



HODNOCENÍ EFEKTIVNOSTI ANTIMIKROBIÁLNÍCH ÚPRAV NA CYKLISTICKÝCH DRESECH

Diplomová práce

Studijní program: N3957 – Průmyslové inženýrství
Studijní obor: 3911T023 – Řízení jakosti

Autor práce: **Jan Větrovský**
Vedoucí práce: Ing. Hana Štočková





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Textile Engineering ■

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF ANTIMICROBIAL TREATMENTS FOR CYCLING JERSEYS

Diploma thesis

Study programme: N3957 – Industrial Engineering

Study branch: 3911T023 – Quality Control

Author: **Jan Větrovský**

Supervisor: Ing. Hana Štočková



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta textilní

Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jan Větrovský**
Osobní číslo: **T13000063**
Studijní program: **N3957 Průmyslové inženýrství**
Studijní obor: **Řízení jakosti**
Název tématu: **Hodnocení efektivity antimikrobiálních úprav na cyklistických dresech**
Zadávací katedra: **Katedra hodnocení textilií**

Zásady pro vypracování:

1. Proveďte rešerši na téma antimikrobiální účinek na textiliích používaných k výrobě cyklistických dresů.
2. Vyberte skupinu uživatelů cyklistických dresů a proveďte průzkum preferovaných uživatelských vlastností pro tuto skupinu. Vyhodnoťte ho též z pohledu významnosti antibakteriálního účinku.
3. Vytipujte vhodnou nedestruktivní metodu zjišťování antimikrobiálního účinku v podmínkách laboratoří Technické univerzity v Liberci a tuto metodu aplikujte ve své práci.
4. Porovnejte efektivnost antimikrobiálního účinku u cyklistických dresů, které jsou dostupné na trhu s dresy, u nichž byla aplikována dodatečná úprava "Silver plus" v procesu domácího praní.
5. Navrhněte marketingovou strategii pro uvedení produktu s efektem "Silver plus" na trh.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: **50 - 60 stran**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

STANĚK, J. Textilní zbožíznalství. Vláknenné suroviny, příze a nitě. TUL 2006.

PASTRNEK,R.- VLACH,P. Finální úpravy textilií. TUL 2002

ROZSYPAL, S., Bakteriologie a virologie,1. vydání v ČR. Praha. 1994. ISBN 80 - 85827-16-6

ROZSYPAL, S., Úvod do molekulární biologie, díl 2., Brno 2002, ISBN 80-902562-2-8

STRACHAN,T. a READ, A.P., Human molecular genetics. ISBN 0-8153-4184-9

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Hana Štočková

Katedra hodnocení textilií

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Iva Dolinová

Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace

Ostatní konzultanti:

Ing. Petr Štoček

Katedra hodnocení textilií

Datum zadání diplomové práce:

24. října 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

14. května 2015

Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka



doc. Ing. Vladimír Bajzík, Ph.D.
vedoucí katedry

V Liberci dne 30. března 2015

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou 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 diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom 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.

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 14.5.2015

Podpis:



Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí této práce Ing. Haně Štočkové za vedení a cenné rady, které mi byly při zpracování této diplomové práce velice nápomocny.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Ivě Dolinové, konzultantovi této diplomové práce, za cenné rady, jeho znalosti z oboru biologie a za poskytnuté materiály.

Poděkování patří též panu Janu Sýkorovi, majitelovi společnosti Sýkora Sportswear, za zapůjčení testovacích dresů a materiálů, bez kterých by tato diplomová práce nebyla realizovatelná.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá hodnocením efektivnosti antimikrobiálních úprav na cyklistických dresech. Cílem práce je porovnat efektivnost antimikrobiálního účinku úpravy provedené výrobcem pleteniny s úpravou provedenou v domácím prostředí. Konkrétně byla hodnocena úprava vpletením stříbrné nitě s aplikací reklamního vzorku Silver Plus. Dalším cílem práce je vytipování vhodné metodiky, kterou bude nadále možno používat k rutinnímu testování.

Diplomová práce je rozdělena na dvě hlavní části, teoretickou a experimentální. V teoretické části byla provedena odborná rešerše na diskutovaná témata. V experimentální části jsou použity metodiky, pomocí kterých je možné vyvozovat hypotézy o fungování antimikrobiálních vlastností funkčních úprav. Na základě získaných výsledků došlo k významnému rozšíření spektra testů, tak aby se výsledky vhodně doplňovaly. Diplomová práce tedy diskutuje výsledky získané nejen biologickými, ale i chemickými a mikroskopickými metodami. Dotazníkové šetření vedlo ke vzniku marketingové strategie, kterou je možné aplikovat na testovaný reklamní produkt

Klíčová slova:

Cyklistické oblečení, syntetické materiály, antimikrobiální úpravy, nanostříbro, mikrobiální testy, PCR.

Abstract

This thesis deals with evaluation of the effectiveness of antimicrobial treatments for cycling jerseys. The aim of this thesis is to compare the effectiveness of the antimicrobial effect of treated (made by the manufacturer and homemade) and untreated cycling materials. Evaluation was mainly concerned with jersey contains silver threads and the promotion of Silver Plus. Another aim of this thesis is the identification of appropriate method, which we could be used for routine testing.

Diploma thesis is divided into two main parts: the theoretical and experimental part. The theoretical part was done by academic search on the discussed issues. The experimental part contains used methods, which helps to determine hypotheses about the jerseys antimicrobial function. Based on the results we expanded range of testing methods.

The discussed results are based not only by biological methods, but also by chemical and microscopic methods. Questionnaire survey led to the marketing strategies that can be applied to the tested Silver Plus product advertising.

Key words:

Cycling wear, synthetic materials, antimicrobial treatment, nanosilver, microbial tests, PCR

Obsah

Seznam zkratk	11
Úvod	12
1. Analýza cyklistického oblečení	14
1.1 Syntetické materiály a jejich vlastnosti.....	15
1.1.1 Polyesterová vlákna.....	15
1.1.2 Polyamidová vlákna.....	16
1.1.3 Polypropylenová vlákna.....	16
1.1.4 Elastan.....	16
1.1.5 Karbonová vlákna.....	17
1.1.6 Charakteristika funkčního oblečení.....	17
1.2 Druhy cyklistického oblečení.....	19
1.2.1 Dlouhé cyklistické oblečení.....	20
1.2.2 Krátké cyklistické oblečení.....	21
1.3 Antimikrobiální úpravy oblečení.....	22
1.3.1 Úpravy textilií za pomoci stříbra.....	23
1.3.2 Úprava polyesterových vláken.....	23
1.3.3 Antibakteriální nanovrstva.....	24
1.3.4 Úprava Sanitized.....	24
1.3.5 Reklamní vzorek Silver Plus.....	25
1.3.6 RUCO-BAG AGP.....	25
1.4 Cyklistické oblečení a možná zdravotní rizika.....	26
2. Biologická část	28
2.1 Mikrobiologie.....	28
2.2 Molekulární biologie.....	28
2.3 Bakterie.....	29
2.3.1 Staphylococcus aureus.....	30

2.3.2	Klebsiella pneumoniae	30
3.	Teoretická přípravná část experimentu	31
3.1	Morapex	32
3.2	Metoda kolonie tvořící jednotku (KTJ).....	33
3.3	Metodiky izolace DNA	35
3.3.1	Wizard Genomic DNA Purification Kit	35
3.3.2	FastDNA Spin Kit for Soil	36
3.4	Metoda PCR.....	37
3.5	Paralelní pruhová metoda.....	40
4.	Experimentální část.....	42
4.1	Testované druhy oblečení	42
4.1.1	Klasický cyklistický dres.....	43
4.1.2	Klasické cyklistický dres s úpravou Silver Plus	44
4.1.3	Cyklistický dres Silver + AID	44
4.2	Hledání vhodné testovací metodiky	45
4.2.1	Výsledky získané pomocí metody KTJ	46
4.2.2	Výsledky získané molekulárně genetickými testy.....	50
4.3	Testování	52
4.3.1	Časová testovací řada.....	54
4.3.2	Výsledky získané metodou KTJ.....	57
4.3.3	Snímky testovaného materiálu z rastrovacího mikroskopu	64
4.3.4	Výsledky získané paralelní pruhovou metodou.....	68
4.3.5	Měření koncentrace stříbra ve vzorku	71
4.3.6	Stanovení absolutní koncentrace stříbra ve vyluzích.....	72
4.3.7	Výsledky získané metodami molekulární biologie	73
4.3.8	Extrakce materiálu.....	75
4.3.9	Grafické porovnání výsledků	76
5.	Dotazníkové šetření návrh marketingové strategie.....	80

5.1	Návrh marketingové strategie	83
6.	Závěr	85
	Seznam použité literatury	88
	Seznam obrázků	91
	Seznam grafů	92
	Seznam tabulek.....	93

Seznam zkratek

AATCC	Americká asociace textilních chemiků a barvířů
CK	Cyklistický klub
Ct	Cyklus amplifikace
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ICP/OES	Emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou
HNO ₃	Kyselina dusičná
KTJ	Kolonie tvořící jednotku
NaCl	Chlorid sodný
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RNA	Ribonukleová kyselina
SPD	Nášlapný systém pedálů
UCI	Mezinárodní cyklistická unie
16S rDNA	Název testovaného genu kódujícího část malé ribozomální podjednotky sloužící jako kontrola přítomnosti bakteriální DNA

Úvod

Nacházíme se v době, ve které je kladen vysoký nárok na komfort a pohodlí. Lidská populace se snaží všelijak si zpříjemnit rutinní činnosti a díky tomu se stáváme stále pohodlnějšími. Uznejte, že tento trend lze nejvíce zpozorovat například s vývojem a užitím elektroniky. Není tomu tak dlouho, a to si bezesporu všichni pamatujeme, co mobilní telefony dokázali jen volat a psát zprávy. Dnes máme možnost ovládat chytrá multimediální zařízení, která v sobě kombinují mobilní telefon, počítač, televizi, radiopřijímač i navigační zařízení. Vývoj se ale netýká pouze elektroniky, ale značnou měrou zasahuje i ostatní průmyslová odvětví.

Velké inovace a vývoj materiálů se v posledních letech odehrávají také v textilním průmyslu. Zde můžeme uvést jeden z největších úspěchů, co nám textilní průmysl v 21. století přinesl, a to objevení a výroba nanovláken, která mají na světových trzích velký užitný potenciál. Další zajímavý nápad přišel od společnosti Archipelago. Do světa uvedli zimní bundu, která se na první pohled nijak neliší od jiných bund. Její skrytá vlastnost se však ukáže po dopadu paprsků světla z reflektorů automobilu. Bunda má v materiálu všité reflexní vzory, které jsou za normálních podmínek neviditelné. Aktivní reflexní ochranu přinejmenším ocení sportovně založené osoby, jenž provozují své zájmy na pozemních komunikacích a vědí, jaké to je potýkat se s neohledupností dalších účastníků provozu.

Jak jsem zmínil v prvních řádcích, veškerá vylepšení, inovace či vývoj nových materiálů a technologií jsou prováděna za účelem uspokojit stále větší počet požadavků od uživatelů. Tato diplomová práce se zabývá efektivností povrchových úprav na cyklistických dresech. Budu zkoumat, zda textilie s povrchovou úpravou (aplikovanou při samotné výrobě nebo dodatečně) dokáže zpříjemnit užívání cyklistických dresů. Ze zdravotního hlediska se doporučuje po každé vyjížděce vyprat použité oblečení, díky čemuž se jednak vyhýbáme riziku vzniku nežádáných kožních reakcí, ale také eliminujeme zápach. Ten je způsoben nejen činností potních žláz, ale také bakteriální činností. Časté praní s sebou ale nese opotřebování textilie. V případě funkčního oblečení, které je ošetřeno membránou, zde dochází k ztrátě účinnosti

Již nějakou dobu jsou lidstvu známy antibakteriální účinky stříbra. Existuje mnoho studií, které se zabývají výzkumem a testováním efektivnosti stříbrných úprav textilií. V rámci této diplomové práce bude testovat, zda stříbrná antimikrobiální úprava

cyklistického oblečení má opravdu tlumící účinky na vznik bakteriálních kolonií. Definoval jsem si dva hlavní cíle práce. Zda oblečení s tovární úpravou Silver + AID (stříbrná složka aplikovaná během výroby) omezuje růst bakteriálních kolonií. Druhý cíl mé práce zahrnuje testování vlivu mnou aplikované dodatečné úpravy reklamního vzorku Silver Plus od nejmenované společnosti na klasické oblečení. Cílem mé práce je tedy porovnat vliv a účinek dvou aplikací stříbra ve srovnání s textilií, která neprošla žádnou úpravou. Neposledním cílem mé diplomové práce je vytipování metodiky, která bude nejvhodnější pro tyto typy testování.

1. Analýza cyklistického oblečení

Cyklistické oblečení, vyrobené ze syntetických materiálů, se těší stále větší popularitě. Nevyužívají jej pouze profesionální jezdci, jako tomu bylo ještě před nedávnou dobou, ale své místo si vydobývá už i mezi rekreačními a hobby jezdci. Tento fakt je podmíněn třemi důvody:

- dostupností a pořizovací cenou materiálů, z nichž se oblečení vyrábí
- velkým počtem společností, které vyrábějí sportovní oblečení
- postupnou eliminací lidských předsudků, že uživatelé jsou odlišní od okolí

Třetí důvod je velice zajímavý a z mého pohledu nejvíce ovlivňoval (záměrně byl použit minulý čas, protože dnes je užívání cyklistického oblečení považováno za zcela přirozenou věc) zákazníci, kteří váhali nad pořízením tohoto oblečení. Společnost velice obtížně přijímá výrazné změny a často na nové a netradiční věci zaujímá skeptický názor. Naštěstí, alespoň jak tomu bylo u cyklistického oblečení, jen do doby, dokud se neobjevil stále větší okruh uživatelů.

Cyklistické oblečení klade důraz na maximální pohodlí uživatele. K dosažení plného komfortu během jízdy na kole je nutné používat nejen dres (trikot), ale i cyklistické kalhoty. Kompletní cyklistická sada se skládá ze třech základních částí, a to:

- dres a kalhoty
- cyklistická obuv
- rukavice a helma

Cyklistická obuv je jeden z nejdůležitějších prvků. Zpříjemňuje trávení dlouhého času v sedle jízdního kola a mimo pohodlí také eliminuje několik závažnějších zdravotních rizik. Zvýšenému namáhání kloubů v končetinách brání používání obuvi s SPD mechanismem, který zajišťuje správnou polohu kontaktu chodidla s pedálem. [1]

Pro potřebu této práce se ale budeme zabývat pouze první částí cyklistického kompletu - dresem. Na tuzemském trhu jsou všechny výše zmiňované skupiny zastoupeny celou řadou renomovaných výrobců, kteří uspokojí přání i těch nejnáročnějších uživatelů.

V úvodu této kapitoly bylo zmíněno, že cyklistické oblečení je převážně vyráběno ze syntetických materiálů. Mezi nejvíce používané materiály patří polyester, polyamid a elastan. Při výrobě oblečení se jednotlivé materiály většinou užívají v různých poměrech, které si určí sám výrobce (např. cyklistické oblečení od společnosti Sýkora sportswear, jehož sady jsou v rámci této práce testovány, obsahují pouze 100% polyester). Další inovací textilií je stále častější používání karbonových vláken, které se vplétají do struktury materiálu.

1.1 Syntetické materiály a jejich vlastnosti

Syntetické materiály vyrobené na bázi syntetických polymerů jsou v současné době hojně užívané. Poprvé byly vyrobeny v USA v roce 1939. Paul Schlack si nechal jako první patentovat kaprolaktamový způsob výroby polyamidu 6. Polyester je znám již z 19. století a za první světové války se syntetický polyester používal jako impregnační materiál. Až v roce 1941 byl v Anglii vynalezen syntetický polyester.

Za syntetické lze považovat suroviny, které jsou získané syntézou uhlíku, dusíku, síry, vodíku, fluoru a chloru. Ze zmiňovaných jednotlivých molekul se za pomoci chemických reakcí utvářejí makromolekuly - polymery. Syntetická vlákna mají celou řadu výhod - jsou pevná, nemačková, odolná proti plísním, pružná, rychle schnoucí a snadno zpracovatelná. Na druhou stranu mají i záporné vlastnosti v podobě hořlavosti, omezeného pohlcování potu, ale i nedostatečné propustnosti vody a vzduchu.

[2]

1.1.1 Polyesterová vlákna

Základní výrobní surovinou polyesterových vláken je ropa, ze které za pomoci polykondenzace dimethyltereftalátu a glykolu vzniká polyethyltereftalát. Tato sloučenina se nadále zvláknuje z taveniny do šachty, následně dlouží, případně sdružuje do kabelu. Chemické složení polyesterových vláken je vhodné k dalším modifikacím, tedy k vylepšením dalšími chemickými procesy. Polyesterová vlákna mohou být aplikována prakticky do všech textilních výrobků. Zde můžeme uvést např. funkční oblečení, které je vyrobeno z polyesterových a polypropylenových vláken. Polyester je považován za materiál lehký, trvanlivý i odolný vůči vysokým teplotám. Teplota tání

polyesteru je 260°C. Mezi jeho negativa se řadí fibrilace neboli třepení konců vláken při nošení a vyšší riziko vzniku elektrostatického náboje. [3][4]

1.1.2 Polyamidová vlákna

Stejně, jako u polyesteru, je základní surovinou pro výrobu polyamidu ropa. Uměle vyrobený polyamid se získává polymerací nebo polykondenzací. Nejrozšířenější dva typy polyamidu jsou polyamid 6 (silon) a polyamid 6.6 (nylon). Mezi hlavní kladné vlastnosti polyamidu můžeme zařadit pevnost, odolnost a pružnost. Teplota tání polyamidových vláken je 220°C - 250°C (záleží na druhu polyamidu). Díky těmto vlastnostem je polyamid vhodný k výrobě sportovních oděvů. [3][4]

1.1.3 Polypropylenová vlákna

Polypropylen se vyznačuje nejlepšími vlastnostmi. Polypropylenová vlákna jsou zvlákňována z polymerové taveniny kruhovými tryskami do šachty, díky čemuž jsou převážně kruhového průřezu. Ze všech syntetických vláken jsou nejlehčí, nejpevnější, nepružnější a zároveň nejteplejší. Mezi další významné klady patří vysoká odpudivost vody, ale zároveň její dobrý odvod. Polypropylenová vlákna se nesnadno barví a mají nízkou teplotu tání 170°C. [3][5]

1.1.4 Elastan

Elastan je polymer obsahující nejméně 85% segmentovaného polyuretanu. Jeho hlavním kladem je výjimečná pružnost. Elastanové vlákno lze natáhnout na 3 až 7 násobek své původní délky, aniž by došlo k nenávratnému poškození. V roce 1959 byl světu elastan představen americkou firmou DuPont s tvrzením, že se jedná o revoluční materiál v oděvním průmyslu. Elastická vlákna jsou bohužel velice náchylná na pevnost v oděru, proto se zušlechťují. Jedním z obchodních názvů, pod kterým je elastan představován a prodáván, je Lycra. [6]

1.1.5 Karbonová vlákna

Jak bylo napsáno v úvodu této kapitoly, karbonová vlákna se užívají v stále větším rozsahu ve všech průmyslových odvětvích. Jako první s karbonovou textilií přišla italská společnost Tecnoflati, která do podvědomí veřejnosti vstoupila pod názvem Resistex.

Davide Susta, ředitel a zároveň sportovní lékař společnosti, testoval a zdokonaloval karbonovou textilií. Vyvodil několik zajímavých závěrů na základě provedených zátěžových testů textilií, ve kterých testoval následující čtyři parametry:

- teplotu těla
- tepovou frekvenci
- dýchání
- hladinu laktátu v krvi

Získané výsledky byly následující: v karbonové textilií roste tělesná teplota 3x pomaleji a díky vyšší úrovni perspirace se projevuje i lepší funkčnost textilie. Za standardizovaných podmínek a při stejném výkonu spotřebovali sportovci o 3 litry kyslíku za minutu méně, průměrná tepová frekvence byla o 4 úderů/min nižší a koncentrace laktátu v krvi klesla o 12%.

Velkou výhodou karbonových textilií je bezesporu jejich mechanická odolnost. Ta je ostatně s úspěchem využívána k výrobě různých součástí, a to nejen v cyklistickém oboru. Karbonová vlákna, ačkoliv mají průměr jen cca 5—8 μ m, mají ohromnou výhodu v podobě vysoké pevnosti. Od textilie s obsahem karbonu lze očekávat větší trvanlivost i po mnoha vypráních.

Další výhodou karbonu je velmi nízká hmotnost pleteniny při vysoké pevnosti, což mohou sportovci ocenit nižší hustotou použitého materiálu. S větší tuhostí a odolností karbonových vláken se totiž nese také jejich menší spotřeba pro zachování mechanických vlastností textilie. [7]

1.1.6 Charakteristika funkčního oblečení

Charakteristika funkčních materiálů je pouze doplňková podkapitola, ale velice úzce souvisí s výše napsanými řádky. Funkční materiály jsou vyrobeny ze syntetických vláken (viz polyester) nebo z kombinovaných materiálů, které syntetická vlákna

obsahují. Funkční materiály jsou nejčastěji vyráběny z polyesteru nebo polypropylenu. Velice často se v něm nachází příměsi elastanu, protože polyester a polypropylen nespádají mezi pružné materiály.

Funkční materiál by měl pružně reagovat a přizpůsobovat se vnějším vlivům. V posledních letech se těší velké oblibě, jak u amatérských, tak i u profesionálních sportovců. Hlavní úlohou funkčního materiálu je odvod potu směrem od těla.

Aby docházelo k jeho správné funkci, měl by být dodržen standardizovaný tvar syntetických vláken, tj. oválná, kulatá či podobně tvarově jednoduchá. Některé společnosti propagují i vlákna ve tvaru hvězdy. Důvodem je rychlejší odvod potu z povrchu těla. Dodatečnou úpravou vláken (dutá vlákna) se získává další efekt termoregulace. Dutá vlákna přijmou a uchovávají tělesnou teplotu uživatele, díky čemuž nedochází ke zbytečné ztrátě energie potřebné k udržení tělesné teploty. [29]

Veškerá přírodní vlákna mají výborné vlastnosti, ale nespĺňují nároky, které se od nich požadují při aktivním pohybu. Ideální vlákno by mělo mít následující vlastnosti: pevné, lehké, příjemné na dotek, nenasákavé, s dobrým odvodem vody, v létě chladí a v zimě hřeje. Jediné vlákno, které je schopné tyto vlastnosti zkombinovat dohromady je Moira TG 900®. Průřez vláknem Moira se podobá pětilaločné hvězdě a má zásadní vliv na rychlý odvod kapilární vlhkosti. [5]



Obrázek 1: Průřez pětilaločného vlákna Moira

zdroj: www.outdoor-termopradlo.cz

1.2 Druhy cyklistického oblečení

V současné době je na trhu pro zákazníky dostupná široká škála cyklistického oblečení. Rozsáhlý sortiment zahrnuje levnější neznačkové, ale i dražší značkové produkty. Novým potencionálním zákazníkům se tím pádem otevírá skoro neomezený prostor výběru, který je limitován pouze jeho finanční situací.

