější metody patří metody zjišťující počet buněk. Jsou používány

například při kontrole hygienických a sanitačních podmínek potravinářských závodů. Metody stanovující hmotu biomasy jsou používány pouze v kulturách mikroorganismů, zejména při biochemických pracích aj. Sledování biochemické činnosti mikroorganismů je využíváno při rychlém posouzení mikrobiologické čistoty potravin. [46]

Počítání buněk

První skupinou metod stanovení počtu mikrobiálních buněk je počítání buněk. Rozdělujeme ji na přímé mikroskopické počítání buněk, elektronické počítání buněk, nefelometrické stanovení mikroorganismů a kultivační stanovení počtu mikrobiálních buněk.

1) Přímé počítání buněk

První zmíněnou metodu, přímé počítání buněk, lze použít pouze v případě, že hustota mikroorganismů dosahuje hodnoty alespoň $\rho = 10^7$ buněk (bakterií)/ml. Tato metoda se provádí buď v počítacích komůrkách, nebo ve fixovaném nátěru na podložním sklíčku. Výhodou této metody je rychlé získání výsledků, nevýhodou naopak, že u bakterií nelze rozlišit mrtvé buňky od živých.

2) Elektronické počítání buněk

Druhou metodou je elektronické počítání buněk. Tento způsob zjišťování počtu mikrobiálních buněk je založen na nasávání přesně definovaného objemu elektrolytu s rozptýlenými buňkami do elektricky nevodivé trubice. Buňky procházejí otvorem a při jejich průchodu se změní vodivost. Tato změna je přístrojem detekována jako impulz. Předpoklad použití této metody je, že buňky jsou navzájem oddělené, tzn., tvoří řetízky nebo shluky.

3) Nefelometrické stanovení počtu mikroorganismů

Třetí metodou počítání mikrobiálních buněk je nefelometrické stanovení, kde zjišťujeme počet buněk v čiré kapalině na základě intenzity světla odraženého od jednotlivých buněk. Jedná se o rychlou a citlivou metodu, ale koncentrace bakterií musí být v rozmezí 10^5 - 10^7 bakterií/ml.

4) Kultivační stanovení počtu mikrobiálních buněk

Poslední metodou počítání buněk je kultivační stanovení. Principem této metody je přenášení mikroorganismů na vhodnou půdu, kde se mohou rozmnožovat. Zjišťuje se počet živých buněk, protože kritériem životnosti mikrobiální buňky je schopnost autoreprodukce. Výhodou metody je, že nezáleží na koncentraci mikrobiálních buněk a je možno rozlišit jednotlivé druhy či rody mikroorganismů. Nevýhodami metody jsou delší čas potřebný k získání výsledků a u směsí

mikroorganismů nižší výsledky, protože nelze všem organismům najednou zajistit vhodné kultivační podmínky. Do této skupiny metod řadíme stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (MPN, z angl. most probable number), deskovou (plotnovou) difúzní metodu a diluční metodu.

a) Stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (MPN)

Toto stanovení je založeno na sériovém desítkovém zředěním vzorku a zjišťování, ve kterém zředění došlo k vymizení mikroorganismů na takové úrovni, že po inkubaci v tekuté půdě nenastal žádný nárůst. Metoda není příliš přesná, ale umožňuje rozbor tuhých nebo nefiltrovaných vzorků s nízkým obsahem mikroorganismů (koncentrace < 10 zárodků/g).

b) Desková metoda

Tato metoda patří mezi nejrozšířenější kvalitativní metody stanovení účinnosti mikrobiální látky a je „založena na inhibici růstu zkoumaného bakteriálního kmene látkou difundující v koncentračním gradientu agarovou kultivační půdou z testovacího disku“ [47] za předpokladu, že každá kolonie vznikla z jedné buňky. Testovací disk je kolečko filtračního papíru napuštěného definovaným množstvím testovaného antibiotika. Pro stanovení se obvykle používá Muellerova-Hintonova (MH) agaru. Suspenze zkoumaného bakteriálního kmene o dané koncentraci se plošně naočkuje přelitím nebo roztěrem a testovací disky položíme na naočkované kultivační médium. Petriho misky s kultivačními médii necháme 16-24 hodin inkubovat v inkubátoru a poté hodnotíme vzniklou inhibiční zónu kolem testovacího disku, která je charakterizována poloměrem úměrným minimální inhibiční koncentraci daného antibiotika. U vzorků s nízkou koncentrací mikroorganismů se zpracovává větší množství vzorku filtrační metodou.

Obvykle hodnotíme metodu kvalitativně porovnáním s tabelovanými hodnotami minimálních průměrů inhibičních zón. Výsledkem testu je klasifikaci bakteriálního kmene pro dané antibiotikum jako citlivý nebo rezistentní. V posledních letech se pro výsledek metody používají počty kolonietvorných jednotek (z angl. c.f.u. = colony forming unit) a výsledek zahrnuje i to, že kolonie nevznikly jen z jedné buňky a že živný agar nemusí vyhovovat všem přítomným mikroorganismům.

Pracovní postup diskové difúzní metody je následující. Z bakteriální kultury odebereme kličkou 2-3 izolované kolonie a suspendujeme je v 1 ml fyziologického roztoku. Suspenzi vylijeme do misky s agarem. Kýváním miskou pokryjeme

rovnoměrně celý povrch agarů a necháme jednu minutu vsáknout. Vezmeme sadu gram pozitivních testovacích disků a sterilní jehlou položíme jednotlivé disky na povrch agarů ve vzdálenosti 1-2 cm od okraje misky do tvaru pravidelného šestiúhelníku. Označíme identitu jednotlivých disků, misku uložíme do inkubátoru víčkem dolů a inkubujeme přes noc při teplotě 37 stupňů. Po inkubaci změříme pomocí pravítka průměry inhibičních zón, porovnáme je s tabelovanými hodnotami a vyhodnotíme citlivost bakteriálního kmene. [47]

c) **Diluční metoda**

Diluční metoda patří mezi kvantitativní metody stanovení citlivosti bakterií na antimikrobiální látky a lze ji plně automatizovat a standardizovat. Používá se ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) nebo minimální baktericidní koncentrace (MBK). Antimikrobiální látky jsou ředěny geometrickou řadou.

Diluční metoda v agaru se provádí na Mueller-Hintonově agaru s definovanou koncentrací iontů. Po naočkování se plotny inkubují při doporučené teplotě 35 °C nejčastěji 18-20 hodin. Současně je nutné provedení testu citlivosti s testovanými kmeny i pro referenční kmen, jehož hodnotu MIC známe. Výhodou této metody je, že je referenční pro ostatní systémy a lze testovat více kmenů najednou. Nevýhodou může být náročnější provedení a nepraktičnost pro rutinní provoz. [48]

3.4.2 Stanovení buněčné hmoty mikroorganismů

Buněčnou hmotu mikroorganismů stanovujeme přímými metodami nebo nepřímými metodami. K přímým metodám řadíme vážkové stanovení, stanovení obsahu dusíku v buněčné hmotě a stanovení obsahu bílkovin v promyté buněčné hmotě. Nepřímé metody zahrnují turbidimetrické stanovení buněčné hmoty a volumetrická hmota.

Vážkové stanovení buněčné hmoty

Tato metoda se používá především při růstové bilanci mikroorganismů na určitých substrátech nebo při bilančním hodnocení kvasných procesů. Metoda je založena na principu sušení promytých buněk při 95-105 °C do konstantní váhy.

Stanovení obsahu dusíku v buněčné hmotě

Tato metoda, jež se stejně jako předchozí metoda řadí k přímým metodám stanovení buněčné hmoty mikroorganismů, má základ v mineralizaci buněčné hmoty spalováním v prostředí koncentrované kyseliny sírové a stanovují se vzniklé amonné

ionty. Podmínkou provedení této metody jsou dobře promyté buňky, které jsou zbavené zbytků kultivačního prostředí. Její hlavní použití je při bilancování produkce biomasy v biotechnologiích.

Stanovení obsahu bílkovin v promyté buněčné hmotě

Tato metoda se používá hlavně při stanovení enzymových aktivit buněčné hmoty a bílkoviny se stanovují Lowryho metodou či biuretovou reakcí.

Turbidimetrické stanovení buněčné hmoty

Tato metoda, kterou řadíme k nepřímým metodám stanovení buněčné hmoty mikroorganismů, má velkou výhodu, a to, že je mnohem rychlejší a citlivější než přímé metody. Je také přesnější než volumetrická metoda. V této metodě se měří absorbance roztoku a pomocí kalibrační přímky se následně stanovuje buněčná hmota mikroorganismů.

Volumetrická metoda

Nevýhodou této metody, stejně jako předchozího turbidimetrického stanovení buněčné hmoty, je nutnost kalibrační přímky pro každý kmen mikroorganismu.

