



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Antimikrobiální aktivita mědi

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Eliška Pochylá
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Lucie Janovská, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eliška Pochylá
Název práce	Antimikrobiální aktivita mědi
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Lucie Janovská, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Klíčová slova	Měď, nanočástice, antimikrobiální aktivita, antibiofilmová aktivita
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Abstrakt

Bakalářská práce zkoumá antimikrobiální aktivitu nanočástic mědi (100 nm), nanočástic oxidu měďnatého (15 – 50 nm), síranu měďnatého a resveratrolu. Antimikrobiální aktivita byla testována mikrodiluční metodou k 5 referenčním bakteriálním kmenům (*Enterococcus faecalis* (CCM 4224), *Escherichia coli* (CCM 3954), *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955), *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) a *Staphylococcus epidermidis* (CCM 7221)). Také byla testována antibiofilmová aktivita pomocí modifikované Christensenovy metody. Cílem práce bylo zkoumání vlivu nanočástic mědi na působení vybraných antibiotik. Nejúčinnější bylo ovlivnění bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, na kterou bylo spojení mědi s antibiotiky nejúčinnější ve všech testovaných koncentracích. Závěrem bylo provedeno měření bakteriální růstové křivky u bakterií se synergickým účinkem mědi s antibiotiky.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Eliška Pochylá
Title of thesis	Antimicrobial effect of copper
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Lucie Janovská, Ph.D.
The year of presentation	2020
Keywords	Copper, nanoparticles, antimicrobial activity, antibiofilm activity
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Abstract

The bachelor thesis is focused on antimicrobial activity of copper nanoparticles (100 nm), nanoparticles of copper oxide (15 – 50 nm), copper sulfate and resveratrol. The antimicrobial activity was tested by the microdilution method on 5 reference bacterial strains (*Enterococcus faecalis* (CCM 4224), *Escherichia coli* (CCM 3954), *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955), *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) a *Staphylococcus epidermidis* (CCM 7221)). The antibiofilm activity was proved by modifying Christensen's method. The main aim of this work was to investigate the influence of copper nanoparticles on the action of chosen antibiotics. The most effective influence was on the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* in all tested concentrations. In the end measurements were taken of bacterial growth curve of bacteria, which shows a synergistic effect of copper nanoparticles with antibiotics.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Lucii Janovské, Ph.D. za věnovaný čas, cenné rady a především za trpělivost při vypracování mé bakalářské práce.

Obsah

Seznam použitých zkratek	8
1 Úvod.....	9
2 Cíle práce	10
3 Teoretická část.....	11
3.1 Antimikrobiální aktivita látek	11
3.2 Resistance k antibiotikům	12
3.2.1 Mechanismy rezistence	12
3.3 Biofilm	13
3.4 Antimikrobiální aktivita mědi.....	15
3.4.1 Mechanismus toxicity	15
3.5 Nanomateriály.....	17
3.5.1 Mechanismus účinku nanočástic	18
3.6 Nanočástice mědi.....	19
4 Materiál a metody	21
4.1 Materiál.....	21
4.1.1 Laboratorní vybavení a software	21
4.1.2 Použité chemikálie	22
4.1.3 Použitá antibiotika	22
4.1.4 Kultivační půdy.....	23
4.1.5 Bakteriální kmeny	23
4.2 Metody	23
4.2.1 Kultivace a uchování bakteriálních kmenů	23
4.2.2 Identifikace bakterií metodou MS MALDI TOF	24
4.2.3 Modifikovaná Christensenova metoda.....	24
4.2.4 Disková difúzní metoda	25
4.2.5 Stanovení antibiofilmové aktivity látek mikrodiluční metodou	25
4.2.6 Stanovení antimikrobiální aktivity látek mikrodiluční metodou	26
4.2.7 Stanovení antimikrobiální aktivity mědi ve spojení s antibiotiky	27
4.2.8 Růstová křivka	27
5 Výsledky	30
5.1 Stanovení schopnosti tvořit biofilm	30
5.2 Testování citlivosti bakterií k vybraným antibiotikům	30

5.3	Identifikace bakterií pomocí metody MS MALDI - TOF.....	32
5.4	Stanovení antimikrobiální a antibiofilmové aktivity látek	32
5.5	Stanovení antimikrobiální aktivity mědi ve spojení s antibiotiky	36
5.6	Růstová křivka	40
6	Diskuze	45
7	Závěr	49
	Použitá literatura	50

Seznam použitých zkratk

BHI bujón	Brain-heart infusion, bujón z mozkosrdcové infuze
CCM	Czech collection of microorganism, česká sbírka mikroorganismů
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti
HCCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MBIC	minimální biofilm inhibující koncentrace
MBS	minimální bakteriostatická koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace

1 Úvod

K léčbě infekčních nemocí, způsobených bakteriemi, se využívají antimikrobiální látky. Tyto látky usmrcují nebo inhibují růst mikroorganismů v takových koncentracích, které neohrožují léčený makroorganismus. Mezi tyto látky řadíme, mimo jiné, i antibiotika. (Votava, 2001)

V současné době se vlivem nadměrného užívání antibiotik vyvinuly rezistentní kmeny bakterií, na které již řada antibiotik nezabírá. Předmětem zájmu mnoha studií se tedy stalo hledání alternativních antimikrobiálních látek, které by mohly pozitivně přispět k antibiotické léčbě. Jednou z možností by mohlo být využití nanomateriálů, které se ukázaly být dobrými antimikrobiálními činidly. (Sondi 2004)

Ve své bakalářské práci jsem se proto zaměřila na zkoumání antimikrobiální aktivity sloučenin mědi a nanočástic mědi, které by mohly v kombinaci s již používanými antibiotiky vyřešit nebo alespoň snížit problém s narůstající bakteriální rezistencí.

2 Cíle práce

1. Vypracovat rešerši na téma antimikrobiální účinky mědi.
2. Charakterizovat vybrané bakteriální kmeny (potvrdit identifikaci pomocí MS MALDI - TOF, stanovit citlivost k antibiotikům).
3. Stanovit antimikrobiální a antibiofilmovou aktivitu mědi ve srovnání s vybranými antibiotiky a resveratrolem.
4. Určit, zda měď může ovlivnit působení antibiotik.

3 Teoretická část

3.1 Antimikrobiální aktivita látek

Antimikrobiální látky jsou definovány jako léčiva, která se používají k terapii infekčních onemocnění způsobené mikroby a také k profylaxi. (Votava, 2001) Aby se tak látky mohly klasifikovat, musí být schopny zabít či inhibovat růst mikroorganismu v takovém množství, které neohrožuje makroorganismus. Látky, které usmrcují mikroorganismy, se označují jako baktericidní. V klinické praxi se jejich účinek dostavuje do 48 hodin a volí se především u závažných stavů nebo u pacientů se sníženou imunitou. K reverzibilní inhibici růstu a množení slouží bakteriostatické látky, které svůj klinický účinek nabývají až po 3 – 4 dnech a jejich předčasné vysazení znamená možnost opětovného množení mikroorganismů. (Votava, 2007)

Významnou vlastností antimikrobiálních látek je selektivní toxicita pro etiologické agens. Toxicita se vyjadřuje pomocí chemoterapeutického indexu, který značí poměr dávky toxické pro hostitelský organismus a dávky účinné na mikroorganismu. Čím vyšší je tento index, tím méně je látka pro hostitelský organismus toxická, a její podávání může být místní i systémové. (Votava, 2001)

Antibakteriální účinek cílí na pět hlavních míst: syntézu buněčné stěny, bílkovin a nukleových kyselin, dále na metabolické dráhy a funkci buněčné membrány. Na cílovém místě dochází k specifické inhibici antibakteriální látkou. (Goering a kol. 2016)

Jako mnohá léčiva, tak i antimikrobiální látky, mají řadu nežádoucích účinků na hostitelský organismus. Řadí se sem účinky toxické, alergické a biologické. Toxický účinek nastává po předávkování nebo po neupraveném dávkování u pacienta s jaterním či ledvinovým poškozením. Může také docházet k negativním účinkům na trávicí soustavu projevující se zvracením a průjmy. Tento negativní účinek je znám například u tetracyklinů, erytromycinu a furantoinů. Může také docházet k alergickým reakcím. Největší nebezpečí spočívá v anafylaktickém šoku, a to nejčastěji po injekčním podání penicilinu. V neposlední řadě může docházet k biologickým negativním účinkům, ovlivňující normální mikroflóru v těle, kdy dochází k jejímu vyhubení nebo redukci. (Votava, 2001)

3.2 Resistance k antibiotikům

Během posledních šesti desetiletí se lidstvo potýká s problémem adaptace bakterií na antibiotika. Antibiotika jsou vyráběna ve velkém měřítku a jejich terapeutické použití je velmi rozšířené až mnohdy zneužívané. To vedlo k tomu, že bakterie se rychle přizpůsobovaly novým měnícím se podmínkám a vznikaly a šířily se rezistentní kmeny, odolávající většině antibiotik, které se používají k jejich léčbě. (Blázquez, 2002)

3.2.1 Mechanismy rezistence

Mezi hlavní mechanismy bakteriální rezistence patří: a) enzymatická inaktivace, b) cílová modifikace, c) redukce permeability a d) aktivace buněčného efluxu. (Reygaert, 2018)

3.2.1.1 Enzymatická inaktivace

Pro mnohá antibiotika je integrita chemických vazeb, obsahujících estery nebo amidy, ústřední pro jejich biologickou aktivitu. Existuje několik příkladů enzymů, které jsou schopné hydrolytickou vazbu rozštěpit a inaktivují tím aktivitu antibiotika. (Wright, 2005)

Abraham a Chain v roce 1940 poprvé izolovali enzym penicilinasu z *Escherichia coli*, který inaktivoval penicilin. Dalším velmi rozšířenou a největší skupinou enzymů rezistence je skupina transferáz. Například acyltransferasa kovalentně modifikuje volné hydroxylové nebo aminové skupiny na antibiotiku a výsledkem je inaktivace antibiotika. (Wright, 2005)

3.2.1.2 Cílová modifikace

Rezistence bakterií proti bakteriostatickým nebo baktericidním antibiotikům může být dána modifikací cílového místa. Tím se může narušit či zabránit interakci s antibiotiky. (Poole, 2002)

Například u rezistence vůči erytromycinu byla popsána posttranskripční modifikace 23S podjednotky rRNA pomocí specifické methylace pomocí skupiny genů označujících se jako *erm* (erytromycin ribozomální methylasa). (Weisblum, 1995)

3.2.1.3 Redukce permeability

Gramnegativní bakterie mají na rozdíl od grampozitivních bakterií vnější membránu, která je chrání a slouží jako účinná bariéra, kterou musí antibiotika překonat, aby se dostala k cílům lokalizovaných uvnitř buňky. (Nikaido, 1994) Vnější membrána je tvořena lipidovou dvojrůstvou a proteiny, tvořící póry. Malé hydrofilní molekuly antibiotik, jako jsou například β -laktamy, pronikají do buňky přes póry a hydrofilní léčiva difundují přes lipidy. (Delcour, 2009)

Pokud léčivo difunduje přes specifický kanál do vnitřního prostředí buňky, jeho ztráta by mohla být účinným mechanismem resistance. U bakterie *Pseudomonas aeruginosa* došlo ke ztrátě specifického kanálu pro imipenem a bakterie se tak stala rezistentní vůči tomuto antibiotiku. (Quinn, 1986) Pokud je ale vnější membrána narušena činidly, jako je například EDTA, dochází k obnově propustnosti pro antibiotika. (Vaara, 1992)

3.2.1.4 Aktivace buněčného efluxu

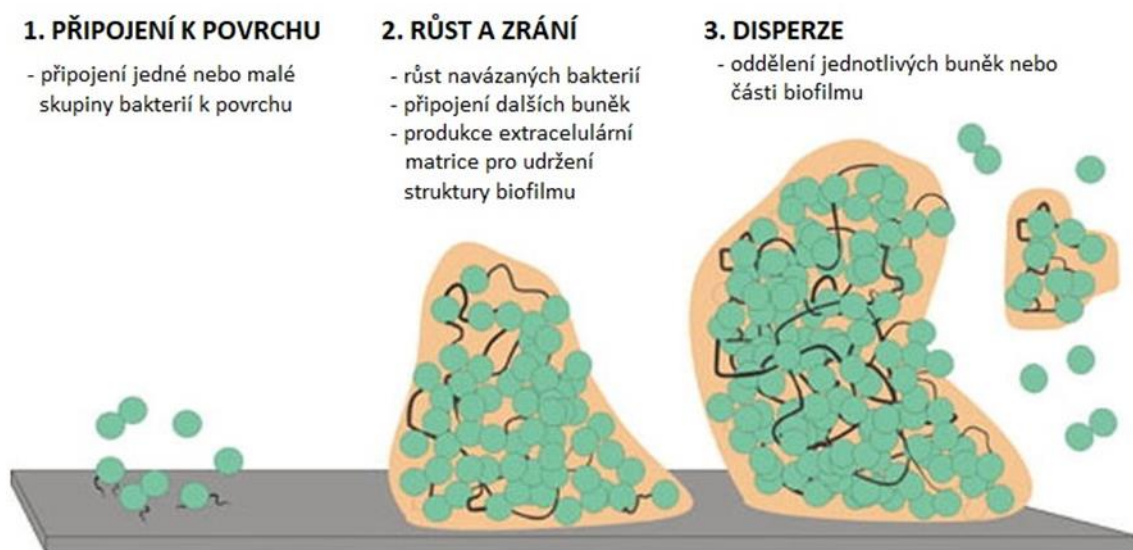
První aktivace efluxu antibiotika z buňky byla popsána u tetracyklinu. Ve studii McMurry a kol. (1980) se ukázalo, že tetracyklinová resistance je dána čtyřmi rozdílnými determinanty na plazmidech v *E. coli*. Byl zkoumán plazmid RPI, kódující rezistenci k ampicilinu, kanamycinu a tetracyklinu, plazmid R222, kódující rezistenci k chloroamphenicolu, sulfoamidům, steptomycinu a tetracyklinu, dále plazmid R144, kódující rezistenci ke kanamycinu a tetracyklinu, a plazmid RA1, který kóduje rezistenci k tetracyklinu. Tyto různé determinanty (RPI (třída A), R222 (třída B) R144 (třída C) RA1 (třída D)) vykazují spojení s exportem tetracyklinu z buňky.