Levné neznačkové oblečení je vhodné pro skupinu uživatelů, kteří provozují cyklistiku na rekreační úrovni. Toto oblečení není finančně náročné, snese i hrubší zacházení, na druhou stranu není tolik propracované jak po výrobní, tak i po strukturní stránce. Tento druh oblečení většinou neobsahuje žádné povrchové úpravy nebo funkční membrány. Pořizovací cena tohoto druhu oblečení je v řádech několika stovek korun.

Pomyslnou střední třídu cyklistického oblečení na tuzemském trhu zastupují všichni čeští výrobci. Jako příklad můžeme uvést největší české společnosti: Sýkora Sportswear, ELEVEN, BeManiax, Kalas Sportswear nebo Lawi. V sortimentu těchto společností se nachází široký výběr druhů oblečení, které se výrazně liší cenou i kvalitou. Mimo aplikace funkčních materiálů a vrstev - společnost Sýkora i Kalas se již zařadily do svých sortimentů dresy s obsahem karbonových vláken, se společností zabývají i zakázkovou výrobou. Zde se snaží svým zákazníkům vyhovět v každém směru, tzn. v použitých materiálech, designem a střihem na míru. Pořizovací cena tohoto oblečení se již pohybuje v řádech několika tisíc korun.

Nejvyšší třídu cyklistického oblečení zastupují společnosti, kteří operují hlavně v zahraničí a s výrobou mají dlouhodobé zkušenosti. Svůj nový sortiment testují a diskutují s elitními jezdci z nejlepších cyklistických stájí. Mezi pomyslnou špičku patří společnost Rapha, která vyrábí oblečení například pro Team Sky. Tyto společnosti k výrobě používají inteligentní textilie a snaží se zpříjemnit náročným profesionálům dlouhé hodiny v sedle. Nový dres od Rapha pro elitní tým Team Sky, který je vyroben v černé barvě, má technologii Coldblack. Vlastnosti této technologie je snížení teploty dresu na přímém slunci a to až o 9°C v porovnání s běžným dresem. Pořizovací cena tohoto oblečení začíná však v řádech několika tisíc korun. [8]

Kolébkou cyklistiky je Evropa, což lze dokázat nejznámějšími a největšími cyklistickými událostmi - Le Tour de France, La Vuelta, Giro d'Italia. Cyklistika je též v Evropě považována za celoroční sport. Vzhledem ke klimatickým podmínkám Evropy a s tím spojeným střídáním ročních období nabízí výrobci sportovního cyklistického

oblečení i varianty pro chladná zimní období. Z tohoto hlediska široká veřejnost dělí druhy oblečení na tzv. dlouhé (použitelné v nepříznivých podmínkách) a krátké (použitelné v příznivých podmínkách).

1.2.1 Dlouhé cyklistické oblečení

Využití dlouhého cyklistického oblečení se vztahuje k převážně nepříznivým klimatickým podmínkám. Hlavní snahou dlouhého oblečení je udržet jezdce v optimální teplotě. Oblečení určené do chladných nebo deštivých dnů bývá často vybaveno různými typy funkčních membrán. Například Etape používá do zimních bund membránu windshell, což je funkční materiál z polyesterových vláken, který je vodoodpudivý a odolný proti povětrnostním podmínkám. [9]

Všeobecně známým funkčním materiálem, který je veřejností běžně užíván, je softshell. Softshell do jisté míry zajišťuje voděodolnost, odolnost vůči povětrnostním vlivům a zároveň zabraňuje prochladnutí. Softshell vděčí za svůj vznik outdoorovým aktivitám, v běžných podmínkách nahrazuje cibulový efekt (jeden kus softshellové oblečení je vyrobeno z několika vrstev). Svrchní vrstvu softshellu nejčastěji tvoří upravená elastická polyesterová vlákna, spodní část je tvořena zpravidla z 100% fleecu. [10]



Obrázek 2: Dlouhý dres od společnosti Vermarc

zdroj: www.wiggle.co.uk

1.2.2 Krátké cyklistické oblečení

Krátké cyklistické oblečení se používá v příznivých klimatických podmínkách. Materiálem na jejich výrobu je převážně polyester (testované oblečení v této diplomové práci má podíl 100% polyesteru) a polyamid. [11] Díky syntetickým materiálům je oblečení lehké, pružné a přilnavé, což se řadí mezi hlavní kladené požadavky v tomto oboru. Primárním úkolem krátkého cyklistického oblečení je odvod potu z povrchu těla uživatele. Je nezbytné, aby výrobci chytře volili tloušťku a strukturu materiálu, hlavně v oblasti zad, zejména kvůli ochraně před slunečními paprsky. Testování dresů s vysokou prodyšností zejména v oblasti zad nejmenované firmy vedlo k úpalům testovaných subjektů.

Jak bylo zmíněno výše (viz strana 19), snahou předních světových výrobců je vyrábět dresy s nejpokročilejšími technologiemi. V případě společnosti Rapha se jedná

o technologii Coldblack. Čeští výrobci se v současné době zabývají aplikací stříbrných a karbonových vláken do trikotů. [12]



Obrázek 3: Dres od společnosti Rapha s technologií Coldblack

zdroj: www.rapha.cc

1.3 Antimikrobiální úpravy oblečení

Největším trendem dnešní doby je inovace a vylepšování produktů. Zákazníci kladou výrobcům stále nové a přísnější požadavky na cílové produkty. Pokud chtějí výrobci obstát na trhu, musí nejen pružně reagovat na přání zákazníků, ale i ustát tlak ze strany konkurence. U textilních materiálů je hlavní snahou zvyšovat jejich komfort, mechanickou odolnost a zároveň snížit nároky na jejich péči, aby nedocházelo k poškození. Antimikrobiální úpravy textilií, které vedou k požadovaným vlastnostem, lze rozdělit do dvou základních kategorií:

Pre - přidání antimikrobiální látky do polymeru před jeho zvlákňováním,

Post - úprava vláken či textilií v průběhu zušlechťovacích operací.

Úkolem takto upravených textilií je co nejvíce omezit nebo eliminovat růst mikroorganismů a tím zaručit, že oblečení může být opakovaně používáno, aniž by bylo nepohodlné či zdravotně nebezpečné.

1.3.1 Úpravy textilií za pomoci stříbra

Stříbro se při úpravách textiliích využívá stále častěji. Nejvíce se aplikuje do sportovních textilií, lze jej využít ale i v medicíně nebo například při úpravách ponožek. Tým Empa zkoumal, jak se různé stříbrné aplikace chovají při praní. Jedním z výsledků studie je i prokázání nižšího uvolňování stříbrných nanočástic z aplikované textilie ve srovnání s aplikací stříbra, které není ve formě nanočástic.

Při pracím cyklu se vždy určité množství aplikovaných stříbrných částic vymyje a končí v odpadních vodách. Při praní nanovlákných textilií dochází k velmi omezenému vyplavování stříbrných iontů. Hlavním důvodem je možnost aplikace menší koncentrace stříbra na nanovlákné textilie a tudíž i menší ztráty během praní.
[13]

1.3.2 Úprava polyesterových vláken

Vědci ve studii Surface Characterization of Sputter Silver-coated Polyester Fiber se zabývali zlepšením funkce polyesterových vláken po aplikaci stříbra. Důvodem je stále rostoucí zájem o užití kovových nanočástic ve vědeckých oborech. Současné textilní materiály, jako bavlna, hedvábí a polyester se často upravují právě těmito nanočásticemi. Bylo zjištěno, že postříbřené textilie ovlivňují adhezi, tření, smáčivost a mohou mít významné antibakteriální účinky. Úpravu textilií lze provádět několika způsoby, např.: pokovování, galvanické pokovování, vakuovou depozici nebo naprašování. Naprašování se jeví jako nejlepší z vyjmenovaných technik, protože je to vcelku jednoduchý proces, který není časově náročný a neškodí životnímu prostředí.
[14]

1.3.3 Antibakteriální nanovrstva

Aplikace stříbra ve formě nanočástic pomocí metody naprašování prokázala antibakteriální vlastnosti. Bylo dokázáno, že u této metody aplikace je síla vrstvy závislá hlavně na síle naprašování. Pokud je síla naprašování menší než 4 W, antibakteriální vlastnosti pozbývají významu, naopak, když je síla naprašování vyšší než 4 W, antibakteriální vlastnosti dosahují hodnot až 99%. [15]

Společnost Schoeller ve svém sortimentu nabízí upravenou přízi, která se nazývá Silver. Podstatou antibakteriální úpravy Silver je aplikace iontů stříbra přímo na přízi. Takto upravená příze je potom používána pro funkční sportovní prádlo a ponožky. Velikou výhodou této úpravy je skutečnost, že se jedná o úpravu permanentní. Oděvy s úpravou Silver jsou stále svěží, chráněné před množením bakterií a vzniku zápachu. [16]

1.3.4 Úprava Sanitized

Společnost Levis představila v roce 2011 speciální cyklistické oblečení, které je určeno pro dlouhodobé a časté ježdění, a které se nijak neliší od běžně nošených věcí. Tento set oblečení – džíny a bunda - je vyroben tak, aby eliminoval pot i zápach. Výrobky z elastického materiálu odolné vůči nečistotám i vodě pomáhají s udržení tělesné teploty. Díky spolupráci společnosti Levis a organizací Schoeller Technologies je toto oblečení vybaveno speciální nano textilií, která zlepšuje reflexní a antibakteriální vlastnosti. Cyklistické oblečení také obsahuje technologii od společnosti Scatch Sanitized, která má zamezit vzniku zápachu. Toto oblečení je primárně určeno pro lidi, kteří se rádi dopravují na kole do zaměstnání a nechtějí po jízdě nepříjemně zapáchat nebo si vozit další věci na převlečení. [17]

Sanitized je licenční antibakteriální úprava švýcarské firmy Sanitized AG, která si získala značný věhlas nejen v oblasti oděvů (především sportovních), ale také v dalších oblastech, jako jsou bytové textilie, matrace, lůžkoviny. [16]

1.3.5 Reklamní vzorek Silver Plus

Silver Plus je produktem společnosti Rudolf Group, který je koncipován tak, aby ho mohla používat i laická veřejnost pro odzkoušení antimikrobiální úpravy. Jedná se o sáček o objemu 20 ml, který je určený na 1 domácí pračku. Produkt byl pro testování, protože se jevil z důvodu aplikace jako nejjednodušší. Podle výrobce se jedná o hygienickou povrchovou úpravu pro všechny typy textilií. Silver Plus je vhodný na textilie, které se při nošení dostávají do těsného kontaktu s pokožkou lidského těla. Dle výrobce má bakteriocidní a mírně fungicidní vlastnosti. Antimikrobiální úprava pomocí Silver Plus je nemigrační, což znamená, že úprava potlačuje výskyt bakterií přímo v místě, kde se nachází navázané stříbro.

Aplikace reklamního vzorku Silver Plus je velice jednoduchá. Jedná se o produkt, který se váže na textil za studena. Před aplikací na zvolenou textilií je nutno tuto látku zředit a řádně rozmíchat dle návodu dodávaném výrobcem, aby se zaručila optimální disperze produktu. Produkt je určen pro aplikaci průmyslových i domácích pračkách. [32]

1.3.6 RUCO-BAG AGP

RUCO-BAG AGP je komerčně dostupným produktem od německé společnosti Rudolf Group. Jedná se o hygienickou povrchovou úpravu, jenž je vhodná pro všechny typy vláken, včetně vlny. Je vhodný na textilie, který se nosí v těsném kontaktu s pokožkou lidského těla. Má bakteriocidní a mírně fungicidní vlastnosti, antimikrobiální úprava je stejně jako u reklamního vzorku Silver Plus nemigrační. RUCO-BAG AGP zajišťuje vysokou odolnost vůči praní, chemickému čištění a žloutnutí, pouze u textilií vyrobených z polypropylenu se mohou tyto vlastnosti projevit omezeně.

Aplikace RUCO-BAG AGP je o něco složitější, než je tomu u reklamního vzorku Silver Plus. Jedná se taktéž o produkt, který se též váže na textil za studena. Před vlastní aplikací se musí naředit správný poměr složky AGP s vodou. Optimální disperze produktu se docílí dle návodu výrobce. V Německu je RUCO-BAG AGP registrován podle směrnice European biocide product directive N-12827. [33]

Úprava RUCO-BAG AGP sloužila v práci jako porovnávací produkt oproti reklamnímu produktu Silver Plus.

Oba výše uvedené produkty jsou součástí konceptu značky SILVERPLUS. SILVERPLUS byl úspěšně uveden na trh ve spolupráci s předními výrobci sportovního oblečení, ponožek, triček a ložního prádla. Principem úpravy SILVERPLUS je seskupení stříbra do sloučenina a jejich aplikace na látku pomocí nátěrových postupů. Jeden gram látky SILVERPLUS má specifický povrch cca 600 000cm²g⁻¹.

Jedná se o inteligentní a inovativní způsob úprav textilií, který je ekonomický a velmi ekologicky šetrný během nošení, praní a sušení. Bylo prokázáno, že SILVERPLUS nezatěžuje životní prostředí. Množství stříbra, které se dostává zpět do přírody, koresponduje s průměrným množstvím nacházejícím se v přírodní soli nebo kamenech. Institut v Hohensteinu provedl studii, při které prokázal, že stříbro obsažené v produktech SILVERPLUS nemá negativní vlivy na pokožku lidského těla. [18]

1.4 Cyklistické oblečení a možná zdravotní rizika

Cyklistické oblečení mimo širokého výčtu výhod mají naneštěstí i několik nevýhod. Zákazník, který se rozhodne pro koupi cyklistického setu, by se neměl s výběrem unáhlit a vše si řádně odzkoušet i informovat se o všech aspektech jeho používání. Při užívání špatně padnoucího oblečení mohou uživatelé hrozit zdravotní problémy. Pokud nebude dodržovat pokyny výrobce, mohou se projevit například kožní bakteriální onemocnění. Jednotlivý výčet rizikových faktorů a jejich důsledků je následující:

Špatně ušitý trikot: riziko vzniku vyrážek a odřenin v místech podpažních jamek, hrudního koše a zátylku.

Špatně ušité kalhoty dresu: riziko vzniku vyrážek, odřenin a kvasinkového onemocnění v oblasti třísel, hýždí a stehenního svalstva.

Vložky v cyklistických kalhotách: riziko vzniku nepříjemných bolestí v oblasti měkkých tkání, špatného prokrvování, v horším případě vznik impotence.

Odvod potu u dresů: riziko vzniku kožního infekčního onemocnění v oblastech podpažních jamek, hýždí a třísel.

U cyklistického oblečení je důležité dodržovat hygienické zásady, tzn. netrávit v použitém oblečení příliš mnoho času, po každém použití je doporučováno oblečení vyprat, vyvarovat se opakovanému užívání použitých věcí. [19]

2. Biologická část

Biologická část této práce se zabývá stručnou charakteristikou mikrobiologických a molekulárně genetických experimentů. V této kapitole jsou vysvětleny pojmy a metodiky související s plánovaným experimentem.

2.1 Mikrobiologie

Mikrobiologie je vědní disciplína zabývající se mikroorganismy. Je odvozena z řeckého slova micron - malý a biologia - studium života. Za mikroorganismus jsou považovány jednobuněčná eukaryota (mikroorganismus, které obsahuje pravé buněčné jádro a organely) a prokaryota (jednobuněčné organismy bez jádra obaleného membránou). Pod mikrobiologickou disciplínu spadají podobory, jako jsou bakteriologie, virologie a protozoologie.

Metoda KTJ (viz strana 34) je jednou ze základních mikrobiologických technik poskytující informaci o oživení daného vzorku. Je však limitována i spoustou omezení, mezi které patří v první řadě omezené procento kultivovatelných bakterií. [20] Nicméně v případě této práce jde o vyhodnocení změny v čase, kde je jako studovaný materiál stále stejný extrakt a proto je toto omezení považováno nepodstatné.

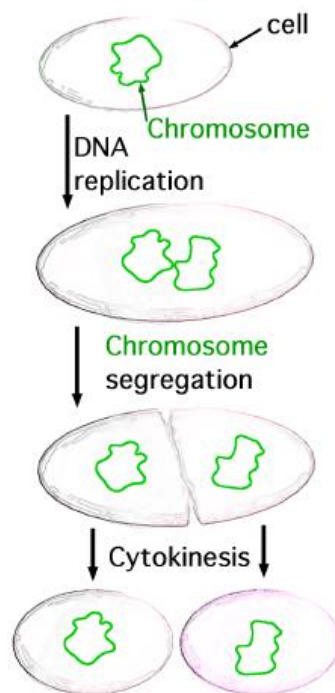
2.2 Molekulární biologie

Molekulární biologie je vědní disciplína zabývající se studiem buněčných biologických procesů na molekulární úrovni. Tato disciplína se věnuje popisu biologických makromolekul (proteiny, nukleové kyseliny, polysacharidy) a jejich funkčním vztahům. Největší pozornost je věnována funkci makromolekul, které se podílejí na dědičnosti organismů, tedy DNA (nukleová kyselina, která je nositelkou genetické informace u všech organismů), RNA (nukleová kyselina, která je zodpovědná za přenos informace z nukleových kyselin do proteinů) a proteinům. Znalosti molekulární biologie jsou dnes využívány ve všech vědních oborech. Základní metoda molekulární biologie - PCR (viz strana 38) vychází z poznatků molekulární biologie, konkrétně mechanismu replikace. [21]

2.3 Bakterie

Bakteriologii, vědní disciplínu zabývající se bakteriemi, významně rozvinul Robert Koch a Louis Pasteur. Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické organismy nejčastěji tyčinkovitého nebo kokovitého tvaru. Mezi další tvary lze uvést tvary spirálovité, kyjovité a vláknité. Jejich velikost je v řádu několika mikrometrů. Rozmnožování probíhá mechanismem binárního dělení, což je nepohlavní forma rozmnožování jednobuněčných organismů, při které dochází k rozdělení jedné mateřské buňky na dvě dceřiné. Na lidské kůži je srovnatelný počet bakterií, jako je počet buněk lidského těla.

Pomyslnou první příčku nejčetnějšího zastoupení tvoří *Staphylococcus epidermidis*, dále různé druhy streptokoků a difteroidy. V kožních záhybech s vlhkou zapádkou stoupají počty bakterií o čtyři až šest řádů (podpažní jamky, rozkrok, atd.) a rozkladem složky potu se podílí na tělesném zápachu. Bakterie se však nenachází jen na povrchu lidského těla. Další skupiny specifické mikroflóry můžeme najít například v ústech, kde se mohou podílet na tvorbě zubního kazu, ale jsou též zodpovědné za počáteční rozklad stravy. Nedílnou součástí lidského organismu jsou například i bakterie v našem trávicím traktu, kde pomáhají při dalším rozkladu potravy. Takovýchto skupin bychom mohli najít velké množství. [22]



Obrázek 4: Rozmnožování jednobuněčných organismů

zdroj: www.biolog.blog.cz

Bakterie se rozdělují do dvou základních skupin, na gram-pozitivní a gram-negativní bakterie. Toto rozdělení vychází z techniky barvení, kterou vymyslel dánský vědec Hans Christian Gram. Gram-pozitivní bakterie získávají po barvení modrou barvu, gram-negativní bakterie jsou po obarvení růžové. Tyto rozdíly jsou dány složením bakteriální stěny, která v případě gram-pozitivních bakterií obsahuje vysoké množství peptidoglykanu. Zároveň tyto bakterie neobsahují vnější vrstvu buněčné membrány ani lipopolysacharidovou vrstvu. [31][35]

2.3.1 Staphylococcus aureus

Staphylococcus je anaerobní, nepohyblivý gram-pozitivní kok patřící do rodu stafylokoků. Bakterie byla poprvé objevena v roce 1880 skotským chirurgem Alexanderem Ogstonem v hnisu z otevřených ran. *Staphylococcus* se přirozeně nachází na kůži a v oblasti nosohltanu u lidí a zvířat. Pokud dojde k oslabení imunity hostitele, je schopen vyvolat různá onemocnění, jako záněty, pneumonie, atd. [31]

2.3.2 Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae spadá do rodu Gram-negativních bakterií. Svůj název dostala od německého bakteriologa Edwina Klebse. Jejich nejčastější výskyt je v přírodě, hlavně ve vodě a v půdě, ale zároveň je součástí běžné flóry v ústech, na kůži i v trávicím traktu. Bakterie *Klebsiella* mohou způsobovat bronchopneumonii a infekce močových cest. [31]

3. Teoretická přípravná část experimentu

Cílem práce je najít optimální nedestruktivní metodu testování antimikrobiálního účinku. Zástupce antimikrobiálního efektu byl zvolen produkt Silver + AID (aplikace stříbra do textilie během výrobního procesu) a produkt Silver Plus (následná aplikace na dresu bez původní finální úpravy). Výsledky obou úprav se budou porovnávat s výsledky dresu bez jakékoliv antimikrobiální úpravy.

Molekulárně genetické testy jsou v tomto případě zatíženy několika limity. Přes velkou přesnost analýz, kdy jsou veškeré experimenty prováděny standardní metodikou na přístrojích přesně zaznamenávajících generované fluorescenční signály (real-time PCR) dochází při jejich vyhodnocení k projevu velké chyby. Tato chyba je spojena s prvním krokem testování, který zahrnuje proces izolace. Citlivost kitů používaných při izolaci DNA z extraktu se pohybuje řádově v daleko vyšších koncentracích. Pro potřeby diplomové práce nebylo možné zavádět jinou metodiku, ať již z časových nebo finančních důvodů. Výsledky molekulárně genetických testů slouží tedy pouze jako další důkaz přítomnosti bakteriální DNA v extraktu a nelze je dále podrobně statisticky hodnotit a zpracovávat.

Jako prvotní nedestruktivní metodika byla určena metoda KTJ, založena na zkoumání extraktu vytlačeného za pomoci fyziologického roztoku. KTJ je zatížena chybou ředění, kterou lze ale přesnou prací a vhodným výběrem ředění minimalizovat. Nicméně v případě optimalizace celého postupu by se mělo pravděpodobně dosáhnout reprodukovatelných výsledků.

