



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta zdravotnických studií ■

Vliv ultrazvuku na dva různé typy bakteriálních kultur

Bakalářská práce

Studijní program: B3944 – Biomedicínská technika
Studijní obor: 3901R032 – Biomedicínská technika
Autor práce: **Monika Frumarová**
Vedoucí práce: RNDr. Alena Ševců, Ph.D.





Effect of ultrasound on two different bacterial species

Bachelor thesis

Study programme: B3944 – Biomedical Technology
Study branch: 3901R032 – Biomedical Technology
Author: **Monika Frumarová**
Supervisor: RNDr. Alena Ševců, Ph.D.





Zadání bakalářské práce

Vliv ultrazvuku na dva různé typy bakteriálních kultur

Jméno a příjmení: **Monika Frumarová**
Osobní číslo: D15000103
Studijní program: B3944 Biomedicínská technika
Studijní obor: Biomedicínská technika
Zadávající katedra: Fakulta zdravotnických studií
Akademický rok: **2016/2017**

Zásady pro vypracování:

Cíle práce:

Cílem práce je zjistit vliv působení ultrazvuku na bakteriální kultury. Bude určena frekvence a výkon ultrazvuku, které mohou bakterie stimulovat a naopak ty, které jsou pro ně fatální. Porovná se účinek ultrazvuku na gram-negativní a gram-pozitivní bakterie. Součástí práce bude popis použitých kmenů bakterií a jejich kultivace, rešerše vlivu ultrazvuku na bakterie a popis principu ultrazvuku.

Teoretická východiska (včetně výstupu z kvalifikační práce):

Je prokázáno, že ultrazvuk má určitý vliv na bakterie. V práci chci zjistit, jak se liší vliv ultrazvuku na zástupce gram-negativních a gram-pozitivních bakterií a při jakých podmínkách (frekvence a výkon ultrazvuku, případně teplota).

Výzkumné předpoklady / výzkumné otázky:

Jaký vliv má frekvence/výkon ultrazvuku na bakterie?

Liší se vliv ultrazvuku na gram-negativní a gram-pozitivní bakterie?

Jaký vliv má tvar bakterií (tyčinky versus koky) na jejich citlivost na ultrazvuk?

Může ultrazvuk stimulovat růst bakterií?

Metoda:

Kultivace dvou typů bakteriálních kultur (*Escherichia coli* a *Staphylococcus sp.*). Ultrazvuková lázeň. Stanovení počtu KTJ. Fluorescenční mikroskopie.

Technika práce, vyhodnocení dat:

Nejprve se nakultivuje dostatečné množství bakterií a nastaví se hustota suspenze pomocí přístroje ERBA DENSI-LA-METER II. Bakteriální kultury budou vystavené působení ultrazvuku v ultrazvukových lázních s různými parametry. Dále se bakterie budou kultivovat na tuhém kultivačním mediu v Petriho miskách v inkubátoru buněčných kultur IncuCell. U každého vzorku se spočítají kolonie tvořící bakterie (KTJ). Vliv ultrazvuku na bakterie bude vyhodnocený také pomocí fluorescenční mikroskopie (AxioImager Zeiss) a stanovení poměru živých a mrtvých buněk pomocí LIVE/DEAD Cell Viability Assay kit. Následně se z výsledných dat vytvoří grafy (např. Excel) a statisticky vyhodnotí.

Místo a čas realizace výzkumu:

Výzkum bakalářské práce bude realizován v laboratořích oddělení pro nanomateriály v přírodních vědách na Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace.

Vzorek:

Bakterie *Staphylococcus au.* a *Escherichia coli*.

**Seznam odborné literatury:**

1. Pharma Reports: Klinicky významné bakterie. Vyd. 1. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-588-6.
2. KAPRÁLEK, František. Základy bakteriologie. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-811-5.
3. GOERING, Richard V. a kol. Mimsova lékařská mikrobiologie. Vyd. 5. Praha: Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.
4. JULÁK, Jaroslav. Úvod do lékařské bakteriologie. Vyd. 2. Praha: Karolinum, 2015. Univerzita Karlova. ISBN 978-80-246-3210-0.
5. SCHINDLER, Jiří. Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. Vyd.2. Praha: Grada, 2014. Sestra. ISBN 978-80-247-4771-2.
6. MORABITO, Stefano. Pathogenic escherichia coli: molecular and cellular microbiology. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2014. 1 online resource. ISBN 978-19-082-3099-7.
7. MORSTEIN, Vojtěch. Jiná publikační činnost. Lékařská fakulta Masarykovy univerzity [online]. Brno: Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, 2008-2017 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/vmornst/ultrazv.htm>
8. ČECH, Evžen a kol. Ultrazvuk v lékařské diagnostice a terapii. Praha: Avicenum, 1982.
9. HERCEG, Zoran a kol. The effect of high intensity ultrasound treatment on the amount of staphylococcus aureus and escherichia coli in milk. Food Technology and Biotechnology. 2012, 50(1), 46-52. ISSN 1330-9862. Dostupné také z: http://www.researchgate.net/publication/232786910_The_Effect_of_High_Intensity_Ultrasound_Treatment_on_the_Amount_of_Staphylococcus_aureus_and_Escherichia_coli_in_Milk
10. Densilameter II. Erba Group | Erba Lachema s.r.o. [online]. Brno: Erba Group, c2017 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <https://www.erbalachema.com/attachments/Densi-LA-Meter%20II-CZ+SK+EN+RU+PL.pdf>
11. Oživování kultur ze želatinových disků. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity [online]. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, 2011 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: http://www.sci.muni.cz/ccm/down/oziv_GD.pdf

Vedoucí práce:

RNDr. Alena Ševců, Ph.D.

Ústav nových technologií a aplikované informatiky

Datum zadání práce:

28. dubna 2017

Předpokládaný termín odevzdání:

30. dubna 2018

L. S.

prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA
děkanprof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA
děkan

V Liberci 30. listopadu 2017

Vážená paní
Monika Frumarová
č.p. 97
468 27 Nová Ves n/N

Vyřizuje/linka: Holá/485 353 738


V Liberci dne 6.4.2018
č.j.18/8515/015678

Vyjádření k žádosti o ponechání zadání a prodloužení termínu odevzdání bakalářské práce

Vážená paní Frumarová,

na základě Vaší žádosti ze dne 5.4.2018, zaevidované pod č.j.: 18/8515/015678, Vám sděluji, že **souhlasím** s ponecháním zadání bakalářské práce a s prodloužením termínu odevzdání do 30.4.2019.

S pozdravem


prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA
děkan

Technická univerzita v Liberci
Fakulta zdravotnických studií
Studentská 2, 461 17 Liberec 1



Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že texty tištěné verze práce a elektronické verze práce vložené do IS STAG se shodují.

15. 4. 2019

Monika Frumarová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Aleně Ševců, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za poskytnutí cenných rad, připomínek a vstřícnou spolupráci. Dále bych chtěla moc poděkovat Bc. Alici Břečkové za odbornou pomoc při experimentech prováděných v mikrobiologické laboratoři Oddělení pro nanomateriály v přírodních vědách, CXI. Mé poděkování také patří Prof. Mgr. Jiřímu Erhartovi, Ph.D. za zapůjčení dvou přístrojů, které byly využity ve výzkumné části práce. Velké poděkování také patří mé rodině za podporu během studia a při psaní této práce.

Anotace

Jméno a příjmení autora: Monika Frumarová

Instituce: FZS – Biomedicínská technika

Název práce: Vliv ultrazvuku na dva různé typy bakteriálních kultur

Vedoucí práce: RNDr. Alena Ševců, Ph.D.

Počet stran: 61

Rok obhajoby: 2019

Anotace: Cílem práce je zjistit vliv působení ultrazvuku na bakteriální kultury. Bude určena frekvence a výkon ultrazvuku, které mohou bakterie stimulovat a naopak ty, které jsou pro ně fatální. Porovná se účinek ultrazvuku na Gram-negativní a Gram-pozitivní bakterie. Součástí práce bude popis použitých kmenů bakterií a jejich kultivace, řešerše vlivu ultrazvuku na bakterie a popis principu ultrazvuku.

Klíčová slova: Ultrazvuk, Frekvence, Escherichia coli, Staphylococcus sp., Kultivace

Annotation

Name and surname: Monika Frumarová

Institution: FZS – Biomedical technology

Title: Effect of ultrasound on two different types of bacterial cultures

Supervisor: RNDr. Alena Ševců, Ph.D.

Pages: 61

Year: 2019

Annotation: The aim is to determine the influence of ultrasound treatment for bacterial culture. It will be determined frequency and power that can stimulate bacteria and vice versa frequency, which is fatal to them. The effect of ultrasound will be compared on Gram-negative and Gram-positive bacteria. Part of the work will be a description of the bacterial strains and their cultivation, research the effects of ultrasound on bacteria and a description of ultrasound.

Klíčová slova: Ultrasound, Frequency, Escherichia coli, Staphylococcus sp., Cultivation

Obsah

Seznam použitých zkratk	14
1 Úvod	15
2 Teoretická část	17
2.1 Ultrazvuk	17
2.1.1 Objev a vývoj ultrazvuku	17
2.1.2 Fyzikální podstata ultrazvuku	17
2.1.3 Vytváření ultrazvukového vlnění	20
2.1.4 Využití ultrazvuku	21
2.1.5 Účinky ultrazvuku na organismy	22
2.2 Metody studia účinků ultrazvuku na bakterie	24
2.2.1 Stanovení životaschopných buněk	24
2.2.2 Gramovo barvení	25
2.2.3 Fluorescenční mikroskopie	26
2.3 Bakterie	27
2.3.1 Stavba a složení bakteriální buňky	28
2.3.2 Použité kmeny bakterií	30
2.4 Přístroje použité pro stanovení vlivu ultrazvuku na bakterie	31
2.4.1 Ultrazvukový přístroj BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 31 H	31
2.4.2 Ultrazvukový přístroj BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 510 H	32
2.4.3 Piezoelektrický měnič s vanou	33
2.4.4 Bioruptor Standard UCD–200 TM	34
3 Výzkumná část	36
3.1 Cíle a výzkumné předpoklady	36
3.2 Metodika výzkumu	36
3.2.1 Použité materiály a pomůcky	36
3.2.2 Příprava inokula	37
3.2.3 Nakládání se vzorky po vystavení ultrazvuku	38
3.2.4 Popis jednotlivých experimentů	38
3.2.5 Fluorescenční mikroskopie	41
3.2.6 Statistická analýza dat	42
3.3 Analýza dat	42

3.3.1	Výsledek vlivu ultrazvuku s frekvencí 35 kHz na <i>E. coli</i> v kádince a falkonce	42
3.3.2	Výsledky vlivu ultrazvuku s frekvencí 35 kHz na <i>E. coli</i> s chlazením.	45
3.3.3	Výsledek vlivu ultrazvuku s frekvencí 1,65 MHz na <i>E. coli</i> v odměrné baňce	46
3.3.4	Výsledek vlivu ultrazvuku s frekvencí 35 kHz a výkonem 160 W na <i>E. coli</i> ...	47
3.3.5	Výsledek vlivu ultrazvuku s frekvencí 20 kHz a výkonem 320 W	49
3.3.6	Fluorescenční mikroskopie.....	51
4	Diskuze.....	54
5	Závěr	57
	Seznam použité literatury	58

Seznam použitých zkratek

AM	Acetoxymethyl
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
ČSN	Československá státní norma
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
E. coli	Escherichia coli
ISO	International Organisation for Standardization
KTJ	Jednotka tvořící kolonie
LED	Light-Emitting diode
MRSA	Methicilin rezistentní Staphylococcus aureus
Např.	Například
Obr.	Obrázek
RNA	Ribonukleová kyselina
S. aureus	Staphylococcus aureus
SONAR	Sound navigation and ranging
Tab.	Tabulka
VRSA	Vancomycin rezistentní Staphylococcus aureus

1 Úvod

Ultrazvuk je definován jako akustické vlnění s frekvencí vyšší než 20 kHz. Člověk je schopen vnímat zvuk v intervalu mezi 16 Hz a 20 kHz. Mechanické vlnění mimo tento rozsah je tedy pro člověka neslyšitelné. Někteří živočichové vnímají i vyšší frekvence, třeba pes do 30 kHz a netopýr až do 100 kHz. Ultrazvuk má mnohé využití, mezi nejpoužívanější patří diagnostické a terapeutické ultrazvukové přístroje v lékařství. Používá se pro zobrazení měkkých tkání např. v gynekologii, ale i pro zobrazení břišních orgánů nebo třeba srdce. Terapeutický ultrazvuk má uplatnění ve fyzioterapii např. pro zmírnění bolesti a prokrvení tkáně a ve stomatologii např. pro odstranění zubního kamene. Mimo jiné se ultrazvuk značně používá i v průmyslu. Využívá se k čištění povrchů, kontrole vad materiálů, měření rozměrů materiálů a dalších mechanických vlastností včetně tvrdosti, svařování a dokonce i obrábění.

Zkoumání potenciálu ultrazvuku jakožto metody mikrobiální inaktivace odstartovalo v 60. letech 20. století. Dnes vědecké studie uvádějí, že ultrazvuková léčba může u některých mikroorganismů v kapalném médiu způsobit rozbití DNA uvnitř buňky, ale nevyvolá rozbití buněčné stěny [5]. Studie, kde byl použit nízkofrekvenční ultrazvuk s vysokou intenzitou při působení vlivu ultrazvuku po dobu 20 min, prokázala, že bakterie rodu *Staphylococcus* a obecně ty s tlustší buněčnou stěnou jsou vysoce odolné proti inaktivaci ultrazvukem [36]. Dále bylo uvedeno, že Gram-negativní bakterie jsou pravděpodobně více náchylné k působení ultrazvuku než Gram-pozitivní bakterie. Parametry, které mohou výrazně ovlivnit inaktivaci bakterií, jsou expoziční doba a teplota během ošetření [37].

Je tedy prokázáno, že ultrazvuk má určitý vliv na bakterie. Cílem této práce je zjistit, jak se liší vliv ultrazvuku na zástupce Gram-negativních a Gram-pozitivních bakterií a za jakých podmínek. Práce je rozdělena na dva celky. Prvním celkem je teoretická část, která obsahuje základní témata potřebná k pochopení praktické části. Je členěna do několika kapitol, jejichž obsahem je přiblížení vývoje ultrazvuku, jeho fyzikální podstaty a představení využití v různých oborech, především v lékařství. Další kapitola popisuje bakteriální buňku, její specifické vlastnosti a následně jsou zde představeny bakterie použité v této práci. Dále jsou popsány metody a ultrazvukové přístroje, které byly využity k provedení experimentů vyobrazených v následující části. Druhý díl práce je tvořen praktickou částí. Zde jsou popsány samotné experimenty provedené na dostupných ultrazvukových přístrojích, jejich

příprava a vyhodnocení výsledků. Nakonec jsou porovnány výsledky z této práce s výsledky vědeckých studií z odborných článků.

