

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2018

Kristýna Krupičková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV AKUMULACE PHA NA STRESOVOU ODOLNOST BAKTERIÍ VŮČI DEZINFEKČNÍM PROSTŘEDKŮM

IMPACT OF PHA ACCUMULATION ON STRESS RESISTANCE OF BACTERIA AGAINST DISINFECTION
AGENTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristýna Krupičková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1203/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Kristýna Krupičková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Vliv akumulace PHA na stresovou odolnost bakterií vůči dezinfekčním prostředkům

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Studium vlivu přítomnosti PHA v bakteriálních buňkách na jejich odolnost vůči desinfekčním prostředkům

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Kristýna Krupičková
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem akumulace PHA na stresovou odolnost bakterií vůči dezinfekčním prostředkům. Jako modelové mikroorganismy, využitě pro analýzy v experimentální části práce, byly zvoleny dva kmeny: PHA akumulující *Cupriavidus necator* H16 a její mutantní kmen neschopný PHA syntézy *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Tyto bakterie byly exponovány třem vybraným dezinfekčním prostředkům (ethanol, savo a ajatin) o třech různých koncentracích. Byla stanovena viabilita bakterií při působení daných detergentů, a to plotnovou metodou a průtokovým cytometrem. Vliv dezinfekčních prostředků na bakterie byl dále zkoumán bujónovou diluční metodou, která spočívala v měření absorbance v čase. Poslední využitou technikou byla agarová difúzní metoda. Z výsledků je patrné, že produkce PHA pozitivně napomáhá obranyschopnosti buněk vůči dezinfekčním prostředkům, jelikož bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 je více odolný než jeho mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Ze tří vybraných dezinfekčních prostředků je neúčinnější ajatin.

Abstract

This bachelor thesis deals with the influence of accumulation of PHA balancing on the resistance of bacteria against disinfecting means. Two bacterial strains, PHA accumulation *Cupriavidus necator* H16 and its mutant strain insoluble PHA synthase *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ were used as model microorganisms. These bacteria were exposed to three different concentration of three disinfecting means (ethanol, savo and ajatin). The viability of bacteria by the action of disinfectants was determined by the plate method and by the flow cytometry. The influence of disinfecting means against bacteria was examined by the broth dilution method which rested in measurement of absorbance over time. Agar diffusion method was the last one technique use. The results show that PHA production positively aids cell defence against disinfectants because bacterial strain *Cupriavidus necator* H16 is more resistant than its mutant strain *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Of the free selected disinfectants, ajatin is the most effective.

Klíčová slova

Cupriavidus necator, polyhydroxyalkanoáty, dezinfekční prostředky, ethanol, savo, ajatin

Keywords

Cupriavidus necator, polyhydroxyalkanoates, disinfecting means, ethanol, savo, ajatin

KRUPIČKOVÁ, K. *Vliv akumulace PHA na stresovou odolnost bakterií vůči desinfekčním prostředkům*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 47 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana VUT.

.....
Kristýna Krupičková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, PhD. za odborné vedení práce, ochotu, čas a cenné rady potřebné pro vypracování bakalářské práce. Dále bych také chtěla poděkovat Ing. Evě Slaninové a Ing. Lucii Müllerové za ochotu, pomoc při práci v laboratoři a poskytnutí cenných konzultací. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině za trpělivost a podporu během celého mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	BAKTERIE	8
2.1.1	Stavba bakterií	8
2.1.1.1	Cytoplazma	8
2.1.1.2	Genetická informace bakterií	9
2.1.1.3	Plazmidy	9
2.1.1.4	Ribozomy	9
2.1.1.5	Cytoplazmatická membrána	10
2.1.1.6	Buněčná stěna	10
2.1.2	Odolnost bakterií vůči nepříznivým okolním podmínkám	11
2.2	ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	13
2.2.1	Účinek antimikrobiálních látek	13
2.2.2	Mechanismus účinku antimikrobiálních látek	13
2.3	DEZINFEKCE A STERILIZACE	15
2.3.1	Dezinfekční prostředky	15
2.3.2	Rozdělení dezinfekčních prostředků	16
2.3.3	Použité dezinfekční látky	18
2.3.3.1	Ethanol	18
2.3.3.2	Savo	18
2.3.3.3	Ajatin	18
2.4	<i>CUPRIAVIDUS NECATOR</i>	19
2.4.1	Výskyt a vlastnosti <i>C. necator</i>	19
2.5	POLYHYDROXYALKANOÁTY	19
2.5.1	Struktura a vlastnosti PHA	20
2.5.2	Propojení PHA a stresové odpovědi bakterií	21
2.5.2.1	Oxidativní stres	21
2.5.2.2	Teplotní stres	21
2.5.2.3	Osmotický stres	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, BAKTERIE, MATERIÁL A PŘÍSTROJE	23
3.1.1	Bakteriální kmeny	23
3.1.2	Použité chemikálie pro kultivaci mikroorganismů	23
3.1.3	Seznam použitých přístrojů	23
3.2	PŘÍPRAVA INOKULA	23
3.3	ŽIVNÁ MÉDIA	24
3.4	PŘÍPRAVA DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ	24
3.5	STANOVENÍ VIABILITY	25
3.5.1	Stanovení viability na agarové plotně	25
3.5.2	Stanovení viability pomocí průtokového cytometru	25

3.6	BUJÓNOVÁ DILUČNÍ METODA	25
3.7	AGAROVÁ DIFUZNÍ METODA.....	26
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
4.1	STANOVENÍ VIABILITY.....	27
4.1.1	Stanovení viability plotnovou metodou	27
4.1.2	Stanovení viability průtokovým cytometrem	29
4.2	AGAROVÁ DIFÚZNÍ METODA.....	32
4.3	BUJÓNOVÁ DILUČNÍ METODA	33
5	ZÁVĚR.....	40
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	41
7	PŘÍLOHY.....	45

1 ÚVOD

Dezinfekční prostředky jsou chemické látky obecně určené k čištění a dezinfekci neživých předmětů. Aby byl daný dezinfekční prostředek účinný proti konkrétním patogenům, bakteriím či virům, musí mít schopnost nevratně poškodit mikrobiální buňku. Cílem dezinfekčních látek je minimalizovat počet bakterií na neživých předmětech a to usmrcením nebo poškozením buňky. Každý dezinfekční prostředek obsahuje jinou aktivní látku a působí na jiné organismy, podle čehož se v praxi (v lékařství, domácnostech, mikrobiologických laboratořích, a další) volí vhodný dezinfekční prostředek. V současnosti disponuje trh s dezinfekčními prostředky širokým spektrem přípravků určených pro konkrétní použití, proto by se spotřebitel měl při výběru správného dezinfekčního prostředku zaměřit především na antimikrobiální účinky dezinfekčních prostředků, dobu expozice, koncentraci a vliv na materiál.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery produkovány mnoha bakteriemi pro zvýšení stresové tolerance, dále mohou sloužit jako zdroj uhlíku a energie při hladovění mikroorganismů. Polyhydroxyalkanoáty tak napomáhají bakteriím přežít mnoho stresových faktorů, jako jsou teplotní šoky, vysoké nebo nízké koncentrace iontů, volné kyslíkové radikály nebo ultrafialové záření a další. Mezi stresové faktory spadá například oxidativní, teplotní nebo osmotický stres.

Cílem a hlavní náplní předložené bakalářské práce bylo ověřit a prozkoumat antimikrobiální účinky vybraných dezinfekčních prostředků (ethanol, savo a ajatin), stanovit jejich účinnou koncentraci proti bakteriím kmene *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ a prozkoumat vliv akumulace PHA na stresovou odolnost bakterií vůči dezinfekčním prostředkům.

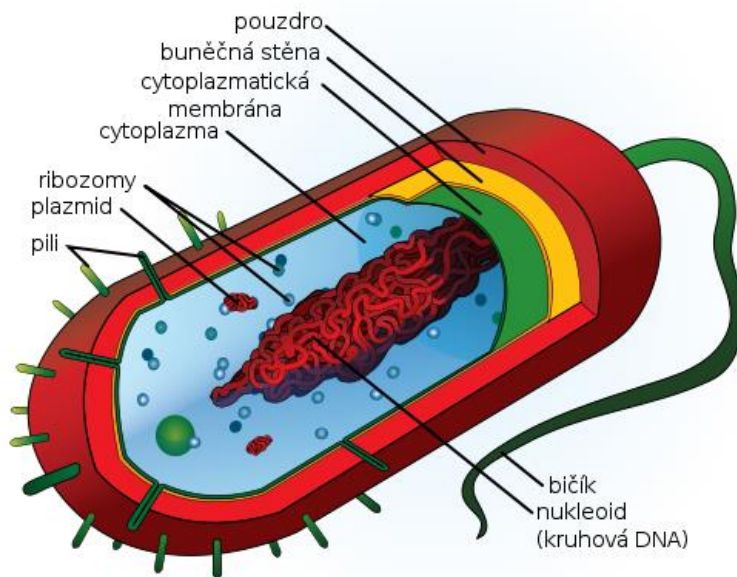
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bakterie

Bakterie jsou prokaryotické jednobuněčné organismy, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 1–10 μm . Tato skupina mikroorganismů patří mezi nejrozšířenější organismy na světě. Bakterie mívají kokovitý či tyčinkovitý tvar a ve velké míře tvoří kolonie. Výživa bakterií se uskutečňuje heterotrofně, autotrofně či fotolitotrofně. Většina bakterií však patří do skupiny fakultativně anaerobních organismů (například bakterie *Clostridium tetani* a *Escherichiacoli*)[1].

2.1.1 Stavba bakterií

Bakteriální buňka je pokryta buněčnou stěnou, která obaluje cytoplazmatickou membránu. Pod cytoplazmatickou membránou se nachází cytoplazma, ve které je uložena jaderná DNA, ribozomy, plazmidy, inkluze a mezozómy. Pohyb (taxe) bakterií je zprostředkováván pomocí bičíků. Bakterie mohou mít různá uspořádání bičíků a také různý počet. Všechny zmíněné komponenty jsou důležité pro přežití a rozmnožování buňky[2].



Obrázek 1: Stavba prokaryotické buňky [3].

2.1.1.1 Cytoplazma

Jak už bylo zmíněno výše, cytoplazma patří mezi důležitou komponentu bakteriální buňky. Za pojem cytoplazma považujeme viskózní, koncentrovaný roztok, zahrnující vodu, aminokyseliny, nukleotidy, ribonukleové kyseliny, vitamíny, glykogen, soli, enzymy a další. Cytoplazma je obklopena cytoplazmatickou membránou, což lze vidět na obrázku 1. Prakticky tvoří vhodné prostředí pro veškeré chemické reakce probíhající uvnitř bakteriální buňky [4].

2.1.1.2 Genetická informace bakterií

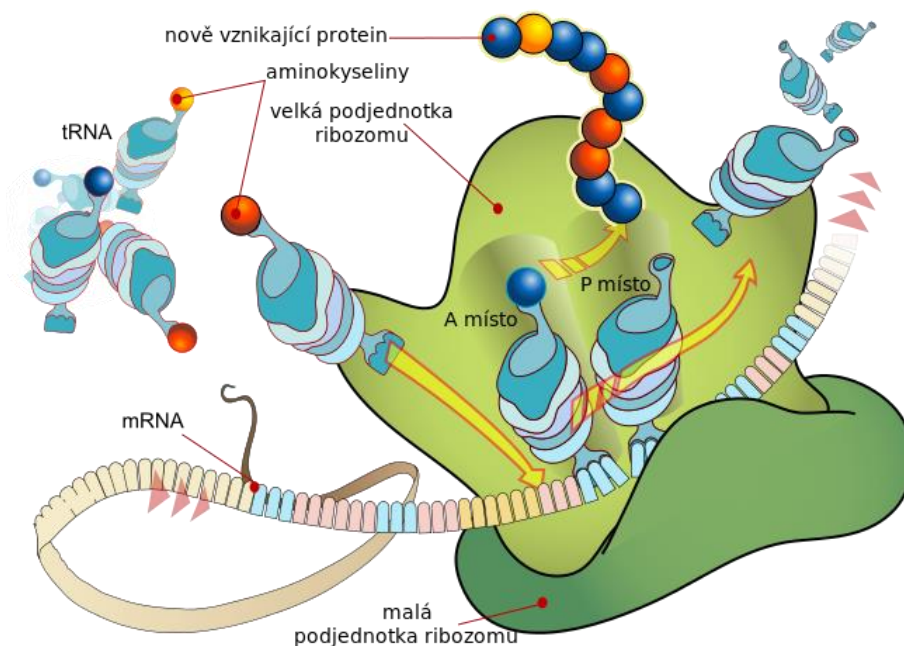
DNA bakterií je složena z jedné velké, do kruhu stočené dvou řetězcové molekuly. Na rozdíl od jádra eukaryot je DNA uložena volně v cytoplazmě a není obalena membránou. Prokaryota tedy neobsahuje jádro. Velikost této molekuly může být až tisíckrát větší než buňka (cca 1,4 mm). Kruhový chromosom, označován také jako mesosom, je v určitém místě uchycen k cytoplazmatické membráně. Nepravé jádro se nazývá nukleoid a obsahuje několik tisíc genů. Každá buňka obsahuje pouze jednu alelu určitého genu, tudíž je považovaná za haploidní a dělí se replikací [4].

2.1.1.3 Plazmidy

Plazmidy představují kruhové úseky DNA uložené volně v cytoplazmě. V případě potřeby, například v genovém inženýrství, lze využít možnosti integrace plazmidu do chromosomu, těmto plazmidům se pak říká epizomální plazmid. Bakterie může obsahovat desítky až stovky plazmidů, které mohou pomocí svých genů měnit vlastnosti buňky. Řada významných vlastností bakterií je zakódována na plazmidové DNA. Mezi nejznámější druhy plazmidů patří R plazmidy, které nesou gen pro rezistenci vůči antibiotikům. Bakterie si sama plazmid nevytváří, ale získává jej buď konjugací, transdukci pomocí bakteriofága nebo transformací GI, což je přenos DNA přes buněčnou stěnu a plazmatickou membránu do bakteriální buňky. Konjugace se uskutečňuje přes fimbrie z jiné buňky [5].

2.1.1.4 Ribozomy

Ribozom sestává z ribonukleové kyseliny a proteinů. U prokaryotického typu buněk je ribozom mnohem menší než u eukaryotického typu buněk. Jeho funkcí je syntéza proteinů na základě mRNA, nebo-li translace. U bakterií se ribozom skládá ze dvou podjednotek 30S a 50S, menší a větší. S označuje jednotku Svedberg, což je jednotka sedimentačního koeficientu, který charakterizuje dobu sedimentace ribozomu v ultracentrifuze. Jeden Svedberg je roven 10^{-13} sekundy [6,7].



Obrázek 2: Ribozom [8]

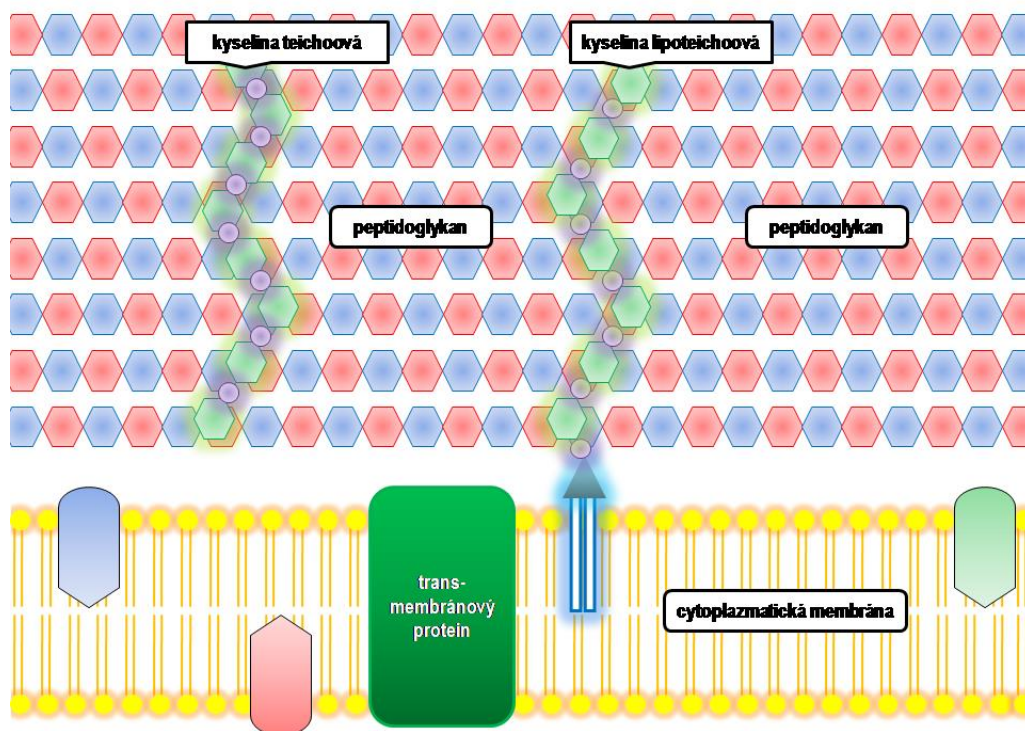
2.1.1.5 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána bakterií je složena z fosfolipidové dvojvrstvy, do které jsou zanořeny proteiny a glykoproteiny. Na rozdíl od propustné buněčné stěny je cytoplazmatická membrána semipermeabilní (polopropustná). Zajišťuje přístup látek a minerálů do buňky a z buňky pomocí bílkovinných přenašečů, difúzí nebo osmózou. Její funkcí je především mechanická opora a ochrana buňky před průnikem velkých molekul[9].