3.4.3 Zjišťování přibližného množství mikroorganismů na základě jejich biochemické činnosti

Do této skupiny metod řadíme mnoho metod zjišťujících hygienický stav a údržnost potravin a potravinářských surovin. Ve většině případů se zjišťuje sumární aktivita všech přítomných druhů bakterií, která je úměrná počtu buněk. Vyjádření počtu buněk je však přibližné z důvodu odlišnosti intenzity sledované reakce u jednotlivých buněk. Výhodou těchto metod je jednoduchá proveditelnost a časová nenáročnost. Hodnoty získané těmito metodami jsou ukazateli kvality potravin.

Tyto metody jsou používané již desítky let. Zástupci novějších metod jsou radiometrické metody, měření elektrické vodivosti, limulus-test a chemoluminiscenční metody. Radiometrické metody jsou často používány v klinické diagnostice a v potravinářství u zmražených potravin. Nejčastěji se zjišťuje tvorba $^{14}\text{CO}_2$ ze značeného uhlíkatého substrátu. Dalším příkladem je měření elektrické vodivosti, které využívá principu zvýšení elektrické vodivosti kultivačních roztoků v důsledku metabolismu bakterií. Během kultivace je sledován slabý elektrický proud procházející roztokem se zaočkovanou kulturou a pomocí kalibrační přímky je možné stanovit počáteční koncentraci mikroorganismů. Metoda je vhodná pro koncentrace 10^2 - 10^6 bakteriálních buněk/g. Další z řady metod je limulus-test (LAL) využívající

lyzát amebocytů ostrorepa amerického. Amebocyty ostrorepa obsahují srážecí faktor, který je uvolňován z amebocytu, pokud se buňka setká s endotoxinem bakterie a výsledkem je koagulace za vzniku gelu nebo vloček [49]. Tento test je velmi rychlý. Posledním příkladem metod této skupiny jsou chemoluminiscenční metody. Tyto citlivé metody se zakládají na stanovení porfyrinů nebo ATP buněk mikrobiálních buněk. Dnes už jsou vyvinuta činidla pro jednotlivé kroky a takéž přístroj pro zjištění luminiscence. [46]

3.5 Vyhodnocení antibakteriální účinnosti – metoda CFU

Pro vyhodnocení antibakteriální účinnosti byla použita metoda CFU. Zkoumané bakterie rodu *Microoccus luteus* byly kultivovány ve sterilních podmínkách kultivačních medií – LB medium a MPA medium. Tekuté medium se zaočkovanou bakteriální kulturou bylo kultivováno 48 hodin v třepačce.

Na testované tenké vrstvy bylo pomocí automatické pipety sterilně nanášeno 160 µl bakteriální suspenze a ponecháno jednu hodinu působit na tenkých vrstvách. Po uplynutí doby působení bylo z tenkých vrstev odebráno 100 µl bakteriální suspenze a přidáno k 9,9 ml 8,5% sterilního fyziologického roztoku. Vyředění bylo provedeno ještě dvakrát až na koncentraci 10⁻⁶ bakterií v suspenzi/ml. Následně bylo z posledního zředěného roztoku odebráno 100 µl suspenze a přeneseno na agarovou plotnu a rozetřeno po celé její ploše pomocí laboratorní hokejky. Všechny části experimentu byly prováděny v laminární boxu a pomocí sterilních pomůcek.

Petriho misky s agarem byly zalepeny parafilmem, vloženy do inkubátoru a kultivovány při 25 °C po dobu 72 hodin. Po uplynutí doby kultivace byly narostlé bakteriální kolonie vyfotografovány, spočítány, vyhodnoceny pomocí vzorce pro výpočet antibakteriální účinnosti (ABÚ; viz vzorec (3.1)) a vyhodnoceny v navrhnutém programu v prostředí Matlab. Stejný postup byl aplikován i na referenční vzorek [50].

$$ABÚ = \frac{KRS - KES}{KRS} \cdot 100 \% \quad (3.1)$$

KRS = počet kolonií referenční skupiny

KES = počet kolonií experimentální skupiny

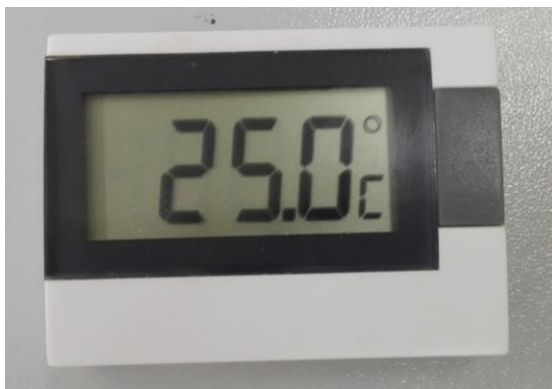
V experimentu byly využity stříbrem dopované tenké vrstvy dopované pomocí pulzní laserové depozice. Morfologie povrchu tenkých vrstev byla vyhodnocena

z obrázků skenovací elektronové mikroskopie. Použitým mikroskopem byl mikroskop JEOL 840 ve zvětšení 400x a 4000x pro urychlovací napětí $HT = 10$ kV. Povrch tenkých vrstev vykazoval hladký povrch. [51]

3.6 Experiment určení vhodné limitní kultivační teploty

Měřenými hodnotami teploty byla teplota v inkubátoru, která byla nastavena na spodní hranici vhodné kultivační teploty, tj. $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplota v průběhu pracovního postupu v laminárním boxu. Teplota $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla zvolena vzhledem k omezení laboratorní techniky v laboratoři, protože při požadavku nižší nastavené teploty by bylo nutné použít chladicí lázně a zachovat teplotu i při další manipulaci s kulturou. Proto se nejedná o stanovení vhodné limitní kultivační teploty pro uvedenou bakterii, ale o stanovení limitní teploty, použitelné v laboratoři, kde byl experiment prováděn a kterou udává literatura [35]. Teplota byla při každém experimentu měřena na začátku inkubace, po 24 hodinách a po 72 hodinách. Teplota byla měřena běžně dostupným digitálním teploměrem (viz obr. 3.5).

Druhou měřenou teplotou byla teplota při inokulaci, tj. naočkování. Toto měření není zcela přesné, a to z důvodu, že se inokulace neprovádí v homogenním prostředí, proto hodnoty teplot jsou spíše orientační. Teplota byla měřena při každém experimentu na začátku inokulace, po 1 hodině a po 24 hodinách.



Obr. 3.5: Používaný digitální teploměr [-]

3.7 Vyhodnocení obrazů – počítání bakteriálních kolonií v Matlabu

Matlab (angl. matrix laboratory) je programové prostředí a skriptovací programovací jazyk od společnosti MathWorks. Program Matlab umožňuje počítání

s maticemi, vykreslování grafů (včetně 3D grafů), počítačovou simulaci, analýzu a prezentaci dat a další. Vlastní programovací jazyk vychází z jazyka Fortan. [52]

Matlab byl použit ke zpracování výsledných obrazů, které zachycují bakteriální kolonie narostlé na Petriho miskách pomocí diluční metody. Navržený skript má za úkol analyzovat obraz a spočítat jednotlivé bakteriální kolonie. Omezením použité metody je situace, kdy bakteriální kolonie narostou v těsné blízkosti tak, že nelze rozlišit jejich hranice. Metoda v tomto případě považuje kolonie za jeden objekt. Toto omezení není ale výrazné a chyba metody je tak minimální.

3.7.1 Popis navrženého programu v Matlabu

Tento kód byl vytvořen za účelem zpracování vyfotografovaných narostlých bakteriálních kolonií. Výstupem tohoto programu je načtený obrázek Petriho misky s narostlými bakteriálními koloniemi s graficky zvýrazněnými a spočítanými bakteriálními koloniemi a vyskakovací okno, které udává počet narostlých bakteriálních kolonií (viz obr. 3.6).

Nejprve za pomoci příkazu *clc*, *close all* a *clear all* bylo zajištěno vymazání aktuálního obsahu *Command window*, zavření všech dalších nepotřebných programů a vyčištění proměnných, aby nedošlo k jejich záměně.

```
clc
clear all
close all
```

Následně pomocí funkce *imread* byl načten soubor ('*bunky.jpg*'), který obsahoval obrázek s narostlými bakteriálními kulturami.