3.3 Biofilm

Mikroorganismy mají schopnost adherovat na různé povrchy a vytvářet tzv. biofilm. Biofilm je tvořen souborem mikrobiálních buněk, které jsou uzavřeny v matici, obsahující extracelulární polymerní látky. Tyto látky jsou složeny primárně z polysacharidů, ale mohou obsahovat také proteiny, nukleové kyseliny nebo lipidy. (Vu a kol., 2009) V matici se mohou nacházet

i materiály jako minerální krystaly nebo složky krve, v závislosti na prostředí, ve kterém se biofilm vytváří. (Donlan, 2002)

Tvorba biofilmu je několikastupňový proces (obrázek 1), který zahrnuje počáteční fázi připojení, nebo-li adhezi, bakterií k povrchu a následnou fázi zrání. Tyto fáze se od sebe navzájem fyziologicky liší a potřebují ke svému zahájení fázově odlišné specifické faktory. V konečné fázi biofilmu dochází k oddělení jednotlivých buněk či buněčných shluků. Tato fáze je považována za klíčovou v procesu šíření infekce na nová místa v lidském těle. (Otto, 2008)



Obrázek 1: Schéma tvorby biofilmu. (upraveno dle Cook, 2014)

Virulentními bakteriemi můžeme označit, mimo jiné ty, které jsou schopné tvořit biofilm. (Růžička a kol., 2004) Díky němu se bakterie stávají odolnými vůči léčbě antimikrobiálními látkami, což je hlavní příčinou selhání léčby. Až 80 % bakteriálních infekcí nejčastěji způsobené bakteriemi *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* nebo *Pseudomonas aeruginosa* jsou spojeny právě s tímto problémem. (Römling & Balsalobre, 2012)

Buňky bakterií rostoucí ve formě biofilmu se od planktonních forem liší i vzhledem na transkribované geny. (Donlan, 2002) Ve studii May a kol. (2009) bylo zjištěno, že počet kopií plazmidu pBR322, nesoucího geny rezistence proti ampicilinu a tetracyklinu, v bakterii *E. coli*, rostoucí ve formě biofilmu, byl vyšší než u buněk v planktonní formě. Po přidání obou antibiotik se ukázalo, že počet plazmidů se jednoznačně zvýšil u buněk rostoucí v biofilmu, ale nikoliv

v planktonní formě. Toto zjištění naznačuje, že biofilm je schopen zvýšit relativní výhodnost plazmidu a zvýšit tak množení rezistentního plazmidu. Avšak mechanismus není zcela objasněn. (May, 2009)

3.4 Antimikrobiální aktivita mědi

Měď patří mezi první kovy, které lidstvo objevilo. První záznamy o využití mědi jako bakteriocidního prostředku pochází ze Smithova papyrusu, který je považován za nejstarší medicínský dokument v dějinách lidstva. V současnosti se měď používá při výrobě bakteriocidů, fungicidů nebo také například při výrobě lékařských nástrojů. (Konieczny, 2012)

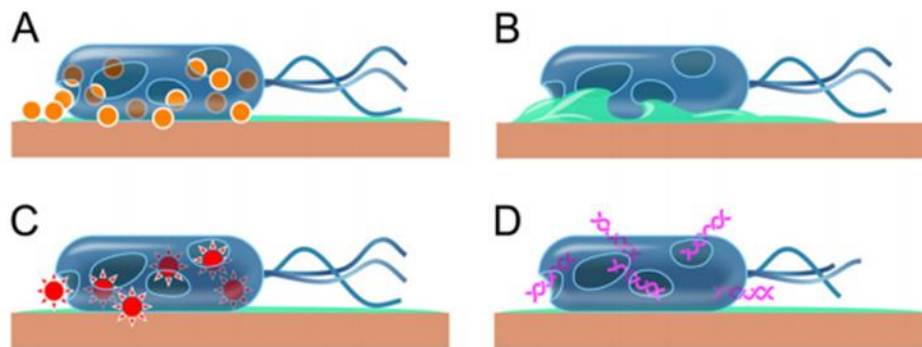
Měď se ukázala být účinná k ošetření ploch způsobené kontaminací mikroorganismy, kdy při jejím použití došlo ke snížením jejich výskytu. Kontaminované povrchy mohou přispět k přenosu patogenů souvisejících s poskytováním zdravotní péče. Přenos patogenů závisí na celé řadě faktorů jako je například schopnost patogenu přežít na suchých površích nebo na frekvenci, s jakou se povrchy běžně dotýkají pacienti či zdravotnický personál. (Boyce, 2007)

Ve studii Schmidt a kol. (2012) bylo prokázáno, že zavedením měděných povrchů na často dotýkané plochy na jednotce intenzivní péče, které byly dříve pokryté plastem, dřevem nebo jinými materiály, se sníží mikrobiální výskyt o 83 %.

Následně ve studii Salgado a kol. (2013) bylo zjištěno, že pacienti, kteří byli umístěni na pokoje jednotky intenzivní péče s měděnými povrchy, mají významně nižší poměr vzniku infekce spojenou s poskytováním zdravotní péče nebo nižší výskyt kolonií methylin-resistentního *Staphylococca aurea* nebo vancomycin resistantního enterokoka, než pacienti na standartních pokojích.

3.4.1 Mechanismus toxicity

Je pravděpodobné, že toxicita mědi může mít několik mechanismů (obrázek 2), které zahrnují permeabilizaci plasmatické membrány, lipidovou peroxidaci na membráně, změnu proteinů a inhibici jejich aktivity až denaturaci DNA. (Borkow, 2012)



Obrázek 2: Mechanismus toxicity mědi. (A) poškození buněčné membrány, (B) uvolnění obsahu cytoplasmy vlivem narušené struktury membrán, (C) reaktivní kyslíkové radikály narušující bakteriální buňku, (D) degradace DNA. (upraveno dle Grass, 2011)

Předpokládá se, že počáteční poškození mědi se odehrává na plasmatické membráně. Nan a kol. (2008) využili ke studiu efektu antibakteriální nerezovou ocel, obsahující měď, na plasmatickou membránu *E. coli* za využití mikroskopu atomárních sil. Struktura buněčné stěny a membrán se s rostoucí dobou působení měnila a obsah cytoplasmy byl uvolněn do okolí, což v konečném důsledku vedlo k usmrcení bakterií.

Měď stejně jako železo patří mezi přechodné kovy, které katalyzují vznik reaktivních forem kyslíku. Mechanismus tvorby je popisován pomocí Fentonovy reakce: $\text{Cu (I)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu (II)} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$. (Liochev, 2002; Valko, 2005)

Výsledky studie Hong a kol. (2012) ukazují, že měď vyvolala neenzymatické oxidační poškození nenasycených mastných kyselin v lipidové membráně, které vedlo ke ztrátě integrity a v konečném důsledku i k buněčné smrti.

Meyer a kol. (2015) zkoumali, jak významná je souvislost mezi vlivem měděného povrchu a zvýšení lipidové peroxidace vedoucí k rychlé buněčné smrti. Ke studiu použili grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* a gramnegativní *Pseudomonas aeruginosa*. Významný rozdíl mezi ztrátou membránové integrity u gramnegativních a grampozitivních bakterií ukázaly výsledky po 45 minutách od expozice mědi, kdy mnohem více grampozitivních bakteriálních buněk odolávalo účinkům mědi. Avšak gramnegativní a grampozitivní bakterie

mají stejné schéma buněčné smrti po vystavení buněk mědi, při kterém dochází ke zvýšení lipidové peroxidace a také k degradaci genomické DNA.

Pokud se kovové ionty naváží na proteiny, může dojít k narušení jejich normální funkce, což může způsobit navození buněčné smrti či virové inaktivace. (Thurman, 1989) Měď je schopná napadat dýchací enzymy v buněčné membráně u *E. coli*. Toto tvrzení potvrzuje studie, která prokázala, že při zotavování buněk *E. coli* docházelo ke sníženému využití kyslíku a buňky byly podle všeho závislé na fermentačních cestách. (Domek, 1984) Další možností by mohla být mědí zprostředkovaná vazba thiolové skupiny na enzymy dýchacího řetězce blízko buněčného povrchu a tím by mohla nastat inhibice jejich funkcí. (Moran, 1976)

Vědci zkoumají také vliv mědi na změny v DNA vedoucí k její degradaci. Skupina Warnes a kol. (2010) zkoumala účinek mědi na DNA enterokoků. K zabránění šíření nosokomiálních enterokokových infekcí a rezistencí na antibiotika je důležité, aby proběhlo narušení DNA. Ukázalo se, že docházelo k rozpadu genomové DNA, po vystavení mědi nebo jejich slitin. Genomová DNA nebyla detekována při testu fragmentace DNA, na rozdíl u testování s nerezovou ocelí.

Za aerobních podmínek vytváří ionty mědi volné kyslíkové radikály, pomocí Fentonovy reakce, které způsobují dvouvláknové zlomy v DNA. (Lloyd, 1999) Výsledky studie Macomber a kol. (2007) ovšem potvrdily, že měď u *E. coli* nezpůsobuje oxidační poškození DNA a dokonce blokuje oxidaci DNA způsobenou železem.

3.5 Nanomateriály

V posledních letech dochází k rozvoji rezistentních bakteriálních kmenů. Předmětem zájmu je tedy nalezení nových účinných baktericidních materiálů. Jedním z řešení jsou nanočástice. V mnoha studiích byla prokázána antibakteriální aktivita nanočástic, které dosahují velikosti 1 až 100 nm. Proto příprava, charakterizace a funkcionalizace nanočástic může být jedna z možností vytvoření nových účinných bakteriostatických a baktericidních látek a materiálů. (Sondi, 2004)

Například ve studii Stoimenov a kol. (2002) bylo prokázáno, že nanočástice oxidu hořečnatého jsou účinné jak proti gramnegativním (*E. coli*), tak i grampozitivním (*Bacillus*

subtilis, *Bacillus megaterium*) bakteriím. Oba typy bakterií byly usmrceny do 20 minut po aplikaci nanočástic. Mezi další nanomateriály, u kterých bylo zjištěno antimikrobiální působení, patří, mimo jiné, stříbro a měď.

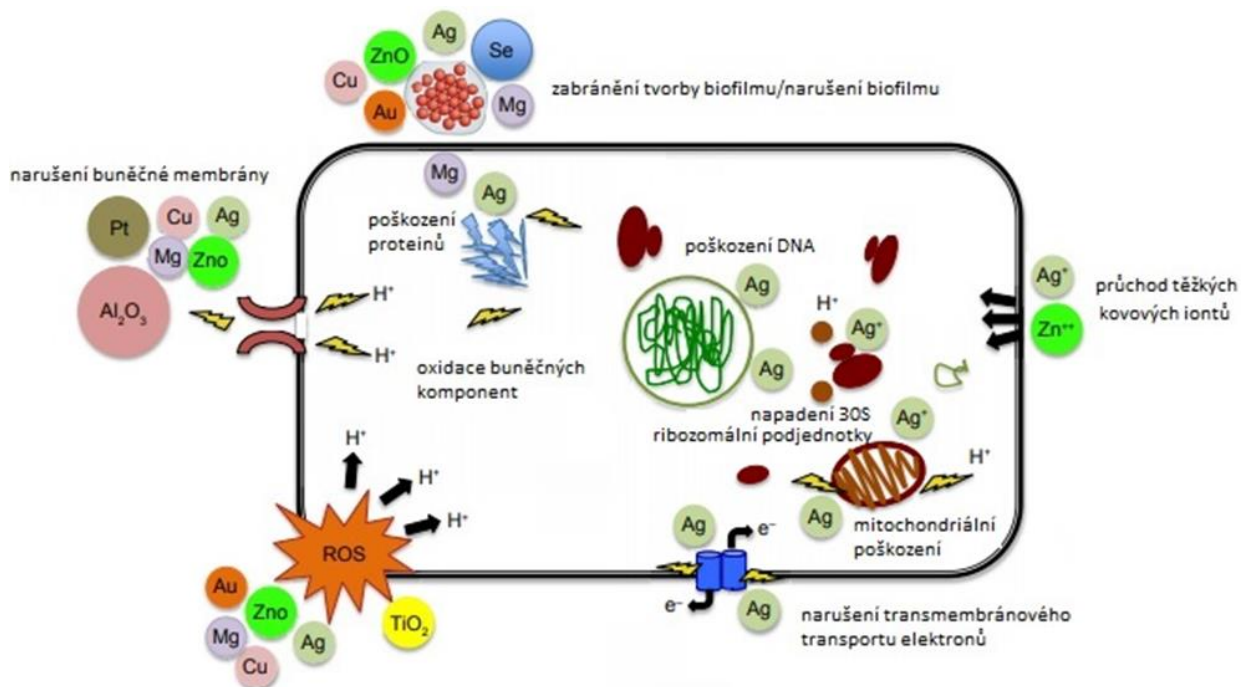
Důležitým aspektem baktericidního působení je také velikost částic. Studie Morones (2005) prokázala vliv velikosti nanočástice na její baktericidní účinek. Nejlepší integraci s bakteriemi vykazují částice o velikosti 1 – 10 nm. Kovové nanočástice jsou k bakteriím více toxické, než pouze jejich iontové formy. Například stříbrné nanočástice, zkoumané ve studii Ingle a kol. (2008), působily na bakterie 1,4 – 1,9× více toxicky než čisté ionty stříbra.