2.1.1.6 Buněčná stěna

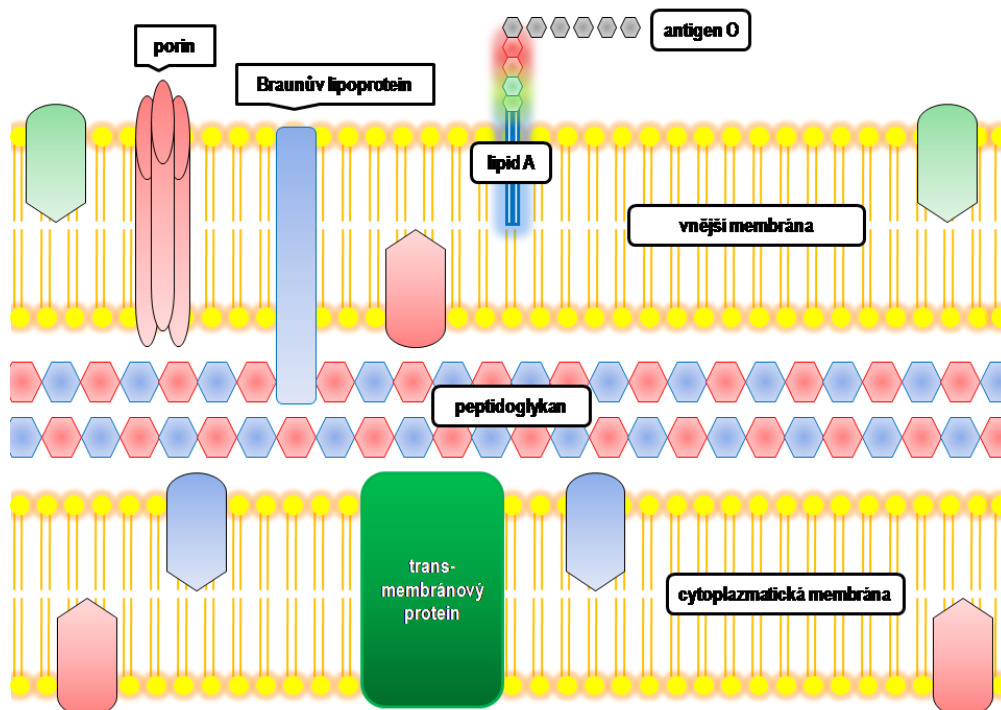
Buněčná stěna bakterií sestává z peptidoglykanu, který je tvořen polysacharidovými řetězci, ve kterých jsou za sebou poskládané N-acetylglukosamin a N-acetylmuramová kyselina. Hraje důležitou roli při ochraně buňky, udává buňce tvar a chrání ji před vnějšími vlivy, jako jsou například patogeny, záření, nebo osmotický tlak. Stavba stěny se liší u gram⁺ a gram⁻ buněk [10].

Gram⁺ bakterie má obecně tlustší buněčnou stěnu a obsahuje větší množství peptidů, které spojují polysacharidové řetězce. Hrubá vrstva peptidoglykenu se skládá ze dvou typů aminosacharidových monomerních podjednotek, jimiž jsou kyselina N-acetylmuramová a N-acetylglukosamin. Tyto podjednotky spolu vytvářejí polysacharidové řetězce spojené β -(1,4)-glykosidickou vazbou a jsou navzájem zesíťované krátkými peptidy. Jejich stavba je jednodušší než u gram⁻ buněk, jelikož neobsahuje lipidy a bílkoviny. Dokáže vázat kationty hořčnaté a vápenaté především díky přítomnosti povrchového antigenu, kyseliny teichoové. Při Gramově barvení, pomocí krystalové violeti, se zbarví do modrofialového odstínu. Alkoholem nelze krystalová violeť vymýt. Mezi důležité zástupce se řadí bakterie rodu *Staphylococcus*, *Enterococcus* a *Listeria*. [10].



Obrázek 3: BS gram⁺ bakterie [11]

Gram⁻ bakterie se vyznačuje tenčí buněčnou stěnou, ale za to velmi komplikovanou strukturou. Sestává z tenké vrstvy peptidoglykanů a z vnější membrány, která je tvořena dvojrůžnou fosfolipidů s bílkovinami. Přebírají zde lipopolysacharidy, jež sestávají ze 3 komponent: lipid A, specifický polysacharid a základní polysacharid. Transmembránové proteiny, tzv. poriny se nachází ve vnější membráně a umožňují pasivní transport nízkomolekulárních látek do buňky. Další důležitou součástí gram⁻ buňky jsou lipoproteiny, především Braunův lipoprotein, který hraje významnou roli při spájení peptidoglykanové vrstvy s vnější cytoplazmatickou membránou, čímž napomáhá udržet kompatibilitu buněčné membrány. Periplazmatický prostor, nacházející se pod vnější membránou, obsahuje tenkou vrstvu peptidoglykanu, nebo-li mureinu. Buňka je barvitelná krystalickou violetí a safraninovým roztokem, kdy se bakterie gramovým barvením zbarví do růžova. Alkohol způsobuje vymytí krystalické violeti. Za nejdůležitější skupiny gram⁻ bakterií jsou považovány proteobakterie, spirochéty a sinice [10].

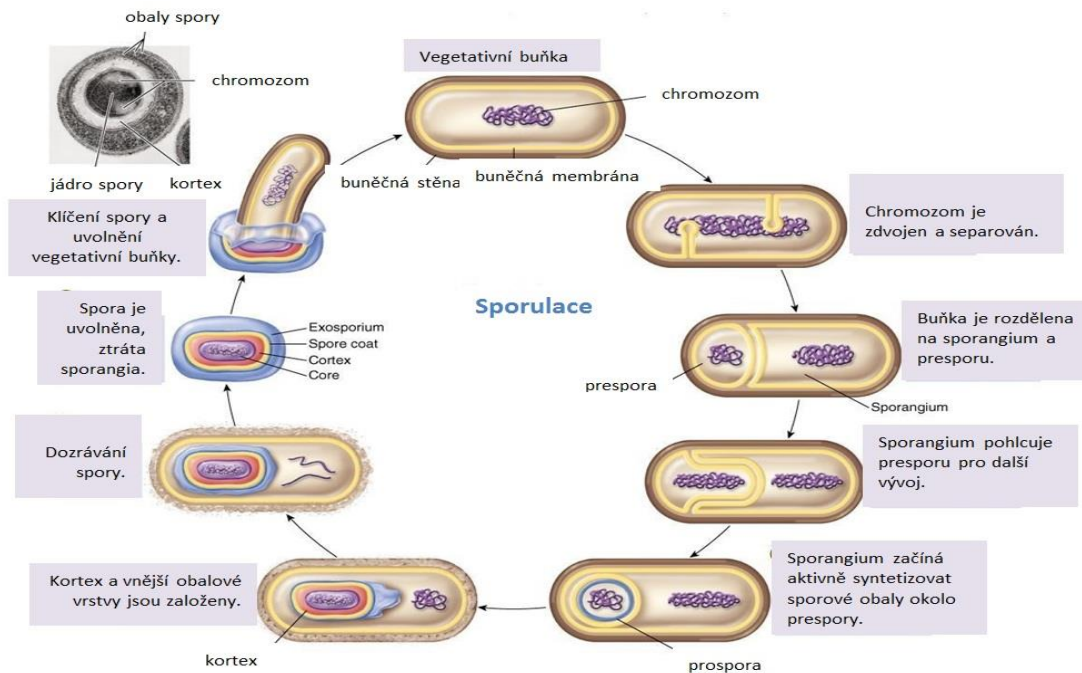


Obrázek 4: BS gram⁻ bakterie [11]

2.1.2 Odolnost bakterií vůči nepříznivým okolním podmínkám

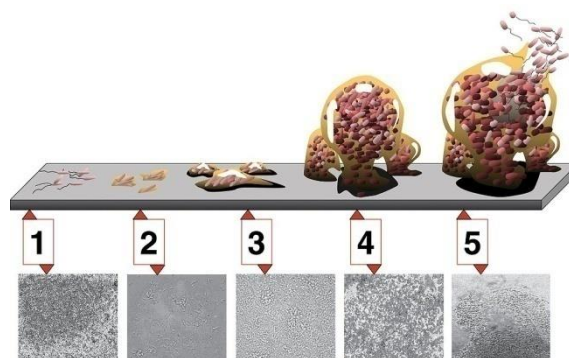
Mezi základní obranné mechanismy bakterií patří tvorba spor, nebo-li sporulace. Spory tvoří zejména gram⁺ bakterie. Spora je považována za klidové stádium buňky. Tento děj začíná replikací DNA a buněčným asymetrickým dělením na konci exponenciální fáze růstu. Vznikají dva různě velké útvary (spora a sporangium), které mají úplný genom. Sporulace je způsobena nepříznivými okolními podmínkami, jako je nedostatek živin, teplota, radiace, kyselost prostředí, dezinfekční látky v prostředí a podobně. Ke studiu procesu sporulace se nejčastěji využívají bakterie rodu *Clostridium*, *Bacillus*, jejichž sporulaci můžeme vidět na obrázku 5. Tento proces má celkem sedm fází a trvá přibližně 10 hodin. V první fázi nastává změna nukleotidu, kdy oba chromosomy vytvoří vláknitý tvar, místo kulovitěho.

Poté následuje vytvoření přepážky směrem dovnitř buňky, která rozdělí buňku na větší sporangium a menší budoucí sporu. Ve třetí fázi dochází k vmezeření budoucí spory do větší mateřské buňky, tím vzniká prespora, která má vnější a vnitřní membránu. Pro další růst spory již není nutný přísun živin, jelikož se začíná v prostoru mezi dvěma membránami hromadit vápník a vzniká silná vrstva kortexu. Mezi peptidoglykanovým kortexem a vnitřní membránou vzniká vnější plášť. V poslední fázi nastává lýze buňky mateřské a uvolní se spora [12].



Obrázek 5: Průběh sporulace [13]

Odolnost bakterií může být také zajištěna tvorbou biofilmu. Za pojem biofilm bývá označováno společenství mikroorganismů, jenž je obklopené polysacharidy, který samy buňky vylučují a tyto mikroorganismy jsou vázané k určitému povrchu. Polysacharidy, proteiny, nukleové kyseliny a lipidy společně tvoří pouzdro, které poskytuje mechanickou stabilitu biofilmu. Díky skvělým vlastnostem těchto biofilmů jsou buňky více odolné vůči antimikrobiálním činidlům. Tvorba biofilmu zahrnuje 5 fází (viz obrázek 6): 1. Iničiální přilnutí, 2. Ireverzibilní přilnutí, 3. Zrání 1, 4. Zrání 2, 5. Odlučování bakterie a zrání kolonie [14].



Obrázek 6: Fáze tvorby biofilmu [15]

Jak už bylo zmíněno výše v podkapitole Buněčná stěna 2.1.1.6, buněčná stěna je jedna z nejdůležitějších ochran buněk. Pokud bychom porovnávali odolnost buněčné stěny gram⁺ a gram⁻ bakterií, zajisté by zvítězila stěna gram⁺ bakterií, která je více odolná vůči chemickým látkám a lytickým účinkům nepříznivých látek. Lipopolysacharidy, přítomny ve vnější membráně buněčné stěny gram⁻ bakterií, hrají významnou roli jako endotoxiny, které se uvolní při buněčné apoptóze [16].

2.2 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky jsou sloučeniny, které inhibují růst mikroorganismů, nebo je usmrcují. Mezi antimikrobiální látky řadíme dezinfekční prostředky, antibiotika, léčiva, enzymy a další. Slouží k vytvoření sterilního (antiseptického) prostředí. Dále jsou známy antiseptika, která jsou aplikována na živou tkáň. Také rozlišujeme sanitizéry, jejichž rozdíl oproti dezinfekčním prostředkům spočívá v ředění. Dezinfekční látky musí mít větší schopnost zabít patogenní bakterie oproti sanitizéru. Tělo si dokáže vytvářet vlastní antiseptika v podobě enzymů jako lysozym a fosfolipáza A2. Tyto enzymy jsou důležitou součástí imunitního systému a najdeme je ve slinách, slzách nebo v mateřském mléce [17].

2.2.1 Účinek antimikrobiálních látek

Podle účinku na bakterie můžeme dělit antimikrobiální látky na:

- bakteriocidní;
- bakteriostatické.

Bakteriocidní antimikrobiální látky poškozují buňku do doby, kdy dojde k úplnému usmrcení. Tento děj je tedy nevratný. Mezi bakteriocidní látky s dezinfekčním účinkem řadíme chlornany, chloraminy, peroxidy, Lugolův roztok, jodovou tinkturu, koncentrované alkoholy, jako je etanol, propanol, dále fenol, ozón, koloidní stříbro a další [17].

Bakteriostatické látky jsou takové, které reversibilně blokují činnost proteinů a nukleových kyselin. Tím dochází k pozastavení růstu buňky. Patří mezi ně, například antibiotika [17].

Důležitým faktorem pro účinnost antimikrobiálních látek je koncentrace, a proto byly zavedeny dva pojmy: minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace.

MIC je pojem, který představuje hodnotu minimální inhibiční koncentrace, což je koncentrace, při které dojde k zastavení množení bakterií. Je důležitá především z hlediska stanovení resistance mikroorganismů na antimikrobiální látky. Určit MIC lze pomocí různých metod, jako je například ředění agaru nebo bujónu [18].

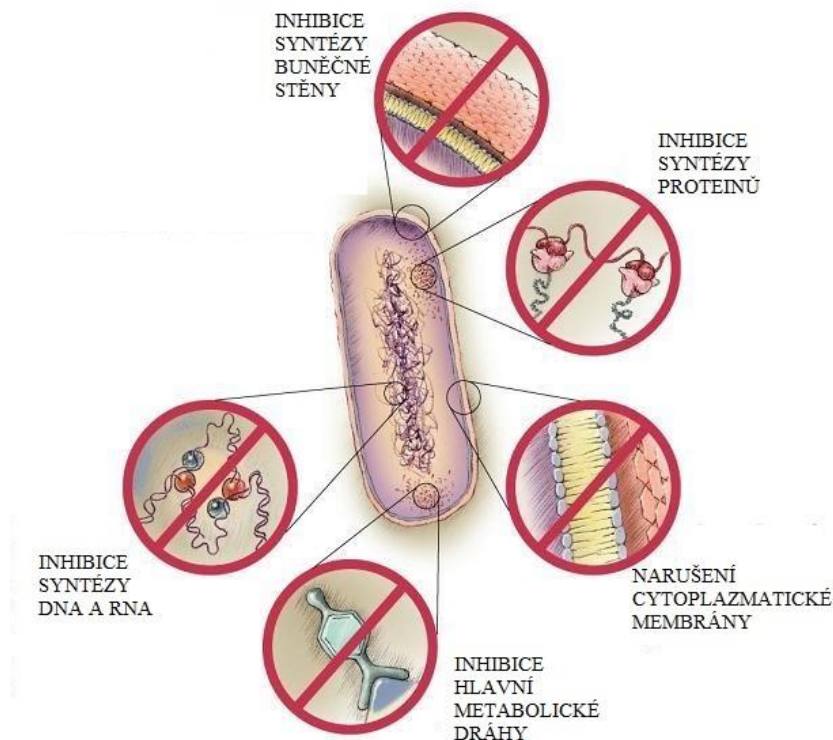
MBC představuje minimální baktericidní koncentraci, které můžeme dosáhnout při zvyšování minimální inhibiční koncentrace. Tato koncentrace antimikrobiální látky je pro bakterie letální. Není tak často používána jako MIC [19].