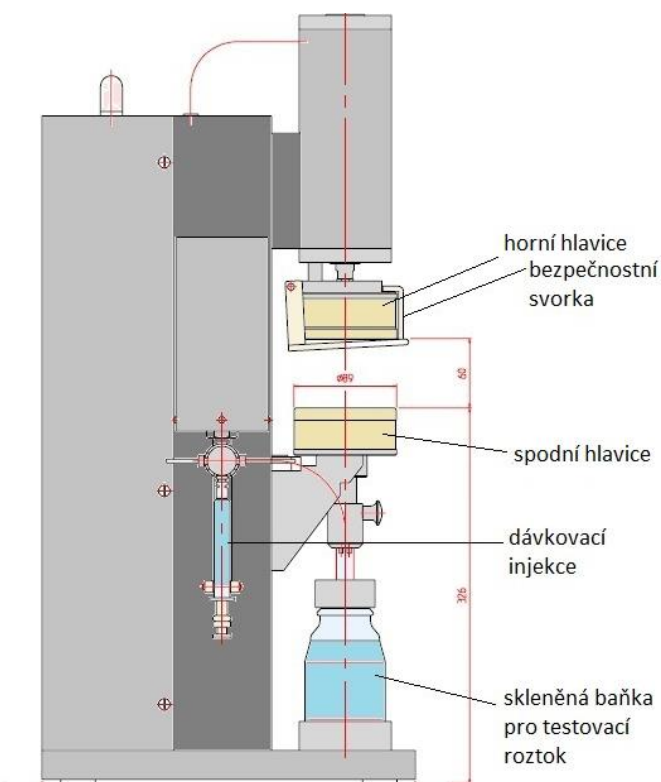
Celé testování je navíc zatíženo velkou chybou již při samotném vstupním získávání mikroorganismů. Otázkou je sterilita celého postupu získávání extraktu. Dále lze předpokládat, že extrakt z celého dresu bude pravděpodobně vypadat rozdílně. Nicméně tato chyba byla eliminována výběrem nejvíce exponovaných míst a dále zachováním stejného postupu při získávání extraktu v různých časech u všech testovaných subjektů. Jako pracovní roztoky budou vždy použity sterilní roztoky 0,85% NaCl (fyziologický roztok) a celá další práce bude probíhat co nejvíce asepticky.

Reprodukovatelnost biologických testů se zajišťuje stejným postupem, který byl autorem této práce osvojen při prvním principálním testování v prosinci 2014 a v lednu 2015. Všechny zvolené postupy byly diskutovány s odbornými pracovníky jak

v oblasti mikrobiologie, tak i molekulární genetiky a v neposlední řadě i mikroskopie a nanovláknenných struktur.

3.1 Morapex

Morapex je laboratorní přístroj, který se používá v textilním průmyslu. Jeho primárním účelem je zkrátit časově náročné zkoušky u textilních materiálů, např. vláken, přízí a plošných textilií. Morapex je založen na principu protlačování definovaného množství testovacího roztoku textilií za určité teploty a pod určitým tlakem. Hlavní výhodou Morapexu je nedestruktivní testování, tzn. bez poničení testované textilie.



Obrázek 5: Popisné schéma přístroje Morapex

Přístroj se skládá z hlavního ovládacího panelu, dvou pohyblivých hlavic s bezpečnostní svorkou, dávkovací injekce a kompresoru. Pro vykonání testu je potřeba i skleněná baňka na testovací roztok a skleněná zkumavka pro zachycení extrahované tekutiny. Obě hlavice jsou vyhřívány na nastavitelnou teplotu.

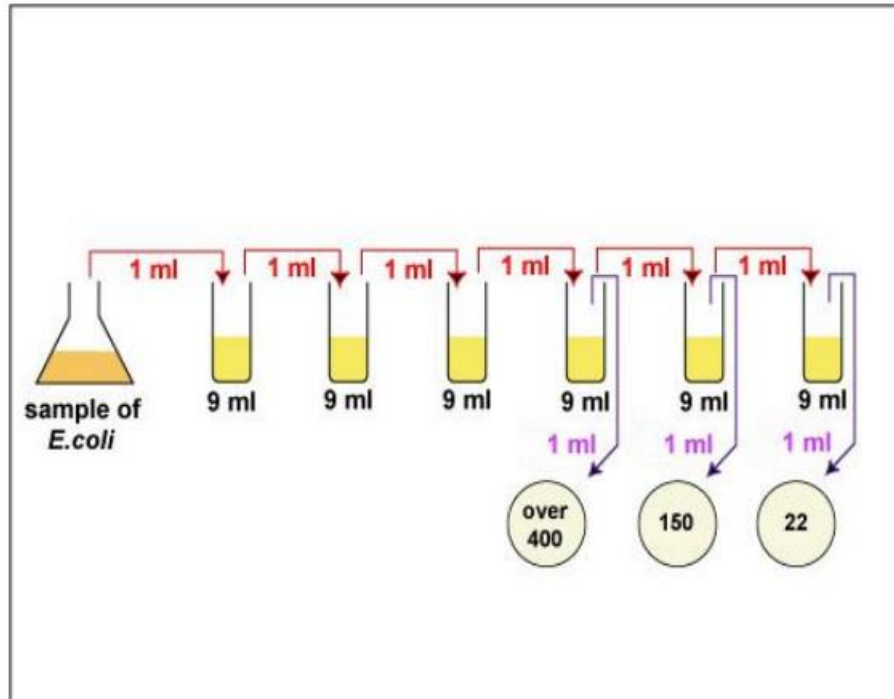
Materiál, který vložíme do přístroje, je tlakovým pístem přitisknut mezi dvě topné desky, které můžeme nahřát na požadovanou hodnotu. Desky lze ohřát na teplotu

až 150°C. Dále musíme do sacího potrubí přístroje přidat kapalinu, kterou budeme louhovat materiál mezi deskami. Nejčastěji se používá voda, destilovaná voda nebo fyziologický roztok. Po nastavení určitých počtů cyklů - jeden cyklus spotřebuje 5 ml roztoku - projde roztok přístrojem a přes otvory v tlakovém pístu se protlačí skrze materiál do extrakční nádoby. Samotný extrakt poté můžeme použít na detekci zbytkových chemikálií, pro určení hodnoty pH materiálu, atd. [23]

3.2 Metoda kolonie tvořící jednotku (KTJ)

Nejjednodušší a zároveň nejlevnější metoda k vyhodnocení výsledků pro potřebu této práce je mikrobiologické stanovení celkového počtu bakterií (KTJ). Jedná se o kulturační stanovení počtu životaschopných mikroorganismů na petriho miskách. Životaschopnost buňky je definována jako schopnost množit se přes binární štěpení za řízených podmínek. U této metody se vychází z předpokladu, že jedna buňka je schopna se na pevném médiu namnožit na kolonii buněk. Výsledky jsou uvedeny v jednotkách KTJ/ml, což je počet tvořících jednotek na 1 mililitr kapaliny.

Počet mikroorganismů je určen lineární vztahem, což znamená lineárním nárůstem kolonií na živném agaru. Standardně se udává počet 30 - 300 KTJ na standardní velikost petriho misky. Pokud je počet kolonií více než 300, výsledek se bere jako přerostlý a nehodnotí se. Při počtech vyšších než 300 kolonií na jedné petriho misce nedochází k lineárnímu růstu bakterií a výsledek je ovlivněn i vlastním působením jednotlivých kolonií na sebe. Aby byl zajištěn optimální počet 300 KTJ na petriho misku (1ml kapaliny), provádí se desítkové ředění původního roztoku, jehož principem je míchání 9 ml nosného roztoku (v našem případě fyziologický roztok) s 1 ml testovaného vzorku (v našem případě extrakt). Takto připravená směs je dále ředěna stejným principem (viz obrázek 6). [20]



Obrázek 6: Desítkového ředění u metody KTJ

Abychom dosáhli počítatelných výsledků, musí se na petriho misku aplikovat 1 ml původního nebo viz výše popsanou metodou zředěného roztoku a zalít agarem. Agar je polysacharid odolný vůči mikrobiálním enzymům. Při aplikaci musí být ohřátý na optimální teplotu. Důvodem je, že při nedostatečném ohřátí je agar tuhý a nedá se nalévat, na druhou stranu, pokud aplikujeme na petriho misky příliš horký agar, je zde riziko zabití bakterií.

Po správném dodržení všech kroků necháme agar na petriho miskách vychladnout, aby opět ztuhl. Poté vložíme misky do inkubátoru, kde je necháme po dobu 3 dnů při teplotě 23 - 25°C.

Vyhodnocení výsledků se provádí ručním okometrickým počítáním. Při velkém nárůstu bakterií není nutné počítat všechny bakterie, stačí vybrat pouze výseč a výsledek poté vynásobit počtem zvolených výsečí (abychom získali ucelený obraz). Pokud počet kolonií přesáhne počet 300, bereme výsledek jako přerostlý a nemůžeme jej zaznamenat do měření. Počet KTJ se stanovuje při ředění, kde nedochází k takto vysokému nárůstu.

3.3 Metodiky izolace DNA

Jako první, kdo provedl izolaci DNA, byl roku 1869 Friedrich Miescherem. V současné době je metoda izolace DNA brána jako rutinní technika v molekulární biologii, bez které nelze žádné molekulárně genetické testy provádět. Metodika je velmi dobře popsána a optimalizována pro široké spektrum materiálů. Ve většině případů lze pro izolaci použít komerčně dostupné kity. [24]

V experimentech byly použity dva postupy pro izolaci DNA. K tomuto kroku se přistoupilo na základě velmi malých výtěžků DNA, které posléze nebylo možné použít pro další testování.

3.3.1 Wizard Genomic DNA Purification Kit

Jako první kit pro izolaci DNA z extraktu byl použit Wizard Genomic DNA Purification Kit od společnosti Promega. Wizard Kit je určen pro izolaci DNA ze širokého spektra materiálů (např. z bílých krvinek, buněčných kultur, živočišných a rostlinných tkání a kvasinek). Postup izolace DNA pomocí tohoto kitu je postavena na čtyřech krocích.

Prvním krokem je postupná centrifugace, v našem případě extraktu získaného pomocí přístroje Morapex. Při tomto kroku dojde k zakoncentrování izolovaného materiálu neboli převedení všech buněk do menšího objemu. Takto získané buňky jsem posléze izoloval.

V druhém kroku se kombinují procesy inkubace s postupným přidáváním pufrů, které oddělí DNA od ostatních částí buněk (zbytky buněčných stěn a ostatních složek).

Třetí krok zahrnuje opět centrifugaci s přidáním isopropanolu a posléze etanolu. Při správném postupu a dostatku izolovaného materiálu lze již pouhým okem zpozorovat ve zkumavce vláček DNA ve formě peletky na dně zkumavky. Oba postupně přidávané alkoholy přečišťují DNA tak, aby byla naprosto čistá, zbavené všech možných inhibitorů a nečistot.

Posledním krokem je eluce neboli uvolnění DNA do vodného roztoku. Takto izolované DNA je připravená pro další molekulárně genetické testy. [25]

Koncentrace DNA byla testována na přístroji QUBIT (Life Technologies). Tento přístroj měří koncentraci DNA pomocí fluorescenčního signálu získaného specifickou vazbou barvy do struktury DNA.



Obrázek 7: Qubit na test DNA pomocí fluorescenčního signálu
zdroj: www.lifetechnologies.com

3.3.2 FastDNA Spin Kit for Soil

Jako druhý postup izolace DNA byl použit FastDNA Spin Kit for Soil od společnosti MP Biomedicals. Stejně jako Wizard Kit je tento kit určen pro získávání DNA z bakterií, kvasinek a dalších rostlinných nebo živočišných organismů. Vzhledem k velkému objemu vylouhovaného vzorku byla zvolena strategie filtrace přes membrány s velikostí 0,22 μm , které jsou schopny zachytit buňky bakterií. Celý filtr s koncentrovanou bakteriální biomasou je posléze vkládán do izolace. Proces izolace DNA za pomoci FastDNA Spin Kitu lze rozdělit na čtyři kroky.

Prvním krokem je vlastní filtrace extraktu přes duraporové membránové filtry. K zachycení filtrovaných buněk se využívá duraporový membránový filtr o velikosti

pórů 0,22 μm . Extrakt z Morapexu byl v plném objemu zfiltrován a biomasa přítomná v 50 ml byla tedy zakoncentrována na ploše filtru.

Druhým krokem je postupná aplikace filtrů do speciálních lyzačních zkumavek (přeložením a nastříháním), kde pomocí přesně definované směsi skleněných kuliček a dvou pufrů dochází k uvolnění bakteriálních buněk z filtru, k rozbití buněčných stěn a lyzi buně.

Třetím krokem při izolaci je promývání izolované DNA, kdy dochází k odstranění všech částí buňky, které by dále snižovaly kvalitu DNA a tím negativně ovlivňovaly molekulárně genetické testy. Jedná se zejména o proteinové zbytky, části buněčných stěn a organel a podobně. Tento krok se provádí na speciálních kolonách, kdy je izolovaná DNA pevně navázána na speciální částice a zbytek je postupně promýván pufrý.

Posledním krokem je uvolnění DNA do výsledného extraktu ultračisté vody, ve které je dále uchována pro molekulárně genetické testy. Koncentrace izolované DNA je opět měřena pomocí přístroje QUBIT. [34]

3.4 Metoda PCR

Metoda PCR (polymerázová řetězová reakce) slouží k snadnému a rychlému zmnožení krátkých, definovaných úseků DNA. Tato metoda byla vyvinuta v roce 1983 Kary Mullisem, ale teoreticky byla popsána již v roce 1971. Za objev a realizaci PCR reakce byla udělena Nobelova cena. Amplifikace DNA pomocí PCR reakce je základním krokem, bez kterého se neobejde žádné molekulárně genetické testování a to v jakékoliv oblasti genetiky (lidská, rostlinná, zvířecí, mikrobiální). [26]

PCR amplifikace vychází z modelu replikace DNA. Při reakci v laboratoři se využívají stejné enzymy, jako jsou ty, které nacházíme v živých buňkách. Úseky DNA, které chceme namnožit, se musí ohraničit primery (krátké oligonukleotidy DNA) a za pomoci enzymu polymerázy se takto ohraničené úseky namnoží až do počtu několika milionů exaktních kopií, což nám umožní vizualizovat testovaný úsek. Nové vlákno DNA je nejčastěji syntetizováno termostabilní DNA polymerázou (enzym, který se používá k replikaci DNA). Všechny tyto úkony probíhají v přístroji zvaném termocykler.

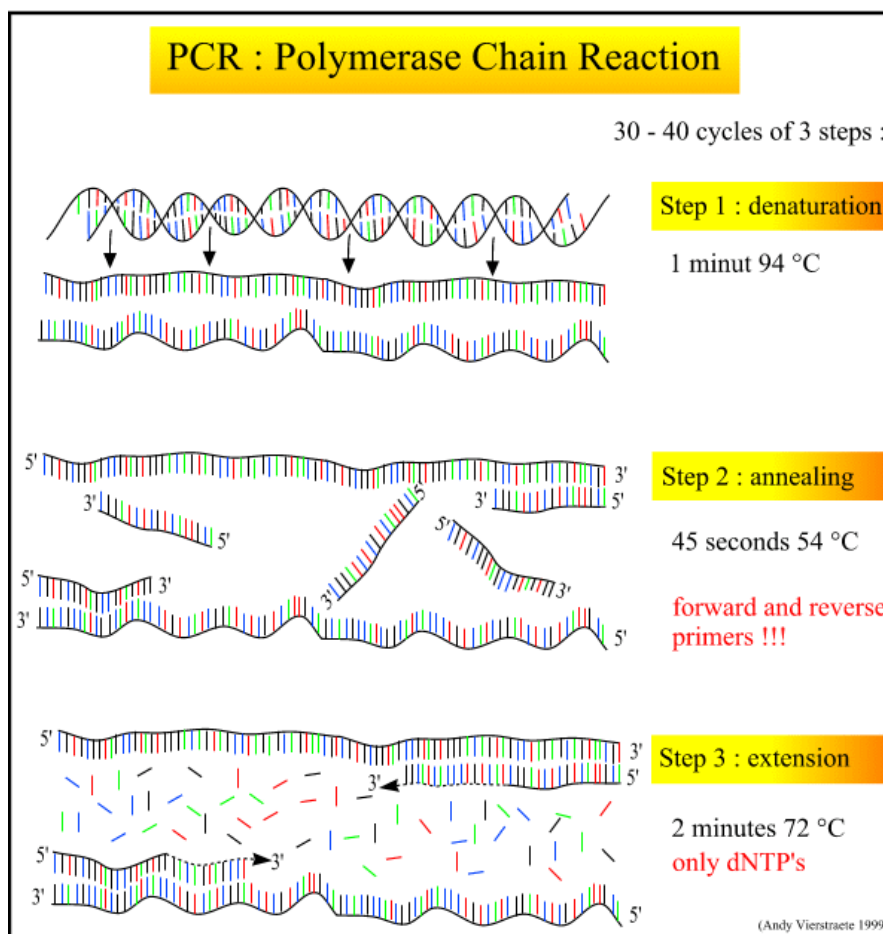


Obrázek 8: Termocykler LightCycler 480 pro PCR reakci

zdroj: www.lifescience.roche.com

Přístroj je zkonstruován tak, aby dokázal během několika sekund výrazně zvýšit nebo snížit teplotu o několik desítek stupňů Celsia. V rámci experimentu jsem vyhodnocoval výsledky na přístroji LightCycler 480, což je jeden z nejnovějších systémů, který provádí real-time PCR analýzu neboli PCR v reálném čase. Reakce probíhají v termobloku vyrobeného ze stříbra. Stříbrný blok právě umožňuje rychlou změnu teploty při cyklování (detekce se provádí pomocí SYBR[®] Green barvičky) během amplifikace nukleových kyselin. [27] Po každém cyklu v PCR analýze dochází ke snímání signálu, což nám umožňuje sledovat průběh vlastní a reakce a zároveň přesně vyhodnotit, kdy došlo k zachycení nárůstu fluorescence, což signalizuje vznik produktu. PCR reakce se skládá z tří důležitých kroků:

- denaturace
- nasednutí primerů (anealing)
- syntéza DNA (extenze)



Obrázek 9: Jednotlivé kroky v PCR reakci

zdroj: 27

Při denaturaci se DNA po dobu 20-30 sekund zahřívá na teplotu 95°C. Při této teplotě dochází k rozpadu vodíkových můstků v jednotlivých molekulách DNA, což má za následek rozvolnění dvoušroubovice (denaturace). Tímto jevem vzniká jednovláknová DNA na kterou nasedají primery.

Aby došlo k nasednutí primerů na jednovláknovou DNA, musí se teplota přístroje snížit na 50 - 65°C. Teplota při tomto kroku se odvíjí od sekvence primerů. Na místa nasednutí primerů se zároveň váže DNA polymeráza.

Posledním krokem cyklu je syntéza DNA. Teplota tohoto cyklu závisí na použité DNA polymeráze. Nejčastěji se používá Taq polymeráza (DNA izolované z bakterie *Thermus aquaticus*), která je aktivní při teplotách od 72 - 75 °C. Během syntézy dochází k přírůstku vlákna DNA k původní molekule DNA. Všechny tyto kroky se cyklicky opakují. Běžný počet cyklů PCR je 35 - 40.

Výsledkem amplifikace PCR jsou křivky, které obsahují Ct hodnoty (cycle threshold). Tyto hodnoty jsou definovány jako počet cyklů potřebných pro překročení prahu fluorescenčního signálu. Jednotlivé hladiny Ct jsou nepřímo úměrné množství hledané nukleové kyseliny (v mém případě DNA) ve vzorku, což znamená, že čím je nižší hodnota Ct, tím se ve vzorku nachází vyšší množství DNA. Během amplifikace PCR se jednotlivé křivky s hodnotami Ct vykreslují v čase. Čím dříve se křivka vykreslí, tím naměřená hodnota Ct je nižší. [28]

3.5 Paralelní pruhová metoda

Tato metoda byla vyvinuta v roce 1976 Americkou asociací textilních chemiků a koloristů (AATCC). Jedná se o destruktivní zkušební metodu, která posuzuje antibakteriální účinnost textilních materiálů. Hlavní výhodou této metody je rychlé a snadné stanovení antibakteriální aktivity u zkoumaných ošetřených textilií. Jednotlivé vzorky, v předepsaném rozměru 2,5 x 5 cm, jsou aplikovány na předem pruhově bakteriemi ošetřenou agarovou desku. Účinnost antibakteriální aktivity vzorků se posuzuje na základě zón, které vznikají na agaru kolem testovaného vzorku. [30]

Resumé

Teoretická část této práce měla za úkol čtenáře seznámit s analýzou cyklistického oblečení, jinými slovy, co se všeobecně za cyklistické oblečení považuje. Bylo v ní definováno, co jsou syntetické materiály, z jakých materiálů se oblečení vyrábí a lehce nastíněno, jaké jsou vlastnosti funkčních materiálů. Dále se pokračovalo analýzou antibakteriálních úprav, které se aplikují na textilie. Pro potřebu této práce byly vybrány odborné publikace zabývající se hlavně aplikací stříbra. Dále v teoretické části seznamuji s biologickou částí shrnující základní informace o biologii, mikrobiologii a molekulární biologii. Závěr již patří přípravné části experimentu, kde se nachází informace o testovacích postupech a metodách, které v experimentální části aktivně používám. Jsou zde popsány jednotlivé přístroje, na kterých se experiment provádí.

Následující část práce se zabývá vlastním experimentem a testováním, kde popisují konkrétní metodiky použité při testování. Při realizaci mého experimentu jsou použity:

- real-time PCR analýza (detekce 16S rDNA genu)
- kultivaci na agaru v petriho miskách (metoda KTJ)
- kontaktní agarové testy
- mikroskopické zhodnocení vlákna po aplikaci stříbra
- chemický rozbor extraktů (ICP OS)

4. Experimentální část

Jak bylo již zmíněno v návrhu experimentu (viz strana 32), moje diplomová práce má za úkol vyhodnotit dva cíle. Prvním cílem je zjistit, zda jsou cyklistické dresy s tovární úpravou Silver + AID efektivnější v potlačování růstu bakterií, než je tomu u dresů bez úpravy. Druhým cílem je zjistit, zda dres s externí úpravou Silver, tzn. mnou aplikované stříbrné složky na dres bez dodatečné úpravy pomocí pracího cyklu, má podobné nebo stejné vlastnosti, jako je tomu u dresu s tovární úpravou Silver AID. Veškeré testování je prováděno v laboratořích na budově L Technické univerzity v Liberci, v oddělení nanomateriálů v přírodních vědách.

Experimentální část této práce obsahuje několik kapitol. První kapitola se zabývá základní charakteristikou testovaných druhů oblečení. Další kapitola je věnována experimentu, který posloužil k výběru vhodné testovací metody. Nejdůležitější, třetí kapitola se podrobně věnuje hlavnímu testování. Jsou zde podrobně popsány jednotlivé testovací metody, postupy, interpretované výsledky. Navíc se zde objevují dodatečné experimenty, které sloužily k ověření správnosti metod a potvrzení jednotlivých postupů.

4.1 Testované druhy oblečení

Oblečení, které v rámci své diplomové práce testuji, mi poskytla společnost Sýkora Sportswear. Na českém trhu se tato společnost poprvé objevila v roce 1990, kdy zpočátku vyráběla cyklistické doplňky, které byly v těchto dobách nedostatkové a špatně dostupné. Sýkora sportswear si na tuzemském trhu vybudoval silné postavení. Úzce spolupracuje s Jiřím Ježkem, který je odbornou veřejností považován za nejúspěšnějšího paralympijského cyklistu. Dále Sýkora sportswear spolupracuje s největšími českými týmy jako Remerx cycling team, Sparta Praha, Kellys Bikeranch team, CK Kolokrám, apod. Název, pod kterým je současnosti tato společnost známa, získala až v roce 2009.

