



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI  
Fakulta mechatroniky, informatiky  
a mezioborových studií ■

# Porovnání sterilizačních metod nanovláknenných nosičů biomasy

## Bakalářská práce

*Studijní program:* B3942 – Nanotechnologie  
*Studijní obor:* 3942R002 – Nanomateriály  
*Autor práce:* **Barbora Pešková**  
*Vedoucí práce:* Mgr. Ing. Lukáš Dvořák, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC  
Faculty of Mechatronics, Informatics  
and Interdisciplinary Studies ■

# Comparison of sterilization methods of nanofiber biomass carriers

## Bachelor thesis

*Study programme:* B3942 – Nanotechnology

*Study branch:* 3942R002 – Nanomaterials

*Author:* **Barbora Pešková**

*Supervisor:* Mgr. Ing. Lukáš Dvořák, Ph.D.



Zadání bakalářské práce

## **Porovnání sterilizačních metod nanovláknenných nosičů biomasy**

*Jméno a příjmení:* **Barbora Pešková**  
*Osobní číslo:* M16000117  
*Studijní program:* B3942 Nanotechnologie  
*Studijní obor:* Nanomateriály  
*Zadávací katedra:* Ústav nových technologií a aplikované informatiky  
*Akademický rok:* **2018/2019**

### **Zásady pro vypracování:**

1. Nastudovat problematiku zaměřenou na metody a možnosti sterilizace.
2. Zpracovat literární rešerši týkající se možností sterilizace a jejich hodnocení.
3. Připravit nanovláknenné nosiče biomasy pro účely laboratorních sterilizačních testů.
4. Realizovat vybrané způsoby sterilizace nanovláknenných nosičů.
5. Posoudit vliv jednotlivých sterilizačních metod na strukturu nanovláknenné vrstvy.
6. Vyhodnotit účinnost jednotlivých sterilizačních metod, interpretovat výsledky a vyvodit závěry.

*Rozsah grafických prací:* dle potřeby  
*Rozsah pracovní zprávy:* 30 – 40 stran  
*Forma zpracování práce:* tištěná/elektronická



### **Seznam odborné literatury:**

- [1] ALBERTS, B. Molecular Biology of the Cell, 6th Ed. PB, Taylor and Francis, New York US, 2014, ISBN: 978-0815344322.
- [2] BERTRAND, J.C., CAUMETTE, P., LEBARON, P., MATHERON, R., NORMAND, P., SIME-NGANDO, T. Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications Microbial Ecology. Springer, 2015, ISBN: 978-94-017-9118-2.
- [3] TREVORS, J.T. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. Journal of Microbiological Methods, 26 (1996), 53-59.
- [4] VETTEN, M.A., YAH, C.S., SINGH, T., GULUMIAN, M. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 10 (2014), 1391-1399.
- [5] NANDA, S. Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials – Chapter 3: Nanoparticle Sterility and Sterilization of Nanomaterials, Frontiers in Nanobiomedical Research, 2016, ISBN: 978-981-3140-43-1.

*Vedoucí práce:* Mgr. Ing. Lukáš Dvořák, Ph.D.  
Ústav nových technologií a aplikované informatiky

*Konzultant práce:* Ing. Magda Nechanická  
Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace

*Datum zadání práce:* 18. října 2018

*Předpokládaný termín odevzdání:* 30. dubna 2019

L. S.

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.  
děkan

Ing. Josef Novák, Ph.D.  
vedoucí ústavu

V Liberci 18. října 2018

## Prohlášení

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

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

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

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

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

23. 4. 2019

Barbora Pešková

## Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu Mgr. Ing. Lukášovi Dvořákovi, Ph.D., který mě uvedl do problematiky sterilizačních metod, poskytl mi podrobné konzultační hodiny a především mi pomohl ve zpracování celé práce.

Velké poděkování patří také mé konzultantce Ing. Magdě Nechanické, která mě po celou dobu provázela laboratořemi a pomáhala mi při porozumění problematiky.

## Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá vzájemným porovnáním vybraných sterilizačních metod, které byly aplikovány na připravené nanovláknenné nosiče. Cílem práce je porovnat jak účinnost jednotlivých sterilizačních metod, tak určit jejich případný vliv na strukturu nanovláknenné vrstvy. Nosiče byly připraveny pokrytím nosné nitě vrstvou z polyuretanových nanovláken, které byly vyrobeny prostřednictvím electrospinningu stejnosměrným a střídavým proudem.