2.2.2 Mechanismus účinku antimikrobiálních látek

Při použití antimikrobiálních látek dochází k nevratnému poškození buněčné stěny a buněčných membrán, což je znázorněno na obrázku 7, může vést až k destrukci struktury

proteinů a nukleových kyselin. Nejdříve se adsorbuje látka na povrchu buňky a prostupuje přes buněčnou stěnu do cytoplazmatické membrány, kde interaguje s proteiny, enzymy a dokonce i s DNA. S rostoucí teplotou a koncentrací stoupá i účinek antimikrobiální látky [17].

Mechanismus účinku antimikrobiálních látek závisí na druhu použité látky. Při použití ozonu, chloru nebo peroxidu dochází k oxidaci. Za to alkálie, kyseliny a horká voda způsobují hydrolýzu, na rozdíl od kovů, alkoholů a fenolů, které mají za příčinu koagulaci bílkovin [17].



Obrázek 7: Mechanismus účinku antimikrobiálních látek [20]

Dezinfekční látky (biocidy) mají obecně širší spektrum účinku než antibiotika a dokážou se soustředit na více cílů v buňce. Biocidy bývají také nazývány jako protoplazmatické jedy, jelikož působí na metabolismus bakterií. Interakce mohou být různého druhu:

A) INTERAKCE S BUNĚČNOU STĚNOU

Dezinfekční látka může interagovat s buněčnou stěnou a dalšími strukturami vně cytoplazmatické membrány. Účinnost biocidu je závislá především na schopnosti látky penetrovat a překonat bariérový efekt vnější membrány buňky.

B) INTERAKCE S CYTOPLAZMATICKOU MEMBRÁNOU

Pokud dezinfekční látka interaguje s cytoplazmatickou membránou, tak dochází k narušení jevu oxidativní fosforylace a k narušení jevů zajišťujících transport látek přes membránu.

C) INTERAKCE S CYTOPLAZMOU

Většina dezinfekčních prostředků interaguje s cytoplazmou, což má za následek inhibici proteosyntézy nebo poruchu syntézy nukleových kyselin [21].

2.3 Dezinfekce a sterilizace

Existuje velký rozdíl mezi sterilizací a dezinfekcí. Použitím dezinfekce dojde k usmrcení patogenních bakterií. Spory a zárodky zůstanou ale nepoškozené. Naopak sterilizace má za následek usmrcení všech vegetativních buněk a spor. Sterilizovat se dá například vlhkým teplem. Tato metoda se provádí v parních přístrojích při teplotě až 134 °C. Dále můžeme sterilizovat pomocí horkého vzduchu, plazmou, formaldehydem a etylenoxidem [22].

2.3.1 Dezinfekční prostředky

Jak už bylo zmíněno výše, viz 2.2.2 Sterilizace a dezinfekce, slovem dezinfekce se rozumí soubor opatření ke zneškodňování mikroorganismů pomocí fyzikálních, chemických nebo kombinovaných postupů, které mají přerušit cestu nákazy od zdroje k cíli. Mezi fyzikální postupy spadá ultrafialové záření o vlnové délce 253,7nm – 264 nm, filtrace, záření, spalování, var v přetlakových nádobách nebo var za atmosférického tlaku po určitou dobu. Chemická dezinfekce se provádí postřikem, ponořením, omýváním nebo otíráním daného místa či přístroje. Chemické dezinfekce zahrnuje mnoho látek, jako jsou například halogeny, aldehydy, alkoholy a étery, tenzidy (povrchově aktivní látky), cyklické sloučeniny, sloučeniny těžkých kovů, hydroxidy a jiné alkálie. Existují fyzikálně-chemické metody dezinfekce, jež zahrnují prací, mycí a čistící stroje, kde dezinfekce probíhá při teplotě 60 °C s chemickými dezinfekčními prostředky. Také paroformaldehydová komora, sloužící k dezinfekci textilu, výrobků z umělých hmot, vlny, kůže a kožešin při teplotě 45 °C až 75 °C, spadá do kategorie kombinované dezinfekce [23].

Dezinfekční prostředky se skládají z aktivní látky, která je mikrobiologicky účinná a působí na patogenní mikroorganismy, dále jsou přítomny pomocné sloučeniny, jež mohou být látky s mycí a leštící substancí nebo látky k optimalizaci pH, barvy, rozpustnosti nebo hustoty a další. Podle druhu aktivní látky, její účinnosti a druhu organismu, na který působíme, je můžeme dělit na účinné, částečně účinné a neúčinné (viz tabulka 1) [24].

sloučeniny. Dále podle způsobu použití jsou to například dezinfekce povrchů, nástrojů, rukou nebo speciální dezinfekce [25].

Sloučeniny chloru

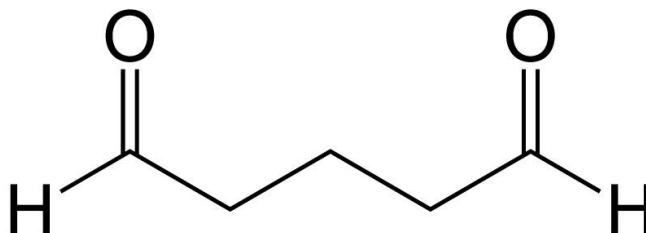
Sloučeniny chloru se v běžné praxi využívají pro dezinfekci předmětů ať už v domácnostech nebo v nemocničních prostorách. Ve zdravotnictví může sloužit jakožto antiseptikum pro dezinfekci kůže. V těchto případech je chlor součástí organických sloučenin, které uvolňují chlor pomalu a nedojde tak k podráždění pokožky. Řada látek, obsahující chlor, má oxidační vlastnosti, díky kterým dochází v buňce patogenu k oxidaci bílkovin, což způsobí jejich denaturaci a následné usmrcení bakterie. Oxidační látky mohou působit i na enzymy a zajistí tak jejich inaktivaci pomocí odštěpeného atomárního kyslíku, který naruší molekulární vazby patogenu [26].

Alkoholy a fenoly

Antibakteriální účinek alkoholů je založen především na poruše buněčné membrány a na denaturaci bílkovin. Nejčastěji používaný antimikrobiální alkohol je ethanol, který je nejúčinnější při koncentraci 70% a působí pouze na bakterie, nikoliv na spory. Při větších koncentracích ethanolu dochází spíše ke konzervaci. Dalšími používanými antimikrobiálními alkoholy jsou izopropanol, ethylenglykol a další. Často se setkáváme s kombinací látek, například etanol se používá do řady dezinfekcí, jako jsou Ajatin, Septonex nebo Jodisol. Alkoholy působí rychle a také se rychle odpařují, jsou vhodné dezinfekci rukou, pokožky, malých a těžko dostupných ploch [27].

Aldehydy

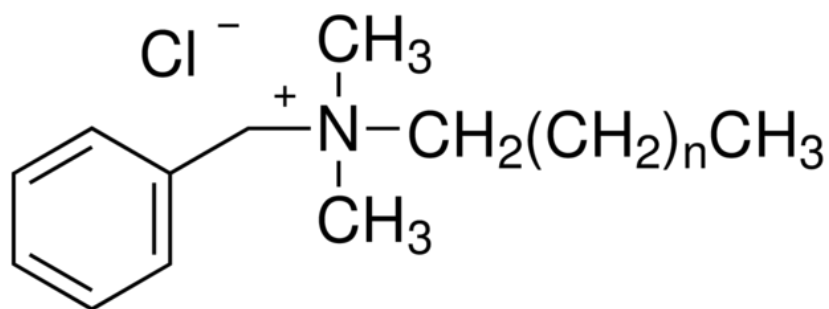
Aldehydy způsobují inaktivaci buněčných enzymů a koagulují bílkoviny. Aktivní látkou jsou glyoxal, glutaraldehyd (viz obrázek 8) a formaldehyd. Aldehydy mají nevýhodu ve vysoké toxicitě, přičemž je potřeba při dezinfekci ploch dbát na skvělé odvětrávání aldehydových výparů, které mohou způsobit alergie [27].



Obrázek 8: glutaraldehyd [28]

Kvarterní amoniové sloučeniny

Benzalkonium chlorid, jehož strukturní vzorec je znázorněn na obrázku 9, a didecyldimethylamonium chlorid jsou kvarterní amoniové sloučeniny narušující buněčnou stěnu především u gram+ bakterií. Tyto sloučeniny nejsou účinné vůči gram- bakteriím a sporám. U buňce se váží na buněčné bílkoviny a inaktivují enzymy [27].



Obrázek 9: Benzalkonium chlorid [29]

2.3.3 Použité dezinfekční látky

2.3.3.1 Ethanol

Ethanol, jinými slovy ethylalkohol, je bezbarvá kapalina, charakteristického zápachu. Jedná se o alkohol, který je snadno zápalný a proto jej řadíme do hořlavin první třídy. Ethanol můžeme připravit z cukrů alkoholovým kvašením působením různých druhů kvasinek. Druh *Saccharomyces cerevisiae* zahrnuje fakultativně anaerobní kvasinky schopné fermentace a užití sacharidů. Pro výrobu lihovin je možné použít kvasinky druhu *Schizosaccharomyces pombe*, která tvoří ethanol anaerobně. Synteticky lze ethanol připravit katalytickou hydratací ethenu nebo katalytickou hydrogenací acetaldehydu. Díky přítomnosti –OH skupiny je molekula schopna tvořit vodíkové vazby. Díky tomuto jevu je teplota bodu varu vyšší. Ethanol se řadí mezi antiseptické a dezinfekční činidlo, jehož účinná koncentrace je 60 – 95%, jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3.2, při této koncentraci vykazuje baktericidní účinky. K dezinfekci kůže nebo nástrojů se používá koncentrace 70 % a 90% ethanol je účinný proti virům [30, 31].

2.3.3.2 Savo

Savo je dezinfekční prostředek, často užívaný v domácnostech jako dezinfekce či k bělení. Účinnou látkou je zde chlornan sodný, jehož sumární vzorec je NaClO. Chlornan sodný můžeme vyrobit zaváděním chloru do chladného a zředěného roztoku hydroxidu sodného. Průmyslová výroba spočívá v elektrolýze roztoku chloridu sodného. Působí jak na gram⁻ bakterie, tak i na gram⁺ bakterie, na bakteriální spory, plísňe a viry. K lýzi buněk dochází kvůli oxidaci funkčních skupin biomolekul, Savo je tedy baktericidní látka. Jedná se o velmi účinný prostředek ničící buněčnou aktivitu proteinů pomocí uvolněného kyslíku. Mechanismus účinku spočívá v denaturaci bílkovin, buněčných membrán a také zasahuje do syntézy proteinů inhibicí enzymy a destrukcí řetězců DNA [32].

2.3.3.3 Ajatin

Ajatin PLUS 10% obsahuje 10 g benzododeciniumbromidu ve 100 ml roztoku. Tento přípravek je určen především k dezinfekci. Jeho zředěná forma se může využít na dezinfekci povrchu pokožky, k plošné dezinfekci povrchů a předmětů. Je účinný především proti gram⁺ bakteriím, kvasinkám, nižším houbám, virům a plísním. Roztok je bezbarvý a nezapáchá, dále je hořlavý, ale neuvolňuje nebezpečné plyny. V nižších koncentracích není zřejmý účinek proti gram⁻ bakteriím [33].

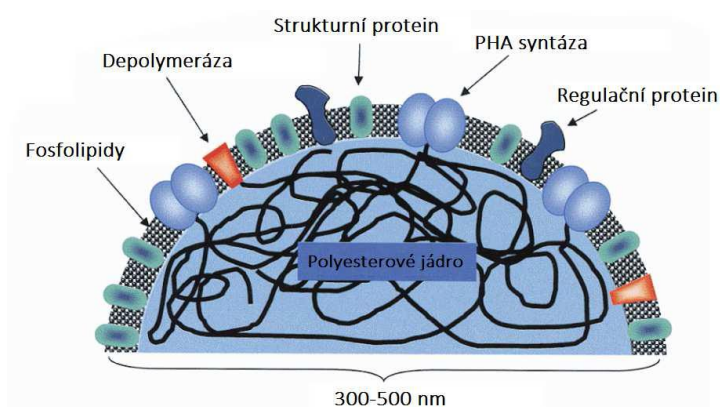
2.4 *Cupriavidus necator*

V mnoha literárních zdrojích se můžeme setkat se starším pojmenováním bakterie *Cupriavidus necator* H16 a to jako *Ralstonia eutropha* (název z roku 1995). V roce 1969 byla bakterie známá pod jménem *Alcaligenes eutrophus*. Tento název byl používán až do roku 2004, kdy byl pozměněn na *Wautersia eutropha* H16 a ještě téhož roku došlo k opětovnému přejmenování na dnes známé a upřednostňované *Cupriavidus necator*. V rámci této práce byla tato bakterie využita jako modelový mikroorganismus pro posouzení vlivu PHA na resistenci mikrobiálních buněk vůči desinfekčním prostředkům, proto budou následující řádky věnovány podrobnějšímu představení této bakterie [34,35].

2.4.1 Výskyt a vlastnosti *C. necator*

C. necator je chemolitotrofní, gram⁻ organismus, nacházející se ve sladké vodě i v půdě a v případě, kdy nejsou přítomny organické substráty, je schopna využívat H₂ a CO₂ jako zdroje energie, přičemž hojně využívají své schopnosti vázat CO₂ ze vzduchu do Calvin-BensonBasshamova cyklu. Naopak v nepřítomnosti kyslíku je bakterie schopna přejít do procesu anaerobního dýchání, kde jsou za akceptory elektronů považovány dusičnany [35].

Bakterie *C. necator* je považována za nejlépe prostudovanou bakterii produkující PHA, konkrétně poly(3-hydroxybutyrát). Tento polyhydroxyalkanoát je akumulovaný ve formě intracelulárních granulí (obrázek 10) v cytoplasmě buňky. Druh bakteriálního kmene a s ním i podmínky kultivace jsou aspekty pro počet a velikost granulí. Povrch granulí je hydrofilní, jelikož je tvořen fosfolipidovou monovrstvou, do níž jsou zanořeny proteiny s různými funkcemi. Jedním ze zástupců mutantních kmenů této bakterie je *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, která není schopna produkce polyhydroxyalkanoátů [36].



Obrázek 10: Schéma struktury polyhydroxyalkanoátové granule [37]

2.5 Polyhydroxyalkanoáty

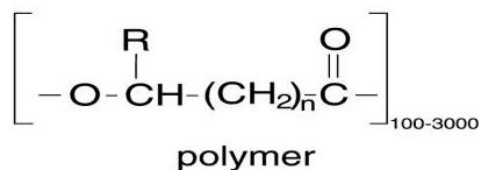
V roce 1926 byly francouzským vědcem Lemoignem objeveny polyhydroxyalkanoáty, což jsou lineární polyestery, které jsou produkovány intracelulárně ve formě inkluzí během stacionární fáze růstu mnoha bakterií a to fermentací cukrů, lipidů, alkanů, alkenů a alkanových kyselin. Mikrobiolog Lemoign použil bakterii *Bacillus megaterium* k izolaci poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB). Schopnost akumulace PHA byla objevena i u dalších gram⁻

i gram⁺ kmenů. Předpokládá se, že bakterie využívají akumulace PHA pro zvýšení stresové tolerance, dále mohou sloužit jako zdroj uhlíku a energie při hladovění mikroorganismů [38,39].

Od běžných syntetických plastů vyráběných z ropy je odlišuje fakt, že jsou vyráběné z obnovitelných surovin, jako jsou například odpadní produkty z potravinářských nebo zemědělských procesů. Dalším významným faktorem je jejich biologická rozložitelnost. Jejich využití je široké, jelikož mají podobné fyzikální vlastnosti, jako například polypropylen nebo polyethylen. Lze je tedy využít v domácnostech, v potravinářském a obalovém průmyslu. V akustice se mohou PHA použít na výrobu reproduktorů, sluchátek nebo mikrofonů. V neposlední řadě nacházejí uplatnění i v medicíně jako implantáty nebo pro řízený transport léčiv do konkrétních buněk[40].

2.5.1 Struktura a vlastnosti PHA

Polyhydroxyalkanoáty jsou polyestery mastných hydroxykyselin. Jsou známy dvě skupiny, do kterých se PHA dělí podle délky řetězců monomerů. První skupinu tvoří polymery obsahující hydroxykyseliny s 3 - 5 atomy uhlíku. Těm se říká Short-chain-length, zkráceně SCL-PHA. Do druhé skupiny spadají polyhydroxyalkanoáty o délce 6-14 atomů uhlíků, jejichž název je medium-chain-length. Zkratka pro tyto polyestery zní MCL-PHA. Bakterie *Cupriavidus necator* produkuje polyestery SCL-PHA [37].