Problémem zavádění nanomateriálů s antibakteriálními vlastnostmi do klinické praxe je jejich toxicita pro organismus. Mechanismus toxicity je studován na rozličných biologických systémech, jako jsou lidské buněčné linie (Maity, 2018), makrofágové (Carlson, 2008) nebo například modelový organismus zebrafish (Griffitt, 2009). Nanotoxicita je dána především tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů, které vedou k oxidačnímu stresu v tkáních. (Fu, 2014)

Jeong a kol. (2018) srovnávali cytotoxicitu tří nanočástic CuO, CoO a ZnO a jejich iontů obsažených v chloridech. Byla zkoumána závislost dávky na cytotoxickém potenciálu na buněčné linie. Křivky nanočástic CuO a CoO ve srovnání s ionty vykazovaly podobné vzorce, což naznačuje, že by se dala cytotoxicita nanočástic CuO a CoO snadno predikovat na základě toxického parametru Cu a Co iontů. Ale u nanočástic ZnO a Zn iontů měly křivky odlišný charakter. Nanočástice měly mnohem menší potenciál cytotoxicity ve srovnání s křivkou iontů. Rozdílné křivky mají nejspíše za příčinu odlišný mechanismus intercelulárního příjmu látek a jejich interakce s intercelulárními detoxikačními molekulami. (Jenong, 2018)

3.5.1 Mechanismus účinku nanočástic

Způsob působení kovových nanomateriálů na mikroby využívá multilaterálních prostředků (obrázek 3). To snižuje pravděpodobnost vzniku rezistence, neboť by muselo dojít k současné vícenásobné genové mutaci. Toxicita nanočástic je především přičítána tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů, inhibující replikaci DNA či poškození buněčné membrány. (Hemeg, 2017)



Obrázek 3: Způsoby účinku nanomateriálů proti bakteriální buňce. (upraveno dle Hemeg, 2017)

Studie amerických vědců Morones a kol. (2005) se zabývala účinkem stříbrných nanočástic na gramnegativní bakterie *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* a *Vibrio cholera*. Výsledkem studie bylo zjištění, že nanočástice o velikosti 1 – 10 nm napadají povrch buněčné membrány a narušují tak její řádné fungování, čímž snižují permeabilitu, díky čemuž se zvýší propustnost a v důsledku toho, nanočástice pronikají do nitra buněk, kde případně mohou způsobovat i poškození DNA.

3.6 Nanočástice mědi

Díky svému antibakteriálnímu účinku nanočástice stříbra a mědi působí proti grampozitivním a gramnegativním mikroorganismům. (Ruparelia a kol., 2008; Yoon a kol., 2008) Výhodou mědi ve srovnání se stříbrem je především její dostupnost a fakt, že je levnějším kovem než stříbro. Stříbro je drahý kov, proto i výroba stříbrných nanočástic s sebou nese vyšší náklady v porovnání s měďnými nanočásticemi. (Ingle, 2013) Avšak antimikrobiální aktivita nanočástic mědi není ve srovnání s nanočásticemi stříbra ještě tolik prozkoumána.

Ve studii Ramyadevi (2011) byl prokázán antibakteriální účinek nanočástic mědi za využití diskové difúzní metody proti bakteriím *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae*. Nejlepší účinek měla měď na *E. coli*, kde inhibiční zóna dosahovala 26 mm. Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* se jevila jako rezistentní, neboť její inhibiční zóna dosahovala 5 mm. V této studii byl také prokázán účinek mědi proti plísním *Aspergillus flavus* a *Aspergillus niger* a kvasince *Candida albicans*. Antimikrobiální vlastnosti vykazovaly i syntetizované nanočástice oxidu mědi ze studie Das a kol. (2012). Nanočástice oxidu mědi o koncentracích 1, 2,5 a 4 mg/ml působily na bakterie *E. coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Opět zde jako u nanočástic mědi došlo k nižší aktivitě proti *Pseudomonas aeruginosa*.

Dalším důkazem antimikrobiální aktivity nanočástic oxidu mědi, je studie Ren a kol. (2009) zabývající se jeho syntézou a charakterizací pro antibakteriální aplikace. Nanočástice oxidu mědi působily v různých koncentracích proti bakteriím *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571), *Staphylococcus epidermidis* (SE-51), *E. coli* (NCTC 9001), *Pseudomonas aeruginosa* (PAOI) a *Proteus spp.* Dokonce bylo zaznamenáno antibakteriální působení na methicilin-rezistentní kmen *Staphylococcus aureus* (EMRSA-16, EMRSA-15).

Vědecká skupina Gopalakrishnan a kol. (2012) syntetizovala další sloučeninu mědi, která jevila aktivitu proti bakterii *E. coli*. Konkrétně se jednalo o nanočástice oxidu měďnatého syntetizovaného z extraktu z listů *Tridax procumbens*.

Předmětem studia se stal také rozdíl v účinku nanočástic mědi a oxidu měďnatého. Nicméně se ukázalo, že antimikrobiální aktivita nanočástic mědi je silnější v porovnání s aktivitou nanočástic oxidu mědi. Účinnější antibakteriální aktivita může být přisuzována lepší schopnosti nanočástic mědi přijímat elektrony. Přenos elektronů mezi bakteriemi a kovovými nanočásticemi je považován za jeden z účinných mechanismů antimikrobiální aktivity nanočástic pomocí narušení bakteriální membrány. (Akhavan, 2010)

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Laboratorní vybavení a software

Absorbanční reader ELx808 (BioTek)

Automatické pipety a příslušné špičky 0,5 – 10 μ l, 1 – 10 μ l, 100 – 1000 μ l (Finnpipette)

Analytické váhy KERN ABT (Kern)

Antibiotické disky (Biorad)

Autokláv DE (Systec)

Bakteriologické kličky 1 μ l (Biologix)

Bambusová párátka (Spontex)

Hlubokomrazicí box ULUF (Arctiko)

Kahan (Trystom s. r. o.)

Láhve na autoklávování o objemu 500 ml (Duran)

Laminární box HERA safe KS 12 Biohazard (ThermoScientific)

Laboratorní inkubátor (termostat) Ecocell (BMT)

Lednička

MALDI destička z leštěné oceli (Bruker)

MALDI TOF spektrometr Microflex LT Systém (Bruker)

MIC inokulátor (‘ježek’) (Trios)

Mikrotitrační destička P (Grama Group a.s.)

Mikrotitrační destička U (Grama Group a.s.)

Multikanálová pipeta (Eppendorf)

Mikrozkumavky typu Eppendorf o objemu 1,5 ml (Eppendorf)

Ochranná fólie na mikrotitrační destičku (LVL technologies)

Parafilm (Pechiney)

Stojánky na mikrozkumavky (Biologix)

Sunflower Mini-Shaker PS-3D (Bioasan)

Software Dynex technologies revelation 4.25 (Dynex technologies, Inc.)

Software MALDI Biotyper 3.1 (Bruker)
Software gen5 verze 1.02.8 (Biotek)
Revelation software version 4.25 (Dynex)
Termostat Incucell 55 (BMT)
Vata buničitá přířez 20 x 30 cm (BATIST)
Vortex v1 (Biosan)

4.1.2 Použité chemikálie

Acetonitril (kat. č. 10120-11000, Penta)
Destilovaná voda
Ethanol absolutní pa. (kat. č. 71250-11000, Penta)
Glukosa (Lékárna Fakultní nemocnice Olomouc)
Metanol (kat. č. 20035-ATO, G. R. Lancher)
Kyselina octová 99% pa. (kat. č. 20000-11000, Penta)
Kyselina mravenčí (kat. č. 147 930250, ACROS ORGANIC)
Krystalová violeť (kat. č. 28290-30100, Penta)
Měď (II), oxid, nano, 15 – 50 nm (kat. č. 8251.1, Roth)
Nano měď, 100 nm (kat. č. 8279.1, Roth)
Resveratrol (kat. č. R5010, Sigma-Aldrich)
Síran měďnatý (kat. č. 451657, Sigma-Aldrich)
Šťavelan amonný (kat. č. 26750-30500, Penta)
Trifluoroctová kyselina (kat. č. T6508, Sigma-Aldrich)
 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (kat. č. C8982-10×10MG, Sigma-Aldrich)

4.1.3 Použitá antibiotika

Amoxicillin trihydrát (kat. č. A0101.0010, Duchefa)
Erytromycin (kat. č. E0122.0010, Duchefa)
Nitrofurantoin (kat. č. N7878-106, Sigma-Aldrich)
Tetracyklin trichlorid (kat. č. T0150.0025, Duchefa)

4.1.4 Kultivační půdy

Brain heart infusion broth (kat. č. M210-500G, HiMedia)

Kryobanka B (kat. č. PP64, ITEST)

Krevní agar (kat. č. H1544, Trios)

Mueller-Hinton agar (kat. č. H6232, Trios)

4.1.5 Bakteriální kmeny

V bakalářské práci bylo použito 5 bakteriální referenčních kmenů (tabulka 1) z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně (CMM, *Czech collection of microorganism*).

Tabulka 1: Referenční bakteriální kmeny

Bakteriální kmen	Číslo kmene	Materiál
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224	moč
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954	klinický izolát
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955	krev
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4223	rána
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCM 7221	hemokultura

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace a uchování bakteriálních kmenů

Z kryozkumavky byla pomocí sterilní bakteriologické kličky vyočkována bakteriální kultura na krevní agar. Naočkované plotny byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin.

Pomocí sterilní bakteriologické kličky byla odebrána 24 h stará bakteriální kultura a resuspendována v kryozkumavce s porézními kuličkami a médiem. Bakteriální kmeny byly uchovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě – 80 °C.

4.2.2 Identifikace bakterií metodou MS MALDI TOF

Na každou pozici na MALDI destičce byla nanesena čistá bakteriální kultura po 24 hodinové kultivaci. Po zaschnutí při pokojové teplotě, byly vzorky převrstveny 1 μ l kyseliny mravenčí a po opětovném zaschnutí 0,75 μ l matricí HCCA. Jakmile matrice dostatečně zaschnula, byla MALDI destička vložena do hmotnostního spektrofotometru Microflex LT.

K identifikaci bakteriálního kmene bylo porovnáno naměřené hmotnostní spektrum s databází spekter pomocí softwaru MALDI Biotyper 3.1. K určení druhu a rodu bakterií sloužily hodnoty skóre. Hodnoty $\geq 2,3$ značí vysokou pravděpodobnost identifikace druhu. Hodnoty skóre $\geq 1,7$ a $2,3 <$ určují pravděpodobnou identifikaci druhu a rodu. Hodnoty skóre nižší než 1,7 považujeme za nespolehlivé určení.

4.2.3 Modifikovaná Christensenova metoda

Tato metoda slouží k průkazu tvorby biofilmu pomocí kultivace bakterií v mikrotitrační destičce. Nejprve byly testované kmeny sterilní bakteriologickou kličkou vyočkovány z kryozkumavek na krevní agar a inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin.

Do zkumavek byla připravena bakteriální suspenze společně s 1,5 ml BHI bujónu s 0,25% příměsí glukózy, která podporuje tvorbu biofilmu. Suspenze byla zhomogenizována na vortexu. Do 4 jamek mikrotitrační destičky bylo pro každý bakteriální izolát napipetováno 100 μ l připravené suspenze. Jako negativní kontrola byl použit čistý BHI bujón a jako pozitivní kontrola byla použita suspenze *Staphylococcus epidermidis* (CCM 7221), který je referenčním kmenem pro tvorbu biofilmu. Destička byla inkubována při 37 °C po dobu 24 hodin.

Po inkubaci byla destička opatrně promyta vodou, aby došlo k odstranění volných buněk. Následně byla provedena fixace 100 μ l 99% methanolu po dobu 15 minut. Methanol byl následně odsát a destička byla ponechána vyschnout. Po vysušení byla obarvena vrstva vytvořeného biofilmu pomocí 100 μ l 1% krystalové violeti po dobu 10 minut. Krystalová violeť byla odstraněna odsátím a jamky destičky byly důkladně promyty vodou. Zůstatky vody v jamkách byly vyklepány do buničiny. Poté byla krystalová violeť uvolněna 100 μ l 33% kyseliny octové a destička byla vložena na třepačku.