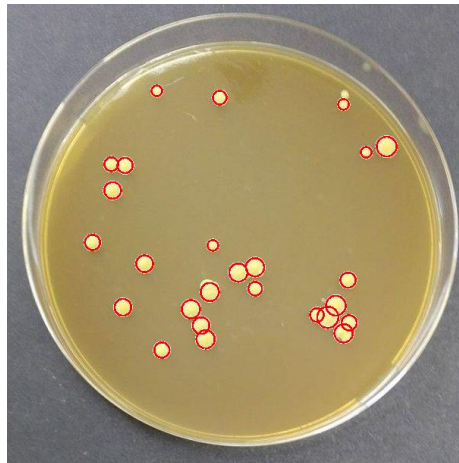
```
a = imread('bunky.jpg');
imshow(a);
```

Do matice s proměnnými *centers* a *radii* bylo pomocí funkce *imfindcircles* identifikovány a načteny pozice center identifikovaných kruhů a poloměry identifikovaných kruhů od identifikovaných center. Byly použity následující parametry: proměnná *a* (načtený obrázek, resp. matice), *radiusRange* určující rozsah pixelů identifikovaných kruhů uložený do matice, parametr *ObjectPolarity* s hodnotou *bright* určující identifikaci světlých kruhů na tmavém pozadí, parametr *Sensitivity* určující citlivost identifikace kruhů, parametr *Method* se zvolenou hodnotou *twostage* určující metodu výpočtu oblasti kruhu a parametr *EdgeThreshold* s hodnotou 0,06 určující prahovou hodnotu identifikace pixelů kruhového okraje. [53]

```
[centers, radii] = imfindcircles(a,[19 45], 'ObjectPolarity',
'bright','Sensitivity', 0.875, 'Method', 'twostage',
'EdgeThreshold',0.06);
```

Poté pomocí funkce *viscircles* s parametry *centers*, *radii* a *Color* s hodnotou *r* (určující barvu identifikovaných kruhů – červenou) byly vytvořeny ze zjištěných parametrů (*centers* a *radii*) kruhy, které graficky vyznačují narostlé bakteriální kolonie. [54]

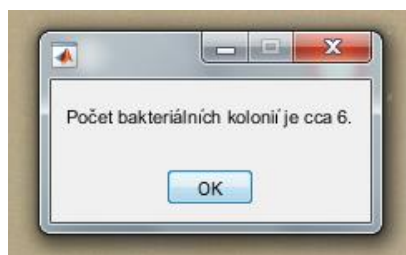
```
h = viscircles(centers,radii, 'Color', 'r');
```



Obr. 3.6: Výstup programu – grafické zobrazení narostlých bakteriálních kolonií [-]

Dále byla do proměnné *C* uložena velikost matice *radii*, aby bylo možné spočítat narostlé bakteriální kolonie pomocí funkce *sum*. Posledním krokem bylo vytvoření proměnné *msg*, do které bylo uloženo pomocí funkce *sprintf* převedené proměnné do formátu *string* a následně funkcí *msgbox* bylo vyskakovací okno, které ukazuje uživateli počet narostlých bakteriálních kolonií, vytvořeno a funkcí *display* zobrazeno (viz obr. 3.7). [55]

```
C = size(radii);
D = sum(C,1);
msg = sprintf('Počet bakteriálních kolonií je cca %i.\n',
D(:,1));
msgbox(msg)
display(D)
```



Obr. 3.7: Výstup programu Matlab – vyskakovací okno se zprávou o počtu narostlých kolonií [-]

Tento kód byl použit pro zpracování všech získaných obrázků z experimentální části bakalářské práce, pouze byly upraveny některé parametry pro jednotlivé obrázky, aby byla zajištěna co nejmenší chybovost programu, neboť obrázky nebyly foceny za stejných podmínek. Upravované parametry byly *radiusRange*, *Sensitivity* a v některých případech i *EdgeThreshold*. U některých fotografií byl kód doplněn o odečtení narostlých kvasinkových kultur, aby nedošlo ke zkreslení výsledků.

Tato metoda má mnoho výhod. Není nutné narostlé kolonie počítat ručně a program sám spočítá počet bakteriálních kolonií, a navíc je vyznačí graficky. Další možností je rozdělení a spočítání kolonií podle jejich velikosti, ale to v tomto případě není potřeba. Za nevýhodu můžeme považovat, že pokud obrázky nejsou fotografovány za stejných podmínek, je třeba upravit některé parametry programu pro jednotlivé obrázky zvlášť. Matlab je velmi vhodným a užitečným prostředím pro takovéto zpracování výsledků, má ale určitá omezení.

4 Výsledky

4.1 Stanovení limitní teploty

Tabulka s naměřenými teplotami v inkubátoru a při inokulaci a fotodokumentace měření teploty.

Tabulka 4.1: Tabulkové měření teploty během kultivace bakteriální kultury

Inkubační teplota – termostat	Teplota 0 hod. t [°C]	Teplota 24 hod. t [°C]	Teplota 72 hod. t [°C]
Experiment I	25,0	25,0	25,0
Experiment II	25,0	25,0	25,0
Experiment III	25,0	25,0	25,0
Experiment IV	25,0	25,0	25,0

Inokulace	Teplota 0 hod. t [°C]	Teplota 1 hod. t [°C]	Teplota 24 hod. t [°C]
Experiment I	24,1	23,0	23,3
Experiment II	22,0	23,2	22,4
Experiment III	24,2	22,3	23,0
Experiment IV	25,1	25,0	24,0



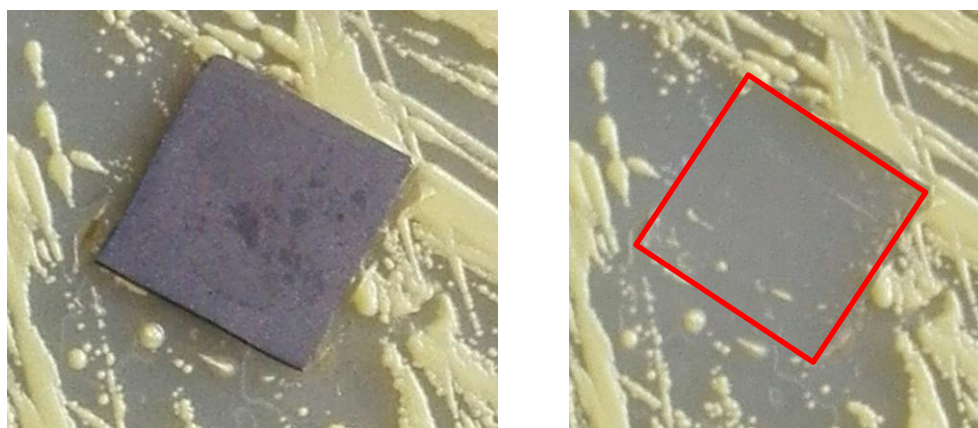
Obr. 4.1: Měření teploty v laminárním boxu [-]



Obr. 4.2: Měření teploty při inokulaci [-]

4.2 Desková metoda

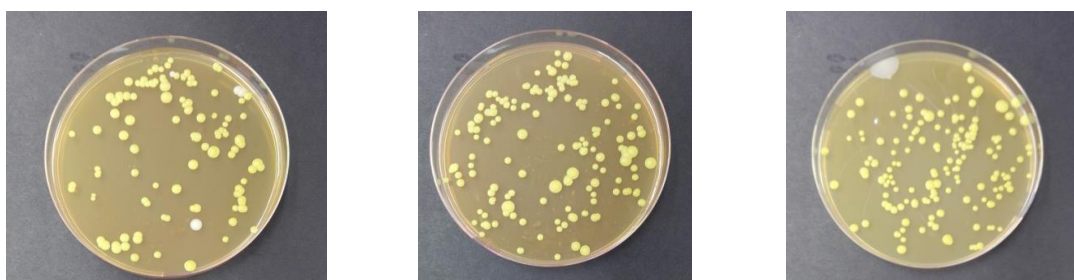
Výsledky agarové deskové metody. První experimenty byly věnovány vyzkoušení uvedené metody pro tenké vrstvy. V pokusech ale nedošlo k žádnému vytvoření inhibiční zóny, jak je vidět na obr. 4.3 a 4.4, bylo pouze zdokumentováno antibakteriální působení v místě tenké vrstvy na agaru s bakteriální kulturou. Proto nebyla tato metoda dále použita a byla změněna na agarovou diluční metodu (viz níže).



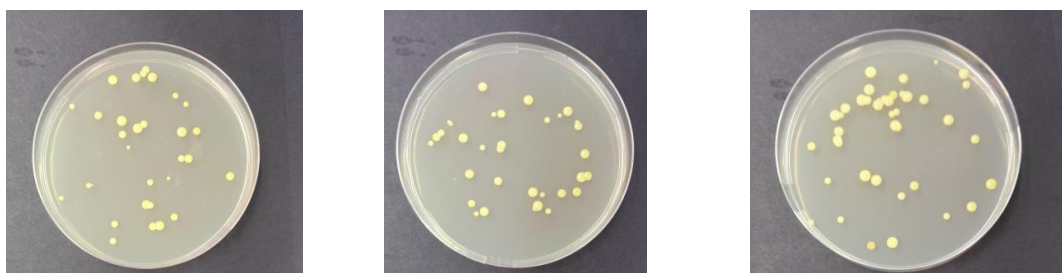
Obr. 4.3 a 4.4: Interakce tenké vrstvy s bakteriální kulturou [-]

4.3 Diluční metoda

Byla provedena série čtyř experimentů, série s kultivačním médiem LB (srovnatelné s výsledky prováděných pokusů s bakteriemi *E.coli* a *B. subtilis*) a kultivačním médiem MPA. Počty narostlých a odečtených bakteriálních kolonií v tabulce 4.2. Příklady narostlých bakteriálních kolonií jsou na obr. 4.5 – 4.10.