2 Teoretická část

2.1 Ultrazvuk

2.1.1 Objev a vývoj ultrazvuku

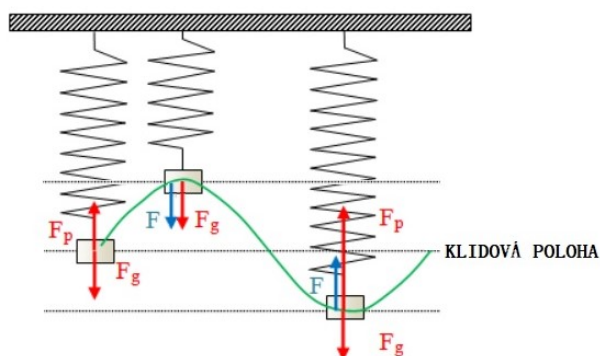
Teoretické základy akustiky a ultraakustiky publikoval anglický fyzik J. W. S. Rayleigh ve své obsáhlé práci *The Theory of Sound* v druhé polovině 19. století [15]. V této publikaci poprvé popsal zvuk jako fyzikální jev. Na tuto práci dále navázaly všechny další výzkumy z oblasti ultrazvuku. Průlomem byl v roce 1880 objev piezoelektrického jevu, který popsali bratři Jacques a Pierre Curie [15]. Přišli s tím, že při mechanické deformaci vzniká na povrchu některých krystalů volný elektrický náboj. Své výzkumy dovršili zjištěním, že tento jev funguje i opačným procesem, při kterém se krystal smršťuje a roztahuje, je-li na jeho povrch přiváděn střídavě kladný a záporný náboj [15]. Tyto objevy umožnily generovat ultrazvukové vlnění o vyšších frekvencích, než bylo doposud možné a staly se tak základem ultrazvukové technologie.

Dříve než se ultrazvuková technologie začala využívat i v lékařství, našla své využití v podobě bezpečnostního zařízení pro lodní dopravu. Tento aparát (SONAR) pracoval na principu ultrazvukového vlnění, které bylo vysíláno horizontálně z lodi ve směru plavby a zpětně registrovalo odrazy od ponořených částí ledovců [15]. Dalším zlepšovacím objevem byla např. přístrojová technika, využívaná v průmyslovém kontrolním odvětví ke zjišťování materiálových vad. Další vývoj byl velmi ovlivněn objevem syntetických piezoelektrických materiálů. Mezi první patřily keramické elektrostriční materiály jako *olovnatý zirkonát titanát* a *baryum titanát*. Později přišly monokrystaly ze sloučeniny *lithium niobát*, které zcela nahradily a svými parametry překonaly přírodní krystaly. Díky monokrystalům byla umožněna výroba velice výkonných a citlivých ultrazvukových měničů [15].

2.1.2 Fyzikální podstata ultrazvuku

Ultrazvuk se šíří formou mechanického vlnění, což je šíření kmitů pružným prostředím, kterým se rozumí prostředí pevné, kapalné a plynné. Mechanické vlnění je způsobeno vychýlením částice působením vnější síly, která se šíří z jedné částice na druhou. V případě,

že na částici nepůsobí žádná vnější síla, setrvává částice v klidové poloze. Působí-li na částici vnější síla, dojde k uvolnění částice, která se začne pohybovat zrychleným pohybem. Proti směru pohybu působí pružné síly, které částici zpomalují až do polohy, kde se zastaví. Pružná síla poté vrací částici zpět ke klidové poloze. Po přejetí klidové polohy částice pokračuje zpomaleným pohybem dále působením setrvačné síly, dokud opět nezastaví [15]. Tento opakující se pohyb částice se nazývá kmitavým harmonickým pohybem, jehož průběh závisí na setrvačných a pružných vlastnostech. Množství času potřebné na jeden kmit se nazývá doba kmitu T . Tento děj lze simulovat na tělese zavěšeném na pružině, která je z jedné strany pevně vetknutá viz Obr. 1.



Obr. 1 Obrázek pružiny.

Převrácenou hodnotou doby kmitu T je frekvence f viz Rovnice 1, jejíž jednotkou je $[s^{-1}]$ neboli hertz [Hz].

$$T = \frac{1}{f} \quad \text{Rovnice 1 [15]}$$

kde je: T perioda kmitu [s]

f frekvence [Hz]

Vztah 2π násobek frekvence definuje úhlovou rychlost ω $[\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}]$. Poloha, v níž se částice při kmitavém pohybu zastavuje, se nazývá amplitudou výchylky. Derivací okamžité výchylky částice podle času je dána rovnice pro rychlost kmitavého pohybu viz Rovnice 2.

$$v = \frac{du}{dt} = \omega U \cos(\omega t + \varphi) \quad \text{Rovnice 2 [15]}$$

kde je: u okamžitá akustická výchylka [m]

U amplituda výchylky [m]

v akustická rychlost [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]

ω úhlová rychlost [$\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$]

φ fázový úhel [rad]

t čas [s]

Derivací akustické rychlosti kmitání podle času je dostána okamžitá hodnota zrychlení a kmitavého pohybu viz Rovnice 3.

$$a = \frac{dv}{dt} = -\omega^2 U \sin(\omega t + \varphi) \quad \text{Rovnice 3 [15]}$$

kde je: a okamžitá hodnota zrychlení [$\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$]

Pro aktivní ultrazvukové vlnění je významná jak hodnota zrychlení, tak i akustické rychlosti, neboť tak vznikají velké dynamické síly, které značně působí na biologické médium. Avšak v oblasti pasivního ultrazvukového pole s malými intenzitami jsou síly zanedbatelné.

Vlnovou délkou je definována vzdálenost dvou sousedních částic kmitajících ve stejné fázi a určuje jí poměr rychlosti šíření zvuku a frekvence vlnění viz Rovnice 4.

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad \text{Rovnice 4 [15]}$$

kde je: λ vlnová délka [m]

c rychlost šíření ultrazvukového vlnění [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]

Podle směru kmitání částic se rozlišuje několik druhů ultrazvukových vln. Kmitají-li částice okolo rovnovážné polohy ve směru šíření, pak se vlnění nazývá vlněním podélným. Podélné vlnění se může šířit v plynech, kapalinách, ale i v pevných látkách, neboť to souvisí s objemovou deformací prostředí. Kmitají-li částice v rovině kolmé na směr šířící se vlny, nazývá se vlna příčná. Příčná vlna se může šířit pouze v prostředí tuhých látek.

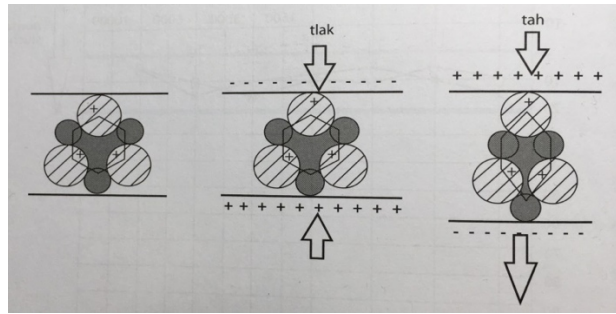
Intenzitou ultrazvukového vlnění I [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$] se rozumí množství akustické energie, které prochází plochou kolmo orientovanou na směr šíření. V reálném prostředí je definována součinem kvadrátu akustické rychlosti v [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$], hustotou prostředí ρ [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$] akustického tlaku p [Pa] viz Rovnice 5 [15].

$$I = v^2 \rho c \quad \text{Rovnice 5 [15]}$$

2.1.3 Vytváření ultrazvukového vlnění

Ultrazvukové kmity lze generovat v širokém rozsahu kmitočtů pomocí mechanických, magnetostrikčních nebo piezoelektrických generátorů [15]. Prvním typem jsou mechanické generátory, které představují malé ladičky nebo píšťaly [16]. Jimi lze získat pouze ultrazvuk nízkých frekvencí a výkonů a v lékařství se nepoužívají. Magnetostrikční generátory jsou založeny na tom, že vyvolávají ultrazvukové kmity v prostředí kolem tyčinky, která je z feromagnetické látky a to ze železa nebo niklu. Tyčinka je umístěna v magnetickém poli generátoru, který je napájen střídavým proudem. Tyčinka pak mění své rozměry se stejnou frekvencí, jakou má střídavý proud. Magnetostrikce umožňuje generovat ultrazvuk nízkých frekvencí do 100 kHz [16], [17].

Posledním typem s velmi rozsáhlými možnostmi využití jsou piezoelektrické generátory. Tyto generátory jsou založeny na nepřímém piezoelektrickém jevu a mohou jimi být produkovány intenzity zvuku až $10 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Piezoelektrický jev lze pozorovat u krystalů, které nejsou středově souměrné a to např. u křemene, Siegenovy soli nebo třeba turmalínu. Přímý piezoelektrický jev se projevuje schopností krystalu generovat na svém povrchu volný elektrický náboj během jeho tlakové deformace. Krystalová mřížka takového krystalu musí obsahovat jak kladné, tak i záporné ionty. Při tlakové deformaci se ionty opačných nábojů posunou v krystalové mřížce tak, že elektrické těžiště záporných iontů a elektrické těžiště kladných iontů se od sebe vzdálí a na plochách krystalu se objeví elektrický náboj viz Obr. 2. Nepřímý piezoelektrický jev je opakem k přímému. U krystalu je vyvolána deformace, tedy jeho smršťování a roztahování, vnějším elektrickým polem. Tedy při zapojení krystalu na dostatečně vysoké střídavé napětí tak získáme zdroj ultrazvuku. Piezoelektrický měnič pak představuje destička z křemene nebo jiného vhodného krystalu, která je vybavena na protilehlých koncích elektrodami, kam je přiváděno vysokofrekvenční střídavé napětí. Destička mechanicky kmitá s frekvencí odpovídající frekvenci střídavého proudu a rozkmitá i okolní prostředí. Přeměňuje tedy energii elektrickou na energii mechanickou. Periodické změny tloušťky krystalu doprovází zvuk, jehož frekvence může být ovlivněna materiálem nebo frekvencí přiváděného střídavého napětí [15], [16], [18].



Obr. 2 Schéma piezoelektrického jevu [16].

2.1.4 Využití ultrazvuku

Terapeutický ultrazvuk se používá především k léčbě kloubních a nervových zánětů. Jeho léčebným účinkem je utišení bolesti, hloubkový tepelný účinek, uvolnění spasmů a především prokrvení tkáně. Zdrojem je vysokofrekvenční oscilátor a piezoelektrický krystal, který je uložen v hlavici. K léčbě se používá ultrazvuk o intenzitě $0,5 - 3 \text{ W.cm}^{-2}$ s frekvencí 1 až 3 MHz. Hlavice ultrazvuku se přikládá na léčená místa, potřena olejem nebo gelem tak, aby se zabránilo vzduchové vrstvě mezi kůží a hlavicí [16], [17].

Využití vyšetřovacího ultrazvuku v lékařství je v dnešní době základní a možná i nejrozšířenější zobrazovací diagnostickou metodou. Akustické vlnění takového přístroje je generováno piezoelektrickými měniči s frekvencí 2,5 – 10 MHz. Ultrazvuk se šíří nejlépe tekutinou a měkkými tkáněmi prochází jen s malými ztrátami. Na rozhraní různých tkání se odráží a síla takového odrazu závisí na velikosti změny akustické impedance. Piezoelektrický krystal má funkci vysílače i přijímače mechanických kmitů, takže detekuje odrazy vyslaného signálu, z toho určí velikost echa a z jeho časového zpoždění hloubku odrazu. Ze zpětně odražených signálů se získává ultrazvukový obraz [16], [17].

Ve stomatologii se používá ultrazvuk k odstraňování zubního kamene a kazu. Generátorem kmitů je magnetostriční zdroj s feromagnetickou tyčinkou. Obvykle jsou užívány frekvence v rozmezí 24 – 42 kHz. Metoda je to v celku nenáročná, rychlá a šetrná ke sklovině. Velice důležitým faktorem je kavitace, právě ta narušuje struktury zubního kamene [16].

Ultrazvuk se mimo jiné používá v některých oblastech průmyslu. Například čištění ultrazvukem, kdy za pomoci fyzikálně-chemických procesů, nárůstu teploty, tlaku a

zrychlení částic média, ve kterém je předmět ponořen, dochází k rozrušování vazeb nečistot čištěného předmětu. Dále se provádí různé kontroly ultrazvukem, kdy lze zjišťovat plošné vady materiálu včetně jejich polohy a rozměru. Ultrazvuk lze tedy využít i k měření délek, tloušťek a několika dalších mechanických vlastností materiálu včetně tvrdosti. Dalším využitím je metoda svařování ultrazvukem, kde se jedná o modifikaci třetího svařování, kdy jsou dva svařence přitlačeny k sobě, první je pevně fixován a druhý kmitá frekvencí ultrazvukového měniče. Jako poslední příklad lze uvést obrábění ultrazvukem, kde se mezi nástrojem, představující zdroj ultrazvukových kmitů, a obrobkem nachází abrazivo, jehož zrna vlivem ultrazvuku kmitají a odebírají materiál.

2.1.5 Účinky ultrazvuku na organismy

Hlavními projevy ultrazvuku v kapalných látkách jsou produkce tepla a vznik kavitace. Aktivní interakce ultrazvuku a biologického systému je proces, kdy silové působení ultrazvukového pole působí na biologický systém a vyvolává tak jeho změny. Živý systém zároveň ovlivňuje charakter ultrazvukového pole a tak se vzájemně ovlivňují. Biologické účinky se dělí na primární a sekundární. Primární jsou způsobené mechanickými složkami ultrazvukového pole. Sekundární jsou způsobené přeměnou mechanické energie na tepelnou, elektrickou a další [15], [20].

Mechanické účinky ultrazvukového pole vyplývají z jeho mechanické podstaty, periodicity a vysokých frekvencí. Průchodem ultrazvukového vlnění prostředím nastávají lokální tlakové vlny změny dosahující řádově až MPa/mm. Následkem podtlakové vlny dochází ke vzniku dutinek. Tento jev se nazývá kavitace, jde o periodické vznikání a zanikání nespojitostí prostředí. Kavítaci rozlišujeme podle účinnosti a způsobu vzniku na stálou (rezonanční) a přechodnou (kolapsovou). Kolapsová kavitace vzniká důsledkem nelineárního průběhu ultrazvukové vlny při amplitudách vyšších, než je atmosférický tlak. V podtlakové fázi vzniká kavitační dutinka, která v přetlakové fázi prudce kolabuje. Následkem kolapsu v jeho místě nastává prudký nárůst teploty až o čtyři řády, silný tlakový ráz a dutinka se rozpadne na četné dutinky mikro rozměrů. Při nižší intenzitě ultrazvukového pole vzniká rezonanční kavitace. Dutinka se dostává pomocí tlakového kmitání ultrazvukové vlny do rázových pulzací. Svým kmitáním dutinky snižují energii ultrazvukových vln a přetváří ji na

teplo. Kavitační jevy se objevují až při dostatečné prahové intenzitě ultrazvukového pole, která závisí na jeho frekvenci a viskozitě prostředí [15], [16].

Tepelné účinky vznikají při přeměně energie ultrazvukové vlny na teplo. Takto vznikající zvýšení teploty je velice významným faktorem působení ultrazvuku na biologický systém. V absorpčním prostředí vzniká teplo vnitřním třením a relaxačními procesy s ohledem na fyzikální vlastnosti absorpčního prostředí. Vznik tepla je v biologických systémech ovlivňován nehomogenní strukturou. K nejvýraznější absorpci a následnému uvolnění tepla tak dochází na rozhraní prostředí s různou akustickou impedancí. V souvislosti s nehomogenním prostředím a charakterem ultrazvukového pole je i rozložení teplot značně nerovnoměrné a okamžitá hodnota teploty se mění v čase i prostoru [15], [16].

Biologické účinky závisí především na intenzitě ultrazvuku. Všeobecně lze říct, že intenzita ultrazvuku do $1,5 \text{ W.cm}^{-2}$ má pozitivní účinek na funkci tkání. Mezi tyto pozitivní účinky patří zvýšení rychlosti metabolismu a urychlení biochemických reakcí. Se zvyšující se intenzitou se tyto účinky zvyšují, ale intenzity vyšší než 3 W.cm^{-2} mají za následek strukturální změny, jako rozpad buněčného jádra, tepelné koagulace bílkovin a některé malé živočichy lze usmrtit [17].