Tvorba biofilmu byla hodnocena změřením absorbance při 570 nm ve fotometru proti slepému vzorku (čistý BHI bujón). Vzorky byly vyhodnoceny pomocí softwaru Dynex technologies revelation 4.25 na základě rovnic a přiřazených symbolů -/+ /++ /+++ . Vzorky s výsledkem +++ byly hodnoceny jako pozitivní a -/+ /++ jako negativní.

4.2.4 Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda slouží ke stanovení citlivosti bakterií k vybraným antibiotikům. Byla testována citlivost/rezistence k amoxicilinu 30 µg, erytromycinu 15 µg, nitrofurantoinu 100 µg a tetracyklinu 30 µg.

Pomocí sterilní bakteriologické kličky byla do zkumavky obsahující 5 ml BHI bujónu naočkována bakteriální kultura. Suspenze byla následně homogenizována na vortexu. Bakteriální kultura byla poté inokulována nalitím na Mueller-Hintonův agar. Přebytek inokula byl slit do nádoby s desinfekcí. Po zaschnutí bakteriální kultury byly na agar umístěny antibiotické disky.

Po inkubaci misek při 37 °C v termostatu po dobu 16 – 24 hodin, byly změřeny průměry vytvořených inhibičních zón. Tyto naměřené hodnoty byly porovnány s tzv. klinickými breakpointy (mezními hodnotami) antibiotik uvedenými ve směrnici EUCAST verze 10.0. Bakterie, u kterých byla naměřená hodnota průměru inhibičních zón větší nebo rovna stanovené hranici, byly vyhodnoceny jako citlivé k danému antibiotiku. Pokud byl změřený průměr menší než stanovená hranice nebo nebyla patrná viditelná inhibice růstu, byla tato bakterie hodnocena jako rezistentní.

4.2.5 Stanovení antibiofilmové aktivity látek mikrodiluční metodou

Schopnost zabránit tvorbě biofilmu byla testována u nanočástic mědi o velikosti 100 nm, nanočástic oxidu měďnatého o velikosti 15 – 50 nm, síranu měďnatého, resveratrolu a u antibiotik amoxicilinu, erytromycinu, nitrofurantoinu a tetracyklinu.

Do všech jamek mikrotitrační destičky typu P řad B – H bylo napipetováno 100 µl BHI bujónu s 0,25% příměsí glukózy. Následně byl připraven roztok obsahující 9,9 ml BHI bujónu s příměsí glukózy a 100 µl testované látky a zhomogenizován na vortexu.

Do jamek v řadě A bylo napipetováno 200 µl testované látky, pozitivní a negativní kontroly. Jako pozitivní a negativní kontrola byl použit BHI bujón. Poté bylo provedeno ředění dvojkovou řadou. Byla tak vytvořena koncentrační řada 256 – 0,0078 µg/ml, ze které se vychází při testování antibiotik v antibiotickém středisku.

Dále bylo připraveno inokulum. Do zkumavky byly ke 2 ml BHI bujónu přidány 2 – 3 kolonie vykultivované kultury tak, aby vytvořený zákal odpovídal hodnotě 0,5 McFarlanda. Zásobní inokulum bylo 10× naředěno 18 ml sterilní destilované vody, aby se docílilo optimální koncentrace buněk. Vytvořené inokulum bylo nalito na Petriho misku a pomocí sterilního MIC inokulátoru byly naočkovány jamky destičky. Inokulátor byl před použitím vždy umístěn do 96% ethanolu a následně vyžhán plamenem. Destička byla inkubována při 37 °C v termostatu po dobu 24 hodin.

4.2.6 Stanovení antimikrobiální aktivity látek mikrodiluční metodou

Nejdříve bylo do všech jamek řad B – H mikrotitrační destičky typu U napipetováno 50 µl bujónu BHI. Poté byly připraveny roztoky obsahující 9,9 ml BHI a 100 µl testované látky, tak aby výsledná koncentrace pro antibiotika odpovídala 256 µg/ml a pro testované látky 2560 µg/ml. Do sloupců řady A bylo napipetováno 100 µl roztoku připraveného roztoku nebo čistého BHI podle schématu. Pomocí dvojkového ředění byla vytvořena koncentrační řada 256 – 0,0078 µg/ml pro antibiotika a 2560 – 0,078 µg/ml pro testované látky.

Dalším krokem bylo vytvoření bakteriální suspenze a pomocí sterilní destilované vody byla koncentrace upravena tak, aby byla dosažena koncentrace 1×10^6 buněk/ml. Vytvořené inokulum bylo nalito do Petriho misky a pomocí MIC inokulátoru bylo provedeno naočkování jamek mikrotitrační destičky. Inokulátor byl před použitím vždy umístěn do 96% ethanolu a následně vyžhán plamenem. Destičky byly inkubovány v termostatu při 37°C po dobu 24 hodin.

Po inkubaci byla odečtena hodnota MIC a následně byly jednotlivé jamky vyočkovány MIC inokulátorem na krevní agar, aby mohlo být zjištěno bakteriostatické a baktericidní působení. Každá jednotlivá destička byla vyočkována na dva krevní agary, kde na prvním byly

sloupce 1 – 6 a na druhém 7 – 12. Naočkované plotny byly inkubovány v termostatu při 37°C po dobu 24 hodin.

Následující den byla odečtena hodnota minimální bakteriostatické koncentrace (MBS) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). Poslední jamka, kde byl prokázán bakteriální růst, byla označena za hodnotu MBS. Baktericidní účinek byl zjištěn na agarových plotnách, kde nebyl viditelný bakteriální růst.

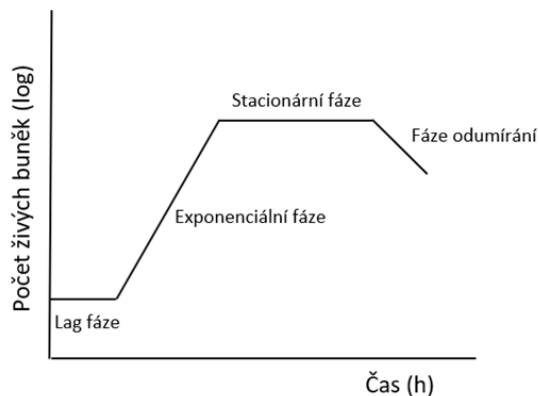
4.2.7 Stanovení antimikrobiální aktivity mědi ve spojení s antibiotiky

Pro testování byly vybrány koncentrace mědi 320 a 640 µg/ml, které zabránily tvorbě biofilmu. Nejprve byly vytvořeny roztoky mědi o potřebných koncentracích. Koncentrace 320 µg/ml byla vytvořena navážením 64 mg mědi a následným rozpuštěním ve 200 ml bujónu BHI. Koncentrace 640 µg/ml byla vytvořena rozpuštěním 128 mg mědi ve 200 ml bujónu BHI. Dále byly vytvořeny suspenze antibiotik s mědí v bujónu BHI, tak aby bylo dosaženo koncentrace 256 µg/ml.

Do jamek mikrotitrační destičky v řadě A bylo napipetováno 100 µl testovaných látek. Pomocí dvojkového ředění byla vytvořena koncentrační řada 256 – 0,0078 µg/ml a následně byl aplikován stejný postup jako v předchozí kapitole pro stanovení hodnot MIC a bakteriostatického a baktericidního působení.

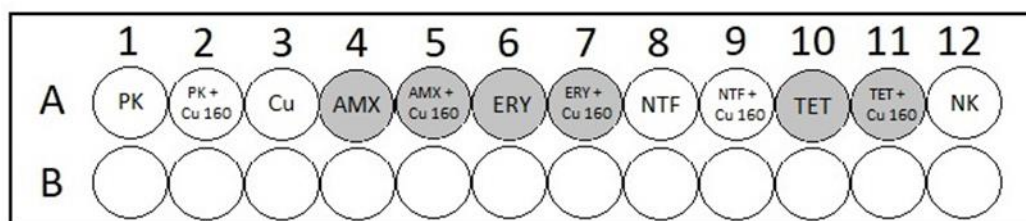
4.2.8 Růstová křivka

Na základě výsledků z antimikrobiální aktivity mědi v kombinaci s antibiotiky byly vybrány dva bakteriální druhy *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) a *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955), u kterých byl pozorován vliv mědi v určitých koncentracích na vývoj jednotlivých fází růstové křivky (obrázek 4).

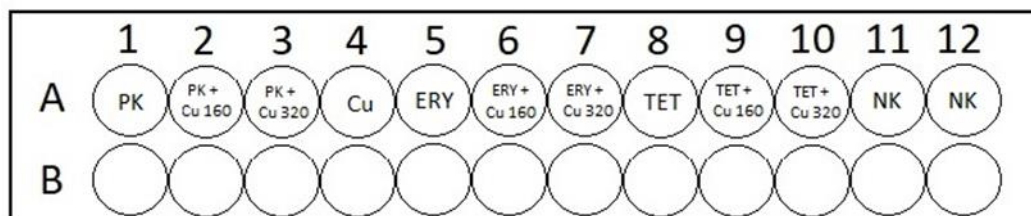


Obrázek 4: Jednotlivé fáze bakteriálního růstu.

Do mikrotitrační destičky typu P bylo napipetováno 100 μ l testované látky podle schémat (obrázek 5, 6) a byla vytvořena příslušná koncentrační řada pomocí dvojkového ředění. Po inokulaci destičky bakteriálním kmenem byla destička přelepena fólií a vložena do readeru EL808 od firmy Biotek na 24 hodin. Po dvou minutovém protřepání byla měřena absorbance při vlnové délce 630 nm. Měření probíhalo v intervalu jedné hodiny. Pomocí softwaru Gen 5 byly ukládány jednotlivé naměřené hodnoty absorbance pro následné vyhodnocení.



Obrázek 5: Pořadí testovaných látek na prvním řádku mikrotitrační destičky pro kmen *Staphylococcus aureus* (CCM 4223). PK = pozitivní kontrola (BHI bujón); PK + Cu 160 = pozitivní kontrola (BHI) s příměsí mědi o koncentraci 160 µg/ml; Cu = měď; AMX = amoxicilin; AMX + Cu 160 = amoxicilin se suspenzí mědi o koncentraci 160 µg/ml v BHI bujónu; ERY = erytromycin; ERY + Cu 160 = erytromycin se suspenzí mědi o koncentraci 160 µg/ml v BHI bujónu; NTF = nitrofurantoin; NTF + Cu 160 = nitrofurantoin se suspenzí mědi o koncentraci 160 µg/ml v BHI bujónu; TET = tetracyklin; TET + Cu 160 = tetracyklin se suspenzí mědi o koncentraci 160 µg/ml v BHI bujónu; NK = negativní kontrola (čistý BHI bujón). Koncentrace v řadě A byla u všech šedě vyznačených látek 1 µg/ml a u zbývajících 256 µg/ml.



Obrázek 6: Pořadí testovaných látek na prvním řádku mikrotitrační destičky pro kmen *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955). PK = pozitivní kontrola (BHI bujón); PK + Cu 160 = pozitivní kontrola (BHI) s příměsí mědi o koncentraci 160 µg/ml; Cu = měď; ERY = erytromycin; ERY + Cu 160 = erytromycin se suspenzí mědi o koncentraci 160 µg/ml v BHI bujónu; ERY = erytromycin; ERY + Cu 320 = erytromycin se suspenzí mědi o koncentraci 1320 µg/ml v BHI bujónu; TET = tetracyklin; TET + Cu 160 = tetracyklin se suspenzí mědi o koncentraci 160 µg/ml v BHI bujónu; TET + Cu 320 = tetracyklin se suspenzí mědi o koncentraci 320 µg/ml v BHI; NK = negativní kontrola (čistý BHI bujón). Koncentrace v řadě A byla u všech testovaných látek 256 µg/ml.

5 Výsledky

5.1 Stanovení schopnosti tvořit biofilm

Schopnost bakterií růst ve formě biofilmu byla prokázána pomocí modifikované Christensenovy metody v mikrotitrační destičce. Hodnocení proběhlo ve spektrofotometru na základě měření absorbance v jamkách a stěnách destičky (tabulka 2). U bakterie *E. coli* (CCM 3954) nebyla prokázána schopnost tvorby biofilmu. Ostatní testované kmeny byly biofilmopozitivní.

Tabulka 2: Schopnost růstu bakterií ve formě biofilmu

Bakteriální kmen	Hodnocení dle hodnoty absorbance
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224)	+++
<i>Escherichia coli</i> (CCM 3954)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4223)	+++
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (CCM 7221)	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955)	+++

5.2 Testování citlivosti bakterií k vybraným antibiotikům

Diskovou difúzní metodou byla stanovena citlivost k antibiotikům amoxicilinu, erytromycinu, nitrofurantoinu a tetracyklinu o určitých koncentracích. Naměřené průměry vzniklých inhibičních zón (tabulka 3) byly srovnány s breakpointy podle EUCASTU. (Clinical breakpoint – bacteria verze 10.0, http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/, tabulka 4). Konečný výsledek, zda je bakteriální kmen rezistentní nebo citlivý k danému antibiotiku, je shrnut v tabulce 5.

U kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955) a *Enterococcus faecalis* (CCM 4224) nebyla stanovena citlivost ke všem testovaným antibiotikům. Citlivost byla stanovena pouze u těch antibiotik, které se využívají v klinické praxi. U bakterie *E. coli* (CCM 3954) byla stanovena citlivost pouze k amoxicilinu a nitrofurantoinu.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty průměrů inhibičních zón

Bakteriální kmen	Hraniční zóny (mm)			
	AMX30	ERY15	NTF100	TET30
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224)	24	13	-	10
<i>Escherichia coli</i> (CCM 3954)	22	8	15	20
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4223)	27	25	-	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (CCM 7221)	18	0	-	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955)	0	0	0	0

Testovaná antibiotika: AMX30 = amoxicilin 30 µg; ERY15 = erytromycin 15 µg; NTF 100 = nitrofurantoin 100 µg; TET30 = tetracyklin 30 µg; - = dané antibiotikum nebylo testováno

Tabulka 4: Klinické breakpointy pro testované bakterie podle EUCAST

Bakteriální kmen	Hraniční zóny (mm)			
	AMX30	ERY15	NTF100	TET30
<i>Enterococcus faecalis</i>	x	x	R < 15 C ≥ 15	x
<i>Escherichia coli</i>	R < 14 C ≥ 14	x	R < 11 C ≥ 11	x
<i>Staphylococcus spp.</i>	R	R < 18 C ≥ 18	x	R < 19 C ≥ 22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	x	x	x	x

Testovaná antibiotika: AMX30 = amoxicilin 30 µg; ERY15 = erytromycin 15 µg; NTF 100 = nitrofurantoin 100 µg; TET30 = tetracyklin 30 µg; x = dané antibiotikum nebyly ve směrnici EUCAST uvedeny breakpointy, R = rezistence; C = citlivost

Tabulka 5: Stanovení citlivosti/rezistence k daným antibiotikům

Bakteriální kmen	AMX30	ERY15	NTF100	TET30
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224)	-	-	x	-
<i>Escherichia coli</i> (CCM 3954)	C	-	C	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4223)	R	C	x	C
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (CCM 7221)	R	x	x	C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955)	-	-	-	-

Testovaná antibiotika: AMX30 = amoxicilin 30 µg; ERY15 = erytromycin 15 µg; NTF 100 = nitrofurantoin 100 µg; TET30 = tetracyklin 30 µg; R = rezistentní; C = citlivý; x = antibiotikum nebylo testováno; - = nelze vyhodnotit

5.3 Identifikace bakterií pomocí metody MS MALDI - TOF

Pomocí metody MS MALDI-TOF byly ověřeny všechny testované bakteriální kmeny použité v experimentální části práce.

5.4 Stanovení antimikrobiální a antibiofilmové aktivity látek

V experimentální části bakalářské práce byla stanovena antimikrobiální aktivita testovaných antibiotik a látek, obsahujících měď, a resveratrolu. Hodnota MIC byla zjištěna mikrodiluční metodou. Přeočkováním na krevní agar bylo zjištěno, zda se jedná o bakteriostatickou nebo bakteriocidní látku.

Největší antimikrobiální účinky vykazovalo antibiotikum tetracyklin, které u všech testovaných bakteriálních kmenů dosahovalo nejnižších hodnot MIC a MBS, kromě bakterie *Enterococcus faecalis* (CCM 4224). U této bakterie nižších hodnot MIC a MBS dosahoval amoxicilin. Nejúčinnější bakteriocidní působení bylo zaznamenáno u tetracyklinu u bakterie *E. coli* (CCM 3954), kde hodnota MBC byla 1 µg/ml.

Z testovaných látek, obsahující měď, největší antimikrobiální aktivitu u všech kmenů vykazoval síran měďnatý. Další účinnou látkou byl oxid měďnatý, kterých u grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) dosahoval stejných hodnot MIC jako síran

měďnatý. U gramnegativní bakterie *E. coli* (CCM 3954) byla účinná také nano měď. Resveratrol byl v testované koncentraci pro všechny testované bakteriální kmeny neúčinný. Látky nano měď a oxid měďnatý nepůsobily v testované koncentraci na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955).

Antibiofilmová aktivita testovaných antibiotik a látek byla provedena za použití modifikované Christensenovy metody. U bakterie *E. coli* (CCM 3954) bylo při testování zjištěno, že tato bakterie neroste ve formě biofilmu.

Byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace, která zabránila růstu biofilmu (MBIC). Při testování látek, obsahující měď, byla u všech bakteriálních kmenů stejná a dosahovala koncentrace 320 µg/ml. Výjimkou byly bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955) a *Staphylococcus aureus* (CCM 4223), kde hodnota MBIC odpovídala 640 µg/ml. U *Pseudomonas aeruginosa* byla tato hodnota dosažena u oxidu měďnatého a u *Staphylococcus aureus* u oxidu měďnatého a také síranu měďnatého. Látka resveratrol sice nevykazovala v testované koncentraci žádný antimikrobiální účinek, ale u všech testovaných bakteriálních kmenů vykazovala schopnost inhibovat růst biofilmu při koncentraci 320 µg/ml.

Z testovaných antibiotik byl neúčinnější tetracyklin, u nějž byly naměřeny nejnižší hodnoty MBIC u všech testovaných bakteriálních kmenů, vyjma bakterie *Enterococcus faecalis* (CCM 4224). U této bakterie byla nejnižší hodnota MBIC naměřena u amoxicilinu.

Výsledky testování antimikrobiální a antibiofilmové aktivity v jednotkách koncentrace µg/ml jsou shrnuty v tabulce 6–7.

Tabulka 6: Stanovení citlivosti k antibiotikům v testované koncentraci 256 – 0,0078 µg/ml.

Bakteriální kmen	Antibiotikum	MIC [µg/ml]	MBS [µg/ml]	MBC [µg/ml]	MBIC [µg/ml]
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224)	Amoxicilin	0,25	0,25	-	0,25
	Erytromycin	0,5	0,5	128	0,5
	Nitrofurantoin	8	-	8	8
	Tetracyklin	16	16	64	16
<i>Escherichia coli</i> (CCM 3954)	Amoxicilin	2	2	4	-
	Erytromycin	32	-	32	-
	Nitrofurantoin	2	-	2	-
	Tetracyklin	0,25	0,25	1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4223)	Amoxicilin	0,5	0,5	>256	0,5
	Erytromycin	0,5	0,5	256	0,5
	Nitrofurantoin	16	-	16	2
	Tetracyklin	0,25	0,25	>256	0,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (CCM 7221)	Amoxicilin	4	-	4	4
	Erytromycin	>256	>256	>256	>256
	Nitrofurantoin	32	32	64	16
	Tetracyklin	1	1	>256	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955)	Amoxicilin	>256	-	>256	128
	Erytromycin	128	128	>256	128
	Nitrofurantoin	>256	-	>256	128
	Tetracyklin	8	8	128	8

MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBS = minimální bakteriostatická koncentrace; MBC = minimální bakteriocidní koncentrace; MBIC = minimální inhibiční koncentrace, zabraňující růstu biofilmu

Tabulka 7: Stanovení citlivosti ke sloučeninám mědi a resveratrolu v testované koncentraci 2560 – 0,0078 µg/ml.

Bakteriální kmen	Látka	MIC [µg/ml]	MBS [µg/ml]	MBC [µg/ml]	MBIC [µg/ml]
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224)	Cu	640	-	640	320
	CuO	2560	-	>2560	320
	CuSO ₄	320	-	320	320
	resveratrol	>2560	>2560	>2560	320
<i>Escherichia coli</i> (CCM 3954)	Cu	320	-	320	-
	CuO	2560	-	2560	-
	CuSO ₄	320	-	320	-
	resveratrol	>2560	>2560	>2560	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4223)	Cu	1280	1280	>2560	320
	CuO	640	640	2560	640
	CuSO ₄	640	-	640	640
	resveratrol	>2560	>2560	>2560	320
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (CCM 7221)	Cu	1280	-	1280	320
	CuO	1280	1280	2560	320
	CuSO ₄	800	-	800	320
	resveratrol	>2560	>2560	>2560	320
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955)	Cu	>2560	>2560	>2560	320
	CuO	>2560	>2560	>2560	640
	CuSO ₄	320	-	320	320
	resveratrol	>2560	>2560	>2560	320

MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBS = minimální bakteriostatická koncentrace; MBC = minimální bakteriocidní koncentrace; MBIC = minimální inhibiční koncentrace, zabraňující růstu biofilmu

5.5 Stanovení antimikrobiální aktivity mědi ve spojení s antibiotiky

Na základě výsledků antibiofilmové aktivity mědi byly zvoleny koncentrace 640 a 320 $\mu\text{g/ml}$, u kterých se testovalo, zda může měď ovlivnit působení antibiotik. Jelikož bylo dosaženo negativních výsledků v těchto koncentracích pro všechny testované bakterie vyjma *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955), byla následně koncentrace mědi snížena na 160 a 80 $\mu\text{g/ml}$. Při těchto koncentracích byla opět stanovena antimikrobiální aktivita mědi ve spojení s antibiotiky.

U bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955) při koncentracích mědi 640 a 320 $\mu\text{g/ml}$ bylo dosaženo stejných výsledků, které jsou shrnuty v tabulce 8. Výsledky testování jsou zobrazeny na obrázcích 7 – 9. U antibiotika tetracyklin bylo ve spojení s mědí dosaženo synergického účinku, kdy se hodnoty MIC, MBS i MBC posunuly o 2 řády dolů v porovnání s hodnotami dosažených při antimikrobiální aktivitě antibiotik. Z hodnot MIC a MBS 8 $\mu\text{g/ml}$ došlo k posunu na 2 $\mu\text{g/ml}$ a u hodnoty MBC z 128 $\mu\text{g/ml}$ na 32 $\mu\text{g/ml}$. U erytromycinu nastal také synergický účinek, ale změna byla pouze o 1 řád posunutí směrem dolů. U antibiotik amoxicilinu a nitrofurantoinu bylo dosaženo indiferentního účinku.

Při snížené koncentraci mědi 160 $\mu\text{g/ml}$ bylo dosaženo negativních výsledků u bakterie *Staphylococcus epidermidis* (CCM 7221) a *Enterococcus faecalis* (CCM 4224). U bakterie *E. coli* (CCM 3954) bylo docíleno stejného působení jako při testování antimikrobiálního účinku antibiotik. Stejného působení bylo docíleno také u antibiotik amoxicilinu, tetracyklinu u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955). U této bakterie došlo k synergickému účinku u erytromycinu, kde došlo k posunutí hodnot MIC a MBS o 1 řád dolů. U nitrofurantoinu ve spojení s mědí dochází k účinnějšímu bakteriocidnímu působení, neboť došlo k posunu hodnoty MBC na 32 $\mu\text{g/ml}$ z hodnoty 128 $\mu\text{g/ml}$.

U bakterie *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) bylo dosaženo při koncentraci mědi 160 $\mu\text{g/ml}$ synergického účinku u všech antibiotik, kromě nitrofurantoinu, kde bylo zaznamenáno stejné působení jako s pouhým antibiotikem. Vlivem mědi působí antibiotika bakteriocidně. Výsledky v jednotkách $\mu\text{g/ml}$ jsou zaznamenány v tabulce 10.

Shodné výsledky, jako při testování mědi o koncentraci 160 µg/ml, byly dosaženy také u koncentrace mědi 80 µg/ml, vyjma bakterie *Staphylococcus aureus* (CCM 4223). Zde výsledky dosáhly stejného působení jako při testování antimikrobiálního účinku antibiotik.

Změna nastala pouze v bakteriocidním působení tetracyklinu na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955), kde byl pozorován indiferentní účinek. Výsledky jsou ukázány v tabulce 9.

Tabulka 8: Výsledky stanovení citlivosti antibiotik ve spojení s mědí o koncentracích 320 a 640 µg/ml pro bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955). Synergický účinek je zvýrazněn tučně.

Bakteriální kmen	Látka + Cu	MIC [µg/ml]	MBS [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955)	Amoxicilin + Cu	>256	>256	>256
	Erytromycin + Cu	64	64	256
	Nitrofurantoin + Cu	>256	>256	>256
	Tetracyklin + Cu	2	2	32

MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBS = minimální bakteriostatická koncentrace; MBC = minimální bakteriocidní koncentrace

Tabulka 9: Výsledky stanovení citlivosti antibiotik v spojení s mědí o koncentraci 80 µg/ml pro bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955). Synergický účinek je zvýrazněn tučně.