Obr. 4.5 – 4.7: Narostlé bakteriální kultury slepého vzorku na LB médiu [-]



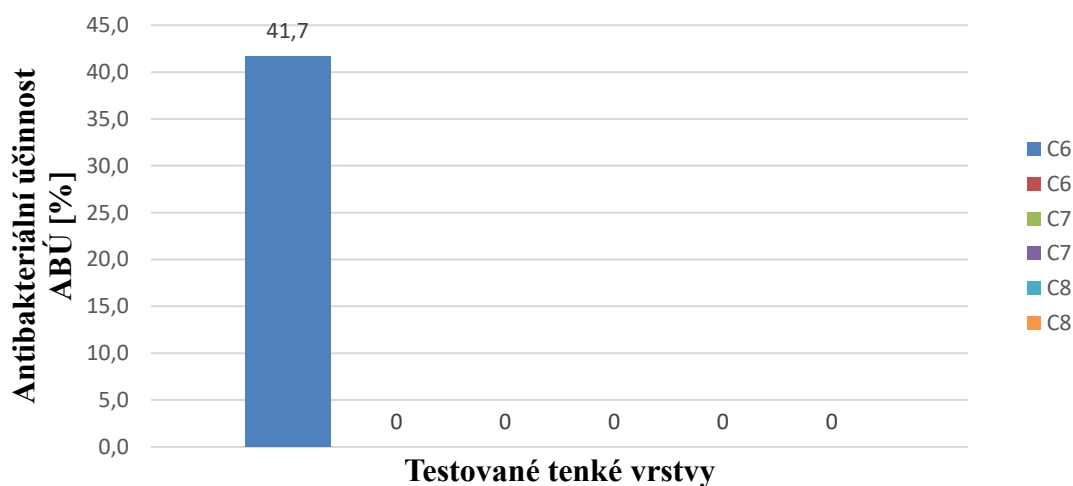
Obr. 4.8 – 4.10: Narostlé bakteriální kultury tenké vrstvy C7 na MPA médiu [-]

Tabulka 4.2: Počet narostlých bakteriálních kolonií pro jednotlivé tenké vrstvy na MPA médiu (experiment č.1)

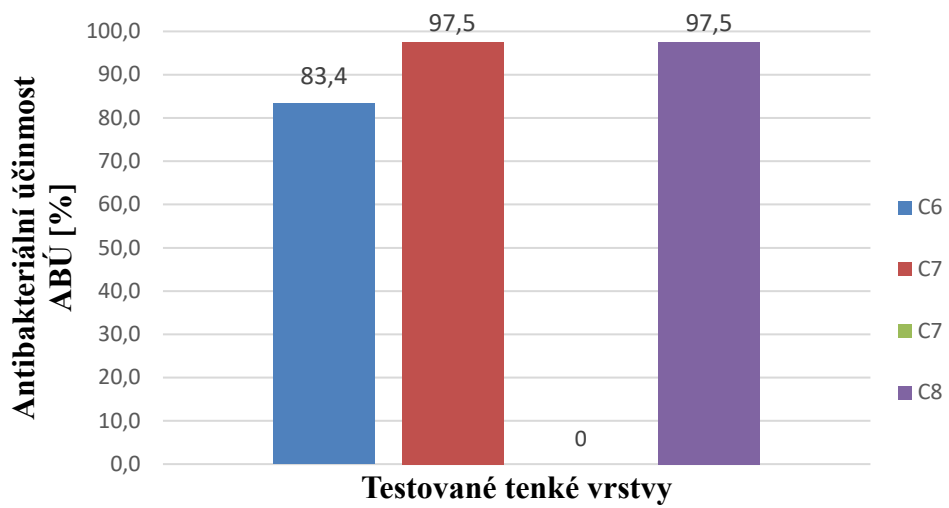
Slepý vzorek	Si 100	C6 1:3	C7 3:5	C7 3:5	C8 1:7
158	50	3	1	145	5
106	44	34	3	109	5
139	33	30	6	175	0
Průměr [-]	Průměr [-]	Průměr [-]	Průměr [-]	Průměr [-]	Průměr [-]
134,3	42,3	22,3	73,2	143,3	3,3

Tabulka 4.3: Počet narostlých bakteriálních kolonií pro jednotlivé tenké vrstvy na LB médiu (experiment č.1)

Slepý vzorek	Si 100	Si 100	C6 1:3	C6 1:3	C7 3:5	C7 3:5	C8 1:7	C8 1:7
2	44	15	8	1	0	1	27	2
6	42	23	0	6	5	16	32	6
4	54	10	5	0	14	3	39	5
Průměr [-]	Průměr [-]	Průměr [-]	Průměr [-]	Průměr [-]	Průměr [-]	Průměr [-]	Průměr [-]	Průměr [-]
4,0	46,7	16,0	4,3	2,3	6,3	6,7	32,7	4,3



Obr. 4.11: Graf antibakteriální účinnosti jednotlivých tenkých vrstev na LB médiu



Obr. 4.12: Graf bakteriální účinnosti jednotlivých tenkých vrstev na MPA médiu

5 Diskuse

Hlavním cílem mé bakalářské práce bylo navrhnout a realizovat experiment pro vyhodnocení antibakteriální účinnosti stříbrem dopovaných tenkých vrstev, vyhodnotit jejich antibakteriální účinnost, získané fotografie zpracovat v prostředí Matlab a najít vhodnou limitní kultivační teplotu. Tenké vrstvy dopované stříbrem byly testovány v předchozích experimentech pomocí bakterií *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*. Výsledky experimentů prokázaly vysokou antibakteriální účinnost tenkých vrstev. Pro vyhodnocení výsledků nebylo ale dosud použito v řešených pracích prostředí Matlabu. Experiment, který je předmětem bakalářské práce, byl nově proveden na mikroorganismu *Micrococcus luteus*.

Bakterie byla kultivována nejdříve v LB médiu, následně v masopeptonovém bujónu a agaru. V průběhu experimentu byla měřena teplota inokulace a kultivace bakterie. Bakterie byla kultivována v limitní teplotě přístrojového vybavení užívané mikrobiologické laboratoře. Teplota byla měřena v průběhu experimentu v prostředí laminárního boxu LABOX a kultivačního inkubátoru INCUCCELL.

Prvotním záměrem bylo antibakteriální účinnost zkoumat a vyhodnocovat pomocí agarové difúzní metody, která je běžně používanou metodou a je pro tento experiment velmi rychle vyhodnotitelná a poměrně vhodná. Po provedení pilotního experimentu jsem ale zjistila, že na pevných agarech není pozorovatelná a vyhodnotitelná inhibiční zóna. Opakovaně nedošlo k vytvoření zóny, a proto jsem zvolila jako druhou nejvhodnější metodu – agarovou diluční metodu. U této metody již došlo k očekávanému nárůstu bakteriální kultury, a tak bylo vyhodnocení antibakteriálních vlastností tenkých vrstev provedeno touto metodou. Tato metoda spočívá v působení narostlé bakteriální suspenze na tenkých vrstvách, následnému vyředění bakteriálních kultur a kultivaci odebraného, vyředěného a rozetřeného množství kultury na pevných agarech. Narostlé bakteriální kolonie se spočítají a pomocí vzorce pro určení antibakteriální účinnosti (viz vzorec 3.1) se stanoví antibakteriální účinnost daných tenkých vrstev.

Protože je velmi náročné ručně počítat jednotlivé narostlé bakteriální kolonie, Existuje několik počítačových softwarů, s jejichž pomocí je možné fotografie vyhodnocovat. Jednou z možností je program ImageJ. Já jsem si pro vyhodnocování vybrala program Matlab, protože se jedná o prostředí, které je dostupné pro studenty

Fakulty biomedicínského inženýrství. Program jsem napsala jsem tak, že zpracovává nahranou fotografii Petriho misky s narostlými bakteriálními koloniemi a počítá je (viz kapitola 3.8). Prostředí Matlab je obecně velmi bohatý na možnosti zpracování zejména obrazových souborů, a proto se nabízelo hned několik možností, jak program koncipovat, aby program narostlé bakteriální kolonie počítal. Nakonec se jako nejvhodnější jevila metoda, kdy program detekoval kruhové objekty se zadanými parametry a následně je označil (viz obr 3.6). Zpracováním fotografií s narostlými bakteriálními kulturami v prostředí Matlab jsem získala počet bakteriálních kolonií a vynesla je do tabulky 4.2 pro narostlé kolonie na LB kultivačním médiu a do tabulky 4.3 pro narostlé kolonie na MPA kultivačním médiu. Průměry počtů narostlých bakteriálních kolonií byly potom použity při výpočtu antibakteriální účinnosti. Pro názornější představu byly vypočtené hodnoty antibakteriální účinnosti vyneseny do grafu (viz obr. 4.11 a obr. 4.12) pro LB a MPA kultivační médium. Ze získaných výsledků s ohledem na růst bakteriálních kolonií v jednotlivých experimentech, ale nelze vyhodnotit antibakteriální účinnost pro bakterii *Micrococcus luteus*. Příčinu spatřuji v provedení omezeného množství kultivačních pokusů, v experimentu nebyly použity komerčně připravené půdy, vše jsem sama připravovala. Časová náročnost na provedení jednotlivých bakteriálních kultivací je dlouhá. O diluční metodě je i v mikrobiologické literatuře uváděno, že je to metoda časově náročná [46]. V jejím případě je také nutná určitá mikrobiologická laboratorní praxe, i to může být příčinou uvedených výsledků.