Účinek ultrazvuku na vodu a elektrolyty. Voda je základní složkou intracelulárních i extracelulárních prostředí, tvoří až 90 % hmotnosti organismů a podílí se na transportu látek i energie. Rychlost šíření ultrazvuku ve vodě je závislá na její teplotě. Na rozdíl od jiných látek rychlost šíření ultrazvuku ve vodě s rostoucí teplotou stoupá a to až do 347 K, při vyšší teplotě již klesá. Přítomnost iontů ve vodě ovlivňuje její fyzikální vlastnosti, mění se tak i hustota vody a tím i rychlost šíření ultrazvuku, v elektrolytech je větší než ve vodě. Zvyšování intenzity ultrazvuku má za následek kvalitativní změny vzájemného působení, s tím i zvýšený přenos energie ultrazvukovou vlnou způsobuje nárůst vznikajícího tepla. Při intenzitě vyšší než 1 W.cm^{-2} vzniká kavitace, která zapříčiňuje další následující významné děje. Jedním z nich jsou především chemické změny, jejichž výsledkem je vznik volných radikálů [15].

2.2 Metody studia účinků ultrazvuku na bakterie

V této práci byla použita metoda Kultivace bakteriálních kultur, metoda stanovení počtu jednotek tvořící kolonie (KTJ), Gramovo barvení, fluorescenční mikroskopie a těm jsou věnovány následující tři kapitoly.

2.2.1 Stanovení životaschopných buněk

Pro stanovení počtu životaschopných buněk se používá metoda založená na počítání kolonií vyrostlých na živném agarovém kultivačním médiu po aerobní kultivaci mikroorganismů při 37°C. K této metodě je potřeba agar s kvasničným extraktem, destilovaná voda, autokláv, potřebný vzorek, Petriho miska, inkubátor nastavený na teplotu 37°C ± 2°C [26].

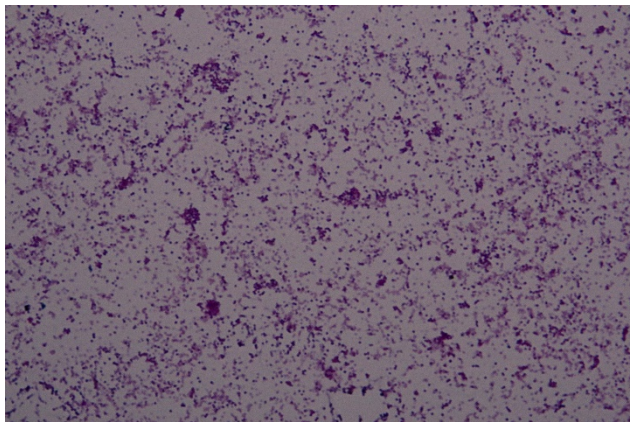
Na přípravu kultivačního média je potřeba agar s kvasničným extraktem a destilovaná voda. Všechny složky se zamíchají do vody a během zahřívání se nechají zcela rozpustit. Následně je třeba hotové médium sterilizovat v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 15 min, poté je médium skladované v chladničce. Před použitím se médium rozeřeje a nechá zchladnout, aby mikroorganismy po nalití do Petriho misky nezažily vysokou teplotou [26].

Odměřený nebo zředěný objem požadovaného vzorku, nejvýše však 2 ml, se v Petriho misce dokonale a rovnoměrně krouživým pohybem promíchá s 15 – 20 ml kultivačního média. Následně se misky po ztuhnutí média kultivují v inkubátoru při teplotě 37°C po dobu 48 h [26]. Na pevné půdě živného agaru v Petriho miskách rostou bakterie v koloniích, kdy každá osidluje určité malé území, většinou pravidelného tvaru. Tyto kolonie mohou mít různý tvar, velikost, konzistenci i zbarvení. Převážná většina bakterií vyrostle během 18 až 48 hodin v koloniích. Platí, že rychlost množení bakterií je dána počtem generací za jednotku času, a tedy čím je generační doba kratší, tím je růst kolonií rychlejší [7]. Po hotové kultivaci se z celkového počtu kolonií vyrostlých na kultivačním médiu spočítá počet kolonií tvořících jednotek (KTJ). Vyhodnocují se počty kolonií vyrostlých jak na povrchu, tak i uvnitř živné půdy. Nelze správně vyhodnotit misky, na kterých je méně než 30 KTJ nebo více než 300 KTJ [14].

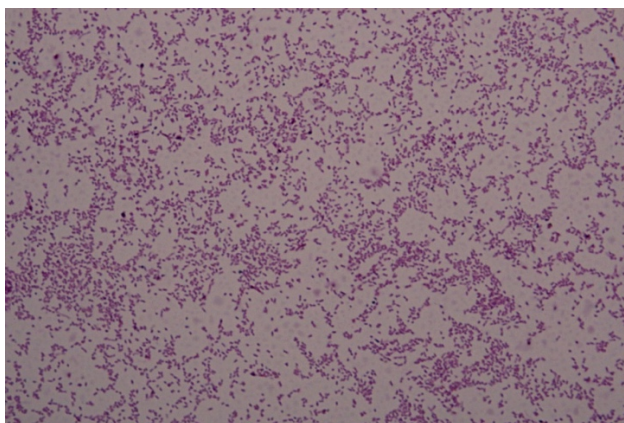
2.2.2 Gramovo barvení

Gramovo barvení je metoda, kterou lze odlišit Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie (podrobný popis viz 2.3.1). Gram-pozitivní bakterie mají silnou vrstvu peptidoglykanu, ve které se udrží barvivo krystalová violet. Gram-negativní bakterie mají tuto vrstvu tenkou, z té se krystalová violet vymyje [29].

Mikrobiologickou kličkou se odebere malé množství kolonie dané bakterie z Petriho misky. Nanese se na podložní sklíčko, kde jsou bakterie řádně rozmíchány v kapce fyziologického roztoku. Po zaschnutí je vzorek zafixován protažením v plamenu. Poté je aplikováno barvivo krystalová violet, které je po chvíli působení vypláchnuto Lugolovým roztokem. Následně je preparát důkladně proplachován acetonem a dobarven karbolfuchsinem, který se nechá působit asi 1 min a opět je opláchnut a nakonec usušen. V průběhu Gramova barvení Gram-pozitivní bakterie navázaly krystalovou violet a jsou tedy zbarveny do modra (Obr. 3) a Gram-negativní bakterie navázaly karbolfuchsin a jsou zbarveny do červeno-růžova (Obr. 4) [29]. Výsledek Gramova barvení může být ovlivněn stářím buněk a jejich fyziologickým stavem [29]. Na výsledném obrazu pak mohou vypadat trochu jinak.



Obr. 3 Gramovo barvení Gram-pozitivní bakterie *S. aureus*. Foto: autorka.



Obr. 4 Gramovo barvení Gram-negativní bakterie *E. coli*. Foto: autorka.

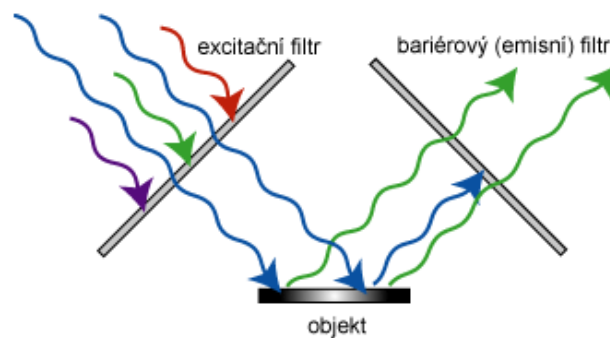
2.2.3 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je velmi cenným nástrojem pro studium buněk a buněčných částí mikroorganismů. Ty jsou buď přirozeně fluoreskující, nebo jsou nabarveny specifickými fluorescenčními barvivy. Fluorescenční mikroskop je velmi podobný běžnému optickému mikroskopu, jen je navíc doplněn o dva filtry (excitační a bariérový) a především o intenzivní zdroj ultrafialového světla. Součástí fluorescenčního mikroskopu je zpravidla software pro obrazovou analýzu [10].

Fluorescence patří mezi fotoluminiscenční záření. Je to fyzikální jev, kdy jsou některé látky po ozáření světlem schopny absorbovat světelné záření o určité vlnové délce (excitace). Následně je část této energie ve velmi krátké době opět vyzářena (emise) v podobě světla o delší vlnové délce. Tento posun vlnové délky neboli Stokesův posun, je způsoben ztrátou části energie v podobě uvolnění tepla. Excitace a emise jsou pro fluorescenční barvicí látky důležité, protože pro každé barvivo je charakteristické jiné excitační a emisní spektrum. Fáze, kdy molekuly látek přechází z emise do základního stavu, je označována jako luminiscence. Trvá-li krátce, pak mluvíme o fluorescenci, trvá-li delší dobu, jedná se o fosforescenci [11].

Vzhledem k vysoké citlivosti můžeme použít nízkou koncentraci barvicí látky a snížit tak riziko ovlivnění živých buněk cytotoxickým působením barviva. Pozadí je obvykle temné a pozorované objekty jasně září. Toho je dosaženo pomocí dvou filtrů, které společně dokáží oddělit excitační a emisní záření na základě vlnových délek, čímž minimalizují signál pozadí viz Obr. 5. Excitační filtr se nachází mezi zdrojem světla a preparátem. Umožňuje propouštět

barvy o určitých vlnových délkách použitých právě pro excitaci. Bariérový filtr je umístěn mezi preparátem a okulárem a umožňuje vyčlenit požadovanou část spektra [11].



Obr. 5 Excitační a bariérový filtr fluorescenčního mikroskopu [11].

Fluorescenční barviva neboli fluorofory můžeme rozdělit na vnitřní a vnější. Vnitřní fluorescence buněk se vyskytuje přirozeně a je dána především proteiny, pro které je fluorescence charakteristická. Vnější fluorescence je umožněna prostřednictvím fluoroforů, které se přidávají ke zkoumanému preparátu, jež sám není schopen fluorescence [12].

Testování životaschopnosti neboli stanovení poměru živých a mrtvých buněk pomocí Live/Dead Cell Viability Assay kit, je založeno na stanovení podílu mrtvých a živých buněk v populaci. Životaschopnost je určena propustností barviva membránou. Mrtvé buňky průchodu barviva membránou nezabrání, barvivo se naváže a dojde ke změně emitovaného záření. Mezi nejlepší fluorescenční sondy indikující životnost buněk patří calcein AM, především díky silné fluorescenci a svému úspěšnému zachytu v živých buňkách. Naopak pro detekci mrtvých buněk jsou vhodné sondy jako ethidium bromid či propidium jodid [12].

2.3 Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické organismy, které mohou tvořit kolonie. Buňky bakterií jsou řádově až desetkrát menší než buňky eukaryotické. Průměrně se jejich velikost pohybuje od 1 do 10 μm . Vzhledem k jejich nepatrné velikosti je poměr velkého povrchu k objemu značný. Buňka má tedy velkou plochu, se kterou je v kontaktu s okolním prostředím, a tak dochází k rychlé výměně látek mezi ní a okolím [5].

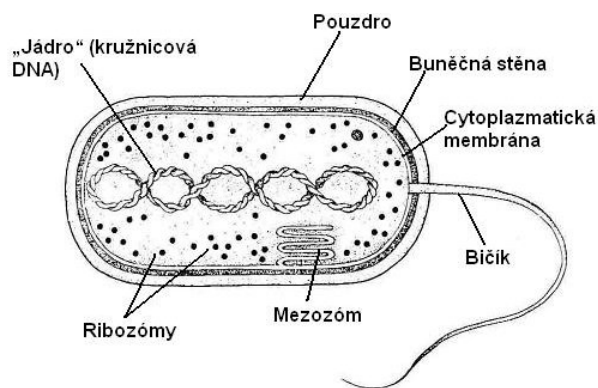
Základní tvar bakterií je kulovitý nebo tyčinkovitý. V případě, že mají kulovitý tvar, jsou označovány jako koky. Mohou zůstat rozdělené nebo naopak vytvářejí dvojice (diplokoky), řetízky (streptokoky) či hrozny (stafylokoky). Mají-li tyčinkovitý tvar, nazýváme je tyčinkami [6].

Důležitou vlastností bakterií je schopnost tvorby biofilmu. Biofilm představuje tenkou vrstvu na pevných tělesech (např. pokožka), která je tvořena společenstvím mikrobiálních buněk. Biofilm je pro mnoho druhů bakterií výhodným, ale pro některé i základním způsobem jejich existence [28]. Vzniká tak, že se bakterie přichytí svými adheziny povrchu, který jim může nabídnout dostatečný přísun živin. Jakmile k povrchu přilnou, změní se jejich chování a fenotyp. Do prostoru okolo sebe produkují velké množství polysacharidu s lepivými vlastnostmi, který buňky drží při sobě a zároveň jim poskytuje prostor pro množení. Biofilm je většinou tvořen více druhy bakterií, a proto jeho tloušťka kolísá. Bakterie tvoří takzvané mikrokolonie, mezi nimi jsou četné dutinky a vzájemně jako celek tvoří spleť kanálků. Biofilm najdeme třeba v lidském střevě, kde je tvořen symbiotickými bakteriemi a chrání střevní sliznici před patogeny. Naopak pro člověka nevýhodným biofilmem je zubní plak, který sestává i z patogenních bakterií, které mohou narušovat zubní sklovinu a způsobit tak vznik zubního kazu [28], [7].

Bakterie mohou způsobovat infekční onemocnění. Míra patogenity bakterií je dána virulencí pro daný živočišný druh. Virulence spočívá ve schopnosti proniknout do tkáně, kde se pomnoží. Dále ve schopnosti osídlit sliznici hostitele a schopnosti přilnout na jeho buňku. Patogeny se dělí na primární a podmíněné. Ty, které způsobují infekční onemocnění u osoby jinak zdravé, jsou primární patogeny. Patogeny, které vyvolávají infekci u osob oslabených nějakým onemocněním nebo dlouhým pobytem v nemocnici, jsou patogeny podmíněné. Do těla se dostávají dýchací soustavou, trávicím traktem nebo kůží. Příkladem je bakterie *Staphylococcus aureus* (více v kapitole 2.3.3) [7].

2.3.1 Stavba a složení bakteriální buňky

Buňka obsahuje nepravé jádro, ve formě cyklické molekuly DNA bez jaderného obalu, které je volně uloženo v cytoplazmě (Obr. 6) [3].