Nanovláknenné nosiče byly následně sterilizovány vybranými fyzikálními a chemickými sterilizačními metodami. Prostřednictvím optického a elektronového mikroskopu byly pořízeny snímky nosičů před a po aplikaci vybraných metod sterilizace. Na těchto snímcích byly vzájemným porovnáním detekovány vlivy na strukturu nanovláknenné vrstvy.

Vysterilizované nanovláknenné nosiče byly dále analyzovány kultivačními mikrobiologickými a molekulárně genetickými metodami. Analýza byla provedena za účelem detekce přítomnosti kultivovatelných i nekultivovatelných mikroorganismů, čímž byla stanovena účinnost jednotlivých sterilizačních metod.

## Klíčová slova

Sterilizace; nanovláknena; nosiče biomasy; kultivační mikrobiologické metody; molekulárně genetické metody; elektronový mikroskop.

## Abstract

The bachelor thesis deals with the comparison of selected sterilization methods, which were used for sterilization of nanofiber carriers. The main goal of the thesis is to compare the effectiveness of individual sterilization methods and to determine their possible influence on the structure of the nanofibrous layer. The carriers were prepared by covering the supporting thread with polyurethane nanofibrous layer made by direct and alternating current electrospinning.

Nanofibrous carriers were subsequently sterilized by selected physical and chemical sterilization methods. By means of optical and electron microscopy, images of carriers were taken before and after application of selected sterilization methods. In these pictures, the effects on the structure of the nanofibrous layer were distinguished by mutual comparison.

The sterilized nanofiber carriers were further analyzed by cultivation microbiological and molecular genetic methods. The analysis was performed to detect the presence of cultivable and uncultivable microorganisms thus efficiency of sterilization methods was determined.

## Key words

Sterilization; nanofibers; biomass carriers; cultivation microbiological methods; molecular genetic methods; electron microscope.



# Obsah

1. Úvod.....	14
2. Teoretická část.....	15
2.1 Definice sterility a sterilizace.....	15
2.2 Historie sterilizace.....	16
2.3 Význam sterilizace.....	18
2.3.1 Využití ve zdravotnictví.....	18
2.3.2 Využití v potravinářství.....	18
2.3.3 Ostatní využití.....	19
2.4 Metody sterilizace.....	19
2.4.1 Fyzikální metody.....	19
2.4.2 Chemické metody.....	21
2.5 Metody hodnocení sterilizace.....	24
2.5.1 Kultivační mikrobiologické metody.....	24
2.5.2 Metody molekulární genetiky.....	25
3. Experimentální část.....	30
3.1 Příprava nosičů.....	30
3.2 Metody sterilizace nosičů.....	31
3.2.1 Fyzikální metody.....	31
3.2.2 Chemické metody.....	32
3.3 Molekulární genetické metody.....	33
3.3.1 Izolace DNA.....	33
3.3.2 Měření koncentrace DNA.....	35
3.3.3 Real-time PCR.....	35
3.4 Kultivační mikrobiologické metody.....	37
3.5 Charakterizace nanovláken.....	38
4. Výsledky a diskuze.....	39

4.1 Vliv na strukturu nanovlákněné vrstvy .....	39
4.1.1 Nosiče sterilizované fyzikálními metodami .....	39
4.1.2 Nosiče sterilizované chemickými metodami.....	44
4.2 Výsledky kultivačních mikrobiologických metod .....	49
4.3 Výsledky molekulárně genetických analýz.....	51
5. Závěr.....	57
Seznam literatury.....	58