U hodnocení přístrojového vybavení je nutné uvést, že z porovnání jednotlivých parametrů (viz tabulka 3.3 a 3.4) vyplývá, že vliv na provedený experiment je minimální, neboť parametry přístrojů se od sebe výrazně neliší. Laminární box i inkubátor mají v pracovním prostoru homogenní prostředí a nemůže tak dojít k ovlivnění experimentu vlivem proměnlivých hodnot parametrů jednotlivých přístrojů.

Laminární box od firmy LABOX [40], který byl použit v experimentu, se liší od laminárního boxu od firmy EuroClose [43] ve stejné cenové kategorii pouze v několika parametrech. Laminární box MB-120 disponuje o 3 l větším pracovním prostorem, vyzařuje do okolí více hluku (rozdíl cca 5 dB) a proudění vzduchu je pomalejší (o 0,05 m/s). Laminární box od firmy EuroClone je sice menší a mám menší intenzitu osvětlení (o 100 lx), ale má o trochu lepší parametry, co se týče technických parametrů. Je tišší a má větší proudění vzduchu v pracovním prostoru.

Při porovnání inkubátorů je třeba především zmínit tyto parametry – rozsah okolní teploty, přesnost nastavení teploty, spotřeba energie, objem komory, teplotní jednotnost, teplotní fluktuace a doba nahřívání. Inkubátor použitý v experimentu, od firmy INCUCCELL, má obecně o něco horší parametry než inkubátor od firmy BINDER, který byl vybrán pro porovnání. Teplotní rozsah mají téměř identický. Odchyšky teploty inkubátoru INCUCCELL jsou větší o $\pm 0,1$ °C časově a $\pm 0,4$ °C prostorově. Není to nějak výrazný rozdíl, který by výrazně měnil podmínky pro inkubaci, ale z technického hlediska jsou tyto odchyšky výrazné, zejména pro prostorovou teplotní odchylku. Objemově se komory liší o 2 l; inkubátor INCUCCELL ji má větší. Výhodou inkubátoru BINDER je rychlejší doba nahřívání na 37 °C, a to o 11 min. Firma BINDER ještě u svého výrobku uvádí teplotní jednotnost při 37 °C, a to hodnotu 0,5 (\pm K), což je zanedbatelné. Stejně tak jako hodnota teplotní fluktuace – 0,1 (\pm K).

Protože z porovnání přístrojového vybavení vyplývá, že jejich parametry se výrazně neliší, lze z toho usoudit, že nemají výrazný vliv na kultivaci a inokulaci bakteriální kultury.

6 Závěr

Výstupem této bakalářské práce je vyhodnocení antibakteriálních vlastností stříbrem dopovaných tenkých vrstev testovaných na novém mikroorganismu – bakterie *Micrococcus luteus* – se zaměřením na modifikaci kultivačních podmínek (stanovení vhodné limitní teploty) a vyhodnocením vlivu přístrojového vybavení na průběh experimentu.

Stanovení vhodné limitní teploty bylo omezeno limitní možnou nastavenou teplotou přístrojového vybavení používaného v mikrobiologické laboratoři. Měřením teploty v průběhu experimentu byla potvrzena udávaná spodní hranice vhodné kultivační teploty v literatuře, tj. 25 °C.

Ze získaných výsledků experimentu bohužel nešlo vyhodnotit antibakteriální účinnost s ohledem na růst bakteriálních kolonií v jednotlivých experimentech. Pravděpodobnou příčinou je provedení omezeného počtu kultivačních procesů. Experiment je časově náročný na provedení a kultivace bakteriálních kultur je dlouhá, což koresponduje s literaturou. Dalším důvodem je také malá mikrobiologická laboratorní praxe, která mohla ovlivnit uvedené výsledky.

Pro vyhodnocení narostlých bakteriálních kolonií byl použit mnou napsaný program v prostředí Matlab, které je velmi vhodným prostředkem ke zpracovávání fotografií. Nabízí řadu možností grafického zpracování a také mnoho možností například k vyhodnocení objektů zobrazených na fotografiích. Toho bylo využito i v této práci a program byl napsán tak, že počítal narostlé bakteriální kolonie, graficky je vyznačil, zvýraznil a zobrazil počet narostlých bakteriálních kolonií na Petriho misce.

Vliv přístrojového vybavení na průběh experimentu nebyl prokázán. Při porovnání s přístroji od jiných výrobců bylo zjištěno, že přístroje disponují stejnými či velmi podobnými parametry, a tak nelze spolehlivě prokázat, že změna parametrů by měla vliv na průběh experimentu.

Následné využití závěrů této práce může být přínosem ve výzkumu dalších antibakteriálních vlastností tenkých vrstev a biomateriálů, především v oboru implantologie, který získává na stále větším významu v oblasti medicíny.

Seznam použité literatury

- [1] FREDERICK H. SILVER, David. *Biomaterials science and biocompatibility*. New York: Springer, 1999. ISBN 978-146-1205-579.
- [2] JELÍNEK, M., T. KOCOUREK, J. REMSA, J. MIKŠOVSKÝ, J. ZEMEK, K. SMETANA, B. DVOŘÁNKOVÁ a T. LUXBACHER. Diamond/graphite content and biocompatibility of DLC films fabricated by PLD. *Applied Physics A*. 2010, **101**(4), 579-583. DOI: 10.1007/s00339-010-5912-9. ISSN 0947-8396. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00339-010-5912-9>
- [3] MIKSOVSKY, J., A. VOSS, R. KOZAROVA et al. Cell adhesion and growth on ultrananocrystalline diamond and diamond-like carbon films after different surface modifications. *Applied Surface Science*. 2014, **297**, 95-102. DOI: 10.1016/j.apsusc.2014.01.085. ISSN 01694332. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433214001251>
- [4] JELÍNEK, M., T. KOCOUREK, K. JUREK, J. REMSA, J. MIKŠOVSKÝ, M. WEISEROVÁ, J. STRNAD a T. LUXBACHER. Antibacterial properties of Ag-doped hydroxyapatite layers prepared by PLD method. *Applied Physics A*. 2010, **101**(4), 615-620. DOI: 10.1007/s00339-010-5911-x. ISSN 0947-8396. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00339-010-5911-x>
- [5] KOCOUREK, T., M. JELINEK, J. MIKSOVSKY, K. JUREK a J. KOPECEK. Silver-Doped Layers of Implants Prepared by Pulsed Laser Deposition. *Journal of Computer and Communications*. 2013, **01**(07), 59-61. DOI: 10.4236/jcc.2013.17014. ISSN 2327-5219. Dostupné také z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/jcc.2013.17014>
- [6] ČULÍK, DrSC.,. Bio-materiály, bio-kompatibilita, bio-komposity. In: *Fakulta biomedicínského inženýrství: Biomechanika, biomateriály, biokompatibilita* [online]. Kladno, b.r. [cit. 2016-11-28]. Dostupné z: www.fbmi.cvut.cz/e/biomaterialy/157.doc