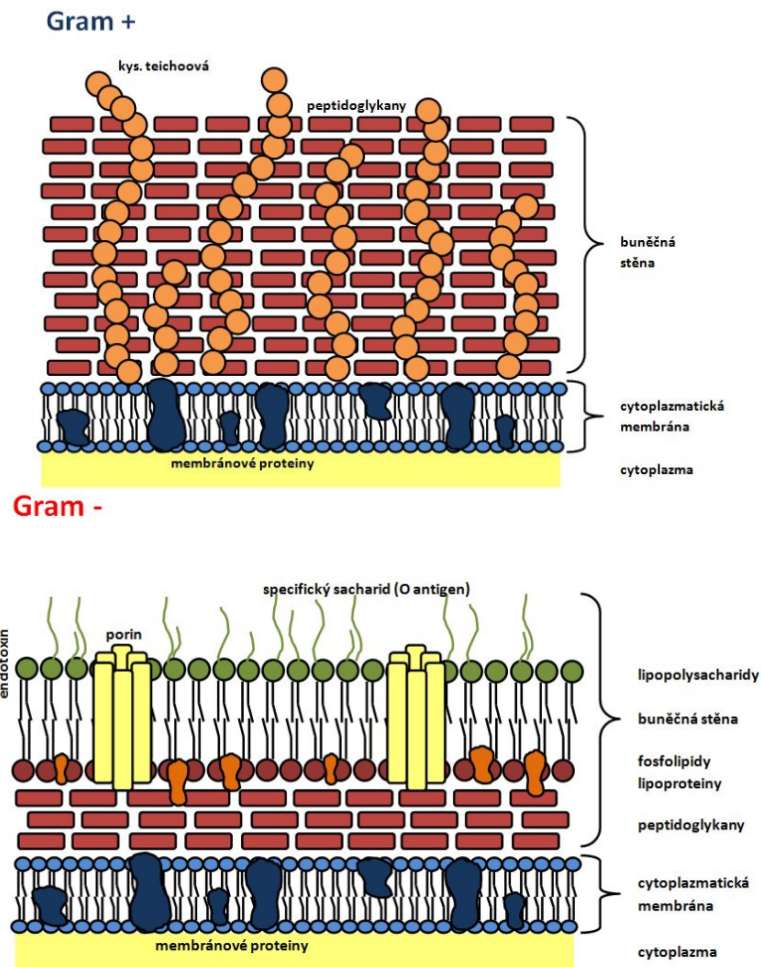


Obr. 6 Typická prokaryotická buňka [4].

Bakteriální buňka se svou jednodušší strukturou podstatně liší od buněk eukaryotických. Co se týče struktur, obsahuje pouze cytoplazmu, kruhovou DNA, ribozomy, plazmidy, cytoskelet, cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu. Některé bakterie mají na svém povrchu fimbrie nebo bičík. Fimbrie usnadňují bakteriím přilnout k různým povrchům a bičíky jim usnadňují pohyb. Plazmidy jsou velmi důležité při horizontálním přenosu genů rezistence. Jedná se např. o rezistenci k antibiotikům [5], [7].

Buněčná stěna odděluje bakteriální buňku od okolního prostředí. Udržuje tvar buňky, chrání ji mechanicky proti vnějším nepříznivým vlivům, ale i chemicky proti záření a schnutí. Silná buněčná stěna má velký význam, dokáže odolávat vysokému osmotickému tlaku uvnitř buňky. Základní složkou bakteriální buněčné stěny je peptidoglykan neboli murein. Peptidoglykan je polymer, který je tvořen rozvětvenými řetězci sacharidů a peptidů. Řetězce jsou navzájem pospojovány a tvoří tak pevnou síť. Struktura a vlastnosti stěny se podstatně liší u Gram-pozitivních a Gram-negativních buněk (Obr. 7). Toto rozdělení popsal dánský vědec Hans Christian Gram podle toho, jak bakterie reagují při speciální technice barvení popsané v kapitole 2.2.2 [2], [7]. **Buněčná stěna Gram-pozitivních bakterií** je silná až 20 nm a je tvořena mohutnou vrstvou peptidoglykanu. Navíc ještě obsahuje kyselinu teichoovou, jejíž lineární řetězce pronikají až napovrch buňky. Jejich funkcí je vazba kationtů, především Ca^{2+} a Mg^{2+} , které jsou pro pevnost buňky nepostradatelné [2]. **Stěna buněk Gram-negativních bakterií** je tenčí (okolo 15 nm) a má daleko složitější strukturu. Na tenké vrstvě peptidoglykanu, který je součástí takzvaného periplasmatického prostoru, je zevní membrána. Zevní membrána je třívrstvá a je složena z fosfolipidů, lipopolysacharidů

a proteinů. Tyto vrstvy zevní membrány mají podstatnou roli při ochraně bakteriální buňky [9].



Obr. 7 Buněčná stěna Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií [8].

2.3.2 Použité kmeny bakterií

Escherichia coli je bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Největší význam této skupiny je v kolonizaci gastrointestinálního traktu. Rod *Escherichia* zahrnuje 7 druhů, z nichž pro člověka nejvýznamnější je právě *Escherichia coli*. Tato bakterie je jednou z nejprostudovanějších. Právě proto se v mikrobiologii stala modelovým organismem pro nejrůznější pokusy. Je důležitou součástí střevní mikroflóry teplokrevných živočichů, včetně člověka, kde se podílí na tvorbě vitamínu K. Z tohoto důvodu je přítomnost bakterie *E. coli* v pitné vodě indikátorem fekálního znečištění. *E. coli* může být také významným

patogenem. Mimo trávicí trakt může způsobovat infekci močového systému, pneumonii a infekci ran. Za určitých podmínek patří mezi intestinální patogeny. Jejich patogenita je podmíněna produkcí toxinů, způsobující průjemová onemocnění. Z hlediska morfologie a fyziologie je bakterie *E. coli* Gram-negativní tyčinka, která nevytváří spory. Dosahuje délky přibližně 2 μm a šířky 0,5 μm [1], [7], [13].

Staphylococcus aureus je bakterie z čeledi *Staphylococcaceae*. *S. aureus* je Gram-pozitivní kokovitá bakterie tvořící hroznovité shluky, jejíž buňky dosahují velikosti 0,7 – 0,9 μm . *S. aureus* je patogenní bakterie, která produkuje řadu toxinů jako hemolysin, leukocidin a exfoliatin, z nichž každý specifickým způsobem narušuje integritu eukaryotických buněk. Dále produkuje také toxin, způsobující syndrom toxického šoku (TSST), který působí na cévy a způsobuje záněty až toxický šok. *S. aureus* je častým průvodcem různých onemocnění, nejčastěji kožních. Některé kmeny této bakterie patří mezi nejvýznamnější multirezistentní patogenní bakterie. V poslední době přibývá kmenů rezistentních k antibiotikům. Jedná se především o methicilin rezistentní kmeny, takzvané MRSA. Výskyt infekcí MRSA je celosvětovým problémem ve zdravotnictví, především v nemocničním prostředí. Dále skupina kmenů rezistentní na vankomycin, takzvaných VRSA. Rozšiřující se množství kmenů *S. aureus* rezistentních na antibiotika, jsou ukázkovým příkladem selhávání antibiotické léčby [1], [6], [7].

2.4 Přístroje použité pro stanovení vlivu ultrazvuku na bakterie

2.4.1 Ultrazvukový přístroj BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 31 H

Ultrazvukový přístroj BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 31 H viz Obr. 8 je tvořen nerezovou kompaktní ultrazvukovou vanou, jejíž objem je 0,9 l. Výkon P je 30 W [watt] a frekvenční kmitočet ultrazvuku je 35 kHz. Ultrazvukový přístroj je vybaven automatickým frekvenčním systémem SweepTec, který umožňuje modulaci pracovní frekvence přístroje [30]. Pracovní frekvence se tak mění každých 10 ms o téměř 1 kHz. Díky tomuto systému je v celé lázni homogenní a rovnoměrně působící ultrazvukové pole, což vede k lepšímu účinku. Zařízení má také funkci DEGAS neboli odvzdušnění. Neboť kapaliny obsahují rozpuštěné plyny, které nejsou žádoucí. Tuto funkci je potřeba zapnout na začátku procesu

čištění na dobu 5 – 15 min. Přístroj má digitální spínací hodiny pro čas 1 – 5 min, 10, 15, 30 min a pro nepřetržitý provoz. Konkrétně tato verze přístroje má také termostaticky nastavitelný ohřivač pro teploty 20 – 80°C s LED displejem, který ukazuje cílovou a skutečnou hodnotu teploty. Má široké možnosti využití. Nejvíce se využívá v laboratořích, optikách, klenotnictví a medicíně. Pořizovací cena takového ultrazvukového přístroje se pohybuje kolem 12.000,- Kč [23].



Obr. 8 Bandelin Sonorex Digitec DT 31 H [41]. Rozměry v mm.

2.4.2 Ultrazvukový přístroj BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 510 H

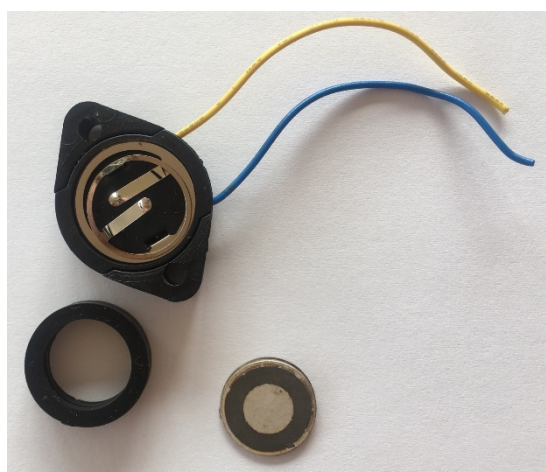
Ultrazvukový přístroj BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 510 H viz Obr. 9 je od stejného výrobce jako přístroj v kapitole 2.4.1, jsou si tedy dost podobné. Stejně jako typ DT 31 H má i tento digitální spínací hodiny, je vybaven vyhříváním, a tedy i termostaticky nastavitelným ohřivačem s LED displejem, systémem SweepTec a funkcí DEGAS. Ultrazvuková vana má výrazně větší objem a to 9,7 l, což bylo využito ke zkoumání více vzorků v různých expozičních nádobách najednou. Navíc má tento typ přístroje i výpusť vody z ultrazvukové vany, a tak je vypouštění vody snadné. Výkon je 160 W a frekvenční kmitočet ultrazvuku je stejný jako u předchozího přístroje 35 kHz. Pořizovací cena takového ultrazvukového přístroje se pohybuje kolem 42.000,- Kč [23].



Obr. 9 Bandelin Sonorex Digitec DT 510 H [42]. Rozměry v mm.

2.4.3 Piezoelektrický měnič s vanou

Toto zařízení je složeno z plastové vany, nebulizační desky a piezoelektrického měniče, který je připojen ke zdroji elektrického napětí. Nebulizační deska obsahuje piezoelektrický měnič viz Obr. 10, jehož frekvenční kmitočet dosahuje 1,65 MHz a elektrický výkon je přibližně kolem 29 W. Tato nebulizační deska se používá jako součástka do přístrojů k rozprašování kapalin např. zvlhčovačů. Piezoelektrický měnič vyzařuje ultrazvukové vlny do kapaliny a následkem toho se z její hladiny oddělují drobné kapičky vody. Tyto kapičky jsou tím menší, čím větší je frekvence ultrazvukového měniče [31].



Obr. 10 Piezoelektrický měnič s frekvencí 1,65 MHz. Foto: autorka.

2.4.4 Bioruptor Standard UCD–200 TM

Přístroj Bioruptor Standard UCD–200 TM využívá vysoce řízenou ultrazvukovou energii a moderní technologie k tomu, aby dosáhl optimálních velikostí fragmentů ideálních pro analýzu genomové DNA a sekvenování [34]. Tento přístroj je také vhodný pro narušení buněk a tkání, takže se používá také k extrakci DNA nebo RNA z buněk a tkání či separaci bílkovin z buněk a tkání. Frekvenční kmitočet tohoto přístroje je 20 kHz a zabudovaný nastavitelný výkon buď na 160, 200 a 320 W [34]. Přístroj se skládá ze zvukotěsného boxu a ultrazvukové vany viz Obr. 11, ovládací jednotky viz Obr. 12 a zásobník vzorků viz Obr. 13. K tomuto přístroji byl zásobník až pro 12 mikrozkušavek o objemu 1,5 ml. Ultrazvuková vana má rozměry 175x160x265 mm a její objem je 750 ml. Voda, která se do vany dává, by neměla mít více než 4°C, případně jsou navíc přidány malé kousky ledu.



Obr. 11 Zvukotěsný box a ultrazvuková vana, Bioruptor Standard UCD–200 TM [25].



Obr. 12 Ovládací jednotka, Bioruptor Standard UCD–200 TM. Foto: autorka.



Obr. 13 Zásobník na vzorky, Bioruptor Standard UCD–200 TM [24].

3 Výzkumná část

3.1 Cíle a výzkumné předpoklady

Cílem této bakalářské práce bylo vyzkoušet a osvojit si různé laboratorní metody od přípravy inokula o určité koncentraci, přes stanovení životaschopnost buněk pomocí počítání KTJ, práci s ultrazvukovými přístroji, Gramovo barvení až po práci s fluorescenčním mikroskopem. Hlavním cílem bylo zjistit vliv působení ultrazvuku na bakterie *E. coli* a *S. aureus*. Zjistit, zda a jaký vliv na dané bakteriální kultury má frekvence a výkon ultrazvukového přístroje. Z rešerše bylo předpokládáno, že různá stavba bakteriálních buněk *E. coli* a *S. aureus* zapříčiní odlišné výsledky. Takže cílem bylo také porovnat výsledky účinku ultrazvuku na Gram-negativní a Gram-positivní bakterie a případně zjistit, zdali má vliv také tvar bakterií (koky × tyčinky).

3.2 Metodika výzkumu

Výzkumná část bakalářské práce byla provedena v mikrobiologické laboratoři Oddělení pro nanomateriály v přírodních vědách, CXI pod vedením Bc. Alice Břečkové, která byla velmi nápomocná, při přípravě a aplikaci metod stanovení života schopných buněk a při manipulaci s kulturou *S. aureus*, se kterou z bezpečnostních důvodů může pracovat pouze proškolený, odborný personál.

3.2.1 Použité materiály a pomůcky

Kultura *E. coli* CCM 3954 v želatinových discích, kultura *S. aureus* CCM 3953 v želatinových discích (CMM, Masarykova univerzita v Brně), kultivační médium Tryptone Soya Broth (HIMEDIA), kultivační médium Plate Count Agar (BIO – RAD), fyziologický roztok (8,5 g NaCl na 1 l destilované vody), Savo, krystalová violet, Lugolův roztok, aceton, karbolfuchsin, destilovaná voda, kahan, podložní sklíčka, mikropipety (Eppendorf) s výměnnými plastovými špičkami, Petriho misky, zkumavky, falkonky, kádinky, očkovací jehly, mikrobiologické kličky, horkovzdušný sterilizátor, chladnička, mrazicí box, spektrofotometr (ERBA DENSI-LA-METER II), inkubátor, termostat (Q-CELL), digitální teploměr, ultrazvukový přístroj Bandelin Sonorex Digitec DT 31 H, piezoelektrický měnič s frekvencí 1,65 MHz, ultrazvukový přístroj Bandelin

Sonorex Digitec DT 510 H, přístroj Bioruptor Standard UCD–200 TM, fluorescenční mikroskop (AxioImager Zeiss).

3.2.2 Příprava inokula

Kulturu *E. coli* bylo nejprve nutné oživit z želatinových disků, které jsou uchovávány v uzavřené nádobě v chladničce. Po vyjmutí z chladničky, byla nádoba s disky ponechána 10 min odstat při pokojové teplotě, aby při otevření nedošlo ke kondenzaci vody. Poté se vyžihanou, lehce teplou očkovací jehlou dotklo disku tak, aby se přilepil a mohl být přenesen do tekutého kultivačního média Tryptone Soya Broth. Disk byl nechán v inkubátoru po dobu 48 hodin při teplotě 37°C v termostatu [21].

Po kultivaci se sterilní mikrobiologickou kličkou nabralo inokulum, které bylo rozočkováno na tuhé kultivační médium Plate Count Agar. Poté byla kultura *E. coli* opět dána do inkubátoru na dobu 48 hodin při 37°C.

Z této kultury pak bylo připraveno inokulum o výchozí koncentraci přibližně 3×10^8 buněk/ml. Mikrobiologickou kličkou byla odebrána kultura a rozetřena o stěnu zkumavky se sterilním fyziologickým roztokem (8,5 g NaCl na 1 l destilované vody).