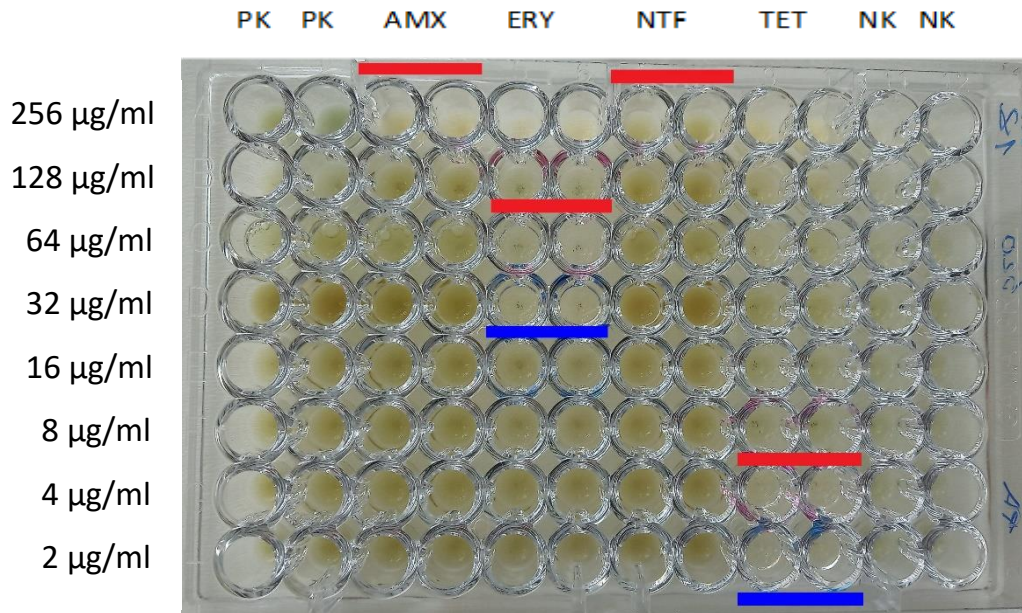
Bakteriální kmen	Látka + Cu	MIC [µg/ml]	MBS [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955)	Amoxicilin + Cu	Stejné působení jako s antibiotiky		
	Erytromycin + Cu	64	64	-
	Nitrofurantoin + Cu	Stejné působení jako s antibiotiky		
	Tetracyklin + Cu	8	8	128

MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBS = minimální bakteriostatická koncentrace; MBC = minimální bakteriocidní koncentrace

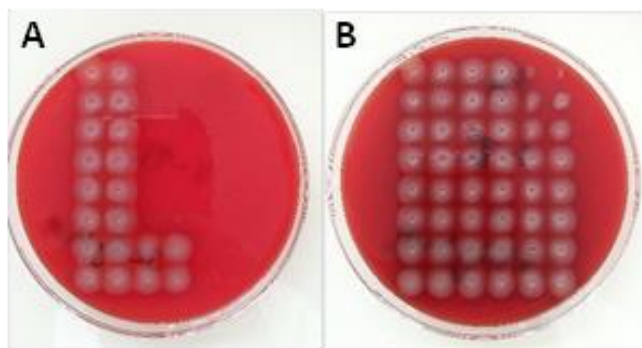
Tabulka 10: Výsledky stanovení citlivosti antibiotik v spojení s mědí o koncentraci 160 µg/ml pro bakterie *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) a *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955). Synergický účinek je zvýrazněn tučně.

Bakteriální kmen	Látka + Cu	MIC [µg/ml]	MBS [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4223)	Amoxicilin + Cu	0,25	-	0,25
	Erytromycin + Cu	0,0625	-	0,0625
	Nitrofurantoin + Cu	stejně působení jako s antibiotiky		
	Tetracyklin + Cu	0,03	-	0,03
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955)	Amoxicilin + Cu	stejně působení jako s antibiotiky		
	Erytromycin + Cu	64	64	-
	Nitrofurantoin +Cu	stejně působení jako s antibiotiky		
	Tetracyklin + Cu	8	8	32

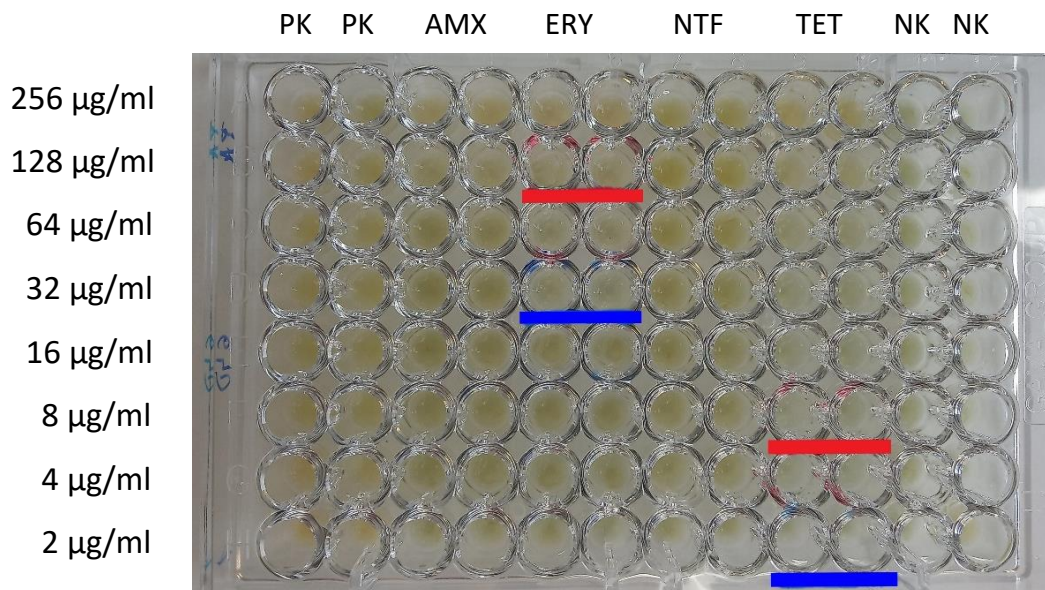
MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBS = minimální bakteriostatická koncentrace; MBC = minimální baktericidní koncentrace



Obrázek 7: Výsledky testování citlivosti antibiotik ve spojení s mědí o koncentraci 320 $\mu\text{g/ml}$ u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955). Červená čára značí hodnotu MIC antibiotika a modrá čára hodnotu MIC v kombinaci s mědí koncentraci 320 $\mu\text{g/ml}$. PK = pozitivní kontrola (BHI) s mědí o koncentraci 320 $\mu\text{g/ml}$; AMX = amoxicilin s mědí o koncentraci 320 $\mu\text{g/ml}$; ERY = erytromycin s mědí o koncentraci 320 $\mu\text{g/ml}$; NTF = nitrofurantoin s mědí o koncentraci 320 $\mu\text{g/ml}$; TET = tetracyklin s mědí o koncentraci $\mu\text{g/ml}$; NK = negativní kontrola (BHI).



Obrázek 8: Stanovení MBS a MBC u kmene *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955) na krevním agaru. (A) vyočkované sloupce 7 – 12 z mikrotitrační destičky vyobrazené na obrázku 7; (B) vyočkované sloupce 1 – 6 z mikrotitrační destičky vyobrazené na obrázku 9.

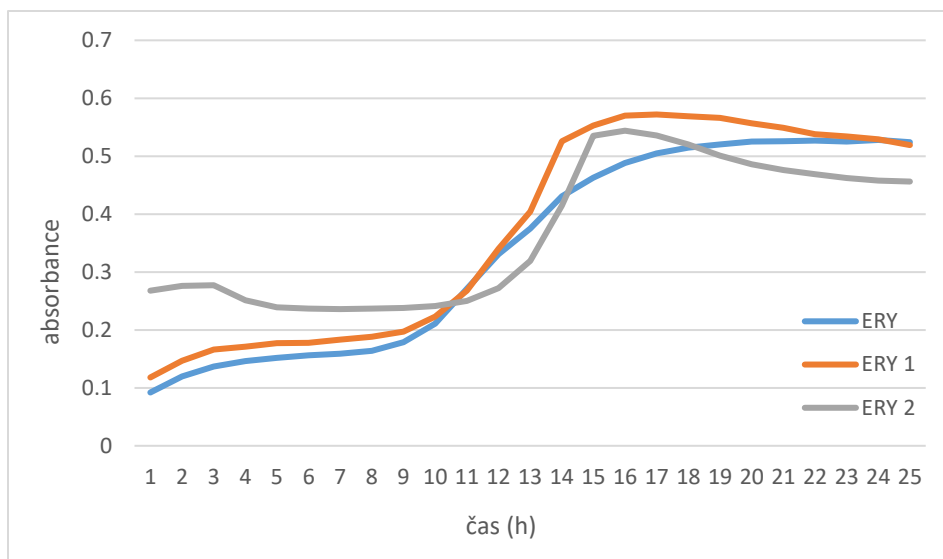


Obrázek 9: Výsledky testování citlivosti antibiotik ve spojení s mědí o koncentraci 640 µg/ml u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955). Červená čára značí hodnotu MIC antibiotika a modrá čára hodnotu MIC v kombinaci s mědí o koncentraci 640 µg/ml. PK = pozitivní kontrola (BHI) s mědí o koncentraci 640 µg/ml; AMX = amoxicilin s mědí o koncentraci 640 µg/ml; ERY = erytromycin s mědí o koncentraci 640 µg/ml; NTF = nitrofurantoin s mědí o koncentraci 640 µg/ml; TET = tetracyklin s mědí o koncentraci µg/ml; NK = negativní kontrola (BHI).

5.6 Růstová křivka

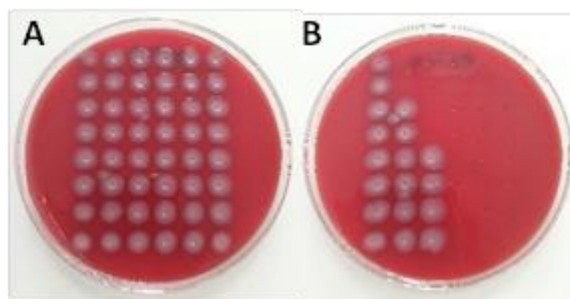
V závěru experimentální práce byl zkoumán efekt mědi ve spojení s vybranými antibiotiky na jednotlivé fáze růstové křivky u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955) a *Staphylococcus aureus* (CCM 4223), které vykazovaly synergický účinek antibiotik ve spojení s mědí (obrázek 10 – 13, tabulka 11).

Antibiotikum erytromycin ve spojení s mědí o koncentraci 160 µl/ml způsobilo u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* prudší nárůst exponenciální fáze. Při zvýšení koncentrace mědi na 320 µl/ml došlo ve spojení s erytromycinem k prodloužení *lag* fáze růstu o 3 hodiny (graf 1). V případě tetracyklinu ve spojení s mědí došlo u obou koncentrací k prodloužení *lag* fáze o 2 hodiny.

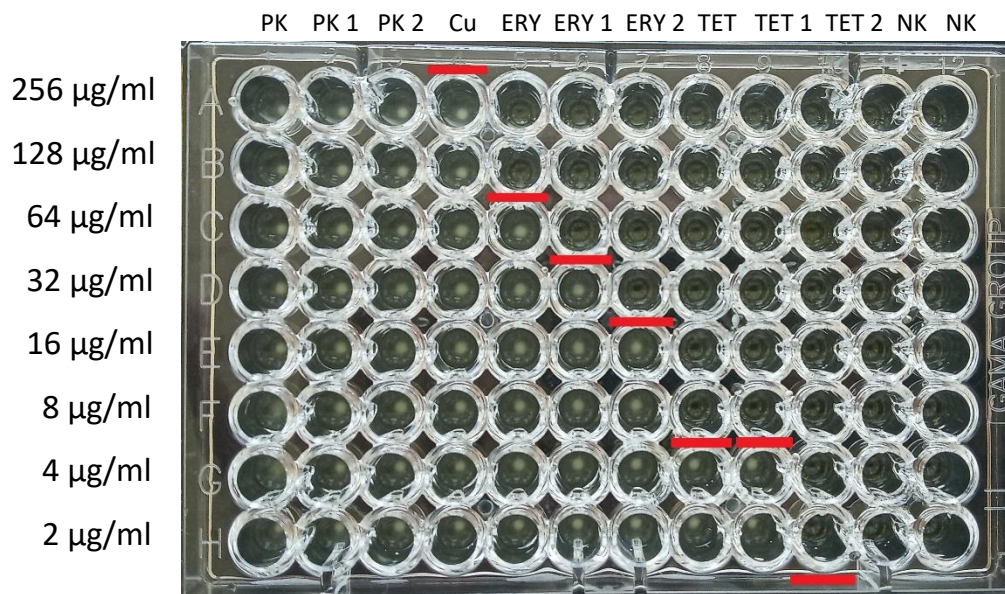


Graf 1: Vliv mědi o koncentracích 160 µl/ml a 320 µl/ml ve spojení s antibiotikem erytromycinem na jednotlivé fáze růstové křivky bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955) v závislosti na čase. ERY = erytromycin; ERY 1 = erytromycin + měď o koncentraci 160 µg/ml; ERY 2 = erytromycin + měď o koncentraci 320 µg/ml.

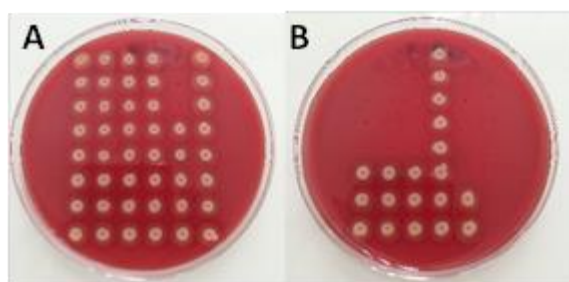
Vlivem mědi o koncentraci 160 µg/ml a amoxicilinu došlo u bakterie *Staphylococcus aureus* (CCM 4232) k prudšímu nárůstu exponenciální fáze. U zbývajících testovaných antibiotik – erytromycinu, nitrofurantoinu a tetracyklinu docházelo ke zpomalení nástupu exponenciální fáze. V případě tetracyklinu bylo prodloužení *lag* fáze až o 9 hodin.