## Seznam obrázků

<b>Obr. 1:</b> Znázornění D-hodnoty a vztahu logaritmu k počtu žijících bakterií (Baume et al., 2016).....	16
<b>Obr. 2:</b> Schéma cyklů amplifikace DNA. Převzato z (Thermo Fisher, 2019). .....	27
<b>Obr. 3:</b> Schéma prvního kroku amplifikace. Převzato z (Mendelova univerzita v Brně, 2019). .....	28
<b>Obr. 4:</b> Proces navázání fluorescenčního barviva (LabGuide.cz, 2014).....	29
<b>Obr. 5:</b> Fotografie DC nosiče (vlevo) a AC nosiče (vpravo). .....	30
<b>Obr. 6:</b> Schéma hlavního postupu izolace DNA .....	33
<b>Obr. 7:</b> Snímky DC nosičů z optického mikroskopu, které prošly sterilizací fyzikálními metodami .....	41
<b>Obr. 8:</b> Snímky DC nosičů z elektronového mikroskopu (SEM), které prošly sterilizací fyzikálními metodami .....	42
<b>Obr. 9:</b> Snímky AC nosičů z optického mikroskopu, které prošly sterilizací fyzikálními metodami.....	43
<b>Obr. 10:</b> Snímky AC nosičů z elektronového mikroskopu (SEM), které prošly sterilizací fyzikálními metodami .....	44
<b>Obr. 11:</b> Snímky DC nosičů z optického mikroskopu, které prošly sterilizací chemickými metodami.....	46
<b>Obr. 12:</b> Snímky DC nosičů z elektronového mikroskopu (SEM), které prošly sterilizací chemickými metodami .....	47
<b>Obr. 13:</b> Snímky AC nosičů z optického mikroskopu, které prošly sterilizací chemickými metodami.....	48
<b>Obr. 14:</b> Snímky AC nosičů z elektronového mikroskopu (SEM), které prošly sterilizací chemickými metodami .....	49
<b>Obr. 15:</b> Ct hodnoty primeru U16SRT na DC nosičích u jednotlivých sterilizačních metod s výsledky negativní kontroly .....	53
<b>Obr. 16:</b> Ct hodnoty primeru U16SRT na AC nosičích u jednotlivých sterilizačních metod s výsledky negativní kontroly .....	54
<b>Obr. 17:</b> Porovnání Ct hodnot primeru U16SRT DC a AC nosičů u jednotlivých sterilizačních metod.....	55
<b>Obr. 18:</b> Relativní kvantifikace DC a AC nosičů u jednotlivých metod v porovnání s původními nosiči.....	56

## Seznam tabulek

<b>Tab. 1:</b> Program qPCR analýzy .....	37
<b>Tab. 2:</b> Počty heterotrofních kultivovatelných mikroorganismů (KTJ/ml) pro jednotlivé sterilizační metody a typy nanovlákných nosičů .....	51
<b>Tab. 3:</b> Přehled Ct hodnot a koncentrací DNA zjištěných na abou typech nanovlákných nosičů po jejich expozici jednotlivým sterilizačním metodám .....	52

## Seznam zkratek

SAL	sterility assurance level (úroveň zajištění sterility)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
UV	ultraviolet (ultrafialový)
KTJ	kolonie tvořící jednotku
SDS	dodecylsulfát sodný
PEG	polyetylen glykol
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
Ct	Crossing point
DC	stejnoseměrný proud
AC	střídavý proud
PCA	Plate Count Agar
SEM	Rastrovací elektronový mikroskop

# 1. Úvod

Procesu sterilizace je v dnešní době věnována značná pozornost, jelikož absence mikrobiálního znečištění je velmi zásadní pro nespočet oborů a oblastí lidské činnosti. Sterilizací lze dosáhnout takového prostředí, ve kterém nejsou přítomny žádné mikroorganismy. Sterilizace je proto využívána především v medicíně a potravinářství. V medicíně je nejvíce uplatňována sterilizace chirurgických nástrojů, nejrůznějších povrchů či nemocničního oblečení. Pro potravinářský průmysl je typická sterilizace vody, povrchů, strojů a nástrojů, které jsou v kontaktu s potravinami, ale je nezbytná také při balení potravin nejen v ochranné atmosféře. Již po uvedení těchto příkladů se dá s jistotou poznamenat, že bez efektivní sterilizace by nemohla být provedena např. operace pacienta bez významně vysokého rizika infekce a trvanlivost potravin by byla několikanásobně nižší.

Nanotechnologie mají čím dál více praktických aplikací. Hrají čím dál důležitější roli v odvětvích, kde je nutná sterilizace. Vyvíjejí se zde stále nové metody a jejich kombinace pro širší a efektivnější využití v těchto oblastech. Již velmi rozšířené je čištění a dezinfekce vody pomocí nanomateriálů za účelem zvýšení efektivity a také snížení časové náročnosti. To později hraje zásadní roli například v potravinářském průmyslu při zpracování potravin. Pro antimikrobiální účinky je používáno nanostříbro, které je často aplikováno na oblečení nebo do různých kosmetických přípravků. Biotechnologie poskytuje opravdu široké spektrum pro využití nanotechnologií. Je tomu například u čištění půdy, které spolu s čištěním vody bude mít do budoucna velký dopad na životní prostředí.

Cílem bakalářské práce je proto porovnání vybraných sterilizačních metod za účelem dosáhnout sterilního nanovláknenného nosiče biomasy, který bude kromě sterility povrchu vykazovat minimální nebo nejlépe žádné strukturální deformace nanovláknenného nánosu.