Pro stanovení hustoty bakteriální suspenze, byl použit spektrofotometr DENSI–LA–METER II (Erba Lachema), který pracuje na principu měření optické absorbance. Do přístroje byla vložena zkumavka se suspenzí, u níž bylo měření provedeno. V průběhu měření se přístroj se zkumavkou otáčí a provádí tak několik měření. Výsledná hodnota je určena průměrem všech naměřených hodnot. Umožňuje měření v rozsahu 0,3 – 15,0 McFarlandovy zákalové stupnice s minimálním objemem suspenze 2 ml. Ve vlastních experimentech byla nejprve použita hustota č. 1 McF, což je přibližně 3×10^8 buněk/ml. Později byly pomocí desítkového ředění použity i menší koncentrace [22].

Po ukončení práce byly zbylé kultury ze zkumavek zlikvidovány zalitím Savem po dobu 24 hodin a poté vylity do výlevky. Nádobí bylo následně sušeno v sušárně 30 min na 120°C a sterilizováno horkovzdušným sterilizátorem 60 min při 170°C. Zbylé kultury na Petriho miskách byly umístěny do mrazicího boxu (-20°C), tento odpad potom odvezla firma specializovaná na biologický odpad.

Postup přípravy inokula kultury *S. aureus* probíhal stejně jako u *E. coli*.

3.2.3 Nakládání se vzorky po vystavení ultrazvuku

Během vystavení sledovaných bakteriálních kultur ultrazvuku byly v určitých časech odebírány vzorky. Odebírány byly pomocí digitálních mikropipet s výměnnými plastovými špičkami v množství 1 ml, 0,1 ml a 0,01 ml. Vzorky byly napipetovány na předem připravené a popsané Petriho misky. Následně byly Petriho misky ihned přikryty volně přiléhajícím víčkem, aby nemohlo dojít ke kontaminaci z okolního vzduchu. Po ukončení pipetování v daném čase, byly vzorky zality připraveným a na ideální teplotu rozehrátým živným agarem. Agar bylo potřeba důkladně promíchat krouživým pohybem s napipetovaným vzorkem, a ještě důkladněji v případě množství vzorku 0,01 ml. Když byl Agar v zalitých Petriho miskách ztuhlý, byly misky obráceny dnem vzhůru, vloženy do košíku a v uzavřeném pytlí dány do inkubátoru na 37°C na dobu 48 hodin.

Po 48 hodinách byly inkubované kultury připravené k odečtu. Po zhodnocení, které množství kultivovaného vzorku je nejméně přerostlé, došlo na počítání KTJ. Množství vzorku 1 ml a 0,1 ml bylo na Petriho misce ve většině případů přerostlé a nebylo možno jej spočítat. Určení KTJ na Petriho miskách s množstvím 0,01 ml také nebylo snadné spočítat, a tak bylo přikročeno k počítání 1/8 výseče plochy a následnému dopočítání.

3.2.4 Popis jednotlivých experimentů

3.2.4.1 Vliv ultrazvuku s frekvencí 35 kHz na *E. coli* v kádince a falkonce

Využit byl ultrazvukový přístroj BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 31 H s frekvencí 35 kHz a výkonem 30 W. Do tohoto zařízení bylo možné umístit dvě expoziční nádoby, a tak byl experiment proveden v duplikátech. Nejprve byl experiment proveden se skleněnými kádinkami (duplikáty označenými A, B) a poté s plastovými falkonkami (duplikáty označenými C, D). V každé nádobě bylo 50 ml inokula kultury *E. coli*. Výchozí koncentrace inokula byla 1 McF, tedy přibližně 3×10^8 buněk/ml. Experiment trval 90 min a v průběhu byly odebírány vzorky v časech 0, 15, 30, 45, 60, 75 a 90 min. Jen u falkonek nebyly pipetovány časy 30 a 60 min. V každém čase bylo pipetováno množství 1 ml, 0,1 ml, 0,01 ml. Celkem bylo k tomuto experimentu využito 72 ks Petriho misek.

3.2.4.2 Vliv ultrazvuku s frekvencí 35 kHz na *E. coli* s chlazením

V tomto experimentu byl použit také ultrazvukový přístroj BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 31 H, ale s odstraněním vlivu teploty. K tomu byla použita silikonová hadička viz Obr. 14 o průměru 7 mm a délce 1700 mm, která byla napojena na přívod vody a vedena po vnitřní straně ultrazvukové vany. Během experimentu protékala hadičkou studená voda, která tak vodu v lázni ochlazovala. Teplota vody uprostřed lázně byla měřena každých 10 min a bylo tak docíleno udržení teploty vody v lázni v rozmezí 20,3 – 23,8°C. Experiment probíhal v duplikátech, do ultrazvukové lázně byly nejprve umístěné dvě skleněné kádinky (duplikáty označené A a B) a poté dvě falkonky (duplikáty C a D). V každé z nich bylo inokulum kultury *E. coli* o objemu 50 ml. Vzhledem k předchozím výsledkům, kde bylo na konci velké množství vyrostlých KTJ, byla zvolena nižší výchozí koncentrace a to přibližně 3×10^6 buněk/ml. Experiment trval 75 min a vzorky byly odebírány po 15-min v množstvích 1 ml, 0,1 ml, 0,01 ml. Kontrolní vzorek obsahoval stejné množství inokula v kádince a byl bez vlivu ultrazvuku. Kádinka byla umístěna na pracovním stole při pokojové teplotě a během experimentu z ní byly odebírány vzorky v množství 0,01 ml ve stejných časech jako z expozičních nádob. Celkem bylo v tomto experimentu použito 48 ks Petriho misek zalitých agarem.



Obr. 14 Na levé straně přístroje je přivedena chladicí hadička. Foto: autorka.

3.2.4.3 Vliv ultrazvuku s frekvencí 1,65 MHz na *E. coli* ve v odměrné baňce

V tomto experimentu bylo využito zařízení sestavené z plastové vany s piezoelektrickým měničem o výkonu přibližně 29 W a frekvenci 1,65 MHz, což je přibližně $50 \times$ vyšší

frekvenční kmitočet než u prvního použitého přístroje. Do vany byla nalita voda o objemu 670 ml a vodní sloupec po vložení baňky s inokulem dosahoval výšky 83 mm. Vodní sloupec byl tak vysoký, aby nemohlo dojít k rozprašování kapaliny. Ultrazvuková vana byla také chlazena silikonovou hadičkou s průtokem studené vody, a tak byla teplota udržena v rozmezí 21,1 – 22,8°C. Bylo použito 50 ml inokula kultury *E. coli* o výchozí koncentraci přibližně 3×10^6 buněk/ml ve skleněné baňce. Vzhledem k malé velikosti vany do ní bylo možno umístit pouze jednu nádobu, takže experiment nebyl proveden v duplikátu. Piezoelektrický měnič byl připojen ke zdroji elektrického napětí. Vzorky byly odebírány každých 15 min v celé délce experimentu, který trval 75 min. V každém čase bylo pipetováno množství vzorků 1 ml, 0,1 ml, 0,01 ml a současně také množství 0,01 ml vzorku z kontroly, která nebyla ovlivněna ultrazvukem. Celkem bylo v tomto experimentu použito 24 ks Petriho misek zalitých agarem.

3.2.4.4 Vliv ultrazvuku s frekvencí 35 kHz a výkonem 160 W na *E. coli*

K dalším experimentům byl použit přístroj BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 510 H, jehož frekvence ultrazvuku je 35 kHz, tedy odpovídá prvnímu použitému přístroji. Elektrický výkon byl 160 W, což je téměř $5,5 \times$ více než u prvního i druhého přístroje. Tento typ ultrazvukového přístroje je oproti předešlým větší, objem vany je 9,7 l. To bylo využito ke zkoumání vzorků ve třech nádobách (různých tvarů a materiálů) najednou. Experiment byl proveden v triplicátech. Byla použita plastová falkonka, skleněná kádinka s množstvím inokula 50 ml a skleněná baňka s množstvím inokula 100 ml. Experiment trval 60 min a vzorky byly pipetovány každých 15 min v množství 1 ml, 0,1 ml, 0,01 ml. Současně bylo v časech 0, 30 a 60 min pipetováno množství 0,01 ml vzorku z kontroly, která nebyla ultrazvukem ovlivněna. Výchozí koncentrace inokula byla u prvních dvou experimentů s tímto přístrojem přibližně 3×10^6 a u třetího přibližně 3×10^5 buněk/ml. Vzhledem k velikosti ultrazvukové vany nebyla silikonová hadička o průměru 7 mm schopna lázeň ochlazovat, tak to bylo vyřešeno jinak. Každých 15 min byla polovina lázně odpuštěna a dolita chladnější destilovanou vodou, která měla přibližně 25°C. Voda v lázni se tak během experimentu pohybovala mezi 21 – 31,1°C. Celkem bylo k těmto experimentům použito 144 ks Petriho misek zalitých agarem.

3.2.4.5 Vliv ultrazvuku s frekvencí 20 kHz a výkonem 320 W

K dalším experimentům byl použit přístroj Bioruptor Standard UCD–200 TM. Tento přístroj má oproti předešlým přístrojům menší frekvenční kmitočet a to 20 kHz. Naopak má možnost nastavení vyššího výkonu na 160, 200 nebo 320 W. V těchto experimentech byl přístroj nastaven na nejvyšší výkon 320 W. Do ultrazvukové vany bylo nalito 750 ml na 4°C vychlazené destilované vody, do které byly navíc přidány malé kousky ledu, aby se teplota během působení ultrazvuku příliš nezvýšila. Po skončení experimentu byla teplota lázně max. o 2°C vyšší. Následně byl do vody vložen zásobník se vzorky v plastových mikrozkušavkách o objemu 1,5 ml a připevněn na ultrazvukovou vanu. Poté byla zavřena dvířka zvukotěsného boxu, nastaven výkon a požadovaný čas působení. V těchto experimentech byla vlivu ultrazvuku vystavena jak *E. coli* tak i bakterie *S. aureus*. S touto bakterií může z bezpečnostních důvodů manipulovat pouze osoba proškolená, a tou byla velmi nápomocná Bc. Alice Břečková. V první části experimentu byla použita koncentrace přibližně 3×10^6 buněk/ml u každé z bakterií. V druhá část experimentu byla provedena jako technický duplikát. Z vytvořeného inokula od každé bakteriální kultury byla udělána ředění až do koncentrace přibližně 3×10^5 buněk/ml a z toho poté další ředění do koncentrace přibližně 3×10^4 buněk/ml. Z těchto ředění obou bakteriálních kultur byly odebrány vzorky 0,1 a 0,01 ml do zkumavek. Celkem tedy 8 zkumavek. Byly tedy použity koncentrace inokula kultury *E. coli* a *S. aureus* o výchozí koncentraci přibližně 3×10^5 a 3×10^4 buněk/ml. S předpokladem, že přístroj o tak vysokém výkonu bude bakterie eliminovat, byly vzorky v prvním pokusu vystaveny působení pouze 15 min a vzorky byly odebírány každých 5 min. Další experimenty trvaly 30 min a vzorky byly odebírány každých 10 min. Experiment netrval déle, protože je tento přístroj velmi citlivý na teplo generované během používání a při delším cyklu hrozí snížení životnosti přístroje. Vzorky byly pipetovány na Petriho misky v množství 0,1 ml a 0,01 ml. Celkem bylo k těmto experimentům využito 48 ks Petriho misek zalitých agarem.

3.2.5 Fluorescenční mikroskopie

Z inokula kultur *E. coli* a *S. aureus* o výchozí koncentraci přibližně 3×10^4 buněk/ml byly odebrány malé vzorky na podložní sklíčka. Stejně tak byly odebrány i vzorky po 30-min působení ultrazvuku v přístroji Bioruptor Standard UCD–200 TM. Poté byla sklíčka se vzorky zakápnuta fluorescenčními barvivami SYTO 9 a PI. Na rozdíl od SYTO 9 barvivo

PI prostupuje pouze narušenými membránami buněk [33]. Ve výsledku fluoreskují živé bakterie s neporušenými membránami zeleně a mrtvé bakterie s porušenými membránami fluoreskují červeně. Byl použit objektiv se zvětšením 63×. Snímky byly pořízeny z živého náhledu na fluorescenčním mikroskopu AxioImager Zeiss, nejprve černobílou kamerou a následně byly snímky barvami upraveny.

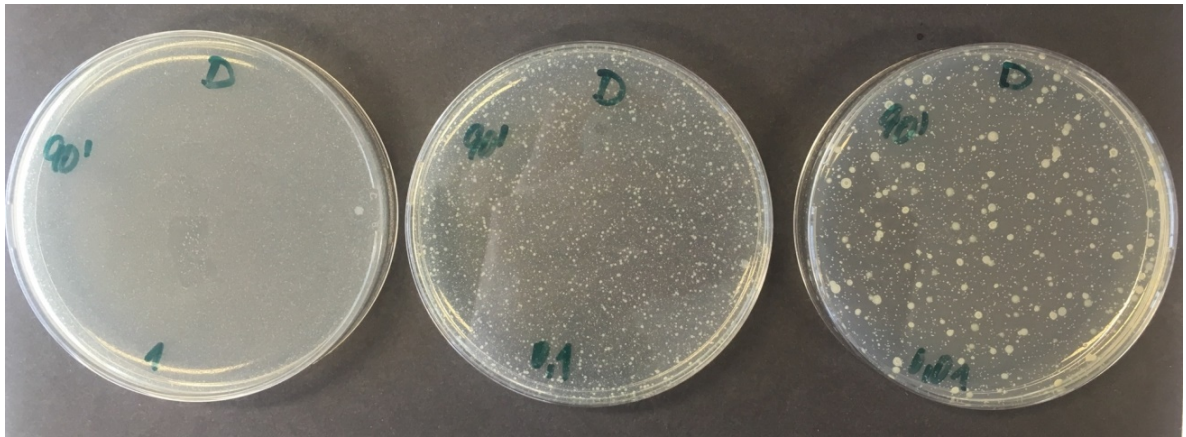
3.2.6 Statistická analýza dat

Pomocí programu Microsoft Office Excel byla provedena statistická analýza dat (kapitola 3.3.1 a 3.3.5) pomocí funkce T-TEST. V kapitole 3.3.1 byl proveden párový t-test porovnání růstu *E. coli* ve skleněných kádinkách a plastových falkonkách. Nejprve byly vypočítány průměry hodnot kádinek A, B a hodnot falkonek C, D a následně byl proveden párový t-test. V kapitole 3.3.5 byl proveden párový t-test technických duplikátů *E. coli* a *S. aureus*, k porovnání výsledků z přibližné výchozí koncentrace 3×10^4 a 3×10^5 buněk/ml. Dále byl proveden nepárový t-test technických duplikátů, kdy v jedné sadě dat byly hodnoty z časů 0 min a v druhé sadě byly hodnoty z časů po 30-min působení ultrazvuku.

3.3 Analýza dat

3.3.1 Výsledek vlivu ultrazvuku s frekvencí 35 kHz na *E. coli* v kádince a falkonce

Po kultivaci vzorků bylo zjištěno, že Petriho misky, ve kterých byl zaléván agarem vzorek 1 ml a 0,1 ml, byly přerostlé a nebylo možné je spočítat (Obr. 15). Počítalo se tedy dávkování 0,01 ml, ale ani v tomto případě nešlo o ideální hustotu vyrostlých kolonií, a tak byly počítány KTJ z 1/8 Petriho misky (Obr. 16).



Obr. 15 Vzorky z falkonky po 90-min působení ultrazvuku; vlevo a uprostřed je vidět příliš mnoho KTJ s kultivovaným vzorkem 1 a 0,1 ml; vpravo je vzorek, který bylo možné hodnotit. Foto: autorka.