Obrázek 10: Stanovení MBS a MBC u kmene *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955) na krevním agaru. (A) vyočkované sloupce 1 – 6 z mikrotitrační destičky vyobrazené na obrázku 11; (B) vyočkované sloupce 7 – 12 z mikrotitrační destičky vyobrazené na obrázku 11.

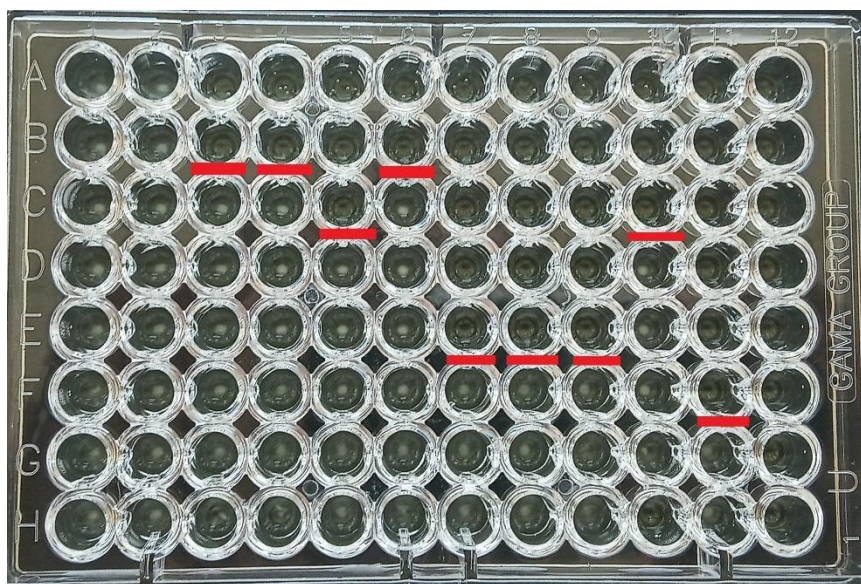


Obrázek 11: Hodnoty MIC zobrazené na mikrotitrační destičce pro bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955) při stanovení růstové křivky. PK = pozitivní kontrola (BHI); PK 1 = pozitivní kontrola (BHI + měď o koncentraci 160 µg/ml); PK 2 = pozitivní kontrola (BHI) + měď o koncentraci 320 µg/ml; Cu = měď; ERY = erytromycin; ERY 1 = erytromycin + měď o koncentraci 160 µg/ml; ERY 2 = erytromycin + měď o koncentraci 320 µg/ml; TET = tetracyklin; TET 1 = tetracyklin + měď o koncentraci 160 µg/ml; TET 2 = tetracyklin + měď o koncentraci 320 µg/ml; NK = negativní kontrola (BHI).



Obrázek 12: Stanovení MBS a MBC u kmene *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) na krevním agaru. (A) vyočkované sloupce 1 – 6 z mikrotitrační destičky vyobrazené na obrázku 13; (B) vyočkované sloupce 7 – 12 z mikrotitrační destičky vyobrazené na obrázku 13.

PK PK 1 Cu AMX AMX 1 ERY ERY 1 NTF NTF 1 TET TET 1 NK



Obrázek 13: Hodnoty MIC pro bakterii *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) při stanovení růstové křivky. Tučně zvýrazněné látky byly testovány při koncentracích 1 – 0,0075 $\mu\text{g/ml}$ a ostatní v koncentračním rozmezí 256 – 2 $\mu\text{g/ml}$. Číselné hodnoty MIC jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce 11. PK = pozitivní kontrola (BHI); PK 1 = pozitivní kontrola (BHI + měď o koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$); Cu = měď; AMX = amoxicilin; AMX 1 = amoxicilin + měď o koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$; ERY = erytromycin; ERY 1 = erytromycin + měď o koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$; NTF = nitrofurantoin; NTF 1 = nitrofurantoin + měď o koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$; TET = tetracyklin; TET 1 = tetracyklin + měď o koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$; NK = negativní kontrola (BHI).

Tabulka 11: Číselné hodnoty MIC získané při stanovení růstové křivky *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) z destičky na obrázku 13.

Testovaná látka	Hodnota MIC [$\mu\text{g/ml}$]
Cu	128
AMX	0,5
AMX 1	0,25
ERY	0,25
ERY 1	0,06
NTF	16
NTF 1	16
TET	0,25
TET 1	0,03

PK = pozitivní kontrola (BHI); PK 1 = pozitivní kontrola (BHI + měď o koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$);
Cu = měď; AMX = amoxicilin; AMX 1 = amoxicilin + měď o koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$;
ERY = erytromycin; ERY 1 = erytromycin + měď o koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$;
NTF = nitrofurantoin; NTF 1 = nitrofurantoin + měď o koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$;
TET = tetracyklin; TET 1 = tetracyklin + měď o koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$; NK = negativní kontrola (BHI).

6 Diskuze

V bakalářské práci byla zkoumána antimikrobiální aktivita nano mědi (100 nm), nano oxidu měďnatého (15 – 50 nm), síranu měďnatého a resveratrolu. Využitím mikrodiluční metody byla zjištěna hodnota minimální inhibiční koncentrace, která je schopna inhibovat růst a množení bakterií. Dále byl zjištěn bakteriostatický nebo bakteriocidní efekt testované látky.

Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla zaznamenána u síranu měďnatého, u nějž byly nejnižší hodnoty MIC u všech testovaných bakteriálních kmenů. U gramnegativních bakterií byla hodnota MIC 320 $\mu\text{g/ml}$ a u grampozitivních se pohybovala od 320 – 800 $\mu\text{g/ml}$. Na všechny testované bakterie působil síran měďnatý bakteriocidně.

Ve studii Benhalima a kol. (2019) bylo pomocí mikrodiluční metody zkoumáno antibakteriální působení síranu měďnatého na nosokomiální patogeny izolované z klinických vzorků. Mezi testovanými byly mimo jiné i *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *E. coli*. Hodnota MIC byla pro kmeny *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Pseudomonas aeruginosa* 400 $\mu\text{g/ml}$. Ve studii bylo testováno 7 kmenů *E. coli*, u nichž byla naměřena hodnota MIC 100 – 400 $\mu\text{g/ml}$. Odlišné hodnoty MIC v porovnání s experimentální částí této bakalářské práce jsou dány rozdílným rozsahem koncentrace, která byla vytvořena dvojkovým ředěním.

Nano oxid měďnatý působil při hodnotě 2560 $\mu\text{g/ml}$ bakteriocidně na grampozitivní i gramnegativní bakterie testované v experimentální části. Účinněji však působily nanočástice mědi, kde se hodnota MBC pohybovala v rozmezí 320 – 2560 $\mu\text{g/ml}$. Nejúčinnější působení bylo zaznamenáno na gramnegativní *E. coli*. U kmene *Pseudomonas aeruginosa* nebylo při testované koncentraci zaznamenáno žádné antibakteriální působení.

Studie Ren a kol. (2009), která srovnávala působení nanočástic mědi a oxidu měďnatého (20 – 95 nm), se svými výsledky zásadně nelišila od získaných hodnot. Na kmen *Pseudomonas aeruginosa* účinkovaly nanočástice oxidu měďnatého bakteriocidně až při koncentraci 5000 $\mu\text{g/ml}$.

Výsledky práce ukazují, že resveratrol nevykazoval v testované koncentraci žádnou antimikrobiální aktivitu na testované bakteriální kmeny. Avšak ve studii Liu a kol. (2016) byl zaznamenán antimikrobiální efekt na bakterii *E. coli* a *Staphylococcus aureus*. U kmene *E. coli*

byla stanovena hodnota MIC 400 $\mu\text{g/ml}$ a u kmene *Staphylococcus aureus* 150 $\mu\text{g/ml}$. Rozdílné hodnoty minimálních inhibičních koncentrací mohou být způsobeny použitím odlišných bakteriálních kmenů s jinou citlivostí na resveratrol než v této práci.

Dále byla také zkoumána antibiofilmová aktivita pomocí modifikované Christensenovy metody. Bakterie, které jsou schopny růst ve formě biofilmu, se stávají více odolnými k terapeutické léčbě antibiotiky a dalšími antimikrobiálními látkami. Uvádí se, že bakterie rostoucí ve formě biofilmu jsou 10 – 1000 krát odolnější vůči účinkům antimikrobiálních látek, než planktonní bakterie. (Mah a kol. 2001) Proto je narušení či inhibice biofilmu důležitá, aby antimikrobiální látka lépe pronikla k virulentní bakterii.

Ve velké části výsledků antibiofilmové aktivity nano mědi, nano oxidu měďnatého, síranu měďnatého a resveratrolu byla dosažena minimální koncentrace, která inhibuje růst biofilmu, 320 $\mu\text{g/ml}$. Pouze u nano oxidu měďnatého u bakterie *Staphylococcus aureus* a síranu měďnatého u bakterie *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, byla potřebná dvojnásobná koncentrace, tedy 640 $\mu\text{g/ml}$. U bakterie *E. coli* bylo prokázáno, že tento kmen neroste ve formě biofilmu. Získané výsledky nelze srovnat s jinými studiemi, neboť nebyla provedena studie, která by se zabývala vlivem nanočástic mědi na růst biofilmu s využitím Christensenovy metody.

Ghasemian a kol. (2015) se zabývali hodnocením efektu nanočástic mědi na inhibici biofilmu u *Pseudomonas aeruginosa* a *Listeria monocytogenes*. Vliv mědi byl zkoumán na skleněném a ocelovém povrchu potaženém měděnými částicemi. Hodnoceno bylo množství životaschopných bakteriálních buněk. Povrchy upravené nanočásticemi mědi významně snížily mikrobiální počet a tvorbu biofilmu. (Ghasemian a kol. 2015)

Výsledky antibiofilmové aktivity, při níž byly zjištěny dvě koncentrace, které inhibují růst biofilmu, byly určující pro zvolení výchozích koncentrací testování vlivu nano mědi v kombinaci s vybranými antibiotiky.

Při testovaných koncentraci mědi 80, 160, 320 a 640 $\mu\text{g/ml}$ bylo dosaženo opakovaných negativních výsledků u některých bakterií s výjimkou kmene *Pseudomonas aeruginosa*, na který působily všechny koncentrace mědi ve spojení s antibiotiky. Negativní výsledky mohly

vzniknout vlivem mědi, která již při těchto koncentracích, byla schopna společně s antibiotiky usmrtit testované bakteriální kmeny.

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* se ve studii Ramyadevi a kol. (2012) jevila jako rezistentní k nanočásticím mědi, proto nebyly zaznamenány negativní výsledky. Doposud nebyly provedeny studie, zabývající se účinkem nanočástic mědi ve spojení s antibiotiky na bakteriální kmeny, proto nemohou být výsledky srovnány s dalšími studiemi.

Účinek nanočástic mědi není natolik prozkoumaný v porovnání například s nanočásticemi stříbra. Morones a kol. (2005) prokázali, že stříbrné nanočástice napadají současně více bakteriálních struktur a jsou účinné i na vysoce rezistentní bakteriální kmeny *Pseudomonas aeruginosa*. Velká výhoda stříbrných nanočástic je tedy v jejich vícestupňové působení. Doposud nebyla zaznamenána rezistence bakterií vůči stříbrným nanočásticím. Rezistence byla pozorována pouze u stříbra v iontové formě. (Silver, 2003)

Ve studii Panáček a kol. (2015) zkoumala vliv spojení nanočástic stříbra o velikosti 26 nm a antibiotik s odlišným mechanismem účinku na bakterie *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Hodnoty MIC byly zjištěny mikrodiluční metodou, která je více vhodná a spolehlivější než difúzní metoda. Silný synergický efekt antibiotik s nanočásticemi stříbra byl prokázán ve velmi malých koncentracích, které nebyly cytotoxické pro savčí buňky. (Panáček a kol., 2015) V této studii byl použit stejný kmen bakterie *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) jako v bakalářské práci při zkoumání vlivu nanočástic mědi na účinek antibiotik. Největší citlivost na nanočástice stříbra prokázala právě tato bakterie, u které byl synergický účinek nejvyšší. Výsledky působení nanočástic stříbra a mědi v kombinaci s erytromycinem na bakterii *Staphylococcus aureus* jsou porovnány v tabulce 12.

Tabulka 12: Srovnání výsledků MIC nanočástice stříbra (26 nm) studie Panáček a kol. (2015) a nanočástice mědi (100 nm) použité v bakalářské práce na bakterii *Staphylococcus aureus* (CCM 4223).

	Panáček a kol. (2015)	Bakalářská práce
Nanočástice	Stříbro (26 nm)	Měď (100 nm)
Koncentrace [mg/ml]	2,5	160
Erytromycin [mg/ml]	0,125	0,5
Erytromycin + nanočástice [mg/ml]	0,00012	0,0625

Nanočástice stříbra mají lepší synergický efekt a vyžadují mnohonásobně nižší použité koncentrace nanočástic ve srovnání s nanočásticemi mědi.