4.1.1 Klasický cyklistický dres

První dresem, který jsem podrobil testování, je dres s obchodním názvem Safety Point. Dres je ušit z mikrovláknenných úpletů, dodávající výrobku vynikající funkčnost. Dres se vyznačuje jemnou strukturou a nevhodným používáním se může poškodit. U těchto dresů se doporučuje vyvarovat kontaktu se suchými zipy, popruhy batohů a jinými hrubými plochami. Nedoporučuje se používání aviváží ani pracích prášků s obsahem bělidel. Dres obsahuje reflexní prvky, které jsou nažehleny na povrch textilie. Na štítku u dresu jsou popsány následující instrukce:

- praní v max. teplotě 40°C
- výrobek se nesmí bělit
- výrobek se nesmí sušit v sušičce
- výrobek se nesmí žehlit
- výrobek se nesmí chemicky čistit [11]



Obrázek 10: Zástupce klasického dresu od společnosti Sýkora sportswear
zdroj: www.cyklodresy.cz

4.1.2 Klasické cyklistický dres s úpravou Silver Plus

Druhým testovaným dresem je výše zmíněný klasický dres, který jsem ošetřil dodatečnou antimikrobiální úpravou reklamním produktem Silver Plus.

4.1.3 Cyklistický dres Silver + AID

Posledním dresem, co se podrobí testování je dres s tovární stříbrnou úpravou Silver + AID. Stejně, jako klasický dres, je tento dres ušit z mikrovlákných úpletů dodávajících výrobku vynikající funkčnost. Dres se vyznačuje jemnou strukturou a nevhodným používáním se může poškodit. Opět se doporučuje vyvarovat kontaktu se suchými zipy, popruhy batohů a jinými hrubými plochami. Dres je vyroben z přiléhavého materiálu, spodní část předního dílu je zakončena protiskluzovou gumou. Materiál Silver + AID obsahuje 3% stříbra aplikovaného přímo do vláken. Na štítku u dresu jsou popsány následující instrukce:

- praní v max. teplotě 40°C
- výrobek se nesmí bělit
- výrobek se nesmí sušit v sušičce
- výrobek se nesmí žehlit
- výrobek se nesmí chemicky čistit [11]



Obrázek 11: Dres Silver + AID od společnosti Sýkora sportswear
zdroj:www.cyklodresy.cz

Všechny výše zmíněné dresy jsou vyrobeny z 100% polyesteru a jedná se o zátažné pleteniny. K ověření pravosti posloužil tavný test, při kterém došlo k tavení vlákna při 258°C. Standardní velikost dresu, tj. XL, spotřebuje 80x160 cm materiálu. Hmotnost dresu v této velikosti je cca 150 g, včetně nášivek, zipu a visaček.

4.2 Hledání vhodné testovací metodiky

Vzhledem k nutnosti použití nedestruktivních testovacích metodik jsem na TUL hledal možnosti, které budou dané kritérium splňovat. Po detailní diskuzi s odborníky jsem zvolil dvě základní techniky. První používanou v mikrobiologické laboratoři (KTJ), druhou používanou v molekulárně genetické laboratoři (real time PCR). Původnímu testování jsem podrobil pouze dva dresy - dres bez jakékoliv úpravy a dres s tovární úpravou Silver + AID. Vzhledem k tomu, že jsem prováděl úvodní testování sloužící pouze k výběru dále používaných metodik, bylo nutné pouze zjistit, zda jsou mezi oběma dresy rozdíly.

Pro pokusné pilotní měření byla použita časová řada, která měla ukázat nárůst bakterií ve stanoveném časovém intervalu. První test proběhl 18. 12. 2014, kdy se extraktem z Morapexu získaly 4 vzorky:

- extrakty z nepoužitých čistých dresů (klasický, Silver + AID)
- extrakty z testovaných dresů po první jízdě (klasický, Silver + AID)

Další testy se opakovaly ve dnech 9. 1. 2015 a 16. 1. 2015 při stejném schématu. Během každého testovacího dne se aplikovaly obě metody zároveň. Získané výsledky z obou testovacích metod jsou popsány níže

4.2.1 Výsledky získané pomocí metody KTJ

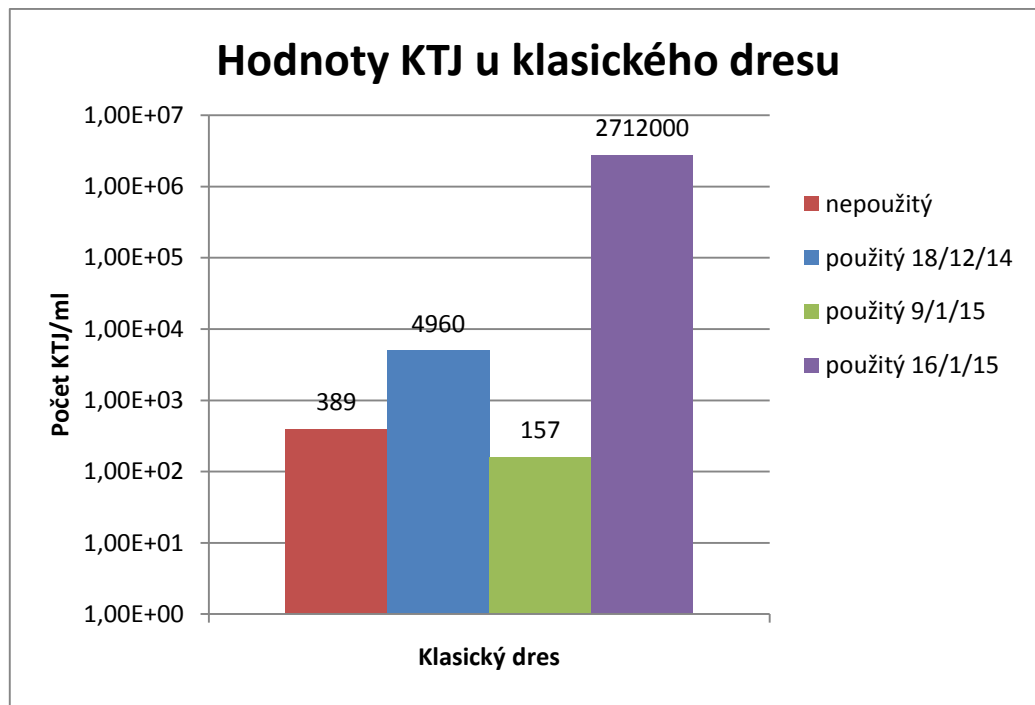
Základem testování je extrakt z dresů, který byl získán pomocí přístroje Morapex. Do fyziologického roztoku jsem vylouhoval tři kontaktní místa (obě podpažní jamky a část zad mezi lopatkami), kde se při sportovní aktivitě nejvýrazněji projevuje funkce potních žláz a tedy předpokládám nejvyšší nárůst bakterií. Extrakt byl poté zanesen do laboratoří, kde se podrobil dalšímu testování (viz strana 34 - KTJ).



Obrázek 12: Petriho misky s aplikovaným extraktem připravené k inkubaci

Tento obrázek zachycuje petriho misky se zpracovanými extrakty. Je zde zachyceno dohromady 16 misek, kde 4 misky patřily čistému klasickému dresu, 4 použitému klasickému dresu, 4 čistému dresu s úpravou Silver + AID a 4 použitému dresu

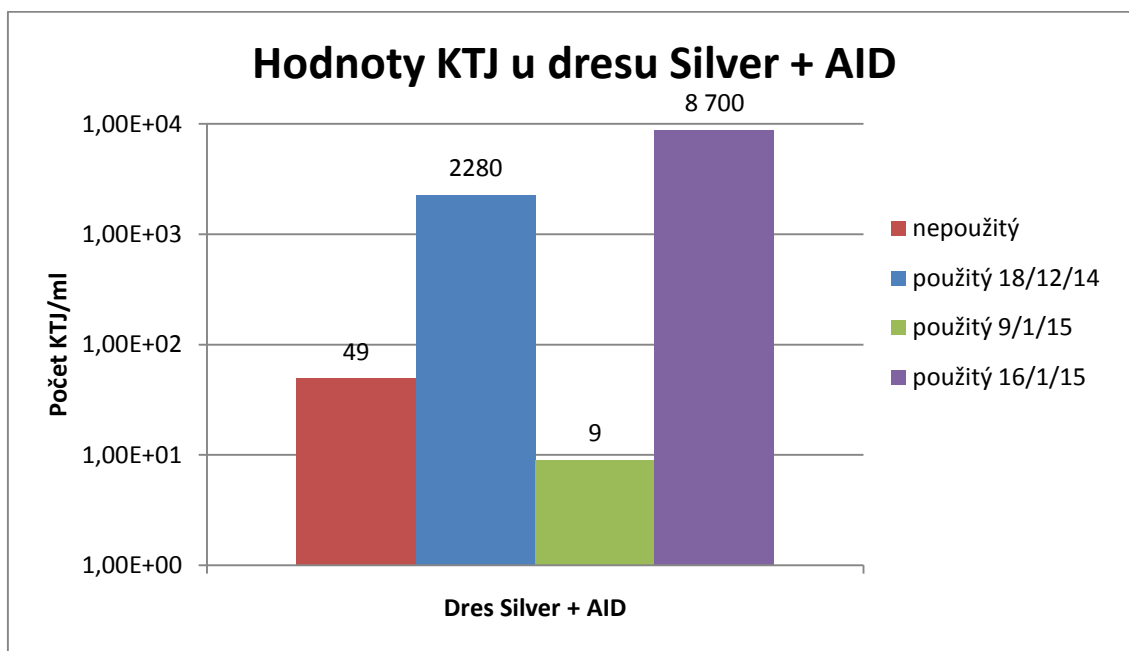
s úpravou. Tento test byl proveden 18. 12. 2014. Obrázek 12 zachycuje hotové petriho misky připravené k inkubaci.



Graf 1: Hodnoty KTJ/ml pro klasický dres

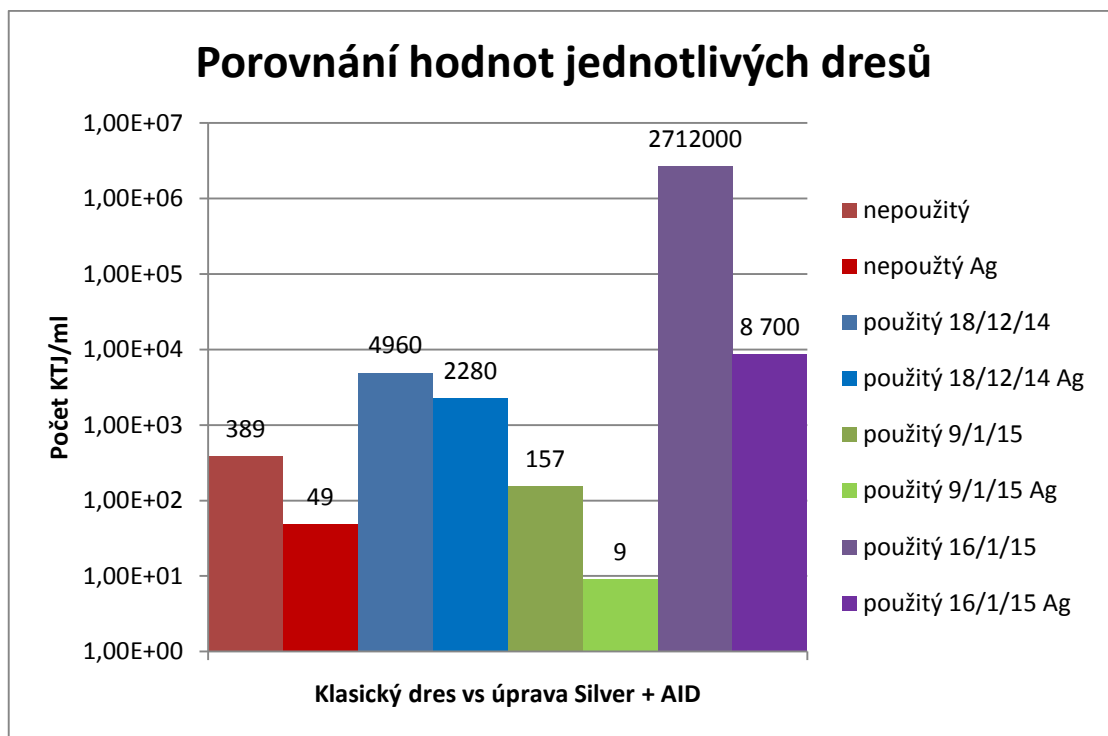
Výsledky u klasického dresu ukazují nárůst bakteriálních kolonií v čase. První sloupec s hodnotou 389 KTJ/ml udává počet bakteriálních kolonií, které se na dresu nacházely před jeho použitím. Tato hodnota by se dala odůvodnit tím, že bakterie zde byly zachyceny na základě manipulace s dresem při výrobě, přepravě, či odzkoušení na pokožce lidského těla po přebrání balíku od přepravce. Respektive je daná „nesterilním“ zacházením s výrobkem. Následující hodnoty zachycují nárůst bakterií po 1 použití v čase. Testovací jízda proběhla 17. 12. 2014, přičemž testování pomocí KTJ proběhlo následující den po použití dresu. Naměřená hodnota na použitém dresu činila 4 960 KTJ/ml. Třetí sloupec vykazuje nižší hodnotu, a to 157 KTJ/ml. Důvodem může být dočasná schopnost dresu potlačit růst bakterií nebo nepřesnost při práci, která je dána mou nezkušeností. Vzhledem k poklesu v obou variantách extraktu mohu předpokládat chybu například i při získávání extraktu. Nicméně s postupujícím časem jsem získával při práci rutinu, kterou jsem potřeboval před rozběhnutím závěrečných testů. Třetí měření ze dne 16. 1. 2015 však vykazuje enormní nárůst bakterií na hodnotu 2 712 000

KTJ/ml. Výsledky vynesené v grafech vychází z nultého ředění. Vzhledem k nárůstu kolonií v časové řadě a po pečlivém zhodnocení testu se přikláním k vysvětlení třetího odběru jako chybně louhovaného. Nepředpokládám schopnost dresu dočasně potlačit nárůst bakterií. Při ředění pravděpodobně k chybě nedošlo, protože ředící řada je v pořádku.



Graf 2: Hodnoty KTJ/ml pro dres s úpravou Silver + AID

Tento graf č. 2 zachycuje výsledky nárůstu bakteriálních kmenů u dresu s úpravou Silver + AID. Testování proběhlo za stejných podmínek a ve stejném časovém harmonogramu, jako tomu bylo u klasického dresu bez úpravy. První sloupek (49 KTJ/ml) popisuje stav před použitím cyklistického dresu. Další hodnoty odpovídají jednotlivým testovacím jízdám. Po prvním použití je zde nárůst na 2 280 KTJ/ml. Třetí sloupek opět vykazuje nižší hodnotu a to 9 KTJ/ml. Poslední sloupek vykazuje nárůst na 8 700 KTJ/ml.



Graf 3: Porovnání klasického dresu a dresu s úpravou Silver + AID

Graf č. 3 zobrazuje množství kolonií na klasickém dresu a dresu s úpravou Silver + AID. Z grafu lze vyčíst, že dres s úpravou Silver + AID vykazuje nižší hodnoty KTJ/ml. Hodnoty KTJ po druhé testovací jízdě stále ukazují příznivější výsledky pro dres s tovární úpravou Silver + AID. Nicméně rozdíly nejsou v řádech. Ke změně dochází až při třetí test, kde se hodnoty liší zhruba dvacetinásobně. Nicméně tento odběr významně vybočuje z řady a předpokládám zde možnou chybu při zpracování. Je těžké odhadnout, kde k chybě mohlo dojít. Hodnoty získané z extraktu po třetí testovací jízdě tedy nelze hodnotit. Nejvýraznější rozdíl je vidět po poslední testovací jízdě. Klasický dres na sobě nesl 2 712 000 KTJ/ml, zatímco Silver + AID 8 700 KTJ/ml.

Tabulka 1: Hodnoty z KTJ u dresu s úpravou Silver + AID

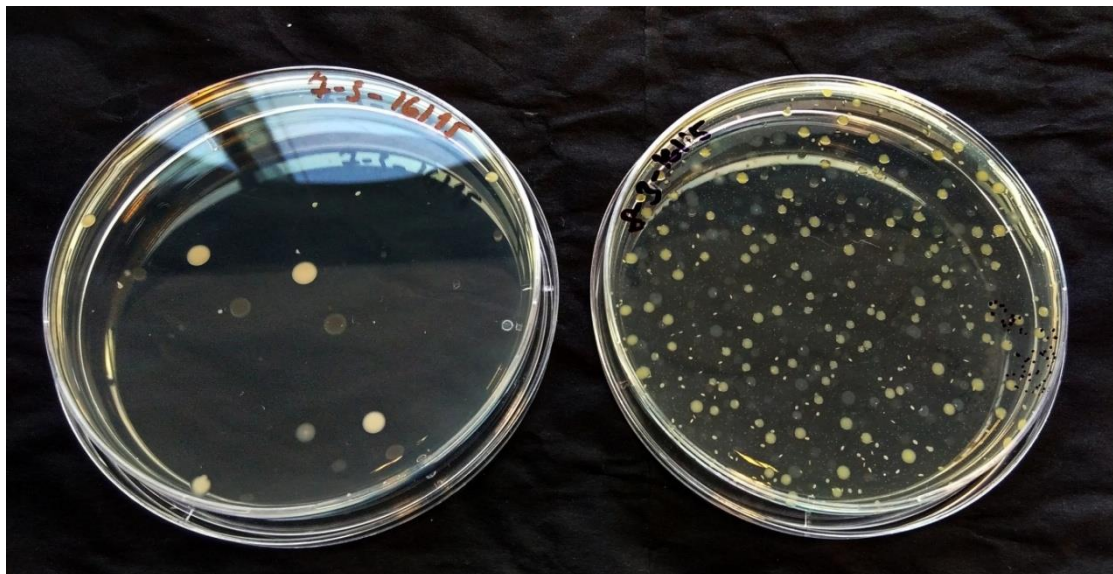
	1. extrakt	2. extrakt	3. extrakt	4. extrakt
Silver + AID	$3,89 \times 10^2$	$4,96 \times 10^3$	$1,57 \times 10^2$	$2,71 \times 10^6$

Tabulka č.1 popisuje hodnoty KTJ získané z jednotlivých extraktů dresu s úpravou Silver + AID.

Tabulka 2: Hodnoty z KTJ u klasického dresu

	1. extrakt	2. extrakt	3. extrakt	4. extrakt
Klasický dres	$4,9 \times 10^1$	$2,28 \times 10^3$	$0,9 \times 10^1$	$8,7 \times 10^3$

Tato tabulka ukazuje naměřené hodnoty na jednotlivých stupních ředění u dresu bez úpravy.



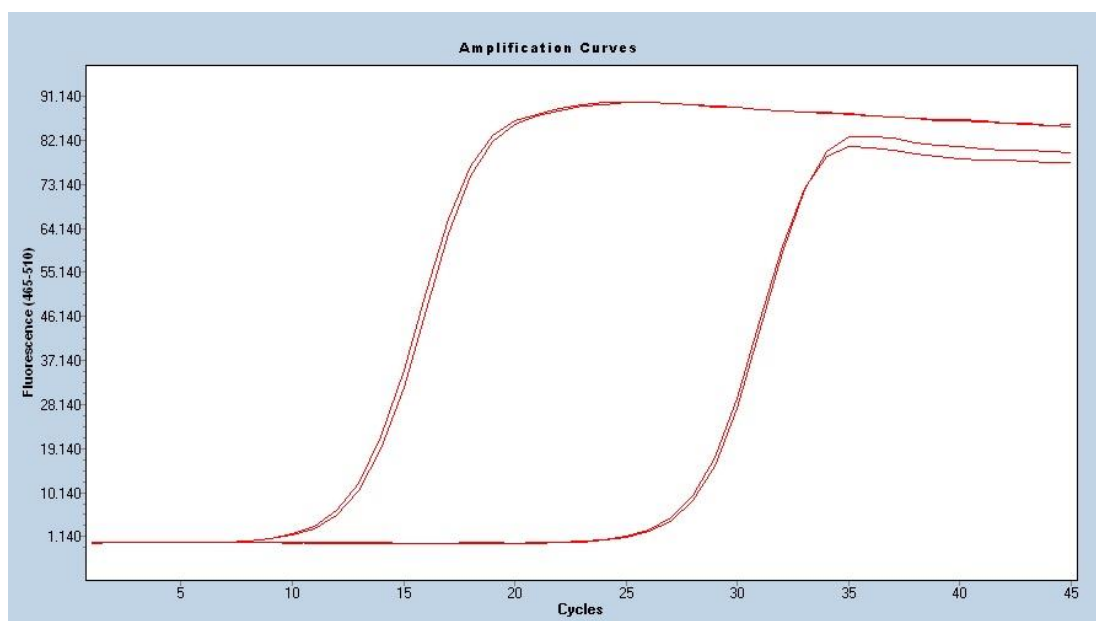
Obrázek 13: Porovnání počtu kolonií na dresu Silver + AID a klasickém dresu ve stejném řádu ředění

4.2.2 Výsledky získané molekulárně genetickými testy

Molekulárně genetické testy jsem prováděl ze stejného extraktu, jako probíhalo mikrobiologické testování. Při zpracování extraktu byly použity obě výše popsané metody izolace DNA. Výsledná koncentrace byla následně měřena na přístroji QUBIT. Všechny izolované DNA jsem otestoval metodou real-time PCR. Celkem bylo testováno 8 vzorků.

Vzorky 1 - 4 byly izolovány za pomoci Wizard kitu. Bohužel QUBIT i PCR vykazovaly negativní výsledky. Vzhledem k nízkým nárůstům KTJ předpokládám nízké bakteriální osídlení dresu. Izolace proto nebyla v tomto případě účinná. Proto jsem nebyl schopen naměřit žádnou koncentraci izolované DNA. U vzorku 5 a 6 byly použity obě metody izolace najednou. Naměřené koncentrace byly opět velmi nízké, nicméně

jsem byl schopen minimálně u jednoho izolovaného vzorku DNA kvantifikovat. Výsledky real-time PCR reakce nicméně ukázaly nárůst fluorescenčního signálu u jiného vzorku. Tuto zkříženou reakci přičítám pravděpodobně chybě při pipetování. Na základě nevypovídající hodnoty byly výsledky vyřazeny. Vzorky 7 a 8 byly již zpracovány izolačním kitem FastSPIN DNA. Po izolaci DNA jsem byl schopen naměřit koncentraci izolované DNA. Také výsledky real-time PCR vykazují pozitivní fluorescenční signály.