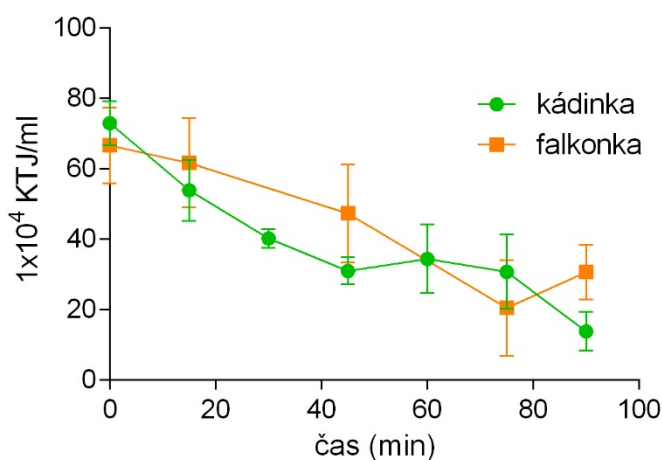
Obr. 16 Počítání KTJ z 1/8 Petriho misky, vzorek A 0,01 ml v čase 90 min. Foto: autorka.

Výsledky spočítaných KTJ jsou vidět v Tab. 1. U výsledků kádinek A i B na Petriho miskách se vzorkem odebraným v čase 45 min byly shluky KTJ. To znamená, že misky byly špatně promíchané a konečná čísla nemohla být správně spočítaná a je nutno je brát s rezervou. U výsledků falkonek (duplikáty C a D) na Petriho miskách se v čase 75 min vytvořily shluky KTJ u středu. Šlo tedy také o špatně promíchané misky a konečné výsledky těchto časů je také nutné brát s rezervou, nicméně potvrzují celkový trend úbytku KTJ v čase.

Tab. 1 Výsledek počtu KTJ na ml $\times 10^2$ pro všechny expoziční nádoby (A, B a C, D jsou duplikáty) v různém množství vzorku na agaru (1; 0,1; 0,01 ml).

čas [min]	1 ml	0,1 ml	kádinka A 0,01 ml	kádinka B 0,01 ml	falkonka C 0,01 ml	falkonka D 0,01 ml
0	přerostlé	přerostlé	7736	6848	5904	7424
15	přerostlé	přerostlé	4776	6000	5264	7056
30	přerostlé	přerostlé	4216	3832	-	-
45	přerostlé	přerostlé	3368	2816	3744	5712
60	přerostlé	přerostlé	4128	2744	-	-
75	přerostlé	přerostlé	3824	2320	1088	3008
90	přerostlé	přerostlé	1768	984	2512	3616

Z výsledků je vidět, že zde negativní vliv byl, neboť úbytek KTJ mezi časem 0 a 90 min byl velký (Obr. 17). V tomto přístroji však docházelo k samovolnému ohřívání vody vlivem mechanického kmitání. Teplota vody byla po 40-min působení ultrazvuku vyšší než 40°C. Tato teplota nad 40°C není příznivá pro *E. coli*, neboť již dochází k denuraci bílkovin. Nebylo tedy možné rozlišit, zda byl výsledný úbytek kolonií způsoben vlivem působení ultrazvuku nebo vlivem vysoké teploty.



Obr. 17 Grafické znázornění vlivu ultrazvuku o frekvenci 35 kHz s rostoucí teplotou.

Párový t-test vyšel s výsledkem $p = 0,770$. To znamená, že mezi výsledky průměrů hodnot z kádinek a falkonek nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl, vliv různých materiálů na výsledky KTJ se tedy neukázal.

3.3.2 Výsledky vlivu ultrazvuku s frekvencí 35 kHz na *E. coli* s chlazením.

Po kultivaci bylo opět zjištěno, že Petriho misky se vzorkem 1 ml a 0,1 ml jsou přerostlé. Počty KTJ byly počítány z 1/8 Petriho misek s kultivovaným množstvím vzorku 0,01 ml. Výsledek KTJ pro kádinku a kontrolu je vidět v Tab. 2. Na Petriho misce v čase 15 min u vzorku z kontroly kádinek byl malý shluk KTJ. Proto konečný počet KTJ v tomto čase nemohl být spočítán úplně přesně. Výsledky KTJ pro falkonky a kontrolu jsou v Tab. 3. Na žádné z těchto Petriho misek se neobjevily shluky, které by zapříčinily nepřesné počítání.

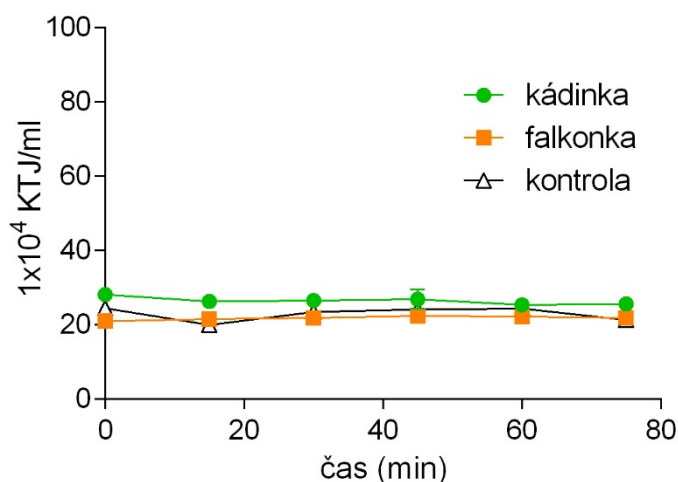
Tab. 2 Výsledek počtu KTJ na ml $\times 10^2$ pro kádinky (A, B – duplikáty) a kontrolu v různém množství vzorku na agaru (1; 0,1; 0,01 ml).

čas [min]	1 ml	0,1 ml	kádinka A 0,01 ml	kádinka B 0,01 ml	kontrola A, B 0,01 ml
0	přerostlé	přerostlé	2816	2808	2552
15	přerostlé	přerostlé	2560	2696	1888
30	přerostlé	přerostlé	2752	2560	2384
45	přerostlé	přerostlé	2496	2872	2496
60	přerostlé	přerostlé	2544	2536	2536
75	přerostlé	přerostlé	2640	2480	2104

Tab. 3 Výsledek počtu KTJ na ml $\times 10^2$ pro falkonky (C, D – duplikáty) a kontrolu v různém množství vzorku na agaru (1; 0,1; 0,01 ml).

čas [min]	1 ml	0,1 ml	falkonka C 0,01 ml	falkonka D 0,01 ml	kontrola C, D 0,01 ml
0	přerostlé	přerostlé	2168	2016	2336
15	přerostlé	přerostlé	2024	2288	2102
30	přerostlé	přerostlé	2080	2288	2304
45	přerostlé	přerostlé	2192	2288	2336
60	přerostlé	přerostlé	2288	2156	2344
75	přerostlé	přerostlé	2112	2256	2160

Graficky znázorněné výsledky, převedené na 1×10^4 KTJ/ml, nevypovídají o úbytku ani přírůstku bakterií *E. coli* (Obr. 18). Mírné výkyvy hodnot mohou být způsobené nepřesným počítáním KTJ při odečtu z 1/8 Petriho misek a následnému dopočítání, toto počítání není a ani nemůže být absolutně přesné.



Obr. 18 Grafické znázornění vlivu ultrazvuku o frekvenci 35 kHz s chlazením.

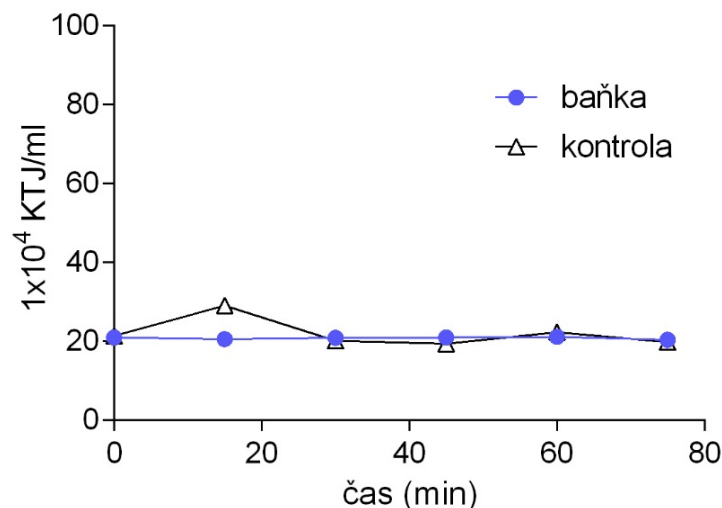
Vliv ultrazvuku při daných parametrech a chlazení se zde neprojevil.

3.3.3 Výsledek vlivu ultrazvuku s frekvencí 1,65 MHz na *E. coli* v odměrné baňce

Výsledky počtu KTJ z tohoto experimentu se v čase příliš nemění (Tab. 4). V čase 15 min u kontroly byly na Petriho misce velké shluky KTJ, pravděpodobně kvůli špatnému promíchání. Až na tuto výchytku lze říct, že jsou hodnoty, dle grafického znázornění (převedené na 1×10^4 KTJ/ml), téměř lineární a nevypovídají o tom, že by měl ultrazvuk o frekvenci 1,65 MHz vliv na bakterii *E. coli* (Obr. 19).

Tab. 4 Výsledek počtu KTJ na $\text{ml} \times 10^2$ pro baňku a kontrolu v různém množství vzorku na agaru (1; 0,1; 0,01 ml).

čas [min]	1 ml	0,1 ml	baňka 0,01 ml	kontrola 0,01 ml
0	přerostlé	přerostlé	2096	2136
15	přerostlé	přerostlé	2056	2904
30	přerostlé	přerostlé	2088	2016
45	přerostlé	přerostlé	2096	1936
60	přerostlé	přerostlé	2112	2232
75	přerostlé	přerostlé	2040	1976



Obr. 19 Grafické znázornění vlivu ultrazvuku o frekvenci 1,65 MHz s chlazením.

3.3.4 Výsledek vlivu ultrazvuku s frekvencí 35 kHz a výkonem 160 W na *E. coli*

Výsledky počtu KTJ z těchto experimentů jsou shrnuté v Tab. 5, 6 a 7. Petriho misky s množstvím vzorků 1 ml a 0,1 ml byly u všech přerostlé, a tak se hodnotilo pouze množství v 0,01 ml. Počítala se každá jednotlivá KTJ, protože jich z této koncentrace (přibližně 3×10^6 v případě výsledků v Tab. 5, 6 a 3×10^5 buněk/ml v případě výsledků viz Tab. 7) nevyrostlo tolik jako v předchozích experimentech. To mohlo být způsobené tím, že bakterie *E. coli* nebyly z čerstvě oživených disků, a tak výsledky mohlo ovlivnit jejich stáří. V průběhu experimentu se odebíraly i vzorky z kontroly, na kterou nepůsobil ultrazvuk. Přestože je při porovnání falkonky v časech 0 a 60 min a kontroly patrný přírůstek KTJ vlivem ultrazvuku po 60-min (Obr. 20), tak podle kontroly, která se pohybovala ± 700 KTJ (Tab. 5), nelze říct, že by se ostatní výsledky výrazně lišily (Obr. 21). Zajímavé je, že u druhého experimentu, hodnoty KTJ v čase 30 výrazně přibýly, a to o téměř 200 KTJ/ml (Tab. 6). Čas půl hodiny odpovídá času dělení buněk, a tak by to mohlo vypovídat o tom, že tento ultrazvuk pravděpodobně dokázal bakteriím vytvořit podmínky spolu s teplotou k tomu, aby se některé z nich začaly dělit. Teplota rostla každou minutu o několik desetin a v čase 30 min byla 29,8°C.

Tab. 5 Výsledek počtu KTJ na ml $\times 10^2$ pro expoziční nádoby falkonku, kádinku, válec a kontrolu v 0,01 ml vzorku na agaru. Výchozí přibližná koncentrace *E. coli* byla 3×10^6 buněk/ml.

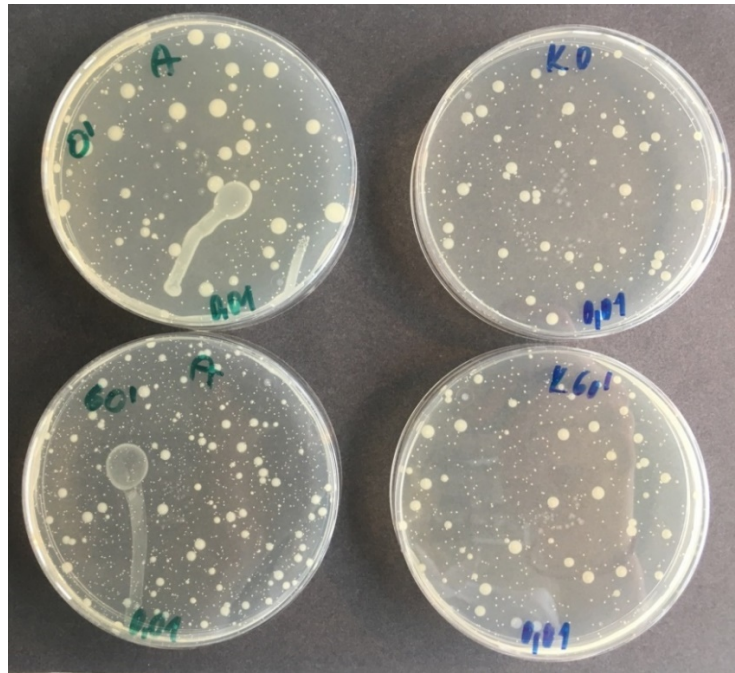
čas [min]	falkonka 0,01 ml	kádinka 0,01 ml	válec 0,01 ml	kontrola 0,01 ml
0	506	452	720	590
15	484	724	646	-
30	574	672	636	710
45	548	738	628	-
60	554	750	610	704

Tab. 6 Výsledek počtu KTJ na ml $\times 10^2$ pro expoziční nádoby falkonku, kádinku, válec a kontrolu v 0,01 ml vzorku na agaru. Výchozí přibližná koncentrace *E. coli* byla 3×10^6 buněk/ml.

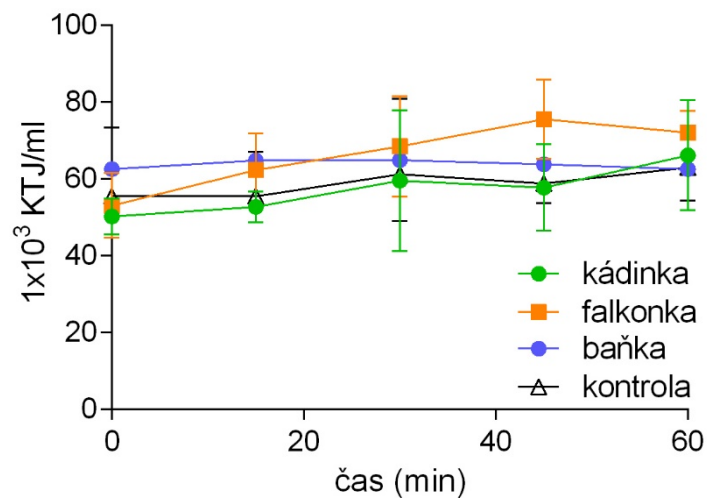
čas [min]	falkonka 0,01 ml	kádinka 0,01 ml	válec 0,01 ml	kontrola 0,01 ml
0	555	619	720	607
15	564	609	671	-
30	789	821	814	672
45	701	867	743	-
60	824	756	714	697

Tab. 7 Výsledek počtu KTJ na ml $\times 10^2$ pro expoziční nádoby falkonku, kádinku, válec a kontrolu v 0,01 ml vzorku na agaru. Výchozí přibližná koncentrace *E. coli* byla 3×10^5 buněk/ml.