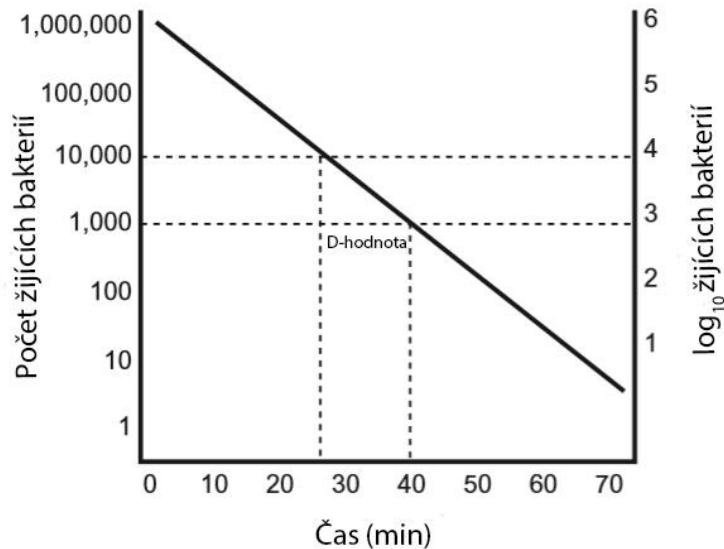
## 2. Teoretická část

### 2.1 Definice sterility a sterilizace

Sterilita může být definována mnoha způsoby. Nejjednodušeji jako nepřítomnost všech životaschopných mikroorganismů. Pokud je tato definice splněna, lze daný objekt/povrch považovat za sterilní. Sterilita je v pravém slova smyslu absolutní termín. Buď je něco sterilní, nebo nesterilní. Neexistují proto pojmy jako například "lehce sterilní" nebo "téměř sterilní" (Sandle, 2013).

Sterilizace je destrukce jakéhokoliv viru, bakterie, houby nebo jiného mikroorganismu, buď ve vegetativním, nebo v nečinném stavu spor a je definována redukcí v rozsahu  $10^{-6}$  úrovně mikroorganismů (TS03 Inc., 2013). Pomocí fyzikální, chemické nebo pokročilé metody je sterilizace používána ke zničení veškerého mikrobiálního života, včetně vysoce rezistentních bakteriálních endospor. Destrukce bakteriálních spor znamená, že sterilizace je proces kompletně zamezující života a reprodukce životaschopných mikroorganismů, na rozdíl od dezinfekce, která je používána pouze pro redukci mikrobiální populace například její inaktivací (Sandle, 2013).

Kvantitativní posouzení sterility může být zajištěno pomocí tzv. SAL (*sterility assurance level*), což je termín používaný k popisu pravděpodobnosti výskytu nesterilní jednotky poté, co byla podrobena sterilizačnímu procesu. Druhým důležitým bodem je, že SAL není přesně definicí zajištění "sterility"; spíše je to pravděpodobnost "nesterility". Termín SAL se používá k popisu pravděpodobnosti, že daný proces či metoda sterilizace nedokázal sterilizovat všechny přítomné mikroorganismy. To je důvod, proč je pojem definován jako pravděpodobnost, že ošetřený předmět zůstane kontaminován jedním nebo více životaschopnými mikroorganismy a nikoliv, jak je někdy uváděn chybně, pravděpodobnost úspěšné sterilizace (Sandle, 2013). Metody sterilizace snižují počet mikroorganismů logaritmičtě. Hodnota D je čas potřebný ke snížení počtu mikroorganismů o 1 log (snížení o 90 %). SAL je ovlivňován počátečním počtem mikroorganismů, jejich odolností a především účinností sterilizačního procesu. Aby byl předmět považován za sterilní, musí být hodnota SAL menší než  $10^{-6}$  (Baume et al., 2016).



**Obr. 1:** Znázornění D-hodnoty a vztahu logaritmu k počtu žijících bakterií (Baume et al., 2016)

## 2.2 Historie sterilizace

V současné době známe mnoho způsobů sterilizačních procesů, které se stále vyvíjí. Přibývá také nespočet využití pro medicínu, potravinářství, průmysl a další odvětví. Způsoby sterilizace mají však svou bohatou historii. Nejznámější je asi sterilizace vlhkým teplem (sterilizace sytou vodní párou). Nasycená pára vzniká zvyšováním teploty vroucí vody v uzavřeném prostoru. Původně má pára a parní přístroje počátek v obyčejné kuchyni. Nejjednodušším autoklávem je vlastně známý Papinův hrnec. Ten umožňuje vytvořit vyšší tlak a voda se tak vaří při vyšší teplotě než v běžném hrnci. Zpočátku se Papinův hrnec používal v laboratořích, později i v průmyslu (Podstatová, 2005). Papinův hrnec však není jediný historický sterilizační přístroj. Další nesou jména také po svých vynálezcích. Jedná se například o Kochův parní sterilizátor a Arnoldův autokláv.