- [7] URBAN, K. a Z. STRNAD. Bioaktivní sklokeramika nahrazující kost: Neživé náhrady srůstající s živou tkání. *Vesmír* [online]. b.r. [cit. 2004-04-19]. Dostupné z: www.vesmir.cz/clanek/bioaktivnisklokeramika-nahrazujici-kost
- [8] MEYERS, Marc a Po-Yu CHEN. *Biological materials science: biological materials, bioinspired materials, and biomaterials*. New York: Cambridge University Press, 2014. ISBN 978-110-7010-451.
- [9] Tenké vrstvy v lékařství a v biologii. In: *Fakulta biomedicínského inženýrství v Kladně* [online]. b.r. [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: <https://www.fbmi.cvut.cz/files/predmety/30/public/TV%20vrstvy%20v%20lekarsvtvi.pdf>
- [10] PARK, Joon. *Bioceramics: properties, characterizations, and applications*. New York: Springer, 2008. ISBN 978-038-7095-448.
- [11] MORAVEC, Hynek, Jaroslav FOJT, Vladimír FILIP a Luděk JOSKA. *Chemické listy: Modifikace povrchu titanu pro medicínské aplikace* [online]. Praha, 2014, **108**(1) [cit. 2017-03-24]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_01_40-45.pdf
- [12] KUDRMAN, Jiří, Radka CHLUBNOVÁ, Jaroslav VESELÝ, František HNILICA a Božena PODHORNÁ. *METAL ...: mezinárodní konference metalurgie a materiálů : sborník přednášek = ... International Metallurgical* [online]. Ostrava: Tanger, 2011 [cit. 2016-12-11]. ISBN 978-80-254-1987-8. Dostupné z: <http://konference.tanger.cz/data/metal2008/sbornik/Lists/Papers/035.pdf>
- [13] JOSKA, Luděk, Marcela PODDANÁ a Jiří FOUSEK. Korozní vlastnosti vývojových slitin titanu pro stomatologii. In: *METAL 2007* [online]. Hrádek nad Moravicí, 2007 [cit. 2017-03-26].
- [14] Takticita. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2016-12-11]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Takticita>
- [15] Abutment. In: *Fakulta biomedicínského inženýrství* [online]. Kladno, b.r. [cit. 2013-04-9]. Dostupné z: <https://predmety.fbmi.cvut.cz/cs/17PBBBB>

- [16] MIKŠOVSKÝ, Jan, Tomáš KOCOUREK, Miroslav JELÍNEK a Jan REMSA. Povrchové vlastnosti biokompatibilních materiálů připravovaných pomocí pulzní laserové depozice. In: *SlidePlayer* [online]. Kladno, b.r. [cit. 2017-01-30]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/3660273/>
- [17] Tenké vrstvy pro lékařství. In: *Fakulta biomedicínského inženýrství: Biofotonika* [online]. Kladno, 2006 [cit. 2017-01-30]. Dostupné z: <http://www.fbmi.cvut.cz/files/predmety/161/protected/prednasky/594.pdf>
- [18] JANUZSOVÁ, Kateřina. Bakteriální infekce. In: *Medixa.org* [online]. 2012 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <http://cs.medixa.org/nemoci/bakterialni-infekce>
- [19] *Bakteriální infekce*. Praha, 2016. Dostupné také z: <http://pau.lf1.cuni.cz/file/5889/bakterialni-infekce-text.pdf>
- [20] MELICHERČÍKOVÁ, Věra. *Sterilizace a dezinfekce*. Druhé, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-139-1.
- [21] Významné bakteriální nemoci u člověka. In: *Bakterie, jednobuněčné organismy* [online]. 2013 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <http://www.bakterie.eu/bakterie-a-lide/bakterialni-nemoci>
- [22] Angína. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2017 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Ang%C3%ADna>
- [23] Tetanus: Infekční onemocnění. In: *Tetanus.cz: Dětské infekční onemocnění* [online]. 2008-2017 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <http://tetanus.cz/>
- [24] *Imunopatologické reakce*. Ústav imunologie UK a 2. lf a FN Motol, b.r. Dostupné také z: http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/cz_medici3_8.pdf
- [25] Jednotlivé nemoci, očkovací látky, jejich efektivita a možné vedlejší účinky. In: *Očkování dětí* [online]. b.r. [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <http://www.ockovanideti.cz/rodice/nemoci.htm>
- [26] VOTAVA, Miroslav. *Mikrobiální biofilm*. Brno, 2007. Dostupné také z: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2007/VLLM0421c/um/3186461/3186507/04_Mikrobialni_biofilm_I.txt
- [27] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.

- [28] HERBERT, George. Biofilm. In: *WikiSkripta* [online]. b.r. [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1197462>
- [29] HERBERT, George. Voština (kompozit). In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Vo%C5%A1tina_\(kompozit\)](https://cs.wikipedia.org/wiki/Vo%C5%A1tina_(kompozit))
- [30] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [31] Buněčná stěna bakterií. In: *Wikiskripta.eu* [online]. Praha, 2017 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%A1_st%C4%9Bna_bakteri%C3%AD
- [32] Bacillus subtilis. *Miniatlas mikroorganismů* [online]. Praha: VŠCHT, b.r. [cit. 2017-01-30]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/bac-sub.htm>
- [33] The Subtle Beauty of Bacillus Subtilis (Part II). *NYrture: New York NATTO* [online]. New York, 2015 [cit. 2017-01-30]. Dostupné z: <http://www.nyrture.com/blog/2015/5/23/the-subtle-beauty-of-bacillus-subtilis-part-ii>
- [34] Micrococcus luteus. *Miniatlas mikroorganismů* [online]. Praha: VŠCHT, b.r. [cit. 2017-01-30]. Dostupné z: <https://old.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/micr.htm>
- [35] KALHOTKA, Libor a Marta TESAŘOVÁ. *Potravinářská mikrobiologie pro Zahradnickou fakultu*. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014. ISBN 978-80-7509-017-1.
- [36] Micrococcus luteus. In: *Microbe Wiki* [online]. 2017 [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Micrococcus>
- [37] Micrococcus luteus. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2017-01-30]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Micrococcus_luteus_9759.jpeg
- [38] Seznam médií: Bakterie - MPA. *Czech Collection of Microorganism* [online]. Brno, 1999 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/ccm/>

- [39] Archiv vah Laboratorní technologická/kontrolní váha Ohaus PA2102C. *Váhy a vážící systémy Ohaus* [online]. Praha, Kladno, 2008-2013 [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: <http://www.ohaus-vahy.cz/archiv-vah-laboratorni-technologicka-kontrolni-vaha-ohaus-pa2102c>
- [40] Mikrobiologický bezpečnostní box: MB-120. *LABOX spol. s.r.o.* [online]. Jirny u Prahy, 2016 [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: http://www.labox.cz/images/downloads/kat_list_cz_MB120_180.pdf
- [41] INCUCELL 55-Standard. *BMT Medical Technology s.r.o.: chráníme zdraví lidí* [online]. 2008-2017 [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: <http://www.bmt.cz/incucell-55---standard85?cat=109>
- [42] Třepačka KS 15 A Control. *MANEKO s.r.o.: laboratorní přístroje a technika* [online]. Praha, 2005-2007 [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: <http://www.maneko.cz/trepacka-ks-15-a-control/>
- [43] Aura Mini: Laminar Downflow Workstation. In: *Biotech innovative* [online]. b.r. [cit. 2017-05-17]. Dostupné z: http://www.euroclonogroup.it/documents//documents/3061_BROCHURE_AUR A%20MINI_EN.pdf
- [44] Microbiological incubators: BD BF KB series. In: *DONAU LAB Prague* [online]. Praha, b.r. [cit. 2017-05-17]. Dostupné z: <http://donaulab.cz//Files/ProductLine/Microbiological%20incubators.pdf>
- [45] Isolace mikroorganismů křížovým roztěrem. FRÉBORTOVÁ, Jitka. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie* [online]. Olomouc, 2015, s. 17-20 [cit. 2017-05-14].
- [46] Zjišťování počtu mikrobiálních buněk v prostředí. DEMNEROVÁ A KOL., Kateřina. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, s. 87-105. ISBN 80-7080-415-7.
- [47] Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie. JULÁK, Jaroslav. *Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2009, s. 40-50. ISBN 9788024611419.

- [48] BEDNÁŘ, Marek, Jan SMÍŠEK a Veronika NĚMEČKOVÁ. Příručka mikrobiologie pro bakaláře 3.LF: Diluční metoda. In: BEDNÁŘ, Marek, Jan SMÍŠEK a Veronika NĚMEČKOVÁ A KOL. *Mikrobiologie 3.LF UK* [online]. Praha, 2009 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm>
- [49] Atlantic horseshoe crab: Anatomy and physiology. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Atlantic_horseshoe_crab
- [50] BC. ALFERIOVÁ, Marie. *Antibakteriální vlastnosti tenkých vrstev*. Kladno, 2012. Diplomová práce. České vysoké učení technické. Vedoucí práce Mgr. Veronika Vymětalová, PhD.
- [51] ING. PÍSAŘÍK, Petr. *Dopace diamantu podobného uhlíku pro použití v medicíně*. Kladno, 2016. Disertační práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce Prof. Ing. Miroslav Jelínek, DrSc.
- [52] MATLAB. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/MATLAB>
- [53] Documentation: imfindcircles. In: *MathWorks* [online]. 2012 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <https://www.mathworks.com/help/images/ref/imfindcircles.html>
- [54] Dokumentation: viscircles. In: *MathWorks* [online]. 2012 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: https://www.mathworks.com/help/images/ref/viscircles.html?s_tid=srchtitle
- [55] Dokumentation: msgbox. In: *MathWorks* [online]. 2006 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: https://www.mathworks.com/help/matlab/ref/msgbox.html?s_tid=srchtitle