čas [min]	falkonka 0,01 ml	kádinka 0,01 ml	válec 0,01 ml	kontrola 0,01 ml
0	483	520	508	466
15	533	536	627	-
30	424	560	495	453
45	481	662	542	-
60	606	654	553	487



Obr. 20 Porovnání KTJ na Petriho miskách, vzorek 0,01 ml z falkonky (vlevo) a kontroly (vpravo) po 0 a 60-min působení ultrazvuku. Foto: autorka.



Obr. 21 Grafické znázornění vlivu ultrazvuku o frekvenci 35 kHz a výkonem 160 W s chlazením na *E. coli* v různých expozičních nádobách.

3.3.5 Výsledek vlivu ultrazvuku s frekvencí 20 kHz a výkonem 320 W

Výsledky počtů KTJ z experimentů s přístrojem Bioruptor Standard UCD–200 TM jsou v Tab. 8 a Tab. 9. První experiment byl proveden s výchozí koncentrací přibližně 3×10^6 buněk/ml (Tab. 8). S předpokladem, že vysoký výkon ultrazvuku docílí viditelné eliminace počtu vyrostlých KTJ, trval experiment pouze 15 min. Petriho misky

s kultivovaným vzorkem 0,1 ml byly přerostlé a výsledky byly odečítány z misek s odebraným vzorkem 0,01 ml. Počítala se každá jednotlivá KTJ, stejně jako v kapitole 3.3.4. U obou druhů bakterií počty KTJ nejprve nepatrně stoupají a následně začínají klesat (Tab. 8). Pokus byl následně zopakován s delším časovým intervalem.

Tab. 8 Výsledek počtu KTJ na ml $\times 10^2$ pro bakterie *E. coli* a *S. aureus* v 0,01 ml vzorku na agaru. výchozí koncentrace 3×10^6 buněk/ml.

čas [min]	<i>E. coli</i> 0,01 ml	<i>S. aureus</i> 0,01 ml
0	785	686
5	845	855
10	728	1360
15	638	1045

Následující experiment byl proveden jako technický duplikát, všechny vzorky byly pod vlivem ultrazvuku stejnou dobu (Tab. 9). Použity byly bakteriální kultury *E. coli* a *S. aureus* o výchozí koncentraci přibližně 3×10^5 a 3×10^4 buněk/ml. V předchozích experimentech bylo ověřeno, že se kontrola vzorků během 75 min nemění, protože tento experiment trval pouze 30 min, tak bylo předpokládáno, že se ani v tomto případě nezmění. Kontrolní vzorky tedy nebyly provedeny. Experiment trval 30 min a vzorky byly odebírány každých 10 min. Pipetované vzorky 0,1 ml byly na Petriho miskách přerostlé, a tak byly hodnoty počítány z 0,01 ml. Na spočítaných KTJ bakterie *E. coli* je vidět tendence klesání hodnot. Po 30-min působení ultrazvuku byly bakterie eliminovány téměř o 90 % původního množství KTJ. Hodnoty, které byly spočítány z výchozí koncentrace buněk 3×10^4 buněk/ml, splňují požadavky normy ČSN EN ISO 6222, a tak mohou být považovány za nejpřesnější. Počet KTJ u bakterie *S. aureus* byl prvních 15 min téměř konstantní a poté začal klesat. Po 30-min působení ultrazvuku klesl počet KTJ o 50 % původního počtu. Rozdíl mezi výsledky bakterií *E. coli* a *S. aureus* byly značné (Obr. 22).

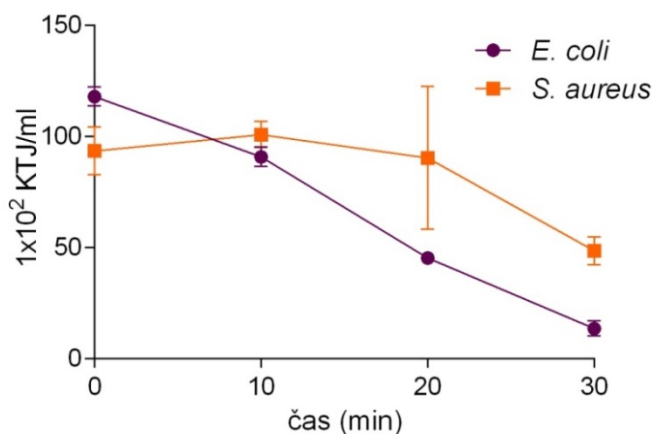
Párový t-test technických duplikátů vyšel u bakterie *E. coli* s výsledkem $p = 0,176$ a u bakterie *S. aureus* s výsledkem $p = 0,114$. Mezi výsledky tedy nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.

Dále výsledek nepárového t-test technických duplikátů u bakterie *E. coli* s výsledkem $p = 0,0014$ a u bakterie *S. aureus* s výsledkem $p = 0,036$. Oba výsledky ukazují, že mezi

počátečními hodnotami a hodnotami po 30-min působení ultrazvuku u obou bakterií je statisticky významný rozdíl.

Tab. 9 Výsledek počtu KTJ na ml $\times 10^2$ pro bakterie *E. coli* a *S. aureus* v 0,01 ml vzorku na agaru, A – výchozí koncentrace 3×10^4 buněk/ml, B – výchozí koncentrace 3×10^5 buněk/ml.

čas [min]	<i>E. coli</i> A 0,01 ml	<i>E. coli</i> B 0,01 ml	<i>S. aureus</i> A 0,01 ml	<i>S. aureus</i> B 0,01 ml
0	121	1149	101	858
10	94	877	105	967
20	44	465	113	675
30	16	112	53	441



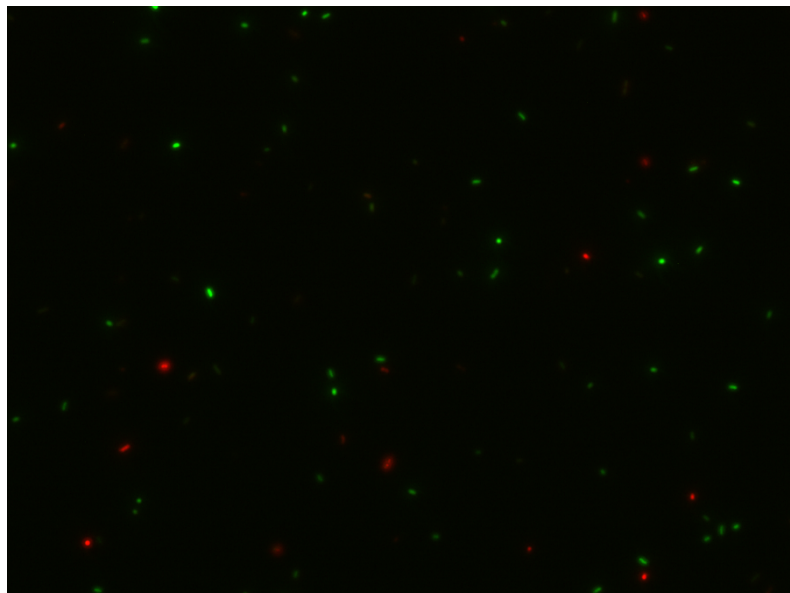
Obr. 22 Grafické znázornění vlivu ultrazvuku na *E. coli* a *S. aureus* o frekvenci 20 kHz a výkonu 320 W.

3.3.6 Fluorescenční mikroskopie

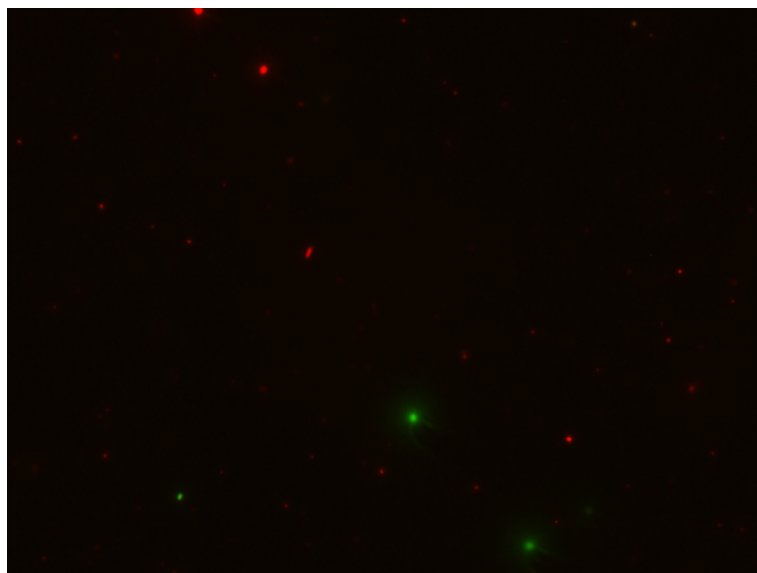
Fluorescenční barvení pomocí Live/Dead Viability Assay bylo provedeno na vzorcích inokula bakteriálních kultur *E. coli* a *S. aureus*, konkrétně z výchozí koncentrace přibližně 3×10^4 buněk/ml (kapitola 3.3.5). Barvení bylo provedeno na vzorku před vystavením ultrazvuku a po vystavení ultrazvuku. Bakterie živé s neporušenými membránami fluoreskovaly zeleně a bakterie mrtvé s porušenými membránami fluoreskovaly červeně. Životaschopnost bakterií byla určena jako poměr živých bakteriálních buněk k jejich celkovému počtu na snímku.

Na snímku s *E. coli* před vlivem ultrazvuku bylo napočítáno 61 živých buněk k celkovému počtu 78 buněk (Obr. 23). Na snímku *E. coli* po vlivu ultrazvuku napočítány

4 živé buňky k celkovému počtu 58 buněk na snímku (Obr. 24). Při porovnání těchto výsledků, s ohledem na celkový počet bakterií na snímku, šlo o 90 % úbytek živých bakterií *E. coli*. Úbytek přibližně 90 % vyšel i pomocí metody počítání KTJ.



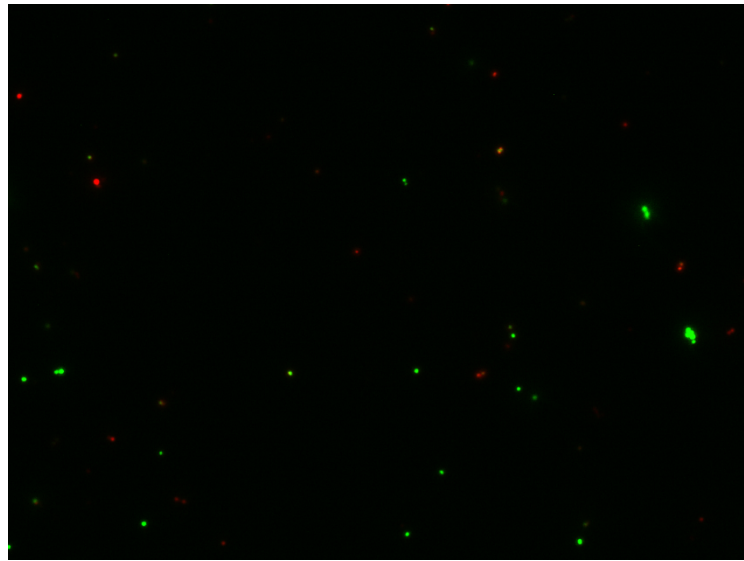
Obr. 23 Fluorescence živých (zelená) a mrtvých (červená) *E. coli* před vystavením ultrazvuku, barveno pomocí Live/Dead. Foto: autorka.



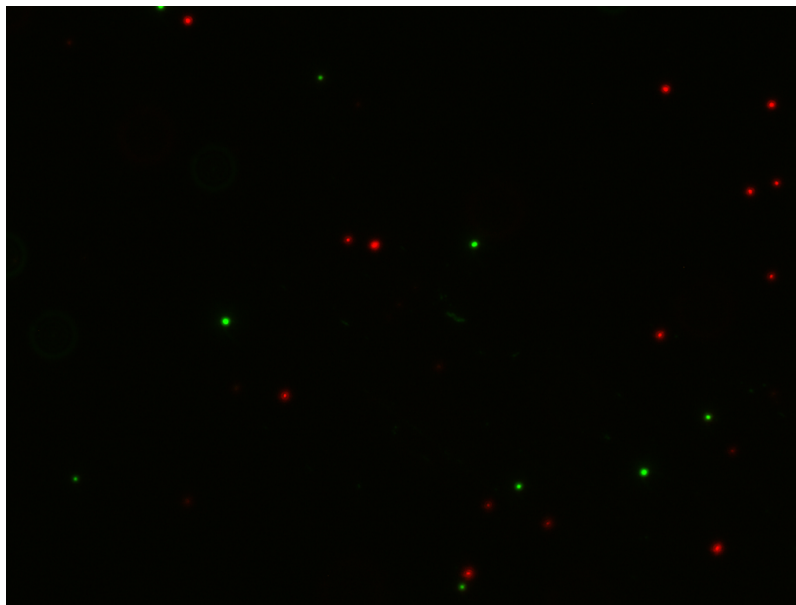
Obr. 24 Fluorescence živých (zelená) a mrtvých (červená) *E. coli* po vystavení ultrazvuku po 30-min, barveno pomocí Live/Dead. Foto: autorka.

Na snímku s *S. aureus* před vlivem ultrazvuku bylo napočítáno 34 živých buněk k celkovému počtu 54 buněk na snímku (Obr. 25). Na snímku po vlivu ultrazvuku bylo napočítáno 9 živých buněk k celkovému počtu 28 buněk (Obr. 26). Při porovnání těchto

výsledků, s ohledem na celkový počet bakterií na snímku, šlo o 48 % úbytek živých bakterií *S. aureus*. Pomocí metody počítání KTJ vyšel úbytek přibližně 50 %.



Obr. 25 Fluorescence živých (zelená) a mrtvých (červená) *S. aureus* před vystavením ultrazvuku, barveno pomocí Live/Dead. Foto: autorka.



Obr. 26 Fluorescence živých (zelená) a mrtvých (červená) *S. aureus* po vystavení ultrazvuku po 30-min, barveno pomocí Live/Dead. Foto: autorka.

4 Diskuze

V rámci výzkumné části práce byly provedeny experimenty, kdy byly do ultrazvukových přístrojů vloženy nádoby s inokulem, na které v určitém časovém úseku působil ultrazvuk. Vzorokly byly pravidelně během experimentu odebírány, pipetovány na Petriho misky a následně kultivovány. Po kultivaci byla stanovena životaschopnost buněk pomocí počítání KTJ. Dále byl určen trend chování bakterií během experimentu dle grafického znázornění a případného statistického zhodnocení výsledku.

Mechanické vlnění podněcuje kmitání částic a vedlejším účinkem je zvyšování teploty vody. Tato zvyšující se teplota měla jednoznačný vliv inaktivace bakterií viz kapitola 3.3.1. Životaschopnost bakterií klesala v čase se zvyšující se teplotou (Obr. 17). Tepelné zpracování, pasterizace, termická dezinfekce jsou známé a běžně se používají např. při výrobě potravinářských výrobků nebo k dezinfekci různých předmětů ve zdravotnictví. Proto byl vliv teploty v dalších experimentech odstraněn pomocí chlazení. Hned následující experiment byl proveden pomocí stejného přístroje BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 31 H s chlazením. Teplota byla udržena mezi 20,3°C a 23,8°C a hodnoty KTJ se nezměnily (Obr. 18). Lze říct, že tento ultrazvukový přístroj neměl na bakterie žádný vliv. Dál se ve všech následujících experimentech chladilo, ale ani u dalších experimentů s ultrazvukovým měničem o frekvenci 1,65 MHz a přístrojem BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 510 H, nebyl pozorován žádný vliv ultrazvuku na bakterie.