Obrázek 11: Struktura PHA [41]

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.4.1, polyhydroxyalkanoáty se nacházejí v cytoplazmě buňky ve formě intracelulárních granulí. Jádro PHA je obaleno fosfolipidovou dvojvrstvou, do které jsou zanořeny strukturální proteiny, PHA depolymerázy, PHA syntézy a další proteiny. Hydrofobní charakter PHA je pro buňku přínosný, protože akumulace PHA nezvyšuje intracelulární tlak [42].

PHA mají vynikající vlastnosti, díky nimž by mohly v budoucnu zcela nahradit již zmíněné syntetické polymery. Mezi nejdůležitější vlastnosti patří biodegradace a snadná odbouratelnost. Některé druhy PHA se řadí mezi termoplasty nebo elastomery. Další výhodou je biokompatibilita vůči různým druhům buněk, jako jsou osteoblasty nebo chondrocyty. Jsou opticky aktivní a to díky mikrobiální produkci, jelikož je bakterie vyrábějí jako čisté enantiomery. Bylo zjištěno, že PHA jsou netoxické látky, které mohou být vyrobeny z obnovitelných zdrojů. Většina takto vyrobených polyhydroxyalkanoátů je nerozpustná ve vodě, krystalická a disponuje vysokým stupněm polymerace. V praxi se můžeme setkat s různými vlastnostmi PHA, založené na jejich vzniku či funkci a v závislosti na zastoupení monomerů. Některé mohou být krystalické, těžké, křehké a tuhé s vysokou teplotou tání

(okolo 180 °C), jiné zase naopak elastické a pružné. Při kombinaci látek s jinými hydroxykyselinami mohou být jejich vlastnosti velice pestré [43].

2.5.2 Propojení PHA a stresové odpovědi bakterií

Bakterie dovedou přežít mnoho stresových faktorů, jako jsou například teplotní šoky, vysoké nebo nízké koncentrace iontů, volné kyslíkové radikály nebo ultrafialové záření a další. Bylo zjištěno, že k přežití v těchto stresových podmínkách jim pozitivně napomáhají polyhydroxyalkanoáty. Stresové faktory lze rozdělit do tří kategorií: fyzický stres, kam spadá například osmotický šok, dehydratace, teplotní stres a další. Druhou kategorií tvoří chemické mutageny, hladovění, metabolické toxiny, pH šok a oxidativní stres, což můžeme zahrnout pod pojem chemický stres. Poslední skupinou je biologický stres, pro který je typické buněčné stárnutí, změny v genotypu nebo konkurence jinými organismy [44].

2.5.2.1 Oxidativní stres

Většina bakterií žije v aerobním prostředí, což je pro ně energeticky výhodné, jelikož se vytváří ATP během oxidativní fosforylace. V průběhu tohoto metabolismu ale probíhají redukce molekulárního kyslíku, což vede až ke vzniku peroxidu vodíku, hydroxylových radikálů, superoxidu nebo oxidu dusnatého. Tyto sloučeniny pak nepříznivě poškozují proteiny a DNA. Při oxidativním stresu se aktivují některé metabolické dráhy, které se snaží odstranit chemicky reaktivní formy kyslíku. V tomto stavu buňky potřebují udržet vysoký poměr NAD(P)H/NAD(P)^+ a toho docílí pomocí glutationu [44].

2.5.2.2 Teplotní stres

Mezi jednu z hlavních vlastností bakteriálních buněk patří fakt, že jsou velice poddajné (odolné i citlivé) okolním teplotám a prostředí. Bakterie patří mezi organismy nejhojněji zastoupené na Zemi a to je způsobeno díky jejich přizpůsobivosti. Podle jejich druhu a prostředí, ve kterém žijí, jsou schopny přežívat v hostitelské i mimo hostitelskou buňku nebo dovedou odolávat teplotním výkyvům způsobeným změnou roční doby nebo denního času [45].

Mikroorganismy dělíme na tři základní skupiny podle optimální teploty. Teplota 5 až 18 °C je ideální pro skupinu psychrofilních bakterií. U mezofilních mikroorganismů se teplota pohybuje okolo 30 °C a třetí skupinu tvoří bakterie, které přežívají v teplotách 45 °C nebo vyšších a těm říkáme termofilní. Pokud dojde ke zvýšení teploty nad optimální teplotu, buňka podléhá tepelné šokové odpovědi (HSR) a naopak při snížení teploty nastane studený šok (CSR). Při zvyšování i snižování teploty může nastat snížení rychlosti růstu. Při snížení teploty může nastat změna stavu buňky, a proto je nutné včlenit mastné kyseliny. Bakterie se snaží těmto jevům bránit indukcí řady proteinů [45].

2.5.2.3 Osmotický stres

Pojem osmóza představuje pasivní transport, při kterém přechází rozpouštědlo přes semipermeabilní membránu z prostoru o menší koncentraci do prostoru s větší koncentrací roztoku. Rozpouštědlo prochází přes membránu samovolně, zatím co rozpuštěné látky neprocházejí nebo je pro ně membrána méně propustná. Ve chvíli, kdy je polopropustná membrána částečně propustná pro rozpuštěné látky, může s sebou rozpouštědlo strhnout

i molekuly rozpuštěné látky. Osmotický tlak závisí na celkové koncentraci rozpuštěných látek v roztoku. S osmotickým tlakem souvisí osmolalita, což je osmotický tlak při určité teplotě v jednotkách koncentrace [46].

Osmotický stres u bakterií razantně ovlivňuje jejich budoucí růst a metabolickou aktivitu. Při stavu, kdy se buňka ocitne v roztoku o větší koncentraci než je koncentrace uvnitř buňky, dochází k difuzi vody z buňky ven a tím se snaží vyrovnat osmotický tlak. Změna obsahu vody v buňce má za následek někdy až fatální změny, jako je například změna objemu, membránového napětí nebo viskozity. Osmotický stres může být způsobený zvýšením nebo snížením osmotického tlaku. Buňky se při osmotickém stresu snaží zabránit lýzi či plazmolýze buňky a to tím, že zmírní vodní tok uvolněním elektrolytů nebo malých organických látek. Snaží se aktivovat osmoregulační systémy syntézou makromolekulárních látek [46].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, bakterie, materiál a přístroje

3.1.1 Bakteriální kmeny

V bakalářské práci byly použity bakterie *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB⁴, který byl zakoupen v Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Německo. Bakterie *Cupriavidus necator* H16 byla získaná z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

3.1.2 Použité chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

- Nutrien Broth (Himedia), India,
- Agar Powder (Himedia), India,
- Beef extrakt (Himedia), India,
- Peptone (Himedia), India,
- Propidium jodid (eBioscience),
- Ethanol,
- Savo,
- Ajatin.

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a.

3.1.3 Seznam použitých přístrojů

- Průtokový cytometr, Apogee A50, Apogee Flow Systems,
- temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o.,
- temperovaá třepačka, Orbital shaker – Incubator ES-20, Biosan,
- termostat, LS-35,
- centrifuga, Boeco U-32R
- Elisa Reader- ELx808, BioTek Instruments, Inc.,
- inkubátor, IP60,
- předvážky, Kern EW 620-3NM,
- laminární box Aura mini, Bio Air Instruments,
- spektrofotometr, Biotech Implen,
- multipipeta,
- běžné laboratorní sklo a vybavení.

3.2 Příprava inokula

Inokula pro kultivace byla připravována ve čtyřech Erlenmayerových baňkách o objemu 100 ml s obsahem 50 ml média. Jako kapalné produkční médium byla použita látka Nutrient Broth o koncentraci 25 g média na 1000 ml destilované vody. Živné médium bylo vysterilizováno v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 60 minut. Inokulum bylo zaočkováno bakteriologickou kličkou v laminárním boxu a to celkem třikrát, přímo z agarové plotny.

Kultivace probíhala 24 hodin na temperované třepačce při 30°C a frekvenci třepání 170 rpm. Po 24 hodinách bylo provedeno zaočkování produkčního minerálního media.

Složení Nutrien Broth:

- Beef extract 10 g/l,
- Pepton 10 g/l,
- NaCl 5 g/l,
- Agar 20 g/l.

3.3 Živná média

Pro přípravu produkčního minerálního média pro kultivaci bakterií *C. necator* H16 a *C. necator* PHB⁻⁴ byly použity následující minerální látky:

- (NH₄)₂SO₄ 1 g/l
- KH₂PO₄ 1,2 g/l
- Na₂HPO₄ 11,1 g/l
- MgSO₄ 0,2 g/l
- Fruktosa 20 g/l
- Roztok stopových prvků* 1 ml
- Destilovaná voda 1000 ml

*Roztok stopových prvků:

- FeCl₃ 9,7 g
- CaCl₂ 7,8 g
- CuSO₄ 0,156 g
- CoCl₂ 0,119 g
- NiCl₂ 0,118 g
- CrCl₂ 0,062 g
- 0,1 M HCl 1000 ml

Minerální médium bylo tvořeno ze solí, které jsou zmíněné výše, a ze 100 ml destilované vody. Opět byla provedena sterilizace a po vychladnutí roztoku bylo v laminárním boxu přidáno 5 ml fruktózy (20g/l), 100 µl roztoku stopových prvků a 5 ml inokula. Takto připravené produkční médium bylo kultivováno 72 hodin při 30 °C na temperované třepačce při 170 rpm.

Všechny sterilizace medií byly prováděny v dobře uzavřeném tlakovém hrnci po dobu 60 minut. Roztoky fruktosy se sterilizovaly 30 minut v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem a před použitím byly vloženy do laminárního boxu, kde byly sterilizovány UV zářením. Roztoky fruktosy a stopových prvků byly přidávány po vychladnutí medií na laboratorní teplotu.

3.4 Příprava dezinfekčních prostředků

Účinnost dezinfekčních prostředků byla zkoumána vždy při třech rozdílných koncentracích. Ethanol byl připravován z 97% roztoku, ze kterého byl, přidáním daného množství destilované vody, připraven postupně 70%, 50% a 10% roztok. Stejným způsobem byl zředěn

i roztok 10% ajatinu. Nejprve byly připraveny roztoky 2%, 1% a 0,1%. Následně bylo zapotřebí připravit i nižší koncentrace ajatinu, jelikož při stanovení viability na agarové plotně došlo k usmrcení všech bakterií při všech koncentracích. Nově zkoumané koncentrace zahrnovaly tedy 0,1%, 0,05% a 0,01% roztok ajatinu. V neposlední řadě byly připraveny 3 roztoky Sava (100%) o koncentraci 5 %, 1 %, 0,1 %.

3.5 Stanovení viability

Stanovení viability bakteriálních kmenů *C. necator* H16 a *C. necator* PHB⁴ bylo prováděno prostřednictvím dvou metod a to plotnovou metodou a pomocí průtokového cytometru.

3.5.1 Stanovení viability na agarové plotně

Pro stanovení vlivu desinfekčních prostředků na životaschopnost bakterií bylo zapotřebí určit počet narostlých kolonií ve vzorku před a po přidání detergentů. 5 ml produkčního minerálního média bylo 5 minut centrifugováno při 5000 otáčkách a poté bylo v laminárním boxu nepipetováno vždy 5 ml daného desinfekčního prostředku o určité koncentraci k supernatantu. K jednomu ze sedimentů bylo nepipetováno 5 ml PBS a tento vzorek sloužil jako kontrola. Produkční médium spolu s daným detergentem bylo kultivováno 20 minut na rotační třepačce při 10 RPM. Poté byly vzorky naředěny s PBS desítkovým ředěním až po hodnotu 10^{-7} . Byly vybrány 3 koncentrace (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7}), ze kterých bylo vždy po 0,1 ml rozetřeno sterilní hokejkou na tři agarové plotny s NB. Kultivace na agarových plotnách probíhala 48 hodin při 30°C a poté bylo spočítáno množství kolonií na miskách v rozmezí od 20 do 200.

3.5.2 Stanovení viability pomocí průtokového cytometru

Průtoková cytometrie je metoda, pomocí níž můžeme analyzovat jednotlivé buňky v krátkém časovém intervalu. V rámci jedné analýzy je možné stanovit řadu různých parametrů. Po vstříknutí vzorku do cytometru jsou částice náhodně roz distribuovány do trojrozměrného prostoru a poté fluidní systém zajistí, že do detekčního prostoru přichází buňky jednotlivě v řetězci [47].

K posouzení vlivu desinfekčních prostředků na životaschopnost bakterií bylo pro přesnost využito porovnání výsledků z plotnové metody s výsledky z průtokového cytometru, jelikož obě metody mohou být do jisté míry nepřesné. Příprava vzorků pro měření viability pomocí průtokového cytometru byla totožná se vzorky z plotnové metody. Rozdíl byl v tom, že z desítkového ředění byla zvolena koncentrace 10^2 , kdežto u plotnové metody byly na misky nanášeny vzorky z ředění 10^3 , 10^5 , 10^7 . Parametry nastavení cytometru byly rozhodující pro rozlišení mrtvých buněk od živých. Na obarvení mrtvých buněk bylo použito 5 μ l fluorescenčního barviva Propidium Iodide (1mg/ml), které interaguje s DNA poškozených bakterií.

3.6 Bujónová diluční metoda

Růst mikroorganismů byl stanoven měřením absorbance při 630 nm při bujónové diluční metodě. K testování byly použity 96 jamkové mikrotitrační destičky. Příprava vzorků pro tuto metodu proběhla následujícím způsobem. Nejprve bylo nutné si ředěním produkčního

média s NB připravit buněčnou suspenzi, tak, aby byla absorbance při 630 nm 0,1. Poté bylo nepipetováno 50µl dané dezinfekční látky do každé jamky (viz. tabulka2) a bylo přidáno vždy 150µl buněčné suspenze. Jako blank byla použita sterilní destilovaná voda. Samotná analýza vzorků byla provedena na ELISA readeru. Byla změřena počáteční koncentrace a koncentrace po 1. minutě a následně se vzorky nechaly inkubovat při 30°C. Absorbance byla měřena v čase 0, 4, 8, 12 a 24 hodinách kultivace.

Tabulka 2: Rozmístění vzorků na destičce (H16)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	blank	blank	blank	E10	E10	E10	E25	E25	E25				H16
B	H16	H16	H16	S5	S5	S5	S1	S1	S1	S0,1	S0,1	S0,1	
C	A2	A2	A2	A1	A1	A1	A0,1	A0,1	A0,1				
D	A0,05	A0,05	A0,05	A0,01	A0,01	A0,01							
E	blank	blank	blank	E10	E10	E10	E25	E25	E25				PHB
F	H16	H16	H16	S5	S5	S5	S1	S1	S1	S0,1	S0,1	S0,1	
G	A2	A2	A2	A1	A1	A1	A0,1	A0,1	A0,1				
H	A0,05	A0,05	A0,05	A0,01	A0,01	A0,01							

3.7 Agarová difuzní metoda

Agarová difuzní metoda byla využívána pro stanovení účinné koncentrace antimikrobiální látky. Pro měření bylo nutné si nejprve nachystat agarové médium, na Petriho misky, na které bylo nanášeno 100µl buněčné kultury, která byla rozetřena sterilní hokejkou. Poté byly misky ponechány 20 minut stát v laminárním boxu a po dvaceti minutách byly vyhloubeny jamky do agarového média, do kterých se nanášelo 50µl antimikrobiální látky o dané koncentraci. Následovala kultivace 24 hodin a poté byla změřena zóna inhibice.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení viability

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo stanovit viabilitu bakterií po přidání daného detergentu a porovnat účinnosti dezinfekčních látek na bakterie. K analýze byly vybrány 3 různé druhy dezinfekčních prostředků – ethanol, savo a ajatin. Z každého vzorku byly připraveny 3 různé koncentrace. U připravených vzorků byla sledována a analyzována účinnost na bakterie *C. Necator* H16 a *C. Necator* PHB⁻⁴.