Výsledky může také ovlivnit velikost použitých nanočástic. Velikost nanočástic stříbra byla 26 nm, přičemž u nanočástic mědi 100 nm. Studie Raghupathi a kol. (2011) uvedla, že na bakterii *Staphylococcus aureus* měly nanočástice oxidu zinečnatého různé bakteriální působení v závislosti na velikosti částice. Byly zkoumány částice o velikosti 12 – 212 nm, přičemž nejlepších výsledků dosáhly nejmenší testované částice.

Silný synergický účinek tetracyklinu a nanočástic stříbra byl zjištěn i u gramnegativní bakterie *Salmonella*. Při koncentraci antibiotika 8 a 16 μM a nanočástic stříbra 50 μM došlo až téměř k 100 % inhibici této bakterie. (Deng a kol., 2016)

Kovové nanočástice s antibakteriálními vlastnostmi mají velký potenciál využití ve farmacii a zdravotnických zařízeních, aby zabránily šíření infekce. (Bankier, 2019) Americká studie Bankier (2019) studovala synergický účinek tří kovových nanočástic. Jednalo se o nanočástice stříbra, mědi a karbidu wolfranu proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, které se řadí mezi běžné nemocniční patogeny. Kombinací všech kovových nanočástic o různých koncentracích, bylo dosaženo mnohonásobně lepších antimikrobiálních účinků na testované bakterie, než vykazovaly jednotlivé nanočástice samy o sobě. (Bankier, 2019)

7 Závěr

Teoretická část práce je zaměřená především na mechanismy antimikrobiální aktivity mědi a dále také na antimikrobiální aktivitu nanočástic mědi.

V experimentální části práce byly splněny všechny vytyčené cíle. Mikrodiluční metodou byla stanovena antimikrobiální aktivita testovaných látek.

Při průkazu, zda testovaná látka je schopna zabránit tvorbě biofilmu, byla použita modifikovaná Christensenova metoda. Bylo zjištěno, že zkoumané látky jsou schopny inhibovat růst biofilmu u všech bakteriálních kmenů o koncentraci 320 $\mu\text{g/ml}$ nebo 640 $\mu\text{g/ml}$ s výjimkou bakterie *E. coli*. U tohoto bakteriálního kmene nebyla prokázána schopnost růst ve formě biofilmu.

Na základě výsledků antibiofilmové aktivity mědi, byl zkoumán její vliv v kombinaci s antibiotiky na testované referenční bakteriální kmeny. Nejvýraznější vliv mělo spojení mědi s erytromycinem na bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, kdy ve všech testovaných koncentracích došlo k synergickému účinku.

Na závěr experimentální části práce bylo provedeno měření růstové křivky u bakterií *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, které vykazaly synergický účinek mědi ve spojení s antibiotiky. Zde bylo zjištěno, že vlivem mědi docházelo nejčastěji k prodloužení *lag* fáze nebo zpomalení nástupu exponenciální fáze růstové křivky.

Použitá literatura

- Abraham** E. P., Chain E. (1940) An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicilin. *Nature* 3713, 837
- Akhavan** O., Ghaderi E. (2010) Cu and CuO nanoparticles immobilized by silica thin films as antibacterial materials and photocatalysts. *Surface & Coating Technology* 205, 219–223
- Bankier** C., Matharu R. K., Cheong Y. K., Ren G. G., Cloutman-Green E., Ciric L. (2019) Synergistic Antibacterial Effects of Metallic Nanoparticle Combinations. *Sci Rep* 9, dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-52473-2#citeas>, staženo 9. 3. 2020
- Benhalima** L., Amri S., Bensouilah M., Ouzrout R. (2019) Antibacterial effect of copper sulfate against multi-drug resistant nosocomial pathogens isolated from clinical samples. *Pak J Med Sci* 35(5), 1322–1328
- Blázquez** J., Oliver A., Gómez - Gómez J. M. (2002) Mutation and Evolution of Antibiotic Resistance: Antibiotics as Promoters of Antibiotic Resistance? *Current Drug Targets* 3, 345–349
- Borkow** G. (2012) Using Copper to Fight Microorganisms. *Current Chemical Biology* 6(2), 93–103
- Boyce** J. M. (2007) Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection, *Journal of Hospital Infection* 65 (S2), 50–54
- Carlson** C., Hussain S. M., Schrand A. M., Braydich-Stolle L. K., Hess K. L., Jones R. L., Schlager J. J. (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 112 (43), 13608–13619
- Cook** L. C., Dunny G. M. (2014) The influence of biofilms in the biology of plasmids. *Microbiol Spectr* 2(5), dostupné z <https://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.PLAS-0012-2013>, staženo 10. 12. 2019
- Das** D., Nath B. CH., Phukon P., Dolui S. K. (2012) Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behaviour of CuO nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 101, 430–433
- Delcour** A. (2009) Outer membrane permeability and antibiotics resistance. *Biochim Biophys Acta* 1794(5), 808–816
- Deng** H., McShan D., Zhang Y., Sinha S. S., Arslan Z., Ray P. C., Yu H. (2016) Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics. *Environ Sci Technol.* 50(6), 8840–8848
- Donlan** R. (2002) Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8(2), 881–890
- Domek** M. J., LeChevallier M. W., Cameron S. C., McFeters G. A. (1984) Evidence for the Role of Copper in the Injury Process of Coliform Bacteria in Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology* 48(2), 289–293
- Fu** P. P., Xia Q., Hwang H. M., Ray P. C., Yu H. (2014) Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal.* 22(1) 64–75
- Ghasemian** E., Naghoni A., Rahvar H., Kialha M., Tabaraie B. (2015) Evaluating the Effect of Copper Nanoparticles in Inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Jundishapur J Microbiol.* 8(5) dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4537522/>, staženo 6. 3. 2020

- Grass G.**, Rensing Ch., Solioz M. (2011) Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Applied and Environmental Microbiology* 77(5), 1541–1547
- Griffitt R. J.**, Luo J., Gao J., Bonzongo J. C., Barber D. S. (2008) Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem* 27(9), 1972–1978
- Goering R. V.**, Dockrell H. M., Zuckerman M. A. a Chiodini P. L. a Julák, J. (2016) *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, str. 463. ISBN 978–807–3879–280
- Gopalakrishnan K.**, Ramesh C., Rangunathan V., Thamilselvan M. (2012) Antibacterial activity od Cu₂O nanoparticles on *E. coli* synthesided from *Tridas procumbens* leaf extract and surface coating with polyaniline. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 7(2), 833–839
- Hemeg H.** (2017) Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *Int J Nanomedicine* 12, 8211–8225
- Hong R.**, Kang T. Y., Michels C. A., Gadura N. (2012) Membrane Lipid Peroxidation in Copper Alloy - Mediated Contact Killing of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 78(6), 1776–1784
- Ingle A.**, Gade A., Pierrat S., Sönnichsen C., Rai M. (2008) Mycosynthesis of Silver Nanoparticles Using the Fungus *Fusarium acuminatum* and its Activity Against Some Human Pathogenic Bacteria. *Current Nanoscience* 4, 141–144
- Jeong J.**, Kim S.H., Lee S., Lee D.K., Han Y., Jeon S., Cho W.S. (2018) Differential Contribution of Constituent Metal Ions to the Cytotoxic Effects of Fast-Dissolving Metal-Oxide Nanoparticles. *Front. Pharm.* 9, 1–10
- Konieczny J.**, Rdzawski Z. (2012) Antibacterial properities of copper and its alloys. *Archives of Materials Science and Engineering* 56(2), 53–60
- Liochev S. I.**, Fridovich I. (2002) The Haber-Weiss cycle - 70 years later: an alternative view. *Redox Report* 7(1), 55–57
- Liu Y.**, Zhou J., Qu Y., Yang X., Shi G., Wnag X., Hong Y., Drlica K., Zhao X. (2016) Resveratrol Antagonizes Antimicrobial Lethality and Stimulates Recovery of Bacterial Mutants. *PLoS One* 11(4) dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4821490/pdf/pone.0153023.pdf>, staženo 29. 2. 2020
- Lloyd D. R.**, Phillips D. H. (1999) Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and nickel (II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutation Research* 424, 23–26
- Macomber L.**, Rensing Ch., Imlay J. A. (2007) Intracellular Copper Does Not Catalyze the Formation of Oxidative DNA Damage in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 189(5), 1616–1626
- Maity P.**, Bepari M., Pradhan A., Baral R., Roy S., Maiti Choudhury S. (2018) Synthesis and characterization of biogenic metal nanoparticles and its cytotoxicity and anti-neoplasticity through the induction of oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 161, 111–120

- May T., Ito A., Okabe S.** (2009) Induction of multidrug resistance mechanism in *Escherichia coli* biofilms by interplay between tetracycline and ampicillin resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(11), 4628–4639.
- Mah T., O’Toole G.** (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9(1), 34–39
- McMurry L., Petrucci R. E., Levy S.** (1980) Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(7), 3974–3977
- Meyer T. J., Ramlall J., Thu P., Gadura N.** (2015) Antimicrobial Properties of Copper in Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Science* 9(3), 274–278
- Moran J. W., Smith T. L., Witter L. D.** (1976) Effect of Potential Water Pollutants and Enzyme Inhibitors on an Automated Rapid Test for *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 32(4), 645–646
- Morones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramírez J. T., Yacaman M. J.** (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16(10), 2346–2353
- Nan L., Yang W., Liu Y., Xu H., Li H., Lü M., Yang K.** (2008) Antibacterial Mechanism of Copper-bearing Antibacterial Stainless Steel against *E. coli*. *J. Mater. Sci. Technol.* 24(2), 197–201
- Otto M.** (2008) Staphylococcal Biofilms. *Curr Topp Microbiol Immunol* 322, 207–228
- Panáček A., Smékalová M., Kilianová M., Pucek R., Bogdanová K., Večeřová R., Kolář M., Havrdová M., Plaza G. A., Chojniak J., Zbořil R., Kvítek L.** (2016) Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect. *Molecules* 21(1), dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6273824/>, staženo 18. 2. 2020
- Poole K.** (2002) Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology* 92 (1), 55S–64S
- Quinn J. P., Dudek E. J., DiVincenzo C. A., Lucks D. A., Lerner S. A.** (1986) Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis.* 154(2), 289–294
- Raghupathi K. R., Koodali R. T., Manna A. C.** (2011) Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. *Langmuir* 27, 4020–4028
- Ramyadevi J., Jeyasubramanian K., Marikani A., Rajakumar G., Rahuman A. A.** (2011) Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters* 71, 114–116
- Ren G., Hu D., Cheng E., Vargas-Reus M. A., Reip P., Allaker R. P.** (2009) Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial application. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33, 587–590
- Reygaert W. C.** (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology* 4(3), 481–501
- Römling U., Balsalobre C.** (2012) Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine* 272(6), 541–561
- Ruparelia J.P., Chatterjee A.K., Duttagupta S.P., Mukherji S.** (2007) Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater* 4(3), 707–716

- Růžička** F., Holá V., Votava M., Tejkalová R., Horvát R., Heroldová M., Woznicová V. (2004) Biofilm Detection and the Clinical Significance of *Staphylococcus epidermidis* Isolates. *Folia Microbiol.* 49(5), 596–600
- Salgado** C. D., Sepkowitz K. A., John J., Cantey J. R., Attaway H. H., Freeman K. D., Sharpe P. A., Michels H. T., Schmidt M. G. (2013) Copper Surfaces Reduce the Rate of Healthcare-Acquired Infection in the Intensive Care Unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 34(5), 479–486
- Schmidt** M. G., Attaway H. H., Sharpe P. A., John J., Sepkowitz K. A., Morgan A., Fairey S. E., Singh S., Steed L. L., Cantey J. R., Freeman K. D., Michels H. T., Salgado C. S. (2012) Sustained Reduction of Microbial Burden on Common Hospital Surfaces through Introduction of Copper. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (7), 2217–2223
- Silver** S. (2003) Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 341–353
- Sondi** I., Salopek-Sondi B. (2004) Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 272(1), 177–182
- Stoimenov** P. K., Klinger R. L., Marchin G. L., Klabunde K. J. (2002) Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *Langmuir* 18, 6679–6686
- Thurman** R. B., Greba Ch. P. (1989) The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Critical Reviews in Environmental Control* 18(4), 295–313
- Valko** M., Morris H., Cronin M. T. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem* 12(10), 1161–1208
- Vaara** M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiology Reviews* 56(3), 395–411
- Vu** B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E. P. (2016) Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules* 14(2), 2535–2554
- Votava** M. (2001) *Lékařská mikrobiologie obecná*. 1. vyd. Brno: Neptun, str. 235, 239. ISBN 8090289622.
- Votava** M., Broukal Z. a Vaněk J. (2007) *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře*. Brno: Neptun, str. 163 ISBN 978–80–86850–03–0.
- Warnes** S. L., Green S. M., Michels H. T., Keevil C. W. (2010) Biocidal efficacy of copper alloys against pathogenic enterococci involves degradation of genomic and plasmid DNAs. *Applied and Environmental Microbiology* 76(16), 5390–5401
- Weisblum** B. (1995) Erythromycin Resistance by Ribosome Modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(3), 577–585
- Wright** G. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 1451–1470
- Yoon** K.Y., Byeon J.H., Park J.H., Hwanf J. (2007) Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment* 373, 572–575