Nebyl zjištěn negativní ani pozitivní vliv frekvence všech testovaných ultrazvukových přístrojů. Výsledky experimentů, popsané v kapitolách 3.3.2 a 3.3.3, nepotvrzují žádný vliv na bakterii *E. coli*. Byly zde použity velikosti frekvence o 35 a 1650 kHz, ani takový rozdíl nebyl na výsledcích nijak znát. Jiná studie, ve které byl použit vysokofrekvenční ultrazvuk s nízkým výkonem, popisuje nejprve značný počáteční nárůst aktivity bakterií, což se v této práci nepotvrdilo [38]. Naopak se uvádí, že při snižování životaschopnosti bakterií jsou mnohem účinnější nižší frekvence společně s velkým výkonem ultrazvuku [39]. Ve většině odborných textů se v této souvislosti věnují přístrojům s frekvencí od 20 do 100 kHz [35], [36], [40].

V posledním experimentu, provedeným pomocí přístroje Bioruptor Standard UCD–200 TM, vykazují oba druhy vybraných bakterií negativní vliv ultrazvuku (kapitola 3.3.5 a 3.3.6). Bakterie *E. coli* po 30-min působení ultrazvuku, vykazuje zhruba 90 % úmrtnost.

Naopak bakterie *S. aureus* vykazuje, po stejném čase působení ultrazvuku, zhruba 50 % úmrtnost. Výsledky stanovení KTJ byly navíc podpořené velmi podobnými výsledky z fluorescenční mikroskopie: *E. coli* 90 % úbytek živých buněk a *S. aureus* 48 % úbytek. Oba bakteriální kmeny byly vystaveny stejnému působení ultrazvuku, a tak bylo prokázáno, že je vliv na bakterie velmi rozdílný. Tento rozdíl by mohl být způsoben odlišnou stavbou stěny buňky. Nelze také vyloučit možnost, že kdyby byla expoziční doba delší, mohlo by být docíleno silnějšího vlivu. Přístroj Bioruptor Standard UCD–200 TM se obvykle používá na přípravu vzorků pro molekulárně genetické analýzy a jeho standartní doporučená doba použití je 10 – 15 min, nebylo proto možné překročit dobu působení 30 min. Ve studii, kde použili ultrazvukový přístroj s frekvencí 40 kHz, s příkonem 350 W, dosáhli po 60-min expozici ultrazvuku velmi podobného výsledku, jako v této práci v kapitole 3.3.5. Dosáhli snížení počtu *E. coli* o 90 % a 40 % snížení u *S. aureus* [27]. To, že tohoto výsledku docílili po delší době, může být způsobeno neznámou účinností přístroje, kterou v článku neuvádějí, lze předpokládat, že výkon na výstupu byl o něco menší. Další studie poukázala na stěnu Gram–pozitivních bakterií, která je na rozdíl od Gram–negativních bakterií, mohutnější a obsahuje silnou biopolymerní vrstvu peptidoglykanu [36], [27], stěna je také bohatě hydratovaná a měkčí. To vše by mohlo napomoci tomu, aby buňka *S. aureus* snadněji absorbovala mechanické vlnění a tím tak byla vůči vlivu ultrazvuku odolnější [36].

V této studii byly dále porovnány expoziční nádoby různých tvarů z plastu a skla. V odborných studiích často používají ultrazvukový přístroj s tzv. sondou, která je přímo ponořena do nádoby s inokulem, tedy bez použití expoziční nádoby [27], [36]. Ultrazvuk pak nepřechází přes další prostředí, nedochází k jeho zeslabování a ultrazvukové vlny jsou přístrojem vyzařovány přímo do inokula s bakteriemi. U použitých přístrojů BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 31 H a BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 510 H nebyl nicméně pozorován žádný vliv materiálu nádoby (plast, sklo). V kapitole 3.3.4 jsou popsány výsledky experimentů, kde za stejných podmínek byly vzorky umístěny do 3 různých nádob a výsledné hodnoty se výrazně neliší. V jedné dřívější studii byly provedeny experimenty na porovnání expozičních nádob, podobně jako to bylo provedeno v této bakalářské práci. Závěrem bylo, že působení ultrazvuku bylo výrazně účinnější v tenkostěnné kádince ze skla oproti tlustostěnnému odměrnému válci nebo plastové nádobě [27]. V této práci se vliv materiálu neukázal, protože v experimentech, kde ho bylo možné testovat, nebyl prokázán žádný vliv ultrazvuku na bakterie. Naopak

do přístroje (kapitola 3.2.4.5), u kterého byl potvrzen vliv ultrazvuku na bakterie, bylo možné vložit pouze plastové mikroskopické nádobky o objemu 1,5 ml a volba jiného materiálu expoziční nádoby tedy v tomto případě možná nebyla.

5 Závěr

V této bakalářské práci byla provedena studie vlivu ultrazvuku na bakterie *E. coli* a *S. aureus*. Teoretická část práce byla věnována popisu fyzikální podstaty ultrazvuku a především jeho využití v lékařství a účinků na živé organismy. V teoretické části byla popsána stavba, složení a vlastnosti bakteriálních buněk. Stručně byly představeny použité metody pro výzkum vlivu ultrazvuku a následně byl zpracován přehled použitých ultrazvukových přístrojů v této práci.

Ve výzkumné části práce byl porovnán vliv na tyčinkovité, Gram-negativní bakterie *E. coli* a kokovité, Gram-pozitivní bakterie *S. aureus*. Jako zdroj ultrazvuku byly dostupné čtyři různé přístroje: 1) BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 31 H, 2) ultrazvukový měnič s frekvencí 1,65 MHz, 3) BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 510 H a 4) Bioruptor Standard UCD–200 TM. Testovaly se nejvyšší možné frekvence a výkony, které byly k dispozici. Konkrétně frekvence 20 kHz, 35 kHz, 1,65 MHz. Výkony 29 W, 30 W, 160 W a 320 W. Negativní vliv na bakterie měla prokazatelně vysoká teplota ($> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) způsobená ultrazvukem a velký výkon ultrazvukového přístroje. Nicméně použité rozpětí dostupných frekvencí ultrazvukových přístrojů vliv stimulace nebo snížení počtu bakterií nepotvrdilo. Dále bylo zjištěno, že Gram-pozitivní stěna napomáhá odolnosti bakterií proti ultrazvukovému stresoru.

V experimentech této práce se dostupnými ultrazvukovými přístroji nepodařilo snížit počet buněk na 0 KTJ/ml. Nejvýkonnějším přístrojem se podařilo snížit počet bakterií *E. coli* o 90 % a *S. aureus* o 50 %. Využití ultrazvuku k dezinfekci či sterilizaci v této fázi není efektivní ani spolehlivé. Byl by potřeba výkonnější ultrazvukový přístroj. Buď takový, do kterého by bylo možno dát větší objem vzorku, nebo např. nějaký předmět, či ultrazvukový přístroj pro použití ve stojanu s tzv. sondou, kde bude možno použít větší nádoby, např. o objemu 0,5 – 4 l.

Seznam použité literatury

- [1] *Pharma Reports: Klinicky významné bakterie*. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-588-6.
- [2] KAPRÁLEK, František. *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-811-5.
- [3] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Encyklopedie hydrobiologie: Prokaryotické organismy* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2017-10-24]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=P035
- [4] Prokaryotická buňka typická pro bakterie [online obrázek]. In: ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Encyklopedie hydrobiologie: Prokaryotické organismy* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2017-10-24]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-006/hesla/img_d10e16096.html
- [5] BEDNÁŘ, Marek et al. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.
- [6] ZÁVODSKÁ, Radka. *Biologie buněk: základy cytology, bakteriologie, virology*. Praha: Scienta, 2006. ISBN 80-86960-15-3.
- [7] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Vyd.2. Praha: Grada, 2014. Sestra. ISBN 978-80-247-4771-2.
- [8] [Buněčná stěna Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií] [online obrázek]. In: Gramovo barvení: pozitivita a negativita. *Wikiskripta* [online]. Wikiskripta. 2011, [2017-10-23], [2017-10-29]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/w/Gramovo_barven%C3%AD
- [9] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2001. ISBN 80-902896-2-2.
- [10] VESELÁ, Mária. Fluorescenční mikroskopie. *Chempoint* [online]. 2011. [cit. 2017-12-11]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/fluorescencni-mikroskopie>
- [11] SOUKUP, Aleš. [Excitační a bariérový filtr fluorescenčního mikroskopu] [online obrázek]. In: Fluorescenční mikroskopie [online]. *Botanická mikrotechnika*. 2004. Katedra fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, [2017-12-11]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>
- [12] FIŠAR, Zdeněk. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. *Univerzita Karlova I. lékařská fakulta* [online]. [cit. 2017-12-11]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/fluorescence.pdf>
- [13] JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Vyd. 2. Praha: Karolinum, 2015. Univerzita Karlova. ISBN 978-80-246-3210-0.

- [14] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. Vyd. 2. Praha: VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-676-0.
- [15] ČECH, Evžen a kol. *Ultrazvuk v lékařské diagnostice a terapii*. Praha: Avicenum, 1982. ISBN 08-085-82.
- [16] BENEŠ J., J. KYMPLOVÁ a F. VÍTEK. *Základy fyziky pro lékařské a zdravotnické obory*. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4712-5.
- [17] BENEŠ J., P. STRÁNSKÝ a F. VÍTEK. *Základy lékařské biofyziky*. Vyd.2. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1386-4.
- [18] PETRŽÍLKA, Václav. *Piezoelektrina a její technické použití*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1960.
- [19] LEPIL, Oldřich. *Fyzika pro gymnázia: Mechanické kmitání a vlnění*. Vyd. 5. Praha: Prometheus, 2017. ISBN 978-80-7196-468-1.
- [20] MORSTEIN, Vojtěch. Jiná publikační činnost. *Lékařská fakulta Masarykovy univerzity* [online]. Brno: Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, ©2008-2017 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/~vmornst/ultrazv.htm>
- [21] Oživování kultur ze želatinových disků. *Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity* [online]. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, ©2011 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: http://www.sci.muni.cz/ccm/download/oziv_GD.pdf
- [22] Densilameter II. *Erba Group | Erba Lachema s.r.o.* [online]. Brno: Erba Group, ©2017 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <https://www.eralachema.com/attachments/Densi-LAMeter%20II-CZ+SK+EN+RU+PL.pdf>
- [23] SONOREX DIGITEC Ultrasonic baths. BANDELIN electronic GmbH & Co. KG [online]. [cit. 2019-01-4]. Dostupné z: https://bandelin.com/produkte/sonorex/sonorex_digitec/?lang=en
- [24] [Zásobník na vzorky, Bioruptor Standard UCD–200 TM] [online obrázek]. In: Bioruptor® Sonicator. *Karolinska Institutet* [online]. [cit 2019-01-06]. Dostupné z: https://ki.se/sites/default/files/bioruptor_user_manual.pdf
- [25] [Zvukotěsný box a ultrazvuková vana, Bioruptor Standard UCD–200 TM] [online obrázek]. In: Bioruptor Sonication System User Manual: Bioruptor Standard UCD-200. *Diagenode* [online]. [cit. 2019-01-06]. Dostupné z: https://www.diagenode.com/files/products/shearing_technology/bioruptor/Bioruptor_Standard_manual_old_model.pdf
- [26] ČSN EN ISO 6222. *Jakost vod – Stanovení kultivovatelných mikroorganismů – Stanovení počtu kolonií očkovaním do živného agarového kultivačního média*. Praha: Český normalizační institut, 2000.

- [27] Monsen, T. et al. In Vitro Effect of Ultrasound on Bacteria and Suggested Protocol for Sonication and Diagnosis of Prosthetic Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009, **47**(8), 2496–2501. DOI 10.1128/JCM.02316-08. Dostupné také z: <https://jcm.asm.org/content/47/8/2496.short>
- [28] SCINDLER, Jiří. Mikrobiální film: Jak žijí bakterie v přirozeném prostředí?. *Vesmír*. 2001, **80**(131), 203–206. Dostupné také z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2001/cislo-4/mikrobialni-biofilm.html>
- [29] Skripta ke cvičení z Obecné mikrobiologie, Cytologie a morfologie bakterií. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity. *Informační systém* [online]. 2017, Masarykova univerzita [cit. 2019-01-15]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/pozorovani_mikroorganizmu.html
- [30] Sweep-Technologie – BANDELIN. *Home – BANDELIN* [online]. [cit. 2019-01-16]. Dostupné z: <https://bandelin.com/ultraschall/sweep-technologie/>
- [31] Nebulizer Ultrasonic Components | APC International. *Piezo Products & Materials Supplier | APC International* [online]. 2016. [cit. 2019-01-16] Dostupné z: <https://www.americanpiezo.com/standard-products/nebulizers-fluid-atomizers.html>
- [32] ČSN EN ISO 8199. *Jakost vod – Obecný návod pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami*. Praha: Český normalizační institut, 2008.
- [33] VESELÁ, Mária. Posouzení životaschopnosti mikrobiálních buněk fluorescenční mikroskopií. *Chempoint* [online]. 2011. [cit. 2019-02-16]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/posouzeni-zivotaschopnosti-mikrobialnich-bunek-fluorescencni-mikroskopii>
- [34] Bioruptor Sonication System User Manual: Bioruptor Standard UCD-200. *Diagenode* [online]. [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: https://www.diagenode.com/files/products/shearing_technology/bioruptor/Bioruptor_Standard_manual_old_model.pdf
- [35] Liao, Xinyu et al. Multiple action sites of ultrasound on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Food Science and Human Wellness*. 2018, **7**(1), 102–109. ISSN 2213-4530. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.01.002>
- [36] Gao, S. et al. Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014, **21**(1), 446–453. ISSN 1350-4177. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417713001442>
- [37] Herceg, Zoran. Effect of High Intensity Ultrasound Treatment on the Growth of Food Spoilage Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. 2013, **51**(3), 352–359. ISSN 1330–

9862. Dostupné také z:
<https://pdfs.semanticscholar.org/3f82/af46c9188f3a9acc6f18109411dea86bf627.pdf>
- [38] Joyce, E. et al. The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2003, **10**(6), 315–318. ISSN 1350-4177. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(03\)00101-9](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(03)00101-9)
- [39] Qian, Z., R. D. Sagers a W. G. Pitt. The effect of ultrasonic frequency upon enhanced killing of *P. aeruginosa* biofilms. *Annals of Biomedical Engineering*. 1997, **25**(1), 69–76. DOI 10.1007/BF02738539. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/BF02738539>
- [40] Bilek, Seda Ersus a Fulya Turantas. Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, **166**(1), 155–162. ISSN 0168-1605. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.028>
- [41] BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 31 H [online obrázek]. In: Ultrazvukové čističky a zvlhčovače [online]. Copyright © 2016 ULTRAZVUK, s.r.o. [cit. 15.04.2019]. Dostupné z: <https://www.ultrazvuk.eu/bandelin-sonorex-digitec-dt-31-h>
- [42] BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 510 H [online obrázek]. In: Ultrazvukové čističky a zvlhčovače [online]. Copyright © 2016 ULTRAZVUK, s.r.o. [cit. 15.04.2019]. Dostupné z: <https://www.ultrazvuk.eu/bandelin-sonorex-digitec-dt-510-h>