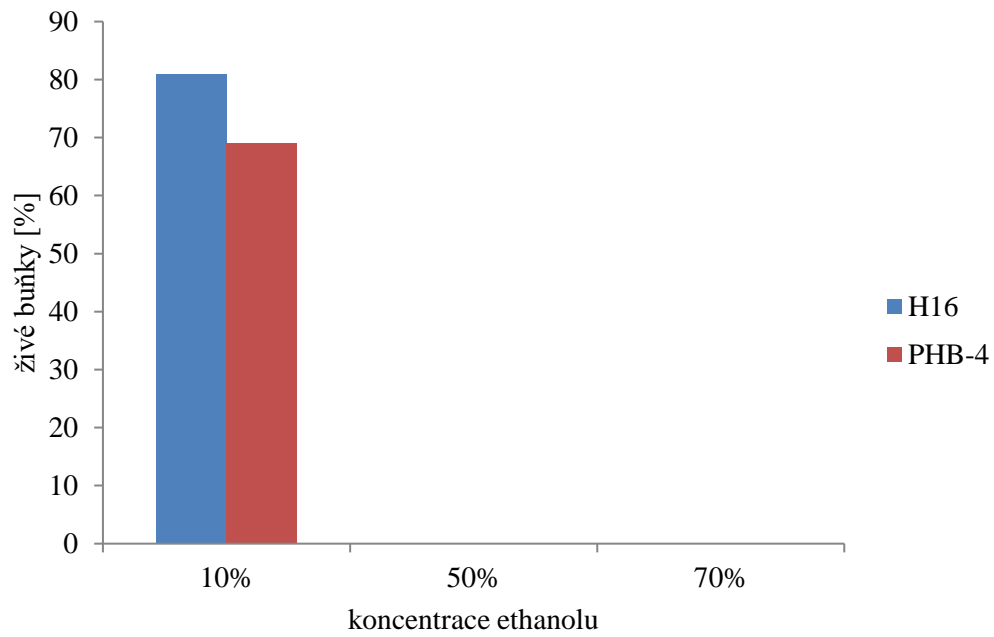
4.1.1 Stanovení viability plotnovou metodou

Ethanol, ajatin a savo byly připraveny dle postupu uvedeném v kapitole 3.4. U sledovaných vzorků byla stanovena antimikrobiální účinnost pomocí plotnové metody, kdy byl určen počet živých kolonií na agarové vrstvě a ten byl následně porovnán s počtem živých kolonií čisté buněčné suspenze.

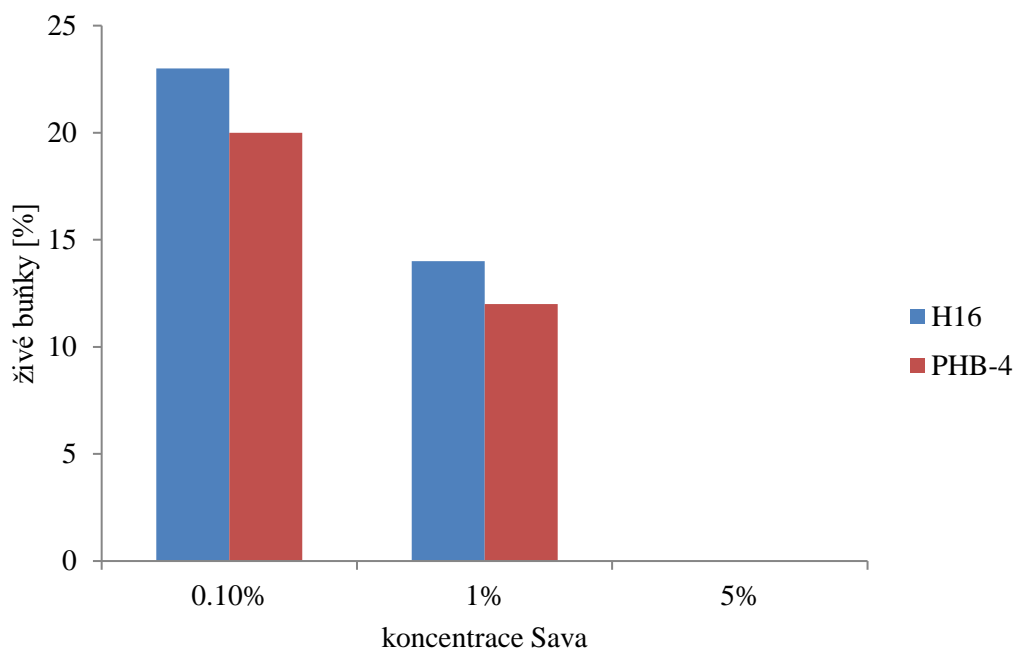
Tabulka 3: procenta živých buněk

LÁTKA	KONCENTRACE	% ŽIVÝCH, H16	% ŽIVÝCH, PHB ⁻⁴
KONTROLA	X	100	100
ETHANOL	10%	81	69
	50%	0	0
	70%	0	0
AJATIN	0,01%	4	0
	0,05%	0	0
	0,10%	0	0
	1,00%	0	0
	2,00%	0	0
SAVO	0,10%	23	20
	1,00%	14	12
	5,00%	0	0

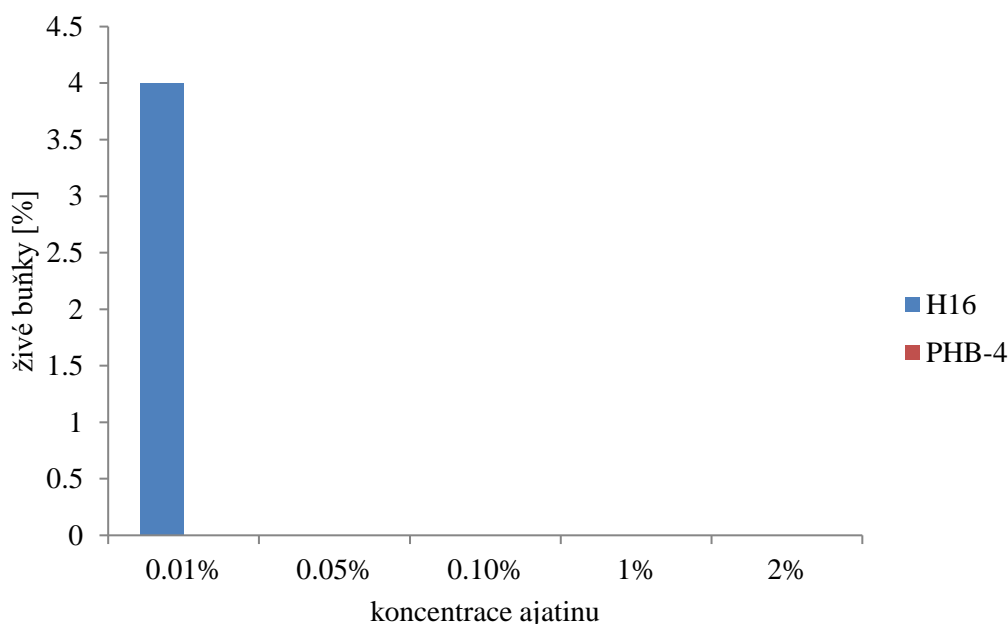
V tabulce 3 jsou uvedeny průměrné hodnoty ze tří vzorků připravených stejným způsobem. Z Tabulky 3 je patrné, že čím je vyšší koncentrace dezinfekčního prostředku, tím větší je úmrtnost bakterií. Podle tohoto experimentu je ajatin nejúčinnějším desinfekčním prostředkem, jelikož i při tak nízkých koncentracích, jako je 0,05%, byly usmrceny veškeré bakterie. Při procentuálním porovnání počtu živých buněk bakterie *C. Necator* H16 a *C. Necator* PHB⁻⁴ je zřejmé, že bakterie *C. Necator* PHB⁻⁴ je méně odolná než bakterie *C. Necator* H16, což může být způsobeno intenzitou tvorby polyhydroxyalkanoátů, které mohou hrát roli v ochraně buňky proti nepříznivým podmínkám.



Graf 1: Procentuální vyjádření počtu živých buněk po použití ethanolu o různých koncentracích



Graf 2: Procentuální vyjádření počtu živých buněk po použití Sava o různých koncentracích



Graf 3: Procentuální vyjádření počtu živých buněk po použití ajatinu o různých koncentracích

Graf 1 názorně ukazuje, že při použití ethanolu o koncentraci 10% není zdaleka tak účinné, jako když použijeme etanol 50% nebo 70%. Ajatin bychom mohli považovat za téměř bezkonkurenční dezinfekční prostředek, jelikož působí skoro ve všech případech stoprocentně baktericidně. I malé procento, jako je například 0,05 % ajatinu dokáže usmrtit bakterie daného kmene. Z grafu 3 je také patrný pokles živých buněk se zvyšující se koncentrací sava. Metabolizace PHA může být příčinou zvýšené odolnosti bakterie *C. necator* H16, která využívá získanou energii k pokrytí energetických nákladů způsobených vystavením buňky dezinfekčním prostředkům. Pro stanovení minimální baktericidní koncentrace musí být ve vzorku usmrceno 99,9 % bakterií, tohoto jevu bylo dosaženo u 50% ethanolu, 0,05% ajatinu a 5% sava.

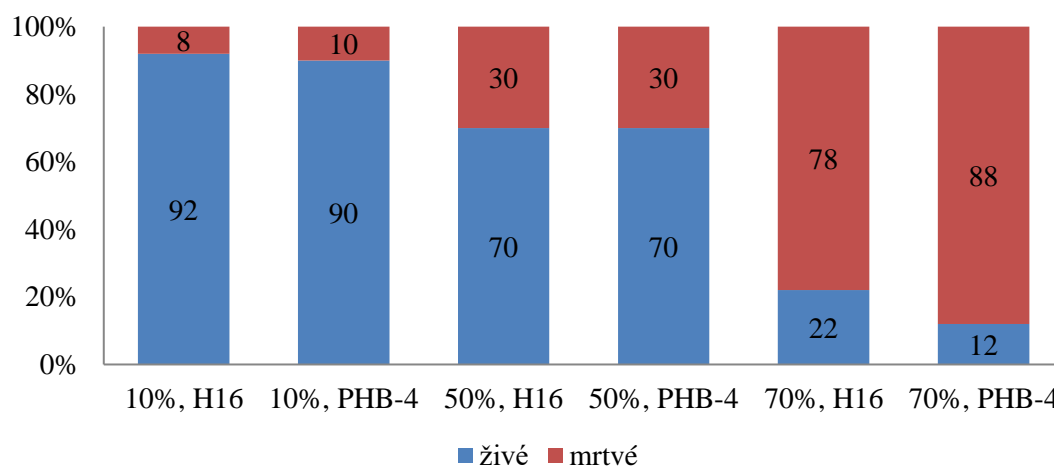
4.1.2 Stanovení viability průtokovým cytometrem

Průtoková cytometrie byla v rámci této bakalářské práce využita ke stanovení počtu živých a usmrcených buněk *C. necator* vystavených účinku desinfekčních prostředků. Pro zabarvení mrtvých buněk bylo použito barvivo Propidium jodid a další analýza probíhala podle kapitoly 3.4.2.

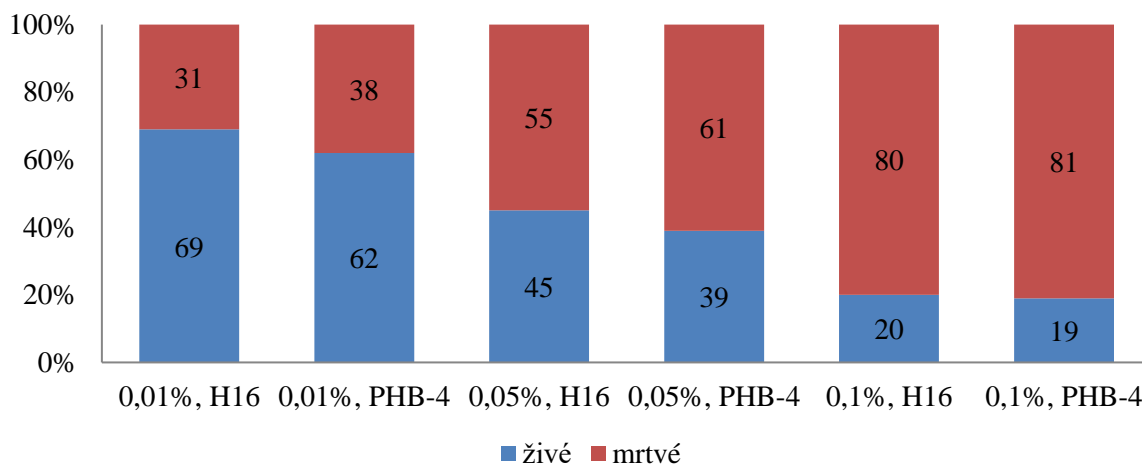
Tabulka 4: výsledky z průtokového cytometru

látka	koncentrace	% živých, H16	% živých, PHB ⁻⁴
KONTROLA	x	100	100
ETHANOL	10%	92	90
	50%	70	70
	70%	22	12
AJATIN	0,01%	69	62
	0,05%	45	39
	0,10%	20	19
	1,00%	17	14
	2,00%	8	7
SAVO	0,10%	92	91
	1,00%	92	90
	5,00%	14	5

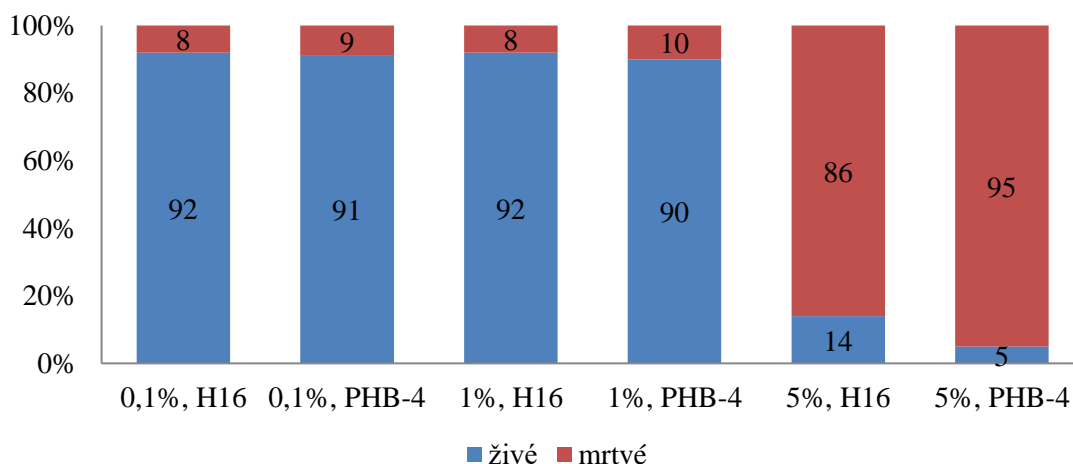
Tabulka 4 ukazuje procentuální porovnání živých buněk ve vzorku oproti čisté buněčné suspenzi při analýze pomocí průtokového cytometru, ten nám potvrdil správnost výsledků z předešlého experimentu. Stejně tak jako u plotnové metody, i tady nám s rostoucí koncentrací látky klesá počet živých bakterií. Ethanol, ajatin a savo se tedy jeví jako bakteriocidní látky. Nejvyšší účinnost byla prokázána u 2% ajatinu, kde počet živých bakterií nepřesáhl 10 % počtu živých bakterií čisté suspenze. Naopak nejméně účinným dezinfekčním prostředkem je savo, jelikož při použití 0,1% a 1% sava přežilo více jak 90% všech bakterií.



Graf 4: Poměr živých a mrtvých buněk při použití různých koncentrací ethanolu (výsledky z cytometru)



Graf 5: Poměr živých a mrtvých buněk při použití různých koncentrací ajatinu (výsledky z cytometru)



Graf 6: Poměr živých a mrtvých buněk při použití různých koncentrací sava (výsledky z cytometru)

Při porovnání grafů z plotnové metody a grafů z průtokového cytometru je patrné, že analýza pomocí průtokového cytometru se mírně liší, což může být způsobeno tím, že se bakterie začaly rozkládat nebo shlukovat a výsledky z cytometru tedy nejsou úplně přesné. Je zapotřebí brát v potaz, že plotnová metoda a průtoková cytometrie se zaměřují na jiný druh měření. U kultivační techniky jsou zřejmé buňky, které jsou schopny dělení, naproti tomu průtoková cytometrie poskytuje informace o buňkách, které nemají poškozenou membránu, jeví se jako živé, ale nejsou schopny dělení. Z grafu 4 je patrné, že nejúčinnější je 70% etanol, kde bylo zhruba 80 – 90 % buněk usmrceno. Naopak okolo 90 % bakterií přežilo při použití 10% ethanolu. Graf 5 znázorňuje rostoucí počet živých bakterií s klesající koncentrací ajatinu. Účinnost sava je znázorněna v grafu 6, kde nejméně živých bakterií je při použití 5% sava. 1% a 0,1% sava má téměř stejný antimikrobiální účinek.