Obrázek 14: Výsledky real-time PCR

Obrázek č. 14 ukazuje křivky, které jsou výsledkem amplifikace real-time PCR. Křivka vlevo, u které se Ct hodnota pohybuje okolo 10, zastupuje vzorek číslo 8. Tento výsledek odpovídá extraktu z klasického dresu, který byl zároveň zpracován metodou KTJ 16. 1. 2015. Pravá křivka, u které se Ct hodnota pohybuje okolo 27, odpovídá vzorku číslo 7, který zastupuje extrakt z dresu s úpravou Silver + AID. Všechny reakce jsem prováděl v duplikátu, tak abych vyloučil chybu pipetování. Přesné hodnoty CT parametru byly 27,78 ve vzorku 7 a 12,54 ve vzorku číslo 8. Tyto výsledky znamenají, že v klasickém dresu bylo zachyceno 2^{15} víc DNA než u dresu s úpravou Silver + AID. Těmto výsledkům zhruba odpovídají i výsledky získané metodou KTJ.

Naměřené výsledky sloužily výhradně k otestování správné metodiky. Metoda KTJ fungovala od samého začátku. Výsledky molekulárně genetických testů jsou zatím pouze orientační a slouží spíše pouze k potvrzení přítomnosti bakteriální DNA v extraktu.

4.3 Testování

Testování, ze kterých jsem vyvozoval závěry a použil je k hodnocení jednotlivých cílů, jsem tedy prováděl na vyzkoušených a ověřených testovacích metodách v rámci možností TUL. Pro každý experiment byla zvolena testovací řada dlouhá 14 dní. Během těchto čtrnácti dní jsem postupně získal 5 stejných extraktů z Morapexu o objemu 50 ml. Aby bylo měření porovnatelné, testu se účastnili 3 různé testovací subjekty - muži.

Díky různým testovaným subjektům jsem byl schopen určit chování úprav v různých biologických podmínkách (mikrobiální osídlení kůže je typické pro každého člověka a velmi se liší). Extrakty získané po poslední jízdě se dále zpracovaly v molekulárně genetické laboratoři. DNA jsem izoloval pouze pomocí kitu FastSPIN DNA kit for soil. Všechna izolovaná DNA byla otestována pomocí real-time PCR.

Výčet všech použitých laboratorních testů:

- mikrobiologická metoda KTJ
- molekulárně genetická metoda real-time PCR
- tavný test vlákna
- zjišťování koncentrace stříbra v produktu Silver Plus a RUCO-BAG AGP
- zjišťování absolutní koncentrace stříbra uchyceného na textili
- paralelní pruhová metoda
- mikroskopická analýza za pomoci elektronového mikroskopu
- extrakce testovaného materiálu

Postup aplikace antimikrobiálního produktu Silver Plus:

Postříbření, neboli aplikace antimikrobiální úpravy na cyklistický dres jsem v rámci diplomové práce provedl dvojím způsobem. První způsob aplikace jsem provedl přesně dle návodu výrobce (u subjektu č.1):

- 20 ml obsah reklamního sáčku Silver Plus se nalije do 250 ml studené vody
- za konstantního míchání se nechá Silver Plus ve studené vodě rozpustit
- rozmíchaný roztok se nalije do prostoru pro aviváž v pračce
- na pračce se nastaví studený prací cyklus se ždímáním (600 otáček/min)
- čistý dres se vloží do pračky a nechá se doběhnout zvolený prací program
- dres se nechá při pokojové teplotě vysušit

Druhý, změněný způsob aplikace antimikrobiální úpravy dresu, který byl použit u subjektů č. 2, 3 a znova u subjektu č. 1 je následovný:

- 20 ml obsah sáčku SILVER PLUS se nalije do 250 ml studené vody
- za konstantního míchání se nechá SILVER PLUS ve studené vodě rozpustit
- připraví se 10 litrová nádoba, která se naplní 5 litry studené vody
- rozmíchaný roztok se nalije do nádoby a zamíchá se
- čistý dres se vloží do nádoby a po dobu 10 minut se ručně v nádobě vymáchá,
- dres se pak nechá při pokojové teplotě vysušit

Postup extrakce:

K extrakce dresů jsem používal laboratorní přístroj Morapex. Jako médium pro extrakty jsem používal fyziologický roztok, což je destilovaná voda smíchaná s chloridem sodným. Před samotnou extrakcí se musí Morapex vypláchnout sterilním fyziologickým roztokem, aby v extraktu nebyla žádná jiná media, která by mohla zkreslit výsledky. Při zapnutí přístroje se musí nastavit dva parametry - teplota ploten, kam se umísťuje materiál a počet cyklů potřebný pro extrakci. Objem injekce Morapexu je 5 ml. Pro všechny extrakty jsem standardně používal teplota ploten 30°C a jeden cyklus jsem

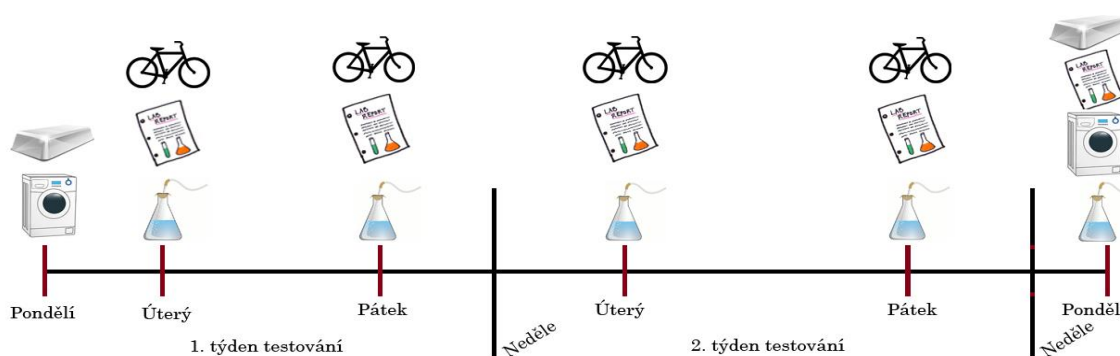
nastavil na 3 x 5 ml. Odpadní médium jsem zachytil do záchytné nádoby a následně vyliil. Do takto připraveného stroje jsem posléze dával jednotlivé dresy a extrakty z každého dresu jsem posléze jímá do sterilních falkonů. Pro potřebu testování se z jednoho dresu sbírá 50 ml extraktu. Po ukončení testování se stroj proplachuje destilovanou vodou.

Postup aplikace antimikrobiálního produktu RUCO-BAG AGP:

Aplikace antimikrobiálního produktu RUCO-BAG AGP je o něco složitější. Nejprve se musí určit, jaký poměr AGP má mít ošetřený materiál. Já pracoval s koncentrací 0,5%. Procento koncentrace se počítá z hmotnosti textilie a poměru lázně, která je v poměru 1:10 ml (jeden gram materiálu = 10 ml lázně). Na aplikaci všech vzorků o celkové hmotnosti 2,3 g jsem použil 2,76 μ l produktu AGP. Do takto připravené lázně se posléze vložily vzorky a po dobu 30 minut se oplachovaly.

4.3.1 Časová testovací řada

Cílem našeho experimentu je zjistit, jak se antimikrobiální úpravy cyklistických dresů dokážou vyrovnat s nárůstem bakterií v čase a v závislosti na četnosti používání. Pro bližší představení celého testovacího cyklu poslouží obrázek č. 15.



Obrázek 15: Grafické rozvržení testovacího cyklu

Na obrázku č. 15 jsem popsal schéma, které pomocí ikon jasně a jednoduše vysvětluje jeden testovací cyklus. Pračka demonstruje praní dresů, stříbrná cihla znamená aplikování antimikrobiální úpravy na klasický dres. Baňka zastupuje práci na Morapexu, tedy získávání extraktu. Laboratorní protokol znamená práce v laboratoři, konkrétně provedení experimentu a vyhodnocení předchozího. Jízdní kolo představuje samotné testování v uzavřených podmínkách. Časový experiment začal v pondělí dne 9. 3. 2015, kdy jsem vypral dresy a na jeden aplikoval stříbro. V úterý se čisté a připravené dresy vylouhovaly na Morapexu. Proces praní byl vždy stanoven na pondělí, na začátku čtrnáctidenního testovacího cyklu. Extrakce a testování je rozvrhnuto na úterý a pátek. Časový interval se odvíjí od třídní inkubace, která je nutná pro relevantní zhodnocení KTJ metody. Pro potřebu mé práce jsem inkuboval při teplotě 23°C.



Obrázek 16: Demontrace testovací jízdy na válcích

Na obrázku č. 16 je vyobrazen autor této diplomové práce a zároveň jeden z testovacích subjektů při zahřívací jízdě, která předcházela samotnému testování jednotlivých dresů. Tento krok je nezbytný proto, aby všechny testované dresy měly zaručené stejné tělesné podmínky. První dres by mohl být v testování zvýhodněný, protože zahřátí organismu a funkce potních žláz se aktivuje zhruba po 10 minutách výkonu, tudíž první dres by nebyl během 30 minutového intervalu plnohodnotně využitý. Testování probíhalo při pokojové teplotě 19°C v místnosti. V každém dresu jsem strávil stejný časový interval - 30 minut. K testování jsou používány válce (typ indoorového cyklistického trenažéru viz obrázek č. 16).

4.3.2 Výsledky získané metodou KTJ

Výsledky dosažené metodou KTJ jsou základním mikrobiologickým testem, který je zatížen časovou prodlevou 3 - 4 dní nezbytných pro nárůst bakteriálních kolonií. Konečný počet bakteriálních kolonií se poté okometricky počítá.

Postup:

Prvním krokem je příprava petriho misek. K mému experimentu standardně používám na jeden dres 4 petriho misky, což znamená, že hodnotím minimálně 4 ředění z každého extraktu. Misky je nutné si řádně nadepsat a očíslovat. K tomuto účelu se používá metoda tzv. kódování, kdy se na misku číselně napíše potřebné informace o vzorku, který je testován.

Kvůli zpřesnění výsledků a eliminaci početní chyby vždy používám metodu desítkové ředění (viz. strana 35). Do sterilních zkumavek pipetuji 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Poté přidám vždy 1 ml ředěného vzorku přesně dle návodu popsaného v teoretické části. Testovaná ředění volím podle pořadí extraktu, čím vyšší číslo extraktu, tím testuji vyšší nárůst kolonií a tedy by nízká ředění nebyla hodnotitelná. Testovaná ředění potom přenáším na petriho misky. Do každé misky pipetuji 1 ml ředěného extraktu. Při práci je stále nutné zachovávat aseptické postupy, tak abych vlastní výsledky nekontaminoval. Posledním krokem je zalití petriho misky ohřátým agarem. Teplota agarů se kontroluje kontaktním testem na kůži předloktí. Příliš vysoká teplota agarů zabije testované bakterie, naopak příliš nízká teplota agarů vede ke vzniku sraženin a nedostatečné homogenizaci vzorky. Misky s aplikovaným vzorkem se nechají na vzduchu vystydnout, aby agar ztuhl. Poté vložíme misky do inkubátoru, kde je necháme po dobu minimálně tří dnů inkubovat při teplotě 23 - 25°C.

Výsledky u testovacího subjektu 1

Pohlaví: muž

Věk: 24 let

Výška: 191,5 cm

Váha: 80,7 kg

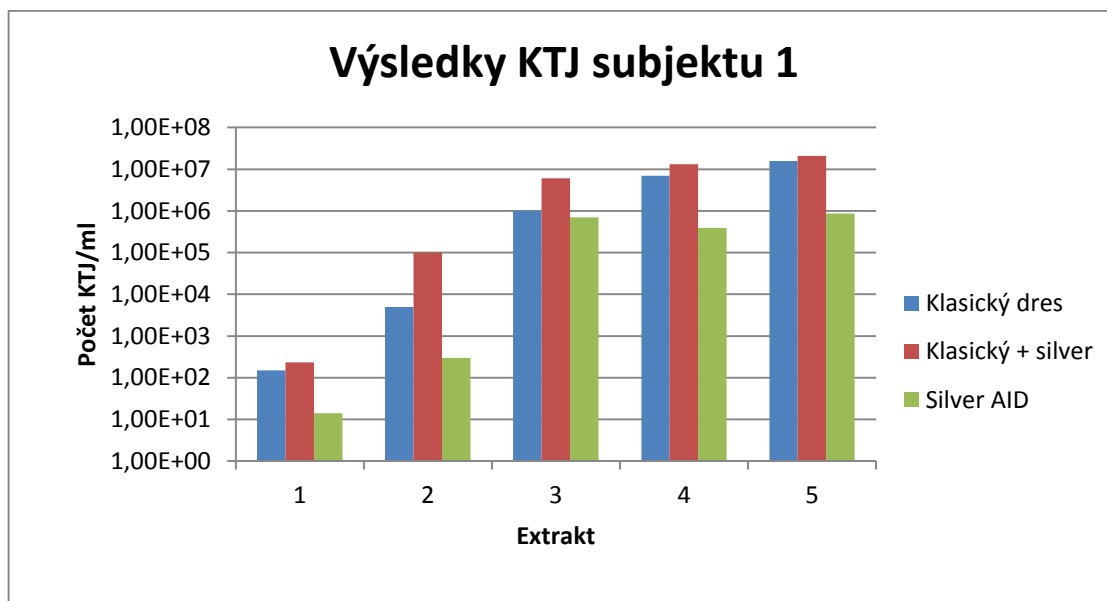
Výsledky ukazují nárůsty kolonií nejen v čase, ale i četnosti používání. Experiment vždy začíná extraktem čistých vypraných dresů, přesně dle zvoleného schématu. První extrakt slouží jako kalibrace celého pokusu a udává nárůst bakteriálních kolonií na dresu, který ještě nebyl testován.

Tabulka 3: Hodnoty z KTJ u prvního subjektu

	1. extrakt	2. extrakt	3. extrakt	4. extrakt	5. extrakt
Klasický dres	$1,5 \times 10^2$	5×10^3	1×10^6	7×10^6	$1,58 \times 10^7$
Klasický + silver	$2,34 \times 10^2$	1×10^5	6×10^6	$1,32 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$
Silver + AID	$1,4 \times 10^1$	3×10^2	7×10^5	$3,9 \times 10^5$	$8,7 \times 10^4$

V tabulka č 3 jsou zaznamenány počty kolonií jednotlivých extraktů. Hodnoty KTJ jsou brány z ředění, kde se nárůsty bakteriálních kolonií nejvíce přibližují číslo 300 KTJ/ ml. Je patrné, že dres s tovární úpravou Silver + AID vykazuje o jeden až dva řády nižší hodnoty KTJ/ml, než je tomu u klasického dresu bez úpravy nebo dresu s úpravou Silver Plus. V případě prvního subjektu se nejefektivněji vzhledem k potlačení růstu bakterií ukázal dres s tovární úpravou Silver + AID. Nejhůře dopadl dres s dodatečnou úpravou Silver Plus.

Aplikace stříbrné složky v tomto případě probíhala dle návodu výrobce dodávaného s produktem reklamního Silver Plus. Jedná se o přímé nalití rozpuštěného roztoku do zásobníku pro aviváž v pračce. Vzhledem k neočekávanému nárůstu bakterií v druhém extraktu na dresu s aplikovaným produktem Silver Plus jsem ji vyhodnotil jako neúspěšnou. Úprava produktem Silver Plus zde působila spíše jako živné médium než antimikrobiální úprava. Dalším vedlejším efektem byl i zápach zmiňovaného dresu, který by odpovídal enormnímu nárůstu bakterií.



Graf 4: Výsledky KTJ u subjektu č. 1

Graf č. 4 reprezentuje jednotlivé dresy a výsledky KTJ/ml v čase. Lze si povšimnout, že dres s úpravou Silver Plus (červený sloupec) se jeví tomto případě opravdu nejhůře. Klasický dres bez úpravy i dres s úpravou Silver Plus vykazují lineární růst nárůst počtu bakteriálních kolonií přítomných v extraktu. Dres s úpravou Silver + AID se od samého počátku drží nejnižší hodnoty. Rozdíly v počtu narostlých kolonií jsou pozorovatelné v řádech.

Výsledky u testovacího subjektu 2

Pohlaví: muž

Věk: 38 let

Výška: 173 cm

Váha: 70 kg

Aplikace externí stříbrné složky byla na rozdíl od subjektu číslo 1 provedena ručně v plastové nádobě o objemu 10l. Stříbrnou aviváž jsem ředil do cílového objemu 5l.

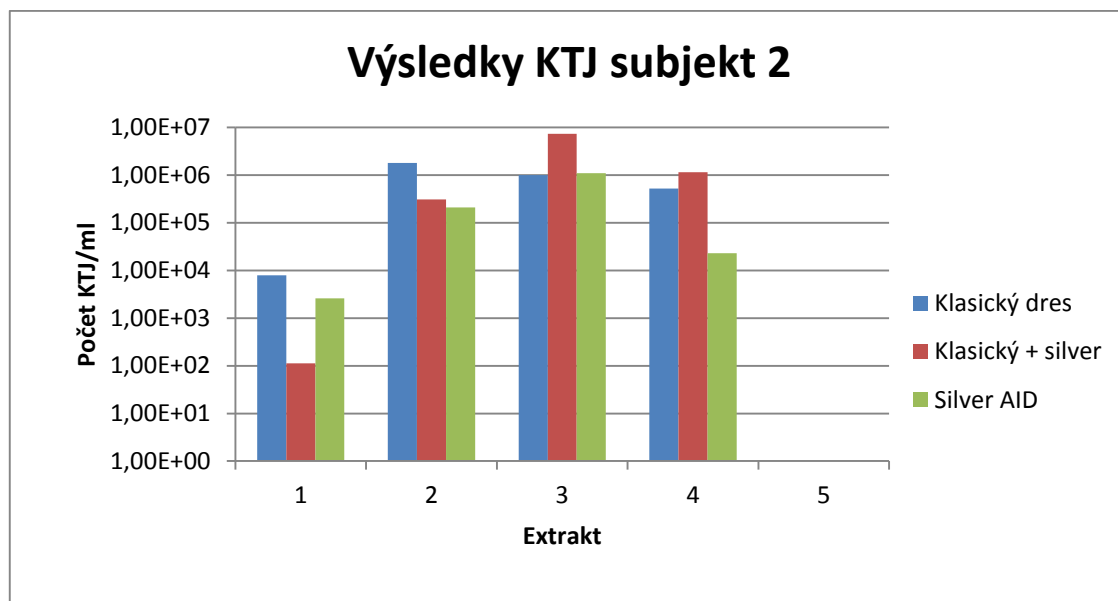
Tabulka 4: Hodnoty z KTJ u druhého subjektu

	1. extrakt	2. extrakt	3. extrakt	4. extrakt	5. extrakt
Klasický dres	$7,9 \times 10^3$	$1,8 \times 10^6$	1×10^6	$5,2 \times 10^5$	vyřazen
Klasický + silver	$1,12 \times 10^2$	$3,1 \times 10^5$	$7,4 \times 10^6$	$1,15 \times 10^6$	vyřazen
Silver + AID	$3,6 \times 10^3$	$2,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$	vyřazen

Výsledky zaznamenané v této tabulce jsou vztaženy k testovacímu subjektu číslo 2. Jako první zvláštnosti si můžeme povšimnout, že na čistých dresech (extrakt 1) se u klasického dresu nachází o jeden řád vyšší množství bakterií, než je tomu u testovacího subjektu 1. Tento skok by se dal vysvětlit, tím, že praní dresů vyrobených ze syntetických vláken se provádí při 30°C - 40°C a díky tomu nedochází k úplnému zabití bakterií.

Výsledky v tabulce č. 4 ukazují, že takto provedený způsob postříbření je efektivnější. Dres s aplikovanou úpravou Silver Plus vykazuje v prvním extraktu nejnižší hodnoty. Lze si ale povšimnout, že při používání se postříbřený dres dostává nejprve na úroveň továrního Silver + AID, poté na úroveň klasického dresu bez úpravy. Účinnost aplikace Silver Plus na cyklistický dres je tedy i u tohoto testovacího subjektu zpochybněna. Na druhou stranu, během testování postříbřený dres nevykazoval nepříjemný zápach, jako tomu bylo u prvního testovacího subjektu.

Z posledního, pátého extraktu jsem nebyl schopen získat žádné bakteriální kolonie. Po vyjmutí vzorku z inkubátoru jsem nebyl schopen nalézt ani jednu narostlou kolonii a to v extraktu z ani jednoho dresu. Evidentně jsem při pracovním postupu něco spletl. Chybu jsem nejprve přičetl špatnému provedení mikrobiologického testu, proto jsem celý test zopakoval. I po následném opakování experimentu nedošlo k nárůstu kolonií ani v jedné variantě extraktu. Provedl jsem detailní analýzu postupu a snažil jsem se vyhodnotit, kde by mohla nastat chyba. Jediný krok, který byl společný všem třem variantám extraktu, byl použitý fyziologický roztok, a proto předpokládám záměnu tohoto roztoku za jiný, který vedl k zabití všech bakterií ve vyluzích.



Graf 5: Výsledky KTJ u subjektu č. 2

Graf č. 5 opět zachycuje jednotlivé dresy a jejich nárůsty KTJ/ml v závislosti v čase. Dres s úpravou Silver Plus vykazoval v prvních vyluzích opět nejnižší nárůst bakteriálních kolonií, který ale neměl dlouhodobý efekt. Nejnižší nárůst bakteriálních kolonií se vysvětlují antimikrobiálním účinkem produktu Silver Plus, který sice působí při vlastní aplikaci a potlačí nárůst bakterií na vypraném dresu, nicméně zřejmě nedochází k ulpění stříbrných částic na pletenině dresu a aplikace Silver Plus má tedy velmi krátký účinek, respektive je účinná pouze na čistý dres a již po první jízdě se její efekt vytrácí. Silver + AID (zelený sloupek) opět prokázal nejvyšší mikrobiální efekt a tedy nejvyšší počet narostlých mikrobiálních kolonií. Zajímavým faktem je průběh jednotlivých sloupečků, který se liší od prvního subjektu.

Výsledky u testovacího subjektu 3

Pohlaví: Muž

Věk: 29 let

Výška: 177 cm

Váha: 68,5 kg

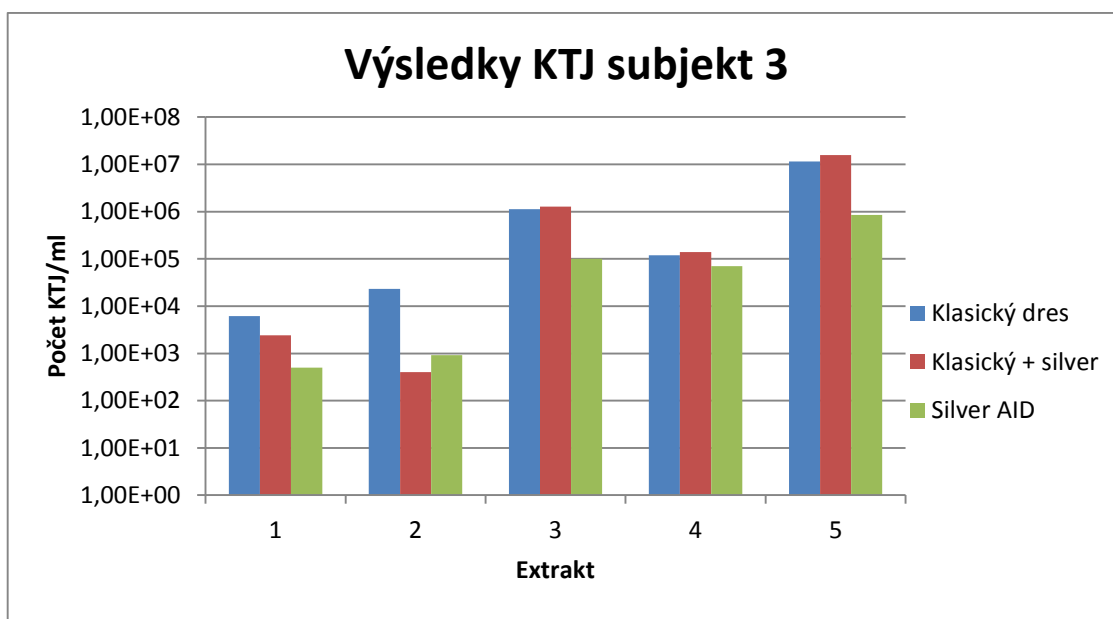
U testovacího subjektu č. 3 jsem opět aplikoval Silver Plus rozpuštěný v 5l studené vody, přímo v desetilitrové nádobě.