Příloha A: Zdrojový kód programu Matlab

```
clc
clear all
close all

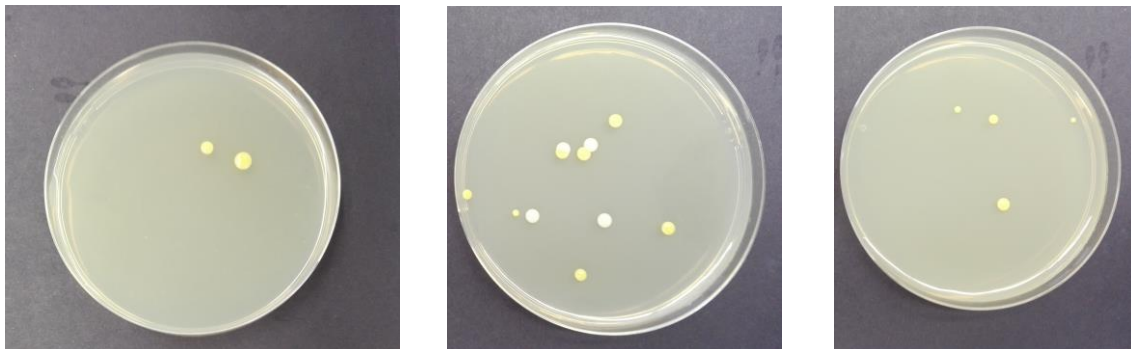
a = imread('bunky.jpg');
imshow(a);

[centers, radii] = imfindcircles(a,[19
45], 'ObjectPolarity', 'bright', 'Sensitivity',
0.875, 'Method', 'twostage', 'EdgeThreshold', 0.06);

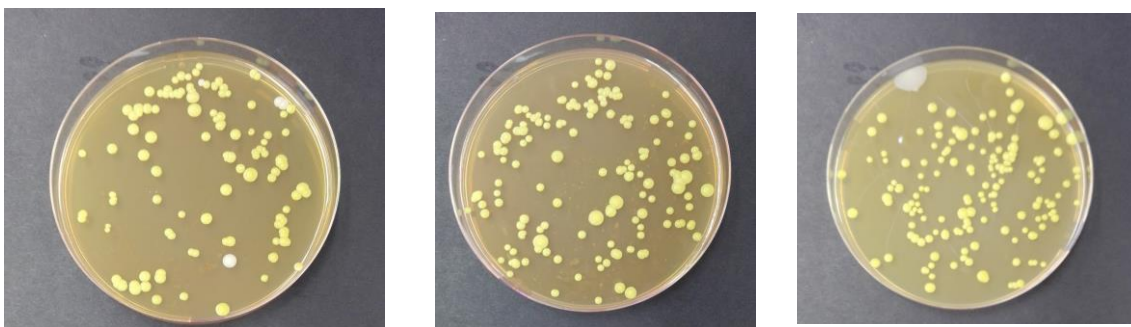
h = viscircles(centers, radii, 'Color', 'r');

C = size(radii);
D = sum(C,1);
msg = sprintf('Počet bakteriálních kolonií je cca %i.\n',
D(:,1));
msgbox(msg)
display(D)
```

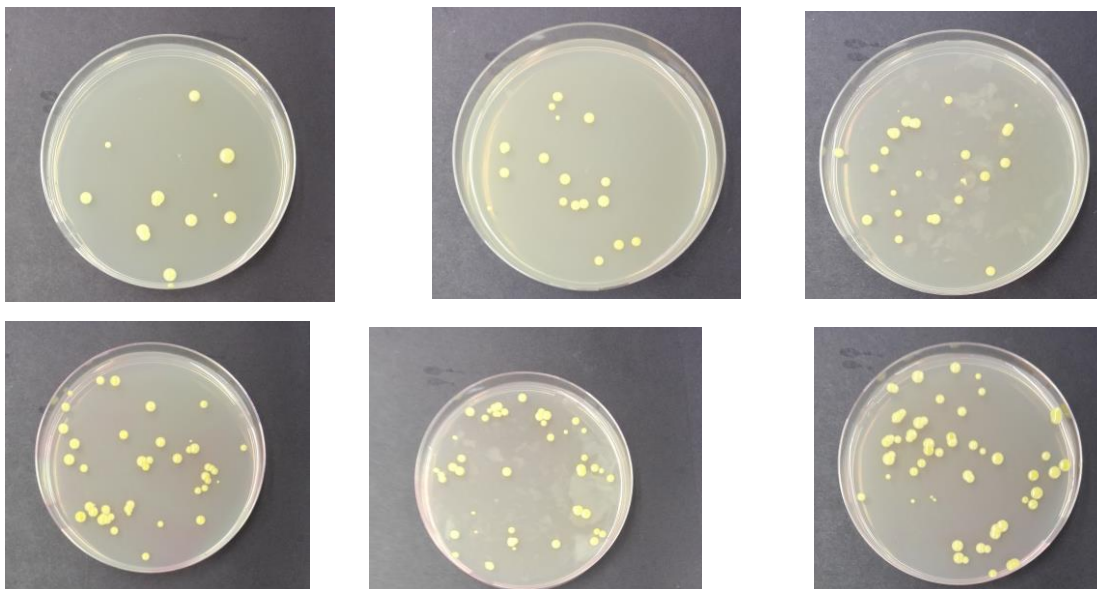
Příloha B: Fotografie narostlých bakteriálních kolonií



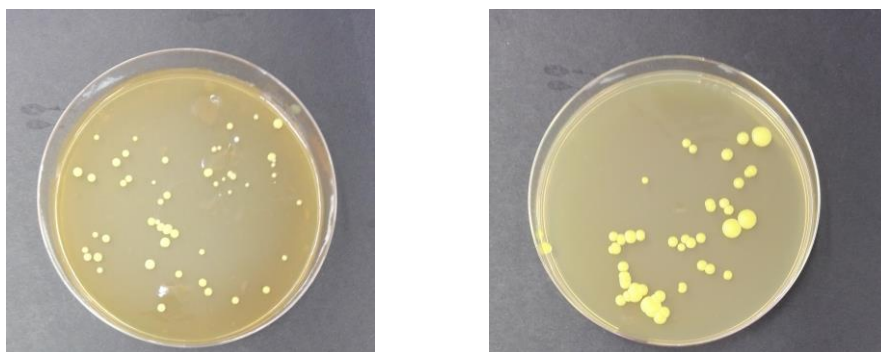
Obr. 9.1, 9.2 a 9.3: Narostlé bakteriální kolonie slepého vzorku na LB médiu [-]



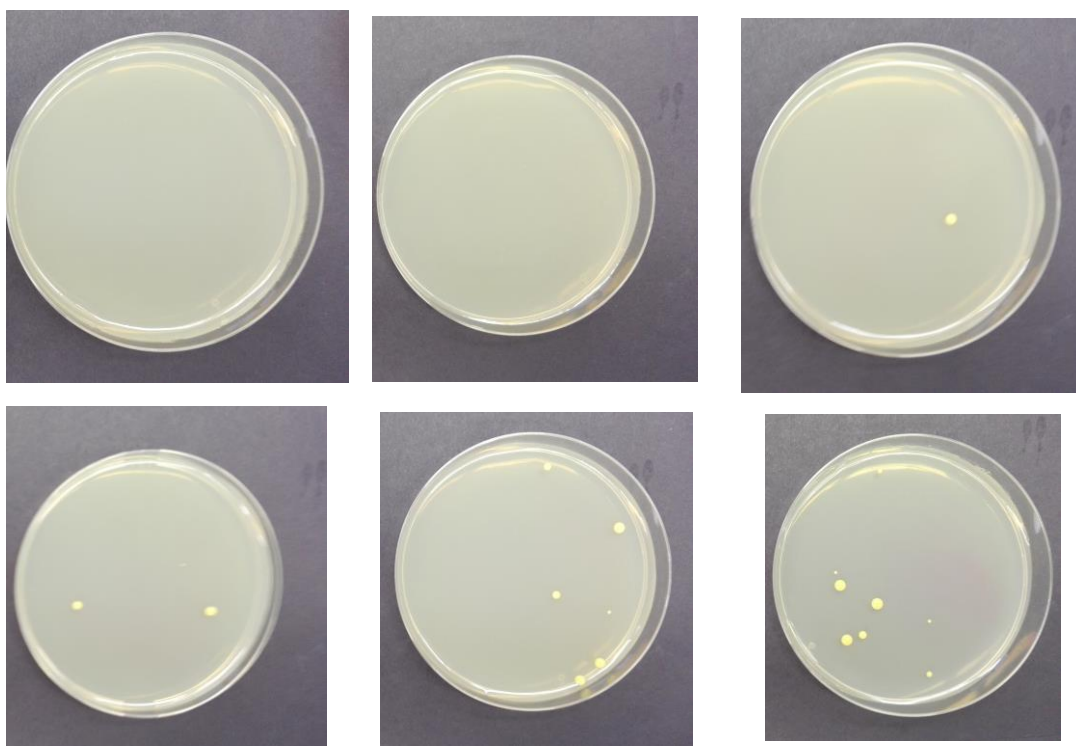
Obr. 9.4, 9.5 a 9.6: Narostlé bakteriální kolonie slepého vzorku na MPA médiu [-]