Větší intenzitu fluorescence udávají mrtvé buňky, naopak živé buňky vykazují menší intenzitu fluorescence. Výsledky z cytometru mohou být do jisté míry zkreslené a to díky dormantním buňkám („spícím buňkám“), které jsou živé, ale jejich chování připomíná spíše mrtvé buňky. V některých případech může být buněčná stěna mrtvých buněk kompaktní, a tudíž se propium jodid nedostane přes stěnu a buňka se jeví jako živá. A v neposlední řadě dochází také k rozkladu buněk, jak již bylo zmíněno výše. Všechny tyto aspekty mohou ovlivňovat konečný výsledek analýzy pomocí průtokového cytometru, a proto lze obecně říci, že výsledky z průtokového cytometru jsou spíše orientační.

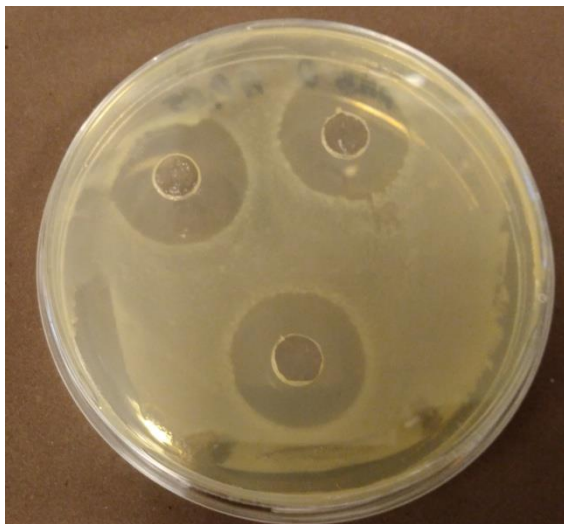
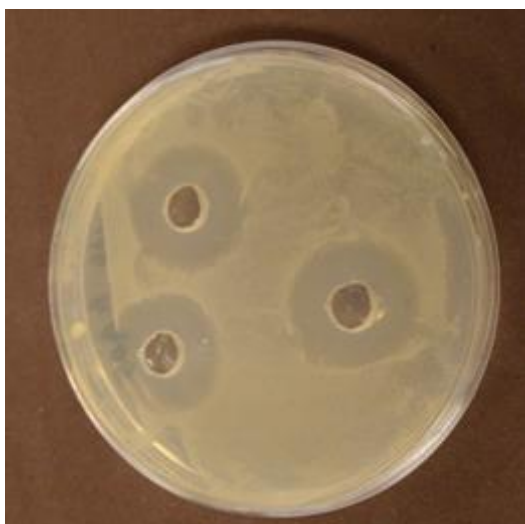
4.2 Agarová difúzní metoda

K testování antimikrobiálního účinku dezinfekčních látek byla použita difúzní metoda, která spočívala ve změření velikosti vytvořených inhibičních zón, a následně byly údaje zpracovány do tabulky 5. Obrázky 12 a 13 ukazují příklady vytvořených inhibičních zón.

Tabulka 5: Velikost inhibičních zón

látka	koncentrace [%]	velikost zóny [cm]	
		H16	PHB ⁻⁴
Ethanol	70	-	0,10
	50	-	-
	10	-	-
Savo	5	0,17	0,18
	1	-	-
	0,1	-	-
Ajatin	2	1,2	1,35
	1	1,18	1,25
	0,1	0,85	0,90
	0,05	0,77	0,80
	0,01	0,32	0,42

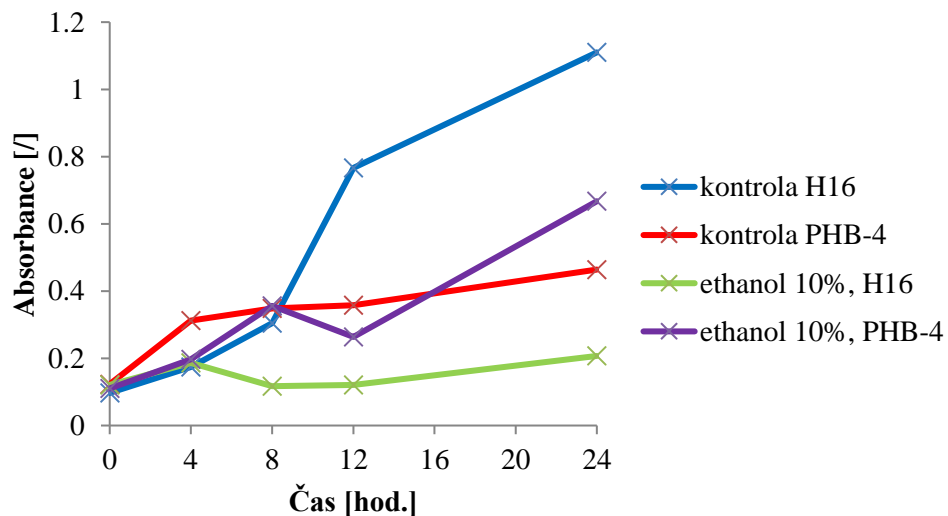
Ze získaných výsledků (tabulka 5) je zřejmé, že největší inhibiční zóna se vytvořila kolem 2% ajatinu., což koreluje s výsledky stanovení viability, kde byla stanovena účinnost ajatinu také jako největší. Naopak nedošlo k vytvoření zóny u 50% a 10% ethanolu a také u 1% a 0,1% sava, což může být způsobeno nedostatečnou koncentrací dezinfekční látky pro usmrcení bakterií. Tyto koncentrace tedy nemůžeme považovat za MBC. Obecně tedy lze říci, že čím je větší velikost zóny, tím je vyšší antimikrobiální účinek dané látky.



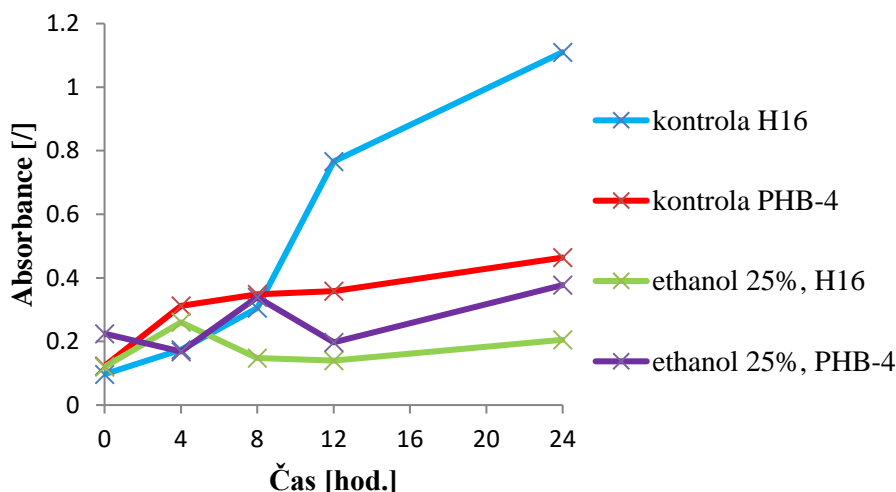
Obrázek 12: Ajatin 0,05%, H16 Obrázek 13: Ajatin 0,05%, PHB-4

4.3 Bujónová diluční metoda

Pro každou látku a každé ředění bylo analyzováno celkem 6 vzorků, ze kterých byly následně vypočteny průměrné hodnoty. Výsledné absorbance, naměřené při analýze pomocí bujónové metody, byly dány do závislosti na čase. Společně byly porovnány absorbance čistých buněčných suspenzí a dané látky o určité koncentraci.

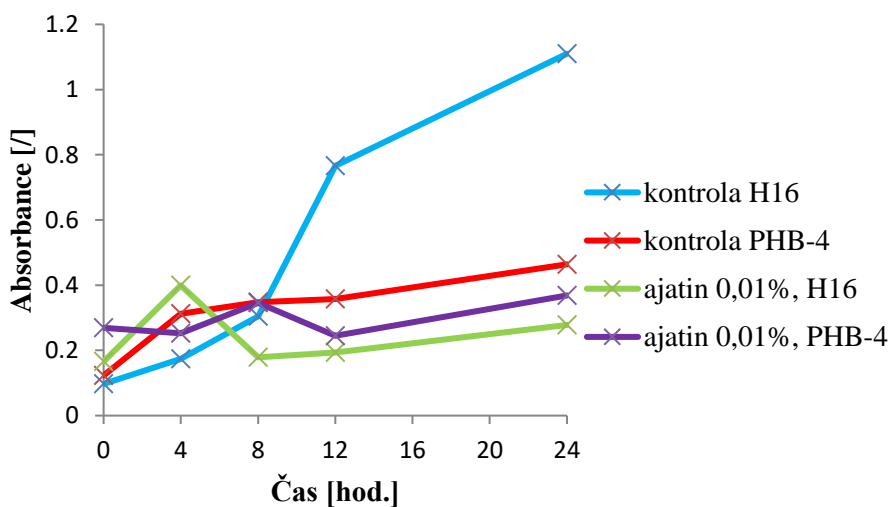


Graf 7: Závislost absorbance na čase pro 10% ethanol

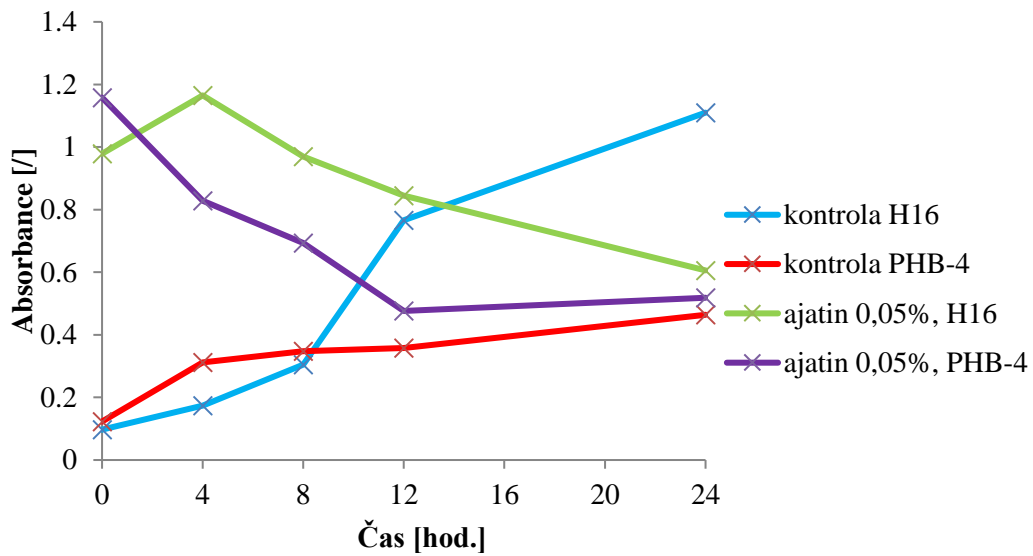


Graf 8: Závislost absorbance na čase pro 25% ethanol

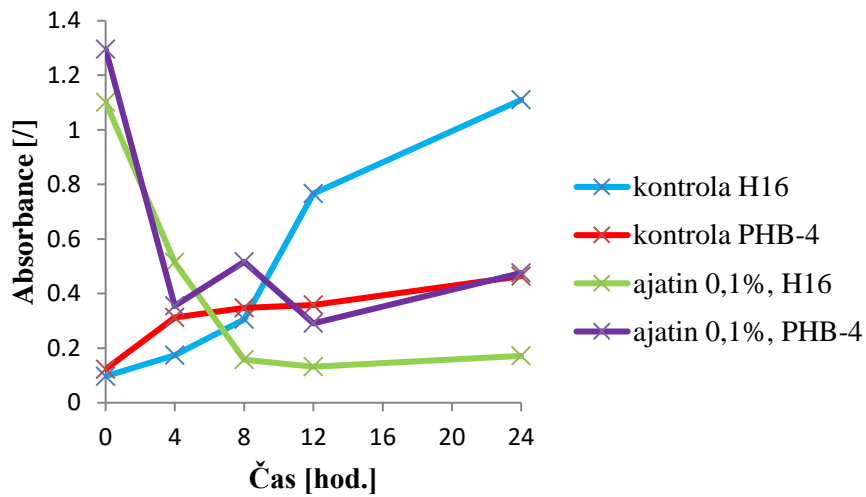
Z grafu 7 a 8 je patrné, že všechny absorbance s časem rostou, což je způsobeno růstem bakterií a tvorbou PHA na ochranu před negativními vlivy dezinfekčních prostředků. Také je zřejmé, že bakterie *Cupriavidus Necator* H16 tvoří více polyhydroxyalkanoátů, oproti *Cupriavidus Necator* PHB⁻⁴, jelikož absorbance těch vzorků rapidně stoupá. Graf 7 ukazuje analýzu buněčné suspenze s přídavkem 10% ethanolu ve srovnání s čistými buněčnými suspenzemi. Absorbance vzorku ethanolu s PHB⁻⁴ dokonce v čase 12 hodin začala růst oproti čisté buněčné suspenzi. Tato vzrůstající tendence mohla být způsobena rozkládáním již odumřelých bakterií. Vyhodnocení vzorků s přídavkem 25% ethanolu je zobrazeno v grafu 8, kde si můžeme všimnout především toho, že po přidání dezinfekčního prostředků k dané kultuře se změnil její chování a tvorba PHA. Křivka zastupující čistý kmen *C. Necator* H16 dosahuje obecně největších absorbancí, proto bychom předpokládali, že i po přidání dezinfekčního prostředku bude absorbance vzorku ethanolu s přídavkem H16 větší jak absorbance vzorku s přídavkem PHB⁻⁴. V přítomnosti ethanolu nedošlo k rapidnímu nárůstu kultury, jelikož má alkohol v tak vysokých koncentracích výrazný inhibiční účinek.



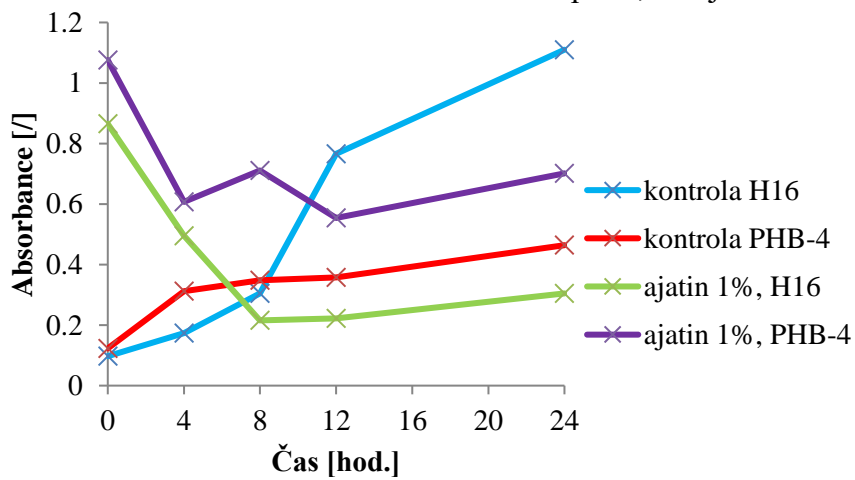
Graf 9: Závislost absorbance na čase pro 0,01% ajatin



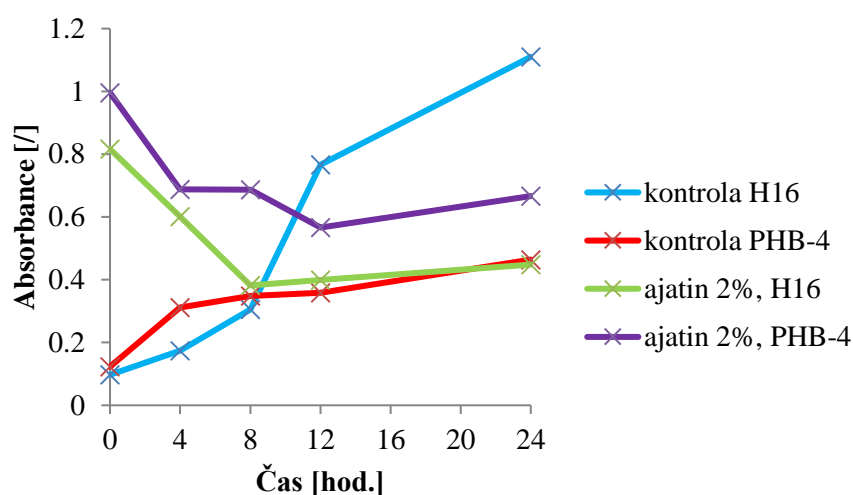
Graf 10: Zavislost absorbance na čase pro 0,05% ajatin