Tabulka 5: Hodnoty z KTJ u třetího subjektu

	1. extrakt	2. extrakt	3. extrakt	4. extrakt	5. extrakt
Klasický dres	$6,2 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$	$1,13 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$1,15 \times 10^7$
Klasický + silver	$2,4 \times 10^3$	4×10^2	$1,28 \times 10^6$	$1,39 \times 10^5$	$1,56 \times 10^7$
Silver + AID	5×10^2	$9,2 \times 10^2$	$1,01 \times 10^5$	7×10^4	$8,5 \times 10^5$

Výsledky prvního extraktu opět vykazují nízký nárůst kolonií těsně po vyprání a aplikaci Silver Plus. Již po první jízdě se ale výsledky z takto upraveného dresu opět významně zhoršují a úprava se opět jeví jako neefektivní.

Dres s úpravou Silver + AID se během testování, vyjímaje prvního extraktu, stále drží na nejnižších hodnotách. Z tabulky si lze povšimnout, že čisté dresy (1. extrakt) mají zase o něco vyšší množství kolonií, než tomu bylo v předchozím případě. Tento náález opět potvrzuje teorii postupného nárůstu bakteriálního osídlení dresu, které se praním pouze redukuje, nikoliv eliminuje úplně. Během testování dres s úpravou Silver Plus opět nevykazoval nepříjemný zápach.



Graf 6: Výsledky KTJ u subjektu č. 3

Graf č. 6 zachycuje jednotlivé nárůsty KTJ/ml v závislosti na čase. Lze si opět povšimnout jiného průběhu nárůstu bakteriálních kolonií, než u subjektu č. 1 a 2.

Výsledky u testovacího subjektu 1 (opakování testu)

Pohlaví: Muž

Věk: 24 let

Výška 191,5 cm

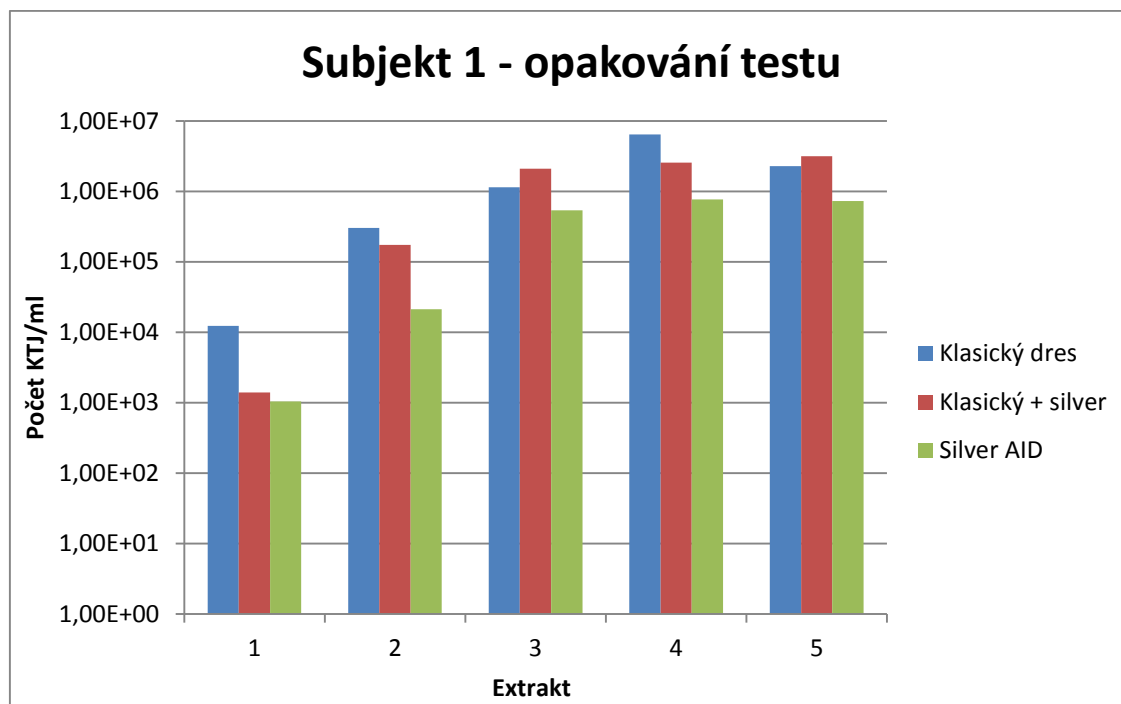
Váha: 80,7 kg

Opakování testu prvního testovaného subjektu jsem provedl, abych zjistil, zda rozdílná aplikace reklamního produktu Silver Plus bude mít vliv na průběh nárůstu bakteriálních kolonií. Aplikaci Silver Plus jsem provedl stejně jako v předchozích dvou případech, tedy ředěním v pěti litrech vody aplikací v desetilitrové nádobě.

Tabulka 6: Hodnoty z KTJ u opakovaného subjektu

	1. extrakt	2. extrakt	3. extrakt	4. extrakt	5. extrakt
Klasický dres	$1,23 \cdot 10^4$	$3,03 \cdot 10^5$	$1,14 \cdot 10^6$	$6,44 \cdot 10^6$	$2,27 \cdot 10^6$
Klasický + silver	$1,4 \cdot 10^3$	$1,74 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^6$	$2,57 \cdot 10^6$	$3,15 \cdot 10^6$
Silver + AID	$1,04 \cdot 10^3$	$2,12 \cdot 10^4$	$5,4 \cdot 10^5$	$7,7 \cdot 10^5$	$7,3 \cdot 10^5$

Výsledky v tabulce č. 6 ukazují, že změněná aplikace antimikrobiální úpravy opět dosahuje nižších hodnot v extraktu získaném okamžitě po vyprání. Bohužel, stejně jako u předchozích 2 subjektů, se antimikrobiální efekt postupně vytrácí. Dres s úpravou Silver + AID opět dosahoval nejnižších nárůstů bakteriálních kolonií. Na rozdíl od prvního testu nevykazoval během testování dres s úpravou Silver Plus nepříjemný zápach.



Graf 7: Výsledky KTJ u opakovaného testu subjektu č. 1

Graf č. 7 zachycuje jednotlivé nárůsty KTJ/ml v závislosti na čase. Lze si povšimnout, že průběh sloupků má podobný lineární trend, jako v prvním testu s aplikací Silver Plus pomocí pracího cyklu. Opakováním testu jsem potvrdil závěry předchozích testů a mé hypotézy, vynesené po prvním testu, tedy, že záleží na vlastní aplikaci. Aplikace Silver Plus do prostoru pro aviváž přímo v pračce není účinná, naopak dochází k úplnému vymizení jakéhokoliv účinku. Průběh nárůstu bakteriálních kolonií je i při opakování testů podobný. Mohu tedy vyvodit, že nárůsty bakteriálních kolonií budou typické pro každého jedince a budou stejné při každém použití dresu.

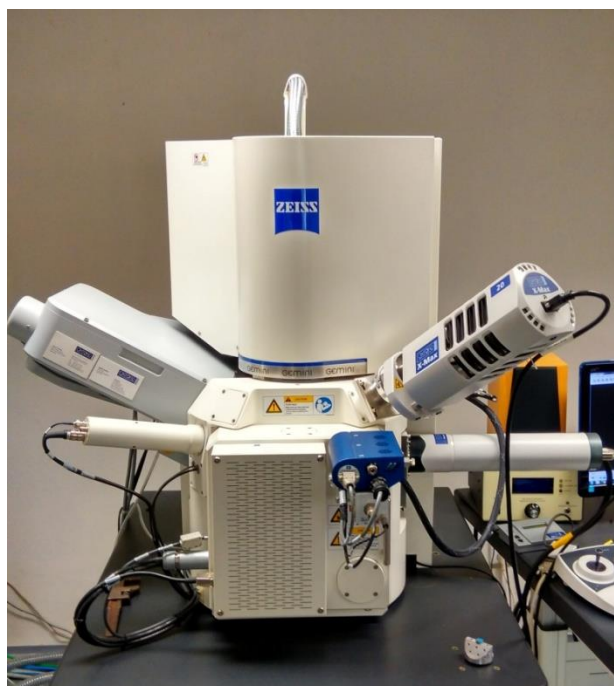
4.3.3 Snímky testovaného materiálu z rastrovacího mikroskopu

Snímky testovaného materiálu za pomoci rastrovacího mikroskopu slouží jako první kontrola a ověření výsledků dosažených metodou KTJ. K tomuto kroku jsem přistoupil na základě výsledků získaných po aplikaci Silver Plus. Pokud vyloučím výsledky prvního testovacího cyklu, kdy nejspíš došlo ke kontaminaci dresu způsobené samotnou aplikací, ve všech ostatních testovacích cyklech vycházela úprava Silver Plus pouze krátkodobě lépe, než dres bez úpravy. Respektive k nejnižšímu nárůstu a tedy i k pozorovatelnému antimikrobiálnímu účinku docházelo pouze u prvního extraktu.

V dalších výluzích se ale dres bez úpravy tak i dres s úpravou Silver Plus v počtu ulpěných bakterií v řádech vyrovnal. K vyhotovení snímků se použil rastrovací mikroskop Carl Zeiss Ultra Plus s mikroanalytickým systémem OXFORD Instruments. V České republice se nachází pouze 2 takto výkonné mikroskopy, z čehož se jeden nachází právě v prostorách TUL.

Postup:

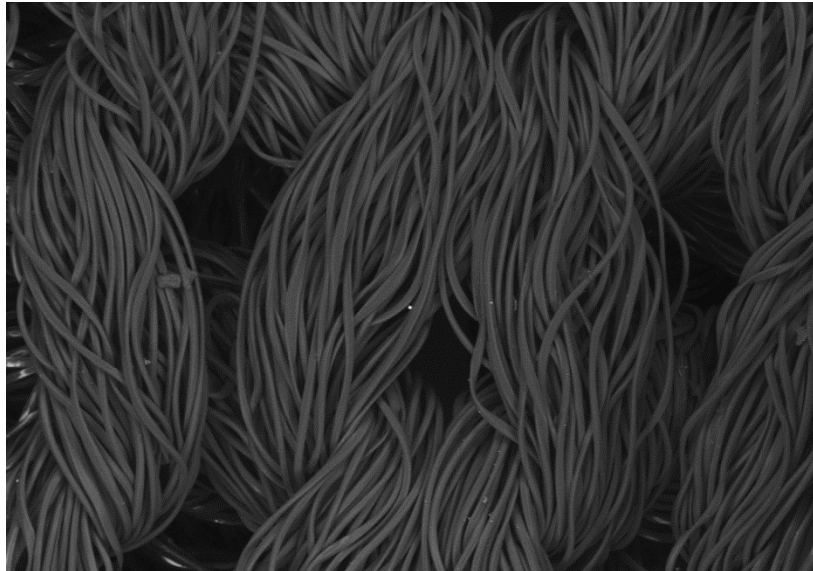
Vzhledem k destruktivnímu způsobu testování jsem oslovil výrobce dresu s žádostí o zaslání pleteniny. Testování jsem podrobil metráž ze všech tří variant testu - klasického dresu bez úpravy, dresu s úpravou Silver Plus a dresu Silver + AID. Jednotlivé vzorky jsem nastříhal na požadovanou velikost a posléze analyzoval. Pro porovnání byl v mikroskopu analyzován vzorek s komerčním RUCO-BAG AGP. Operátor elektronového mikroskopu byl Ing. Pavel Kejzlar, Ph.D z oddělení přípravy a analýzy nanostruktur.



Obrázek 17: Elektronový rastrovací mikroskop Carl Zeiss Ultra Plus

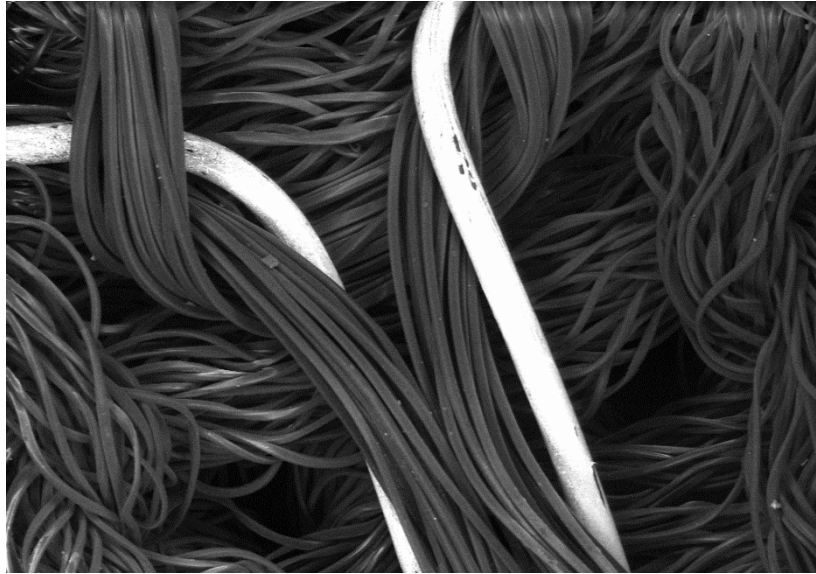
Výsledky:

Snahou tohoto testu je zjistit, proč výsledky z metody KTJ neodpovídají vstupním předpokladům o antimikrobiální účinku Silver Plus. K zodpovězení otázky slouží snímky, na kterých jsou mikroskopicky vyfocené povrchy jednotlivých dresů.



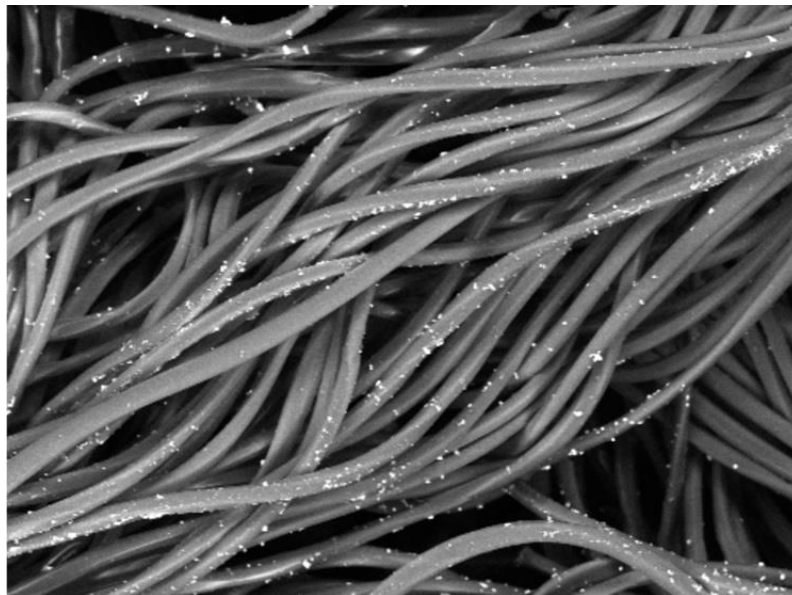
Obrázek 18: Pletenina klasického dresu s úpravou Silver Plus

Obrázek č. 18 zachycuje povrch dresu ošetřen úpravou Silver Plus. Na analyzovaném vzorku o rozměru 1 x 1 cm je zachyceno místo s největší četností uchyceného stříbra. Snímek potvrzuje, že ulpění stříbra je na tomto dresu minimální. Největší kus stříbra, který se na tomto testovaném vzorku nacházel, měl rozměry 4,19 x 4,27 μm .



Obrázek 19: Pletenina dresu Silver + AID

Tato fotka zachycuje stříbrnou niť, která je zapletená do struktury dresu Silver + AID. Niť máš šířku 52,73 μm a po celém dresu se vyskytuje v pravidelně vetkaných očkách. Horizontální vzdálenost jednotlivých oček mezi sebou je 2,198 mm, vertikální vzdálenost je 4,813 mm.



Obrázek 20: Pletenina klasického dresu s úpravou RUCO-BAG AGP

Obrázek č. 20 zachycuje povrch klasického dresu s úpravou RUCO-BAG AGP. Na analyzovaném vzorku je vidět značně větší zastoupení částic. Z chemické analýzy však nelze přesně říci, které částice jsou stříbrné. Nachází se zde velké zastoupení titanových částic, které použitým filtrem nelze odlišit od částic stříbra.

Vzhledem k výsledkům získaným mikroskopickou analýzou jsem se rozhodl přistoupit k dalšímu testování tak, abych byl schopen vše vysvětlit a podpořit své hypotézy. Prvním testem bylo stanovení stříbra v různých výrobcích německé firmy Rudolf Group. K tomuto kroku jsem přistoupil, abych porovnal reklamní vzorek Silver Plus s komerčně prodávaným produktem RUCO-BAG AGP. Dalším testem bylo rozšíření mikrobiologického testování o kontaktní test (paralelní pruhová metoda).

4.3.4 Výsledky získané paralelní pruhovou metodou

Paralelní pruhová metoda je dalším z destruktivních testů, jenž byl v rámci mé diplomové práce použit. Rozhodl jsem se k němu přistoupit na základě přebytečné textilní metráže, kterou jsem zajistil na snímky z elektronových mikroskopů. Hlavní úkol paralelní pruhové metody je otestování antimikrobiálních úprav na agarových deskách. K dosažení výsledků jsem použil dvě testovací bakterie:

- *Staphylococcus aureus* - gram-pozitivní bakterie
- *Klebsiella pneumoniae* - gram-negativní bakterie

Testovanou textilií jsem ručně nastříhal na předem doporučenou velikost 2,5 x 5 cm. Rozměr testování textilie je dán povahou testu, kdy textilie musí pokrýt všechny rovnoběžné očkovací pruhy, které jsou od sebe vzdálené 0,8 cm. Seznam testovaných vzorků:

- klasický dres bez úpravy
- klasický dres + úprava Silver Plus
- klasický dres + úprava RUCO-BAG AGP
- dres s úpravou Silver + AID

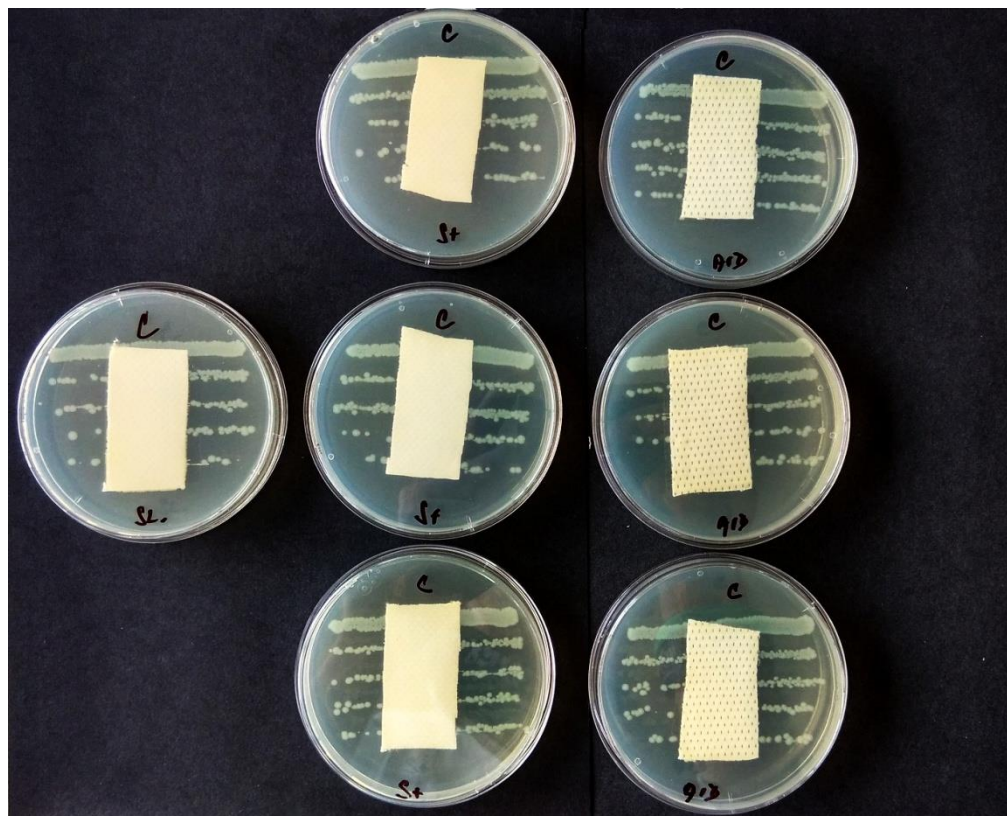
Hlavním cílem testu bylo porovnání dvou výrobků, u kterých jsem předpokládal podobné vlastnosti RUCO-BAG AGP a Silver Plus. Aplikace obou produktů probíhala stejným způsobem (za studena). RUCO-BAG AGP je v současnosti komerčně dostupný a jedná se o certifikovaný výrobek.

Postup:

Očkování agarové misky se provádí za pomoci bakteriologické kličky. Koncentrované bakteriální kultury se pomocí kličky aplikují na agarovou misku v pěti rovnoběžných pruzích. Jednotlivé pruhy se na jednu misku nanáší bez doplnění bakterie na kličku. Při aplikaci nesmí dojít k poškození agaru. Po naočkování všech misek se nakonec opatrně přiloží zkušební vzorek na agarovou plochu tak, aby ležel přes všech pět naočkovaných pruhů. Tento proces se provádí sterilní pinzetou. Pokud vzorek na nějakém místě plně nepřiléhá na agarovou plochu, opatrně jej domáčkujeme skleněnou "hokejkou." Zároveň musíme dbát na to, abychom neopatrnou manipulací nepoškodili povrch agaru.