Obr. 9.7 – 9.12: Narostlé bakteriální kolonie z podložky Si 100 na LB médiu [-]



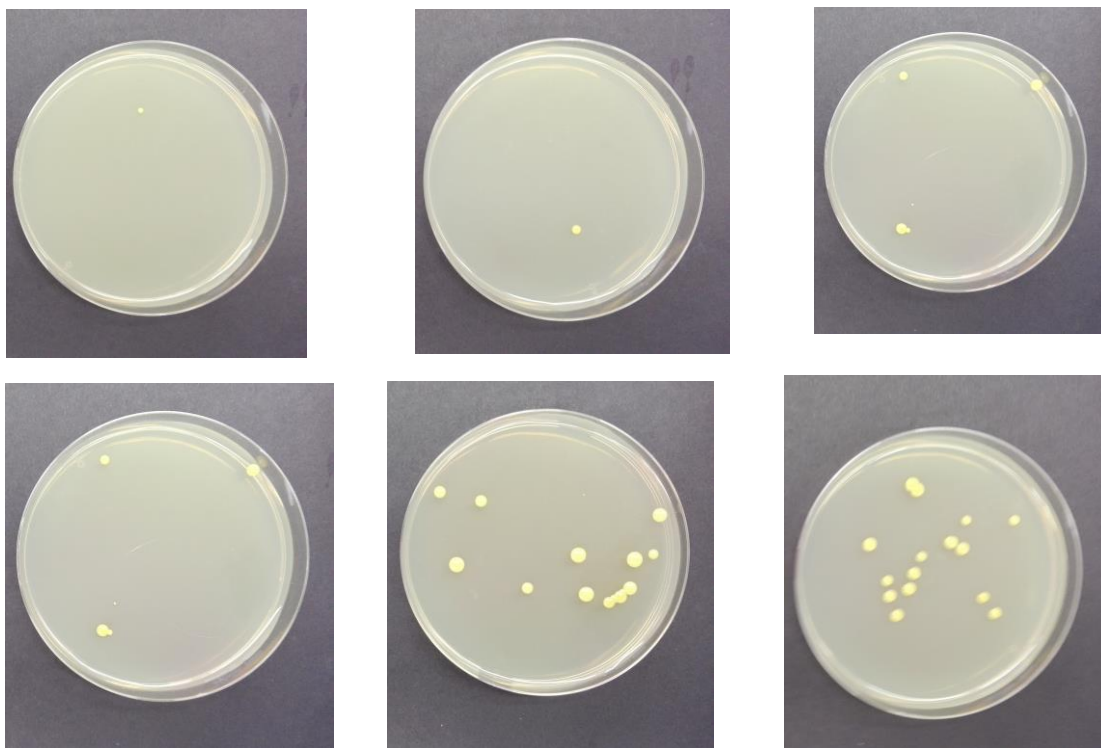
Obr. 9.13 a 9.14: Narostlé bakteriální kolonie z podložky Si 100 na MPA médiu [-]



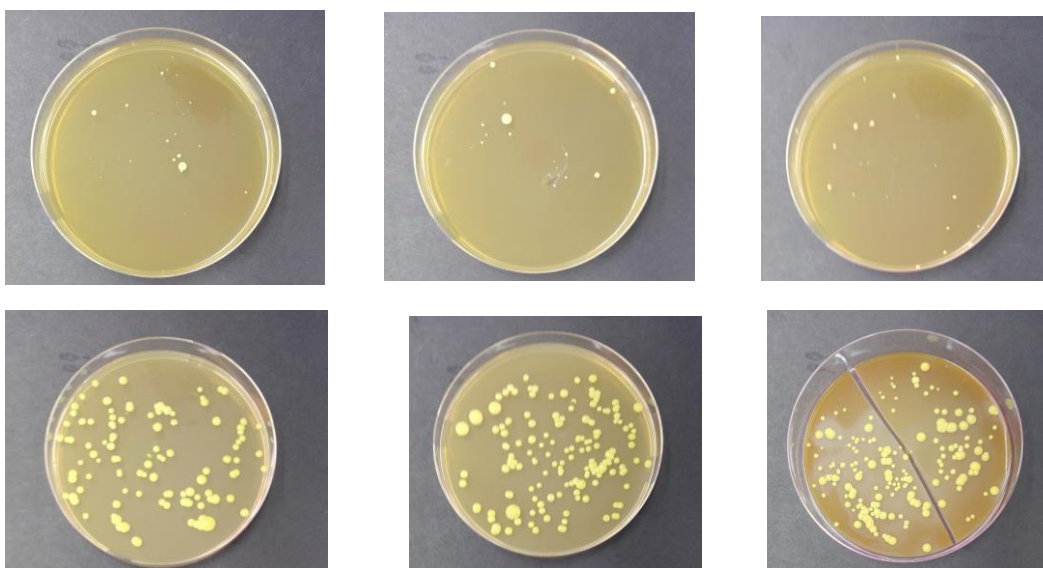
Obr. 9.15 – 9.20: Narostlé a nenarostlé bakteriální kolonie z tenké vrstvy C6 na LB médiu [-]



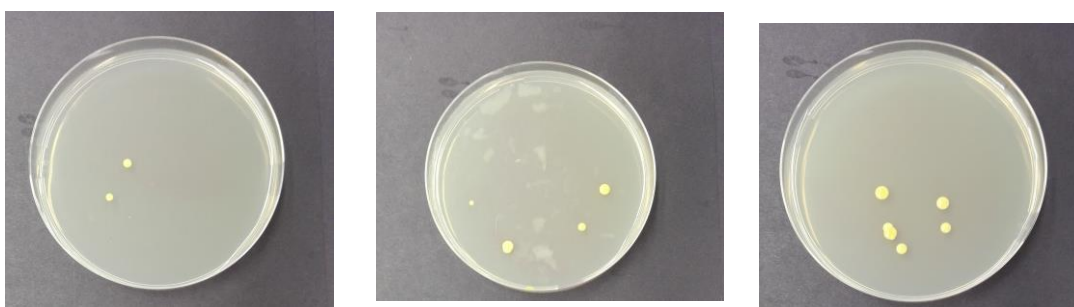
Obr. 9.21 – 9.23: Narostlé bakteriální kolonie z tenké vrstvy C6 na MPA médiu [-]



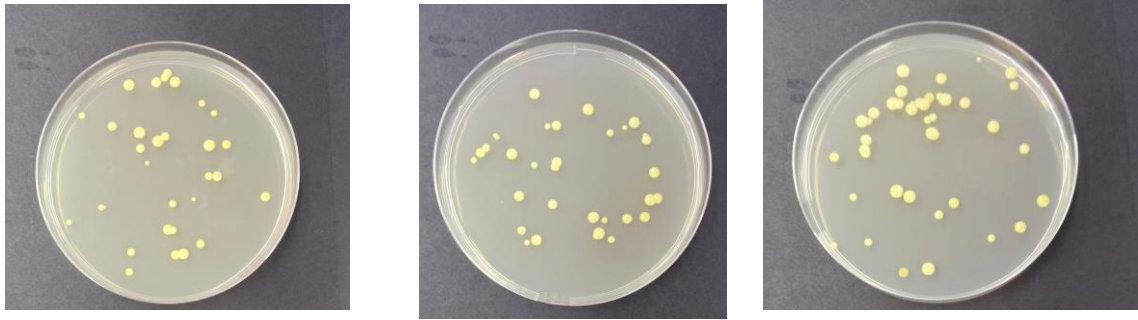
Obr. 9.24 – 9.29: Narostlé bakteriální kolonie z tenké vrstvy C7 na LB médiu [-]



Obr. 9.30 – 9.35: Narostlé bakteriální kolonie z tenké vrstvy C7 na MPA médiu [-]



Obr. 9.36 – 9.38: Narostlé bakteriální kolonie z tenké vrstvy C8 na LB médiu [-]



Obr. 9.39 – 9.41: Narostlé bakteriální kolonie z tenké vrstvy C8 na LB médiu [-]

Příloha C: Obsah přiloženého CD

- 1 Naskenované zadání bakalářské práce
- 2 Bakalářské práce
- 3 Klíčová slova (ČJ a AJ)
- 4 Abstrakt (ČJ)
- 5 Abstrakt (AJ)
- 6 Kód programu Matlab