Graf 11: Zavislost absorbance na čase pro 0,1% ajatin

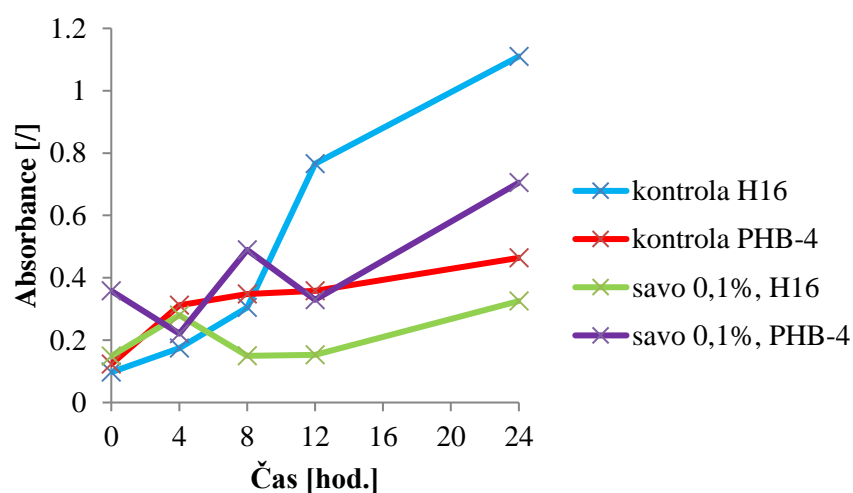


Graf 12: Zavislost absorbance na čase pro 1% ajatin

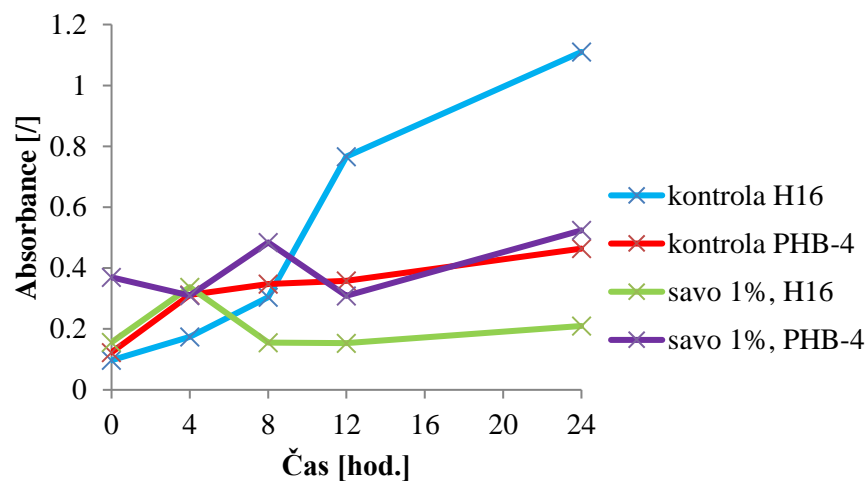


Graf 13: Závislost absorbance na čase pro 2% ajatin

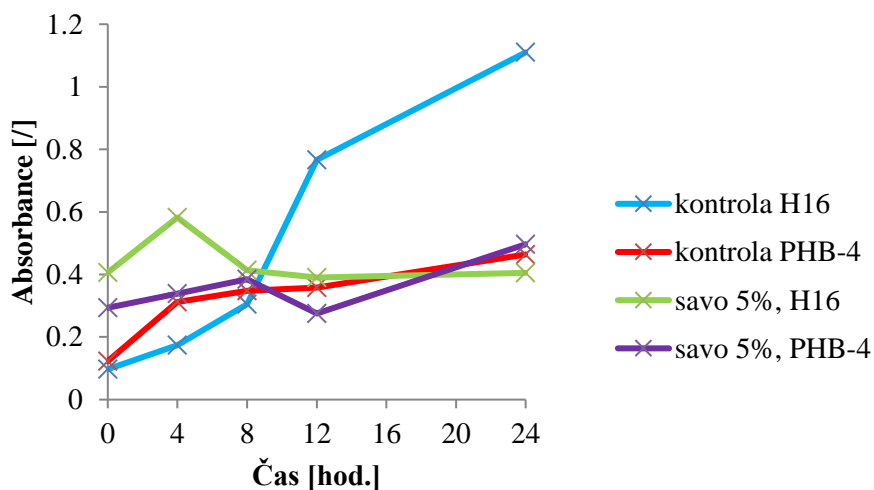
Grafy 9, 10, 11, 12 a 13 zobrazují závislosti absorbance na čase při analýze vzorků s ajatinem. Pouze pro 0,01% ajatin jsou hodnoty absorbance mírně stoupající, ostatní vykazují spíše klesající tendenci. Klesající absorbance označuje velkou úmrtnost bakterií, která je doprovázena postupnou lyzí bakteriálních buněk - což platí pro koncentrace ajatinu 0,05%, 0,1%, 1% a 2%. Naopak 0,01% ajatin vykazuje menší antimikrobiální účinky, což dokazuje graf 9. Vyšší absorbance na počátku může být způsobena vznikem buněčných kluster v důsledku působení ajatinu. Klustry se během experimentu rozpadají a bakterie nerostu.



Graf 14: Závislost absorbance na čase pro 0,1% savo



Graf 15: Závislost absorbance na čase pro 1% sava



Graf 16: Závislost absorbance na čase pro 5% sava

Grafy 14, 15 a 16 ukazují závislost absorbance na čase při analýze vzorků s použitím sava. Při použití 0,1% savaje závislost absorbance na čase téměř srovnatelná se závislostí při použití 10% ethanolu. Obě tyto koncentrace látek ve srovnání s ajatinem nevykazovaly tak vysokou tendenci lyzovat buňky.

Tabulka 6: Srovnání absorbance vůči čisté buněčné suspenzi (kontrola – 100%) pro H16

Dezinfekční prostředek	H16				
	0 h.	4 h.	8 h.	12 h.	24 h.
10% etanol	20↑	0	60↓	80↓	80↓
25% ethanol	20↑	40↑	40↓	80↓	80↓
0,01 % ajatin	60↑	120↑	40↓	80↓	80↓
0,05% ajatin	900↑	560↑	220↑	0	40↓
0,1% ajatin	1020↑	200↑	40↓	80↓	80↓
1% ajatin	800↑	180↑	20↓	80↓	80↓
2% ajatin	740↑	240↑	20↑	40↓	60↓
0,1% savo	60↑	60↑	60↓	80↓	80↓
1% savo	60↑	100↑	60↓	80↓	80↓
5% savo	320↑	240↑	40↑	60↓	60↓

Tabulka 7: srovnání absorbance vůči čisté buněčné suspenzi (kontrola - 100%) pro PHB⁻⁴

Dezinfekční prostředek	PHB ⁻⁴				
	0 h.	4 h.	8 h.	12 h.	24 h.
10% etanol	20↓	40↓	0	20↓	40↑
25% ethanol	60↑	80↓	0	60↓	20↓
0,01 % ajatin	120↑	20↓	0	40↓	20↓
0,05% ajatin	840↑	160↑	100↑	40↑	20↑
0,1% ajatin	960↑	20↑	40↑	20↓	0
1% ajatin	780↑	100↑	100↑	40↑	60↑
2% ajatin	700↑	120↑	100↑	40↑	40↑
0,1% savo	180↑	20↓	40↑	0	60↑
1% savo	200↑	0	40↑	20↓	20↑
5% savo	140↑	0	20↑	20↓	0

Legenda:

- Číslo vyjadřuje procento růstu / poklesu absorbance oproti kontrole (čistá buněčná suspenze)
- 0 značí stejnou absorbance vzorku jako je absorbance kontroly
- ↑ značí růst absorbance
- ↓ značí pokles absorbance

Obecně nejvyšší rozdíl v absorbanci oproti kontrole nastal u ajatinu v čase 0 hodin, kdy byla absorbance vzorku téměř tisíckrát větší než absorbance čisté buněčné suspenze. Vysoká absorbance mohla být způsobena tím, že ajatin jako kation aktivní látka vedla ke vzniku buněčných shluků. Bakterie v čisté buněčné suspenzi začaly produkovat PHA, a tudíž jejich

absorbance rostla. Procentuální srovnání s čistou buněčnou suspenzí tedy klesalo, jelikož bakterie již byly rozloženy. Ve vzorcích, ve kterých nedošlo k tak masivnímu rozložení bakterií, docházelo také k tvorbě PHA u živých bakterií. Obecně lze tedy konstatovat, že všechny testované látky vykazovaly intenzivní inhibiční aktivitu vůči testovaným mikrobiálním kmenům.

5 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byly testovány vybrané dezinfekční prostředky a vliv akumulace PHA na stresovou odolnost bakterií vůči daným dezinfekčním látkám. Pro experimentální část byly zvoleny bakterie kmene *Cupriavidus Necator* H16 a *Cupriavidus Necator* PHB⁻⁴, které mají odlišnou schopnost akumulace PHA.

Jedním z dílčích cílů této bakalářské práce bylo stanovení viability bakterií při použití ethanolu, sava a ajatinu při různých koncentracích. Nejprve byla stanovována viabilita plotnovou metodou, kdy ajatin vykazoval největší antimikrobiální účinek u obou kmenů. Počet živých kolonií se pohyboval okolo nuly. Ethanol dosahoval při plotnové metodě nejvyšších účinků při 50 % a 70%, kdy tak jako u ajatinu, i zde byl počet mrtvých buněk téměř stoprocentní. Při použití 10% etanolu přežila více jak polovina bakterií. Dalším zkoumaným dezinfekčním prostředkem bylo savo, které dosáhlo 100% účinnosti při ředění na 5% roztok. Při porovnání počtu živých buněk obou bakteriálních kmenů vykazoval kmen H16 vždy vyšší procento přežitých buněk, což mohlo být způsobeno schopností akumulace PHA. Byla zde stanovena také minimální baktericidní koncentrace pro všechny 3 látky (50% etanol, 0,05% ajatin a 5% savo).

Dalším parciálním úkolem bylo studium viability pomocí průtokového cytometru. Při této analýze byl ověřen fakt, že se vzrůstající koncentrací látky roste počet usmrcených buněk. Oproti výsledkům z předešlé analýzy byl počet živých buněk mnohem větší, což mohlo být způsobeno započatým rozkladem buněk, nebo kompaktní buněčnou stěnou mrtvých buněk a tudíž se propidium jodid nedostal do buňky a ta se posléze jevila jako živá, proto je zapotřebí brát tuto analýzu spíše orientačně. Přes všechny tyto jevy ovlivňující výsledek lze obecně říci, že výsledky z průtokového cytometru potvrdily výsledky ze stanovení viability pomocí plotnové metody. Největší antimikrobiální účinek tedy opět vykazoval 70% ethanol, 0,1% ajatin a 5% savo a vyšší procento živých buněk opět vykazuje kmen H16.

Další metodou využitou v experimentální části byla agarová difúzní metoda, při které byla měřena velikost inhibičních zón. Největší inhibiční zóna se vytvořila kolem vzorku s 2% ajatinem a ze vzorků se savem byla největší inhibiční zóna v okolí vzorku s 5% savem. Čím větší byla inhibiční zóna okolo jamek, tím více působí dezinfekční látka na bakterie. Při porovnání nejmenší koncentrace ajatinu a největší koncentrace sava byla inhibiční zóna větší u nejnižší koncentrace ajatinu. Tudíž je zřejmé, že ajatin i při velmi nízkých koncentracích je velice účinným dezinfekčním prostředkem. Již po této třetí analýze můžeme tedy s jistotou konstatovat, že ajatin je ze tří vybraných dezinfekčních látek tím nejúčinnějším. Bakteriální kmen H16 byl opět více chráněn před nežádoucími vlivy detergentů, jelikož velikost inhibičních zón byla nižší.

Také v rámci experimentů založených na bujónové diluční metodě byla prokázána vysoká inhibiční účinnost všech testovaných dezinfekčních prostředků v rámci testovaných rozmezí koncentrací a to vůči oběma bakteriálním kmenům. Zajímavý byl účinek ajatinu, který hned po aplikaci k bakteriální kultuře vedl k vysokému nárůstu absorbance. Je pravděpodobné, že ajatin jako kationt aktivní látky vedl ke vzniku buněčných agregátů případně k precipitaci extracelulárních proteinů nebo také proteinů lyzovaných buněk, což rapidně zvýšilo turbiditu vzorku.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

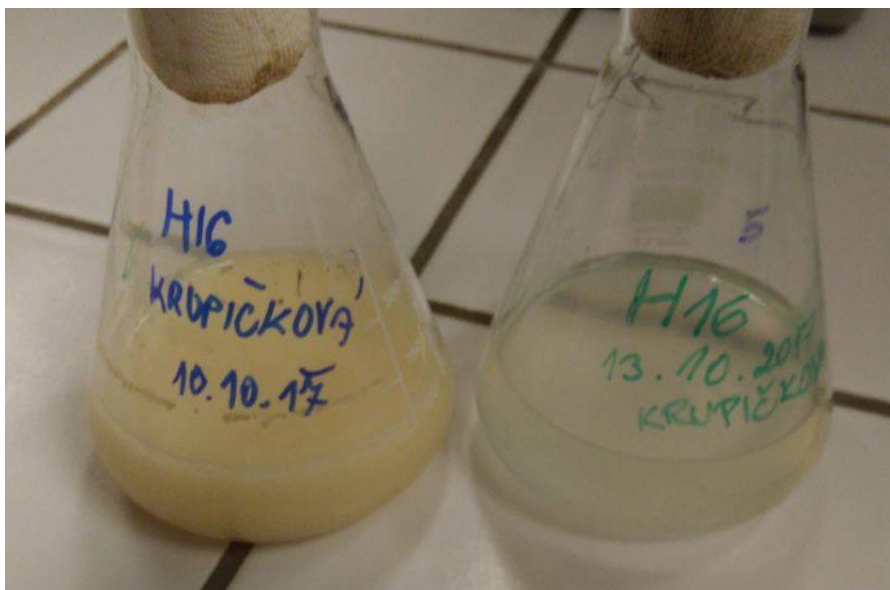
- [1] *Nový přehled biologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2003, xxii, 797 s. ISBN 80-718-3268-5
- [2] MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. *Medical Microbiology, Fifth edition. s.1: Elsevier, 2005*.
- [3] Stavba bakteriální buňky. In: *ELUC* [online]. Olomouc: ESF, 2005 [cit. 2018-02-17]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/21>
- [4] BENEŠOVÁ, M. *Odmaturuj! z biologie. 2., přepracované*. Brno: Didaktis, 2013. ISBN 978-80-7358-231-9.
- [5] KUBIŠTA, V. *Obecná biologie: Úvodní učební text biologie pro 1. ročník gymnázií*. Praha: Fortuna, 1992. ISBN 80-85298-92-9.
- [6] HORÁČEK, J. *Základy lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-246-0006-4.
- [7] ALBERTS, B. *Essential cell biology*. Fourth edition. New York, NY: Garland Science, 2013. ISBN 9780815344551.
- [8] VILLARREAL, M. Ribosome mRNA. Hamburg, Germany: Alemania, 2011, 6.11.2011 [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ribosome_mRNA_translation_es.svg#/media/File:Ribosome_mRNA_translation_cs.svg
- [9] ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 0-8153-3218-1.
- [10] BEDNÁŘ, M., [ET AL.]. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 8023802976
- [11] Antibiotika ovlivňující syntézu buněčné stěny. In: *Mikrobiologie.XF.CZ* [online]. [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.xf.cz/files/atb-bunecna-stena.doc.html>
- [12] TODAR, K. Overview Of Bacteriology. *Textbook of Bacteriology* [online]. University of Wisconsin: Madison Department of Bacteriology, 2008 [cit. 2018-02-19]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/bacteriology.html>
- [13] KOPECKÁ, J.; ROTKOVÁ A. Průběh sporulace. In: *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií* [online]. Ústav experimentální biologie, oddělení mikrobiologie – Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity: Masarykova univerzita, 2017 [cit. 2018-02-19]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/bakterialni_endospory.html
- [14] APARNA, MS.; YADAV S.. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis*. 2008, **12**(6), 526-530.