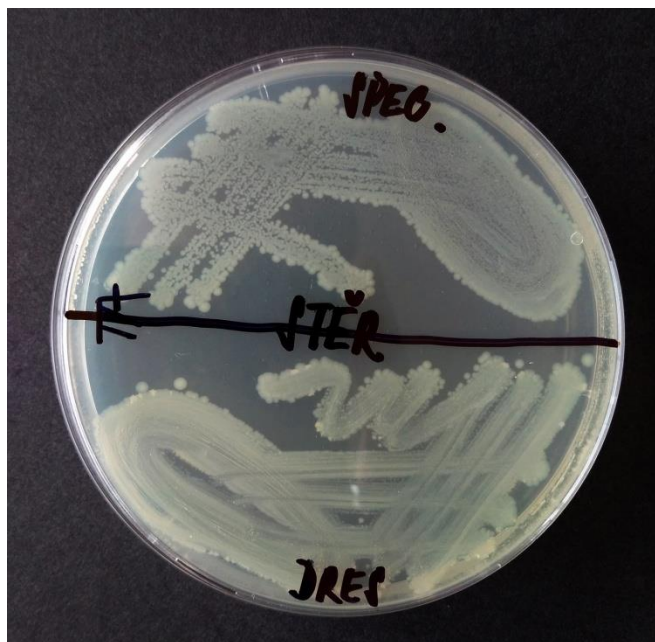
Výsledky:

Testování všech vzorků probíhalo dle návodu metodiky AATCC 147. Inkubace probíhala v tomto případě pouze 24 hodin při teplotě 37°C. Po inkubaci se hodnotí vznik inhibičních zón.



Obrázek 21: Aplikovaný *Staphylococcus aureus* na agarových deskách

Obrázek č. 21 ukazuje misky s naaplikovanou bakterií *Staphylococcus aureus*. Miska vlevo slouží jako kontrola, prostřední trojice misek zastupuje dres s úpravou Silver Plus a pravá trojice misek patří dresu s úpravou Silver + AID. Testování se provádí v triplikátu. Z výsledků je patrné, že se ani v jednom případě neobjevily inhibiční zóny okolo testovaných vzorků. Tudiž antimikrobiální úpravy lze hodnotit vůči tomuto kmenu jako neefektivní.



Obrázek 22: Stěry pod testovanými textiliemi

Vzhledem k nemožnosti hodnotit nárůst kolonií pod pleteninou jsem provedl dodatečný stěr. Výsledek kultivace ukazuje nárůst bakterií jak ze vzorků s úpravou Silver Plus, tak s úpravou Silver + AID.

Stejných výsledků bylo dosaženo i u bakterie *Klebsiella pneumoniae*. U všech testovaných antimikrobiálních úprav (Silver Plus, RUCO-BAG AGB a Silver + AID) nevznikla kolem vzorku žádná inhibiční zóna a došlo k prorůstání bakterií i pod textilií. Z tohoto testu tedy můžu vyvodit závěr, že ani jedna z výše zmíněných antimikrobiálních úprav nemá dostačující potlačující účinky na testovaných bakteriálních kmenech.

4.3.5 Měření koncentrace stříbra ve vzorku

Stanovení jsem prováděl formou stanovení celkového obsahu stříbra metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázanou plasmou. K analýze jsem použil přístroj ICP/OES Optima 2100DV Perkin Elmer. Měření bylo provedeno v axiálním uspořádání, s výkonem generátoru 1500W (pracovní frekvence generátoru je 40MHz).

Návaznost jsem zjistil prostřednictvím referenčních materiálů firmy Analytika Praha. Ke všem operacím jsem pro ředění použil ultračistou vodu o rezistivitě $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ připravená v zařízení ELGA.

Výsledky:

V reklamním produktu Silver Plus jsem naměřil koncentraci stříbra 165 mg/l. Produkt RUCO-BAG AGP obsahoval koncentraci stříbra 4200 mg/l.

4.3.6 Stanovení absolutní koncentrace stříbra ve výluzích

Stanovení absolutní koncentrace stříbra pomůže dále vysvětlit výsledky získané v předchozím testování. Reklamní antimikrobiální produkt Silver Plus na bázi aviváže se v tomto případě porovnávala s komerčním produktem RUCO-BAG AGP, jehož antimikrobiální vlastnosti jsou získávány podobnou aplikací.

Postup:

Stanovení koncentrace stříbra jsem testoval v duplikátech. Oba výrobky jsem aplikoval přesně dle návodu výrobce. Abych byl schopen rozlišit koncentrace stříbra, které ulpěly po aplikaci, testoval jsem dva způsoby výluhu. V prvním jsem testovanou textilií loužil přímo po aplikaci antimikrobiální látky, v druhém případě jsem textilie před loužením propláchl destilovanou vodou. Testovanou textilií jsem ponořil do 10 ml roztoku, který obsahoval 2 ml 65% HNO_3 a 8 ml demineralizované vody a louhoval po dobu 24 hodin při kontinuálním míchání na třepačce (150 otáček/min). Před vlastní analýzou jsem výluh desetkrát ředil. Koncentrace stříbra ve výluhu se změřila metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP-OES) na zařízení Optima 2100 DV.

Výsledky:**Tabulka 7:** Koncentrace stříbra na jednotlivých testovaných vzorcích

vzorek	popis	Ag mg/l	mg/m²
1	Dres Silver Plus a	0,011	0,70
2	Dres Silver Plus b	0,012	0,72
3	Dres s Silver Plus proplach a	0,013	0,81
4	Dres s Silver Plus proplach b	0,012	0,75
5	Dres s RUCO-BAG AGP a	0,181	11,33
6	Dres s RUCO-BAG AGP b	0,184	11,51
7	Dres s RUCO-BAG AGP proplach a	0,184	11,50
8	Dres s RUCO-BAG AGP proplach b	0,173	10,78

Tabulka č. 7 ukazuje jednotlivé koncentrace stříbra na jednotlivých pleteninách. První čtyři vzorky patří antimikrobiální úpravě reklamního vzorku Silver Plus, další čtyři antimikrobiální úpravě RUCO-BAG AGP. Měření vzorků v dubletu zabraňuje vzniku chyby v důsledku měření. Z tabulky je patrné, že proplachování destilovanou vodou nemá v mém případě vliv na stanovení absolutní koncentrace stříbra. Výsledky naznačují, že ulpěné stříbro je uchyceno na textilních strukturách stabilně. První sloupec ukazuje, jaká je koncentrace stříbra (v miligramech) na jeden litr roztoku, druhý sloupec ukazuje přepočít, kolik miligramu stříbra se nacházelo na vzorku o rozměru 4x4 cm. Textilie s úpravou RUCO-BAG AGP vyšla významně lépe než s úpravou Silver Plus.

4.3.7 Výsledky získané metodami molekulární biologie

Molekulárně biologické testy probíhaly na přístroji Light Cycler 480. Prvním krokem testu byla izolace DNA, po ní následovala vlastní PCR analýza.

Výsledky koncentrace DNA:

Koncentrace izolované DNA jsem měřil na přístroji QUBIT. Nejprve jsem musel všechny extrakty zfiltrovat a dále provést izolaci DNA za pomoci kitu FastSPIN DNA for Soil.

Tabulka 8: Koncentrace DNA u jednotlivých subjektů

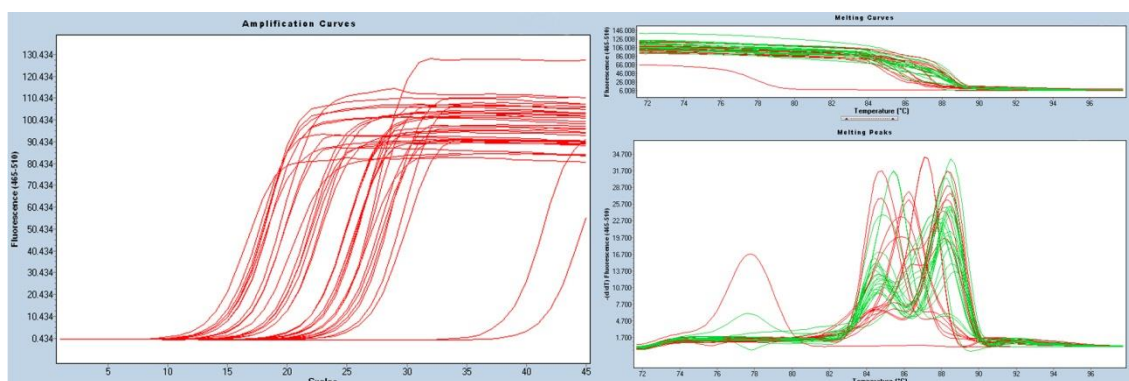
Vzorek	Materiál	Extrakt	Subjekt	DNA (ng/μl)
1	Klasický dres	5	1	<0,5/0,0158
2	Klasický + Silver	5	1	1,09
3	Silver + AID	5	1	<0,50
4	Klasický dres	5	2	0,225
5	Klasický + Silver	5	2	0,251
6	Silver + AID	5	2	0,036
7	Klasický dres	5	3	<0,50/0,0222
8	Klasický + Silver	5	3	<0,50/0,104
9	Silver + AID	5	3	<0,50/-
10	Klasický dres	5	1 OT	1,65
11	Klasický + Silver	5	1 OT	2,87
12	Silver + AID	5	1 OT	0,565

Tabulka č. 8 ukazuje jednotlivé koncentrace DNA získané izolací. Opět zde můžeme pozorovat nejnižší koncentrace DNA u dresu s úpravou Silver + AID. Mezi dresy bez úpravy nebo s úpravou Silver Plus nejsou pozorovatelné velké rozdíly. Respektive výsledky získané z extraktu dresu bez úpravy následují Silver + AID. Z extraktu dresu Silver Plus jsem izoloval nejvyšší koncentrace DNA, což koreluje se všemi provedenými testy a analýzami.

Výsledky real-time PCR:

Tabulka 9: Výsledky real-time PCR analýzy u jednotlivých subjektů

Vzorek	Materiál	Extrakt	Subjekt	Ct	Ct	průměr Ct
1	Klasický dres	5	1	21,79	21,76	21,775
2	Klasický + Silver	5	1	14,82	14,76	14,79
3	Silver + AID	5	1	22,76	23,49	23,125
4	Klasický dres	5	2	19,62	19,48	19,55
5	Klasický + Silver	5	2	18,87	18,58	18,725
6	Silver + AID	5	2	21,72	21,79	21,755
7	Klasický dres	5	3	22,42	23	22,71
8	Klasický + Silver	5	3	24,99	25,5	25,245
9	Silver + AID	5	3	26,62	26,46	26,54
10	Klasický dres	5	1 OT	15,02	15,07	15,045
11	Klasický + Silver	5	1 OT	13,28	14,46	13,87
12	Silver + AID	5	1 OT	16,46	16,58	16,52



Obrázek 23: Výsledky real-time PCR analýzy u jednotlivých subjektů

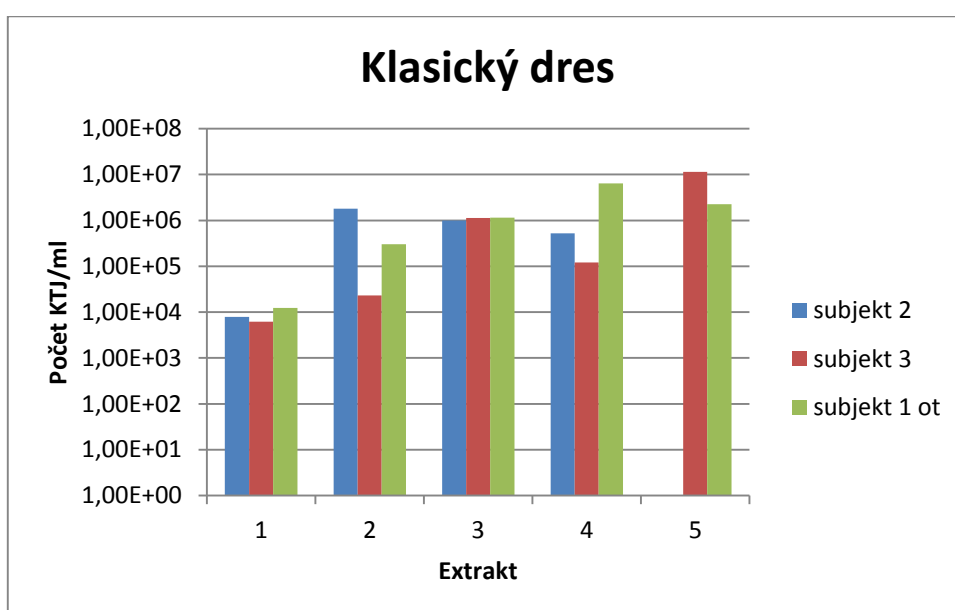
Z tabulky číslo 9 lze opět vyvodit závěry podporující ostatní výsledky testů. Jako první se vždy objevují signály dresu s úpravou Silver Plus, jako druhý nastupuje signál dresu bez jakékoliv úpravy a jako poslední se objevuje signál pro dres s úpravou Silver + AID. Pouze u třetího testovaného subjektu jsou výsledky v pořadí dres bez úpravy, Silver Plus a opět jako poslední signál Silver + AID. Vzhledem k povaze reakce nemůžeme stanovit přesné počty kolonií, nicméně můžeme hodnotit relativní vztahy a zastoupení. Na dresech s úpravou Silver + AID se stejně tak, jako ve všech ostatních biologických testech jsem potvrdil nárůst nejnižšího počtu bakteriální biomasy. Dresy s úpravou Silver Plus vykazují vyšší nárůst biomasy než klasické dresy bez jakékoliv úpravy. Tyto výsledky podporují všechny doposud provedené testy a jsou v přesné korelaci s mými výsledky.

4.3.8 Extrakce materiálu

U metody extrakce materiálu jsem zjišťoval, zda není testovaný materiál ošetřen látkami, které by mohly omezit záchyt antimikrobiální úpravy. Testu se podrobil klasický dres - 100% polyester. Tři gramy této textilie se louhoval po dobu 4 hodin při stanových 4-6 cyklů za hodinu. Jako rozpouštědlo jsem použil Petroleum ether, s bodem varu 40-65°C. V extraktu byly nalezeny estery vyšších mastných karboxylových kyselin, což jsou látky, které mohou pocházet z detergentů, aviváží, změkčovadel, atd. Výše zmíněné látky by mohly způsobit, že se na materiálu udržela malá část produktu Silver Plus.

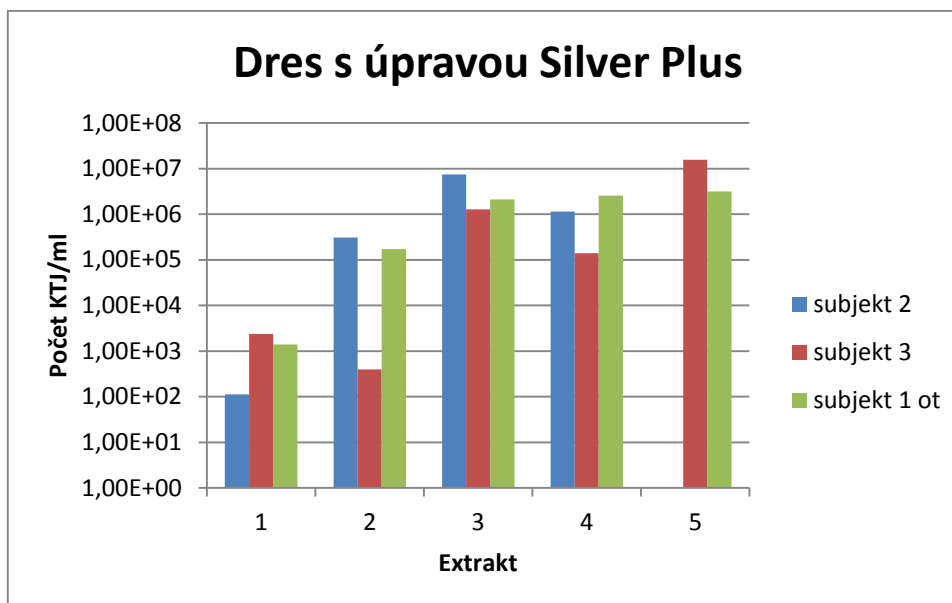
4.3.9 Grafické porovnání výsledků

V následující kapitole jsem porovnával jednotlivé výsledky dresů u všech testovacích subjektů. Jednotlivé grafy představují jeden konkrétní cyklistický dres a výsledky získané od všech třech testovacích subjektů. Musím zmínit, že grafické porovnání neobsahuje výsledky z prvního testu, jsou nahrazeny opakovaným testem. V legendě je tedy uveden na prvním pozici subjekt 2 a na poslední pozici subjekt 1 OT. Zkratka OT v našem případě znamená opakovaný test. Tento způsob seřazení vychází z posloupnosti jednotlivých testovaných subjektů.



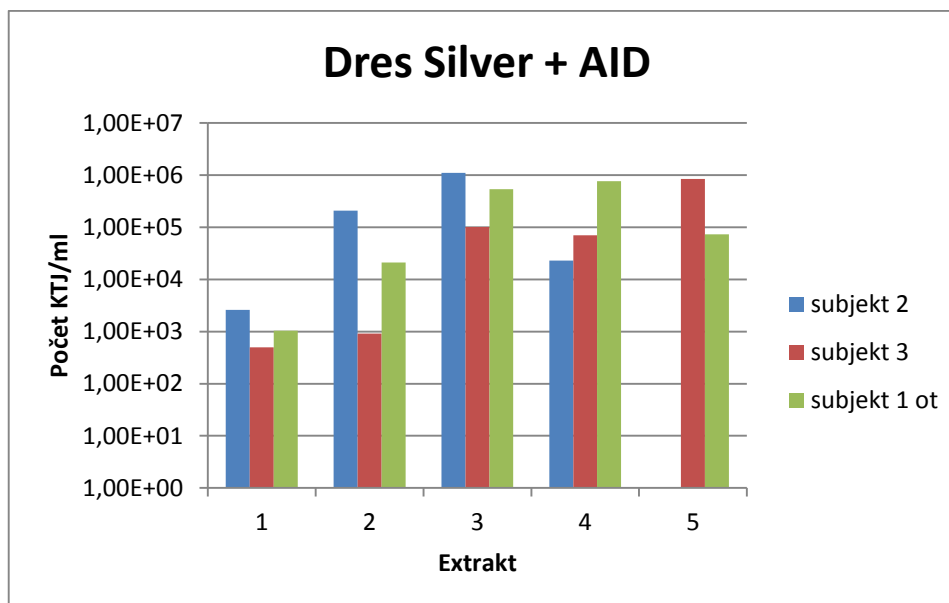
Graf 8: Srovnání klasického dresu mezi subjekty

Graf č. 8 ukazuje množství výskytu bakterií v čase na dresu bez jakékoliv úpravy. První extrakt zastupuje čistý vypraný dres, další extrakty ukazují bakteriální osídlení po použití. V tomto porovnání lze vidět, jak každý testovací subjekt má jiný růstový trend bakterií. Čisté dresy (extrakt 1) mají ve všech případech podobné bakteriální osídlení.



Graf 9: Srovnání dresu s úpravou Silver Plus mezi subjekty

Graf č. 9 stejně jako v předchozím případě ukazuje množství výskytu bakterií v čase na dresu s antimikrobiální úpravou Silver Plus. Jednotlivé subjekty mají opět rozdílné růstové trendy, co se týká počtu bakterií obsažených v jednotlivých extraktech. V grafu je zřejmé, že u čistých dresů (extrakt 1) se bakteriální osídlení značně liší. V grafu lze jasně sledovat trend nárůstu bakteriálních kolonií v čase. V prvním extraktu (ihned po aplikaci) můžeme pozorovat velmi nízký nárůst kolonií, který lze přičítat aplikaci Silver Plus. Nicméně již po první jízdě se množství kolonií téměř zdvojnásobí a antimikrobiální efekt je na úrovni dresu bez jakékoliv úpravy (viz graf výše).



Graf 10: Srovnání dresu Silver + AID mezi subjekty

Tento graf ukazuje množství výskytu bakterií v čase na dresu s provedenou tovární úpravou Silver + AID. U čistých dresů se bakteriální osídlení nepatrně liší a je zde opět pozorovatelný rozdílný růstový trend u jednotlivých subjektů.

Resumé

Experimentální část se zabývá samotným testováním a dělí se na 3 části. První část je věnována informacím, které se váží k testovaným materiálům – dresům. Vzhledem k výsledkům získaným nedestruktivním testováním jsem jako druhou část zvolil testy destruktivní. K tomu účelu posloužily textilní metráže materiálů, ze kterých jsou cyklistické dresy vyrobeny. Experimentální část dále pokračuje kapitolou pilotních experimentů, kdy jsem testoval vhodnost zvoleného experimentálního postupu (mikrobiologické a molekulárně biologické testovací metody). Poslední kapitola experimentální části patří samotnému hlavnímu testování za striktního dodržení všech testovacích podmínek a je obohacena několika dodatečnými testy - destruktivními, kde došlo k ověření správnosti postupu. Zároveň došlo k porovnání a zhodnocení a provázání jednotlivých výsledků.

Jeden testovací cyklus trval čtrnáct dní, dohromady se testování provádělo čtyřikrát a to z důvodu změněného postupu aplikace antimikrobiální vrstvy. Ačkoliv bylo první testování do experimentální části zahrnuto, komparativní závěry se vyvozovaly pouze z testů, kde došlo ke stejné aplikaci mikrobiální úpravy. Hlavní prioritou bylo dodržení stejných testovacích podmínek jednak pro všechny subjekty, ale i pro práci konanou v laboratořích.

5. Dotazníkové šetření návrh marketingové strategie

Dotazníkové šetření slouží v mé práci jako podklad, který doplňuje celé testování. Na základě několika jednoduchých otázek jsem se snažil získat informace o lidech, kteří se věnují cyklistice na závodní i rekreační úrovni. Celý dotazník je konstruovaný tak, aby jednotlivé otázky úzce souvisely s problematikou celé mé diplomové práce. Cílem dotazníkového šetření bylo zjistit, jak je široká veřejnost obeznámena se současnými možnostmi funkčních a antimikrobiálních úprav sportovního oblečení.

Výsledky dotazníku:

Dotazoval jsem celkem 52 respondentů, z nichž 29 byli muži a 23 ženy.

Tabulka 9: Četnosti odpovědí dle pohlaví

č. otázky	Muži (29)					Ženy (23)				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
2	18	11	-	-	-	15	8	-	-	-
3	6	10	9	4	-	2	7	9	5	-
4	16	7	6	-	-	9	10	4	-	-
5	7	6	7	9	-	4	9	8	2	-
6	8	13	1	3	4	3	4	8	5	3
7	12	5	8	4	0	9	4	6	2	2
8	4	14	5	5	1	4	3	10	3	3
9	7	14	5	1	2	8	5	7	3	0
10	9	9	7	3	1	5	3	4	7	4
11	10	5	6	6	2	5	7	5	3	3
12	5	8	5	7	4	7	5	6	4	1
13	10	15	4	-	-	5	15	3	-	-
14	10	10	9	-	-	8	9	6	-	-
15	13	11	5	-	-	11	6	6	-	-
16	9	13	7	-	-	4	15	4	-	-
17	6	23	-	-	-	5	18	-	-	-
18	13	9	7	-	-	10	10	3	-	-

Tabulka č. 9 ukazuje četnosti odpovědí na jednotlivé otázky rozdělené dle pohlaví respondentů.

Tabulka 10: První část otázek dotazníku

Otázka	Odpověď	Respondenti	Podíl
1. Jaké je Vaše pohlaví?	muž	29	55,8%
	žena	23	44,2%
2. Jakým způsobem se věnujete cyklistice?	závodně	33	63,5%
	nezávodně	19	36,5%
3. Kolik času týdně věnujete cyklistice?	1 - 5 hod	8	15,4%
	6 - 10 hod	17	32,7%
	11 - 15 hod	18	34,6%
	více jak 16 hod	9	17,3%
4. Máte nějaké zkušenosti s užíváním funkčního cyklo oblečení?	kladné	25	48,1%
	záporné	17	32,7%
	žádné	10	19,2%
5. Kolik jste ochoten/ochotna na víc utratit za cyklistické funkční oblečení?	1000 - 2000 Kč	11	21,2%
	2000 - 3000 Kč	15	28,9%
	více jak 3000 Kč	15	28,9%
	nevím	11	21,2%
6. Z jakého materiálu je vyroben dres, který nyní užíváte (materiál s největším procentálním zastoupením)?	polyester	11	21,2%
	polyamid	17	32,7%
	polypropylen	9	17,3%
	carbon	8	15,4%
	nevím	7	13,5%
7. Se současnými celkovými uživatelskými vlastnostmi cyklistického dresu jsem ?	spokojen	21	40,4%
	spíš spokojen	9	17,3%
	nemám názor	14	26,9%
	spíš nespokojen	6	11,5%
	nespokojen	2	3,9%
8. S odolností dresů v oděru jsem?	spokojen	8	15,4%
	spíš spokojen	17	32,7%
	nemám názor	15	28,9%
	spíš nespokojen	8	15,4%
	nespokojen	4	7,7%
9. S termoregulačními vlastnostmi dresů jsem?	spokojen	15	28,9%
	spíš spokojen	19	36,5%
	nemám názor	12	23,1%
	spíš nespokojen	4	7,7%
	nespokojen	2	3,9%

Tabulka č. 10 ukazuje první polovinu z celkového počtu 18 otázek. V tabulce se objevuje zadání otázky, odpověď na příslušnou otázku, počet respondentů, kteří na jednotlivou možnost odpověděli a jednotlivé procentuální zastoupení.

Tabulka 11: Druhá část otázek dotazníku

Otázka	Odpověď	Respondenti	Podíl
10. S odvodem vlhkosti z povrchu těla jsem?	spokojen	14	26,9%
	spíš spokojen	12	23,1%
	nemám názor	11	21,2%
	spíš nespokojen	10	19,2%
	nespokojen	5	9,6%
11. Se současným střihem cyklistického dresu jsem?	spokojen	15	28,9%
	spíš spokojen	12	23,1%
	nemám názor	11	21,2%
	spíš nespokojen	9	17,3%
	nespokojen	5	9,6%
12. Která vlastnost z níže uvedených je pro Vás ještě důležitá?	elastičnost dresů	12	23,1%
	tvarová stálost dresů	13	25,0%
	umístění a typ švů	11	21,2%
	světlostalost barev	11	21,2%
	stálost barev v praní	5	9,6%
13. Perete cyklistické oblečení po každé vyjíždce?	ano	15	28,9%
	ne	30	57,7%
	nevím/nesleduji to	7	13,5%
14. Z jakého důvodu provádíte praní cyklistického oblečení?	hygiena/prevence	18	34,6%
	zápach	19	36,5%
	prach/špína	15	28,9%
15. Pokud byste věděli/a, že funkční oblečení po každé vyjíždce prát nemusíte, učinil/a byste tak?	ano	24	46,2%
	ne	17	32,7%
	nevím	11	21,2%
16. Věříte, že antimikrobiální úpravy oblečení zlepšují užité vlastnosti?	ano	13	25,0%
	ne	28	53,9%
	nevím	11	21,2%
17. Víte, že existuje možnost aplikace antimikrobiální úpravy na oblečení, které zvládnete v domácích podmínkách?	ano	11	21,2%
	ne	41	78,8%
18. Pokud byste věděli, že Vámi doma aplikovaná antimikrobiální úprava oblečení má podobné nebo stejné vlastnosti, jako funkční oblečení, zaujala by Vás možnost koupě této "aviváže?"	ano	23	44,2%
	ne	19	36,5%
	nevím	10	19,2%

Tabulka č. 11 ukazuje druhou polovinu z celkového počtu 18 otázek. Stejně jako u tabulky č. 10 se zde opět objevuje zadání otázky, odpověď na příslušnou otázku, počet respondentů, kteří na jednotlivou možnost odpověděli a jednotlivé procentuální zastoupení.

Vyhodnocení dotazníku:

V rámci analýzy všech odpovědí mne nejvíce zaujaly odpovědi na otázku č. 13 - Perete cyklistické oblečení po každé vyjížděce? Z 52 respondentů odpovědělo 30 lidí, že ne. Ještě zajímavější je, že poměr pohlaví v této odpovědi je přesně 50:50. Jak jsem očekával u otázky č. 17 - z 52 dotazovaných respondentů 41 lidí neví o možnosti domácí antimikrobiální úpravy oblečení. V mém souboru to činí 78,8% ze všech dotazovaných. Otázka č. 19, která úzce souvisí s otázkou č. 18, respondenti vítají možnost domácí aplikace antimikrobiální úpravy oblečení. !!! čísla!!!! záležitost, co se dá marketingově zúročit

Pokud shrnu jednotlivé výčty vlastností u cyklistických dresů, respondenti byli převážně s vlastnostmi spokojeni. Větší procento negativních odpovědí padlo pouze na vlastnost odvodu potu z povrchu lidského těla.

Z výčtu jednotlivých materiálů v otázce č. 6 nejvíce respondentů uvedlo, že mají dres vyrobený z polyesteru a polyamidu. Toto zjištění potvrzuje teoretickou analýzu cyklistického oblečení, kde bylo zmíněno, že právě z polyesteru a polyamidu se oblečení nejčastěji vyrábí. V souboru se našlo i 7 respondentů, kteří již používají dres s příměsí karbonových vláken.

Výsledky zpracování dotazníku významně pomohly při návrhu marketingové strategie. Na základě znalostí široké veřejnosti jsem schopen přesněji reagovat na její požadavky.

5.1 Návrh marketingové strategie

Na základě vyhotoveného dotazníku bylo zjištěno, že více než polovina (číslo) dotazovaných respondentů projevila zájem o možnost aplikace antimikrobiální úpravy oblečení v domácích podmínkách. Pokud do tohoto počtu zahrneme i respondenty, jenž

odpověděli možností "nevím," dostáváme se na více než 60% zájem o aplikaci, což jevílo potenciál pro vypracování strategie, jak oslovit tento segment trhu. Hlavní výhodou produktu Silver Plus je jeho freshness efekt, který zabraňuje vzniku nežádoucího pachu.

Osobně bych navrhoval nabízet připravené reklamní sáčky s antimikrobiální úpravou Silver Plus na společenských sportovních akcích, jako je třeba Kolo pro život nebo Cyklomaraton. Důvodem je masová účast široké veřejnosti na těchto závodech. Dlouhodobé statistiky vypovídají, že například seriál závodů Kolo pro život má průměrně okolo 1200 startujících závodníků všech věkových skupin a výkonnosti, včetně české elity. Když si k tomu připočteme účast doprovodů a diváků, dostává se nám široký počet potenciálních zákazníků. Pokud se budeme snažit získat potenciální zákazníky i ze zahraničí, doporučoval bych k reklamním místům využít dva nejprestižnější české závody, a to Malevil Cup, který již druhým rokem spadá do závodů UCI a Rallye Sudety.

Produkt bych nabízel dvěma způsoby. Prvním způsob nabízení by byl po dohodě s pořadatelem závodů, že by se reklamní sáčky přikládaly do dárkových igelítek, kterou každý registrovaný závodník dostává spolu se startovním číslem u registrace závodu. Druhý způsob nabízení produktu by byl na místě konání závodu v podobě reklamního stánku. Reklamní agenti by metodou face-to-face mohli mimo závodníků širokou veřejnost. Forma reklamního stánku a metody nabízení produktu face-to-face by byla vhodná i pro největší český veletrh cyklistiky For Bikes.

Dalšími vhodnými testovacími skupinami by mohli být například pracovníci v exponovaných podmínkách např. hasiči a vojáci nebo např. profesionální sportovci z jiných odvětví než je cyklistika.

6. Závěr

Prvním cílem mé diplomové práce byl výběr vhodné metodiky pro další rutinní testování. Dalším úkolem vyplývajícím ze zadání je vlastní analýza získaných výsledků. Porovnával jsem antimikrobiální úpravy cyklistického oblečení, a sice dodatečnou antimikrobiální úpravu Silver Plus s během výroby aplikovanou úpravou Silver + AID.

Ve všech případech nedestruktivního testování (včetně prvního nezahrnutého testu) za pomoci metody KTJ vyšla nejefektivněji tovární antimikrobiální úprava Silver + AID. U všech subjektů se projevila nejnižším nárůstem bakterií v čase. Četnosti kolonií se pohybovaly o 1 až 3 řády níže, než u zbývajících dresů. Zároveň se během celého užívání na dresu nezachycoval nepříjemný zápach způsobený funkcí potních žláz. Antimikrobiální úprava Silver Plus se v našem případě projevila efektivně v potlačování bakterií hlavně krátkodobě. Efekt aplikace produktu Silver Plus se významně projevil v prvním výluhu. Dalším výsledkem aplikace Silver Plus byl významný freshness efekt.

Všechny zvolené nedestruktivní techniky prokázaly jako nejefektivnější úpravu právě zapletení stříbrné niti přímo do pleteniny. Aplikace dodatečné úpravy dresu se ukázala víceméně bez efektu v porovnání s dresem bez úpravy. Tyto závěry mohou podložit nejen metodou KTJ, ale i metodikami molekulární genetiky, které jsem použil. Ve všech testech se potvrzuje účinnost stříbra, pokud je vhodným způsobem aplikováno na pleteninu.

Vzhledem k závěrům nedestruktivního testu jsem se rozhodl vysvětlit získané výsledky. Pomocí široké škály destruktivních testů jsem doplnil portfolio použitých metod. Výhodou destruktivních testů je možnost detailního pohledu přímo do pleteniny. Zajímala mě jak struktura pleteniny a záchyt stříbra v ní, tak i další doplňkové mikrobiologické testy. V neposlední řadě i analýza výluhů, která odhalí množství zachyceného stříbra. Všechny tyto analýzy mi pomohly dále vysvětlit neočekávané výsledky nedestruktivních testů.

Prvním testem byla paralelní pruhová metoda, která neukázala vliv dodatečné aplikace stříbra na pleteninu, ze které jsou cyklistické dresy vyrobené. V tomto testu jsem použil dva výrobky s rozdílným obsahem stříbra a ani u jednoho se efekt neprojevil. Důvody jsem zjišťoval pomocí chemických analýz. Jako první jsem provedl

analýzu obsahu stříbra ve vlastním výrobku. Koncentrace stříbra v produktu RUCO-BAG AGP byl 25x vyšší než v Silver Plus. I přes tyto koncentrace nedošlo k zachycení stříbra na pletenině, což ukázal další test s výluhy. Tato analýza podpořila mé podezření na problém již při vlastní aplikaci, která nemusí být dána vlastnostmi Silver Plus, ale inhibicí mezi zvoleným dresem a testovaným výrobkem. Tyto hypotézy dále podpořila i mikroskopická analýza pleteniny, která byla schopná detekovat stříbrnou nit v Silver + AID pletenině, ale stříbro nebylo nalezeno v pletenině po aplikaci Silver Plus.

Všechny tyto hypotézy jsou dále potvrzeny metodou extrakce materiálu, která potvrdila přítomnost chemikálií, které by mohly negativně ovlivnit navázání produktu Silver Plus.

Z provedených analýz a testů vyplývá vhodnost jakéhokoliv zvoleného testu. Všechny vedly k relevantním závěrům a doplňovaly své výsledky. Do budoucna bych doporučoval v metodice KTJ pokračovat a ověřit ji na komerčním produktu RUCO 3231, kde předpokládám větší koncentraci stříbra i antimikrobiální účinek. Tím se otestuje účinnost komerčního produktu. Produkt RUCO 3231 je výrobcem určen pro průmyslové prádelny. Aplikace stříbra na pleteninu v principu působí antimikrobiálně, což jsem potvrdil výsledky z dresu Silver + AID. Další analýzy, které neprokázaly antimikrobiální vliv, jsou dle mého názoru dány špatným kontaktem výrobku Silver Plus s pleteninou. Co je příčinou tohoto špatného kontaktu je velmi složité rozkódovat i po kompletním testování, které jsem provedl. Nicméně vzhledem k velmi špatnému zachytu stříbrných částic na pletenině a to v případě jak RUCO-BAG AGP tak i Silver Plus lze velmi důrazně vyvozovat, že došlo ke špatné aplikaci a to pravděpodobně díky vlastnostem testované pleteniny. Aby bylo možné vyvodit konečné závěry, bude nutné provést další testy s jinými druhy pletenin. Dále by bylo vhodné testovat na daleko širší skupině testovacích subjektů. Všechny výsledky mé práce provedené na velmi široké škále testů (mikrobiologické, molekulárně genetické, chemické, mikroskopické) podporují jednotlivé výsledky a lze je použít jak pro destruktivní tak i pro nedestruktivní testování. Všechny testy jsou proveditelné v laboratořích TUL a vydávají relevantní výsledky. Jako nejvhodnější a nejlevnější se mi jeví základní mikrobiologická metoda KTJ, která poskytuje dostatečný obraz o bakteriálním oživení.

Další výsledky a testování kvality antimikrobiální úpravy nelze relevantně zhodnotit, respektive jsou výsledky zatížené chybou, která vzniká již při aplikaci vlastního produktu.

Posledním cílem, návrhem marketingového postupu, jsem myslím, splnil všechny body zadání diplomové práce.

Seznam použité literatury

- [1] *Cycling. Shoes for sporting activities* [online]. [cit. 12. 12. 2014] Dostupné z <http://www.scpod.org/foot-health/footwear/shoes-for-sporting-activities/cycling>
- [2] *Syntetická vlákna* [online]. [cit. 14.12. 2014] Dostupné z http://www.zspasirskajbc.cz/data/file/projekt_opvk_14_sablony/vy_inovace_ch89/vy_32_inovace_iii.2.4.0119.pdf
- [3] STANĚK, J., *Textilní zbožížnalství - Vláknenné suroviny, příze, nitě*. Technická univerzita v Liberci, 2006, ISBN 80-7372-147-3.
- [4] HOFER, A., *Stoffe : 1. Textilrohstoffe, Garne, Effekte*, völlig überarbeitet Auflage, Frankfurt am Main: Deutscher Fachverlag, 1992, ISBN 3-87150-366-5
- [5] *Moira* [online]. [cit. 17. 2. 2015] Dostupné z <http://www.outdoor-termopradlo.cz/clanky/vse-o-vlaknu-moira/>
- [6] Textilní galanterie. *Elasta, Lycra nebo Spandex?* [online]. [cit. 3. 1. 2015] Dostupné z <http://www.aptega.cz/poradna/clanky/elastan-lycra-nebo-spandex/>
- [7] GLADIŠ, T., *Tech news - Cyklistický dres z karbonu?* [online]. [cit. 29. 7. 2014] Dostupné z <http://mtbs.cz/clanek/cyklisticky-dres-z-karbonu/kategorie/tech-news>
- [8] *The go-to jersey for Team Sky* [online]. [cit. 13.1.2015] Dostupné z <http://www.rapha.cc/eu/en/shop/team-sky-pro-jersey/product/SPT02>
- [9] *Materiály* [online]. [cit. 29.7.2014] Dostupné z <http://www.etape.cz/etape/zima-2012/materialy-a-vlozky/materialy>
- [10] *Softshell - TexInfo* [online]. [cit. 16. 12. 2014] Dostupné z <http://texinfo.wz.cz/softshell.htm>>
- [11] Štítek testovaného dresu společnosti Sýkora sportswear
- [12] *SKR Carbon - Cyklodresy* [online]. [cit. 17. 1. 2015] Dostupné z <http://cyklodresy.cz/vyhodne-sety-77/skr-carbon-s1-488.html>>

- [13] *Silver in the Washing Machine* [online]. [cit. 30. 7. 2014] Dostupné z <http://search.proquest.com/docview/1542115026/D1A84671B38F42C7PQ/6?accountid=17116>
- [14] Jiang, S. X., Qin, W. F., Tao, X. M., Zhang, Z. M., Yuen, C. W. M., Xiong, J., Kan, C. W., Zhang, L., Guo, R. H., Shang, S. M.: *Surface Characterization of Sputter Silver-coated Polyester Fiber, Fibers and Polymers*, Vol. 12, March 2011.
- [15] Gaimei, Z., Quiang, Ch., Wencai, X., Fujun, Y., Liqiang, Q., Wei, Y.: *The Antibacterial and Preservation Performance of Cling Wrap Coated by Nano-Silver Film*, *Applied Mechanics and Materials*, Vol. 262, 2003.
- [16] SCHOLLER: *Funkční úprava přízí* [online]. [cit. 30.7.2014] Dostupné z <http://www.texnetis.com/funkcni-upravy-prizi.htm>
- [17] MOULIK, N.: *Levi's hi-tech cycling clothes let you enjoys weat-less long rides* [online]. [cit. 30. 7. 2014] Dostupné z <http://search.proquest.com/docview/871809312/B2FC99B19FE48AFPQ/3?accountid=17116>
- [18] *SILVERPLUS* [online]. [cit. 3. 2. 2015] Dostupné z <http://www.rudolf.de/en/technology/silverplusr.html>
- [19] SHANNON, L. L., *A Delicate Matter: Cycling and Genital Problems* [online]. [cit. 12. 8. 2014] Dostupné z <http://www.womenscycling.ca/blog/health-tips/cycling-genital-problems/>
- [20] GOLDMAN, E., GREEN, L., *Practical Handbook of Microbiology*. 2008
- [21] ROZSYPAL, S., a kol.: *Úvod do molekulární biologie I.-IV. díl +dodatek*
- [22] ROZSYPAL, S., *Bakteriologie a virologie*, 1. vydání v ČR. Praha. 1994. ISBN 80-85827-16-6.
- [23] MORAPEX. *Studijní materiál*. Liberec. Technická univerzita v Liberci.
- [24] VONDREJS, V., STORCHOVÁ, Z., *Genové inženýrství*, Praha. 1997.
- [25] *Instruction for Use Promega* [online]. [cit. 15. 2. 2015] Dostupné z <http://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol>

- [26] DOLINOVÁ, I., *Principy studia biologických systémů*. Studijní materiál. Liberec. Technická univerzita v Liberci.
- [27] LYSKOVÁ, L., *Real-time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice*. Bakalářská práce. Brno. 2008.
- [28] Real time PCR Ct Values [online]. [cit. 17. 2. 2015] Dostupné z http://www.wvdl.wisc.edu/wpcontent/uploads/2013/01/WVDL.Info_.PCR_Ct_Values1.pdf
- [29] *Funkční materiály - TextInfo* [online]. [cit. 15. 12. 2014] Dostupné z http://texinfo.wz.cz/funkcni_material.htm
- [30] AATCC. *Technical manual - Antibacterial Activity Assessment of Textile Materilas: Parallel Streak Method*. AATCC. 2010.
- [31] VOKURKA, M., HUGO, J., KOLEKTIV. *Velký lékařský slovník*. Praha: Maxdorf, 2002. ISBN: 80-85912-43-0.
- [32] *Reklamní vzorek Silver Plus - návod k použití*
- [33] RUDOLF GROUP. *RUCO-BAG AGP - návod k použití*
- [34] *FastDNA SPIN kit for Soil* [online] - návod k použití.
Dostupný z [https:// www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/GEN/6560-200.pdf](https://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/GEN/6560-200.pdf)
- [35] STRACHAN, T., READ, A. P., *Human molecular genetics*.
ISBN 0-8153-4184-9

Seznam obrázků

1	Průřez pětialočného vlákna Moira	18
2	Dlouhý dres od společnosti Vermarc	21
3	Dres od společnosti Rapha s technologií Coldblack.....	22
4	Rozmnožování jednobuněčných organismů	29
5	Popisné schéma přístroje Morapex	32
6	Desítkového ředění u metody KTJ.....	34
7	Qubit na test DNA pomocí fluorescenčního signálu	36
8	Termocykler LightCycler 480 pro PCR reakci	38
9	Jednotlivé kroky v PCR reakci.....	39
10	Zástupce klasického dresu od společnosti Sýkora sportswear.....	43
11	Dres Silver + AID od společnosti Sýkora sportswear	45
12	Petriho misky s aplikovaným extraktem připravené k inkubaci	46
13	Porovnání počtu kolonií na dresu Silver + AID a klasickém dresu ve stejném řádu ředění.....	50
14	Výsledky real-time PCR	51
15	Grafické rozvržení testovacího cyklu	54
16	Demonstrace testovací jízdy na válcích	56
17	Elektronový rastrovací mikroskop Carl Zeiss Ultra Plus.....	65
18	Pletenina klasického dresu s úpravou Silver Plus.....	66
19	Pletenina dresu Silver + AID	67
20	Pletenina klasického dresu s úpravou RUCO-BAG AGP	67
21	Aplikovaný Staphylococcus aureus na agarových deskách	70
22	Stěry pod testovanými textiliemi	71
23	Výsledky real-time PCR analýzy u jednotlivých subjektů	75

Seznam grafů

1	Hodnoty KTJ/ml pro klasický dres	47
2	Hodnoty KTJ/ml pro dres s úpravou Silver + AID	48
3	Porovnání klasického dresu a dresu s úpravou Silver + AID	49
4	Výsledky KTJ u subjektu č. 1	59
5	Výsledky KTJ u subjektu č. 2	61
6	Výsledky KTJ u subjektu č. 3	62
7	Výsledky KTJ u opakovaného testu subjektu č. 1	64
8	Srovnání klasického dresu mezi subjekty	76
9	Srovnání dresu s úpravou Silver Plus mezi subjekty	77
10	Srovnání dresu Silver + AID mezi subjekty	78

Seznam tabulek

1	Hodnoty z KTJ u dresu s úpravou Silver + AID.....	49
2	Hodnoty z KTJ u klasického dresu	50
3	Hodnoty z KTJ u prvního subjektu	58
4	Hodnoty z KTJ u druhého subjektu	60
5	Hodnoty z KTJ u třetího subjektu	62
6	Hodnoty z KTJ u opakovaného subjektu	63
7	Koncentrace stříbra na jednotlivých testovaných vzorcích.....	73
8	Koncentrace DNA u jednotlivých subjektů	74
9	Četnosti odpovědí dle pohlaví.....	80
10	První část otázek dotazníku.....	81
11	Druhá část otázek dotazníku	82