- [15] MONROE, D. *Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms* [online]. In: .2007 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Biofilm#/media/File:Biofilm.jpg>
- [16] VOTAVA, M., BROUKAL Z.; VANĚK J. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře*. Brno: Neptun, c2007. ISBN 978-80-86850-03-0.
- [17] HUGO, W. B., S. P. DENYER, Norman A. HODGES a S. P. GORMAN. *Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology*. 7th ed. Malden, Mass.: Blackwell Science, 2004. ISBN 0-632-06467-6.
- [18] MURRAY, P. R. a Ellen Jo. BARON. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington, D.C.: ASM Press, c2003. ISBN 1555812554.
- [19] BOOTHROYD, P.; Nam X.. PHAM. *Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi*. Singapore: Institute of Southeast Asian Studies, 2000.
- [20] CUMMINGS, B. Mechanism of antimicrobial action. In: *SlidePlayer* [online]. [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <http://slideplayer.com/slide/7063387/>
- [21] MELICHERČÍKOVÁ, V. Ochranná dezinfekce. Praha: Sdružení DDD a Společenstvo drobného podnikání, 2003. ISBN 80-02-01559-2.
- [22] BENCKO, V. *Hygienu: učební texty k seminářům a praktickým cvičením*. 2. přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-551-5.
- [23] MELICHERČÍKOVÁ, V. *Sterilizace a dezinfekce ve zdravotnictví*. Praha: Grada, 1998. ISBN isbn80-7169-442-8.
- [24] SOUKUPOVÁ, V. *Aktivní látky používané k dezinfekci* [online]. In: . [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/2751749/>
- [25] TUČEK, M.; SLÁMOVÁ A. *Hygienu a epidemiologie pro bakaláře* [online]. s. 185-187 [cit. 2017-11-14]. ISBN 978-80-246-2136-2.
- [26] ZHI-BIN, L., H. JIN-TIAN, L. TUN, Z. XU, a kol. Treatment of Folliculitis on the Expanded Postauricular Skin Flap by Topical Iodine Tincture. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*. 2015, 3(8): 486. ISSN
- [27] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie*. Brno: Neptun, 2010a. ISBN 978-80-86850-04-7
- [28] ROTH, C. *Glutaraldehyde 50 %* [online]. In: . [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: https://www.carlroth.com/en/en/Life-Science/Histology-Microscopy/Fixing-Agents/Glutaraldehyde-for-Electron-Microscopy/Glutaraldehyde-50-%25/p/000000010000188c00020023_en
- [29] BENZALKONIUM CHLORIDE. In: *MP* [online]. [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://www.mpbio.com/product.php?pid=02190158&country=56>
- [30] Rozdělení chemických dezinfekčních přípravků. *Agropress.cz* [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <http://www.agropress.cz/rozdeleni-chemickych-dezinfekcnich-pripravku/>

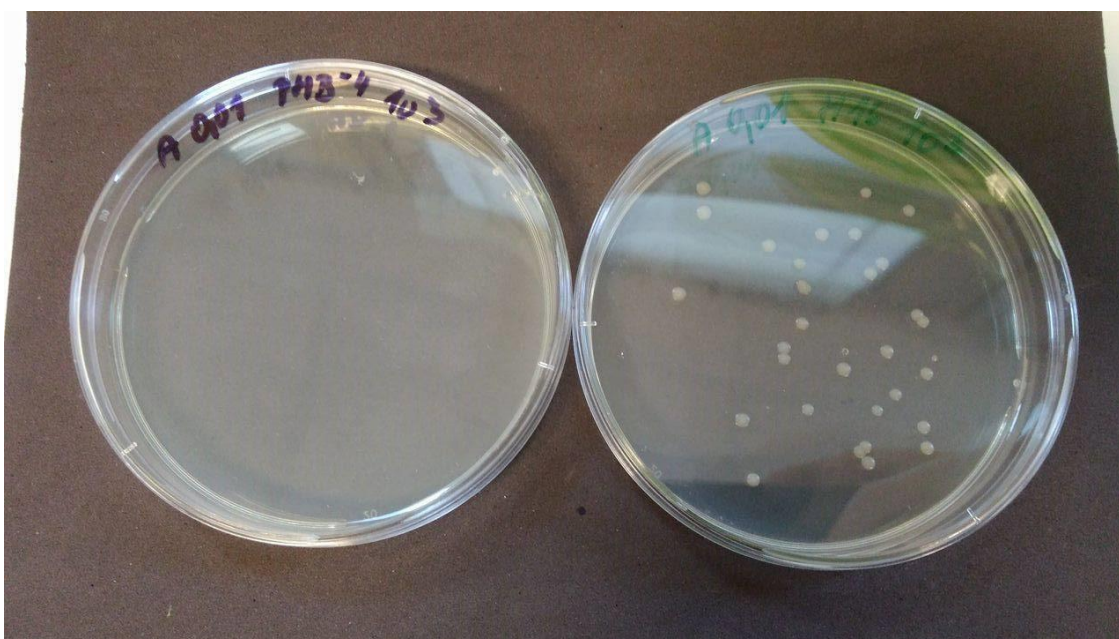
- [31] WESZKIEWICZ, [ET AL.] The influence of alcohol on the oral cavity, salivary glands and saliva. *Pol Merkur Lekarski*. 2011, **30**(175), 69-74. ISSN 1426-9686.
- [32] ZEHNDER M. [ET AL.] Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* [online]. 2002, **94**(6), 756-762 [cit. 2017-12-23]. DOI: 10.1067/moe.2002.128961. ISSN 10792104. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079210402003499>
- [33] Ajatin PLUS roztok 10% 1000ml: Profarma. *Giga lékárna* [online]. Hodonín: F-DENTAL Hodonín s.r.o. - divize farmacie, 2010 [cit. 2017-12-23]. Dostupné z: <https://www.gigalekarna.cz/produkt/ajatin-plus-10pct-roztok-1000ml/>
- [34] CRAMM, R. Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2008, 16.1-2: 38-52.
- [35] Wróbel M., [ET AL.] Polyhydroxybutyrate synthesis in transgenic flax. *Journal of Biotechnology*. 2004, **107**, 41–54.
- [36] POHLMANN, A., [ET AL.]. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature biotechnology*, 2006, 24.10: 1257-1262.
- [37] STEINBÜCHEL, A.; [ET AL.]. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*. 1995, roč. 128, č. 3, s. 219-228. ISSN 03781097. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x.
- [38] KADOURI, D.; [ET AL.] Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2008, 31(2), 55-67 [cit. 2017-12-18]. DOI: 10.1080/10408410590899228. ISSN 1040-841x. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410590899228>
- [39] PHILIP S., [ET AL.] Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2007, **82**(3), 233-247 [cit. 2017-12-18]. DOI: 10.1002/jctb.1667. ISSN 02682575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>
- [40] Polyhydroxyalkanoáty – „plasty“ vyráběné bakteriemi. *Chempoint* [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/obruca-1>
- [41] Wu H-A., Sheu D-S. and Lee C-Y. Rapid differentiation between short-chain length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *Journal of Microbiological Methods*. 2003, **53**, 131–135.
- [42] Zinn, M., B. Witholt & T. Egli. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, **53**(1), 5–21. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00218-6.

- [43] FLICKINGER, M. C.; Drew, Stephen W, *Encyclopedia of Bioúrocess Technology-Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, č.1-5. John Wiley and Sons, 1999. 2024-2133 s. ISBN 1-59124-457-9
- [44] CALDERWOOD, S. K. *Cell stress proteins* [online]. New York: Springer, 2009, xv, 476 p. [cit. 2017-05-01]. ISBN 03-873-9717-5.
- [45] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 361 s. ISBN 80-856-0571-6.
- [46] STORZ, G.; [ET AL.] *Bacterial stress responses*. 2nd ed. Washington,DC: ASM Press, c2011, xv, 506 p. ISBN 15-558-1621-5.
- [47] RAHMAN, Misha. SEROTEC. *Introduction to Flow Cytometry*. Kidlington, 2005.
Dostupné z: <http://static.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>

7 PŘÍLOHY



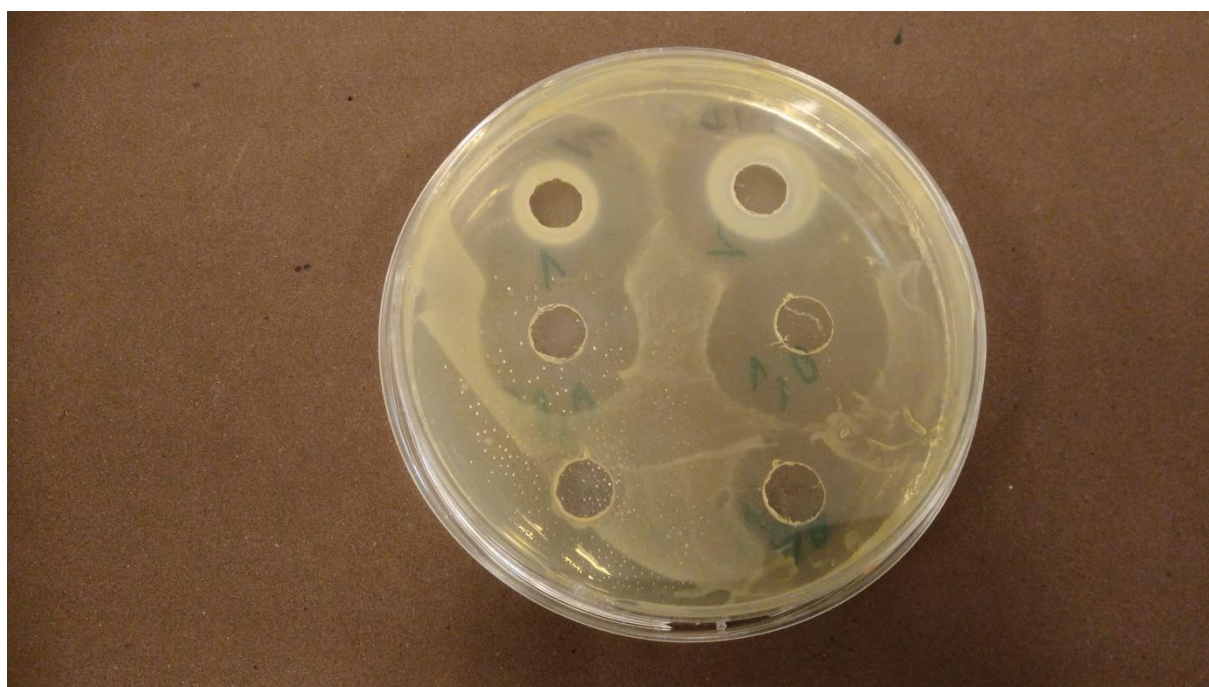
Příloha 1: Porovnání připraveného produkčního média před (vpravo) a po (vlevo) kultivaci



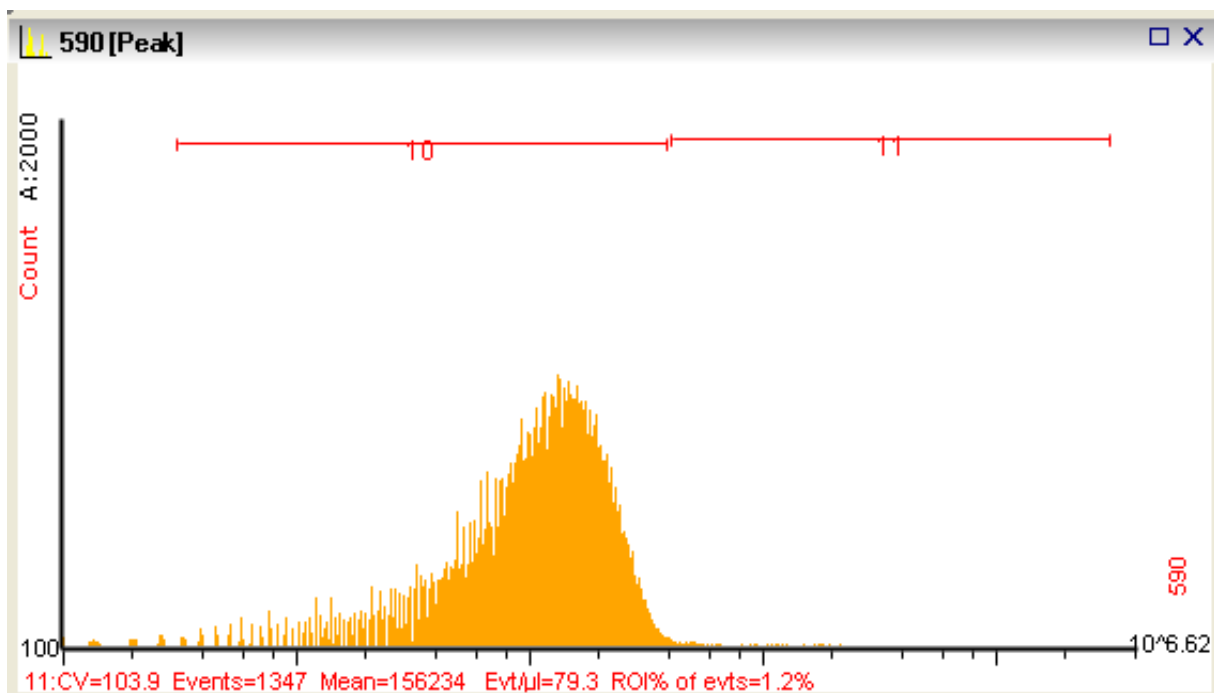
Příloha 2: Porovnání počtu živých kolonií bakterie *C. necator* H16 (vpravo) a bakterie *C. necator* PHB⁻⁴ (vlevo) při použití ajatinu o koncentraci 0,01%



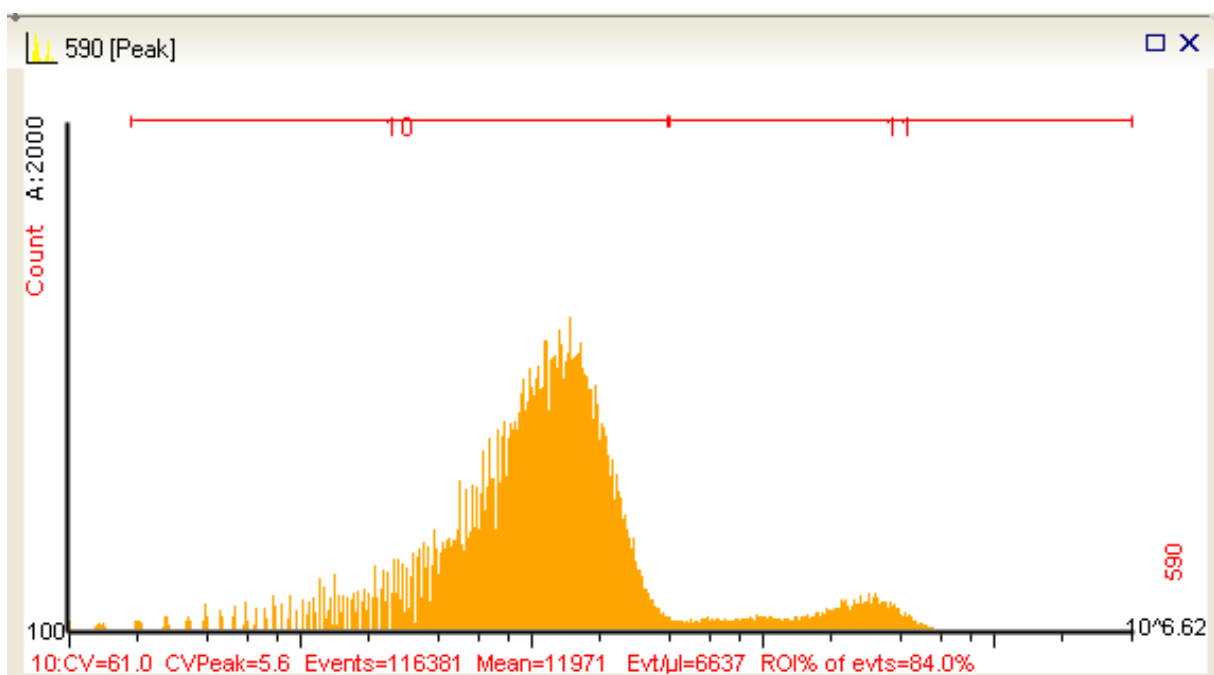
Příloha 3: Porovnání produkčního média bakterie *Cupriavidus Necator* H16 (vlevo) a bakterie *Cupriavidus Necator* PHB⁻⁴ (vpravo)



Příloha 4: Stanovení inhibiční zóny pro ajatin o koncentracích 2 % (vpravo, nahoře) 1 % (vlevo, ahoře), 0,1 % (vpravo, uprostřed), 0,05 % (vlevo, uprostřed), 0,01 % (vpravo, dole) a blank (vlevo, dole)



Příloha 5: Histogram z průtokového cytometru pro kontrolu (čistá buněčná suspenze H16)



Příloha 6: Histogram z průtokového cytometru pro 0,1% ajatin (H16)