Dalším vynálezcem je Robert Koch. Zkoumal dříve hlavní zdravotní problém - anthrax, který zabil stovky lidí a desetitisíce hospodářských zvířat. Jako první použil kondenzátor a první publikoval fotografie bakterií. Jeho nejslavnějším objevem je bakterie způsobující tuberkulózu, pojmenovaná po něm Kochův bacil. Objevil také bakterii, která vyvolává cholera asijskou (Blevins a Bronze, 2010). Jelikož často pobýval v rizikových zemích jako je Afrika a Indie, došel k dalším významným objevům u lepry, spavé nemoci a malárie. Význam Kochova hrnce je zejména v mikrobiologické laboratoři,



protože umožňuje i v současné době některé pracovní postupy. Umožňuje sterilizaci v proudící páře o teplotě až 100 °C. Můžeme říci, že významné rozdíly v účinku suchého a vlhkého tepla jsou známé již od dob Roberta Kocha. Na podobném principu funguje Arnoldův přístroj (Podstatová, 2005).

Historie sterilizace a sterilizačních přístrojů je úzce spojená s městem Brnem. Jedná se o poválečné období a především o 60. až 80. léta minulého století. Malé firmy vyrábějící zdravotnické a laboratorní přístroje se postupně spojovaly a specializovaly zejména na oblast výroby parních a horkovzdušných sterilizátorů a rentgenových přístrojů. Jejich spojením v roce 1952 vznikl podnik Chirana Brno, s. p., který v různých podobách rozvinul výrobu sterilizátorů a rentgenů na mezinárodní úroveň. Později firma dostala jméno BMT Medical Technology, s. r. o., které nese dodnes (BMT Medical Technology s.r.o., 2019).

V 70. a 80. letech nastaly změny v metodách sterilizace. Vše se vyvíjelo a byly stále vyšší nároky na efektivitu. Vodní vařiče přestaly být základním vybavením laboratoří. Protože účinek vařící vody nebo proudící páry za normálního atmosférického tlaku nelze považovat za sterilizující. Byla to vlastně jen pouhá dezinfekce varem. Vařiče byly proto vyřazeny a nahrazeny parním nebo horkovzdušným sterilizátorem. Na operačních sálech se pro sterilizaci používaly tlakové vařiče.

Výjimku získal již zmiňovaný Arnoldův a Kochův přístroj vhodně upravený na beztlakovou páru, používaný za standardních podmínek pouze v mikrobiologických laboratořích. Sterilizace párou a horkým vzduchem nebyly zdaleka jediné metody. V zubních laboratořích se provozovala sterilizace v oleji. Byla to velmi pracná metoda, časově náročná a později, stejně jako vodní vařiče, byla označena jako nepřípustná. Používala se pro sterilizaci násadců a kolének. Po zrušení olejové sterilizace bylo nutné najít jiné řešení. Československé autoklávy i horkovzdušné sterilizátory dosahovaly již tehdy světové úrovně.

Později přichází nová metoda, plasmová sterilizace a s ní prototyp plasmového sterilizátoru. Předpokládalo se, že krátká expoziční doba předurčuje tuto metodu sterilizace k širšímu využití ve zdravotnictví. Metoda je právem označována jako sterilizace 21. století. Princip metody spočívá ve vytvoření vakua v komoře sterilizátoru, vstříknutí roztoku peroxidu vodíku, který je poté odpařen. Molekuly peroxidu procházejí plazmou a štěpí se na volné radikály, které se slučují a reagují s molekulami živé hmoty (DNA, RNA, enzymy, bílkoviny...). Po sterilizačním procesu nezůstávají žádné volné radikály. Plasmová sterilizace je využívána řadou nemocnic, včetně vojenské nemocnice v Praze.

## 2.3 Význam sterilizace

Sterilizace je naprosto zásadní v celé řadě odvětví a oblastí. Mezi ty nejzásadnější odvětví patří zdravotnictví a potravinářství.

### 2.3.1 Využití ve zdravotnictví

Sterilizace zastupuje velkou část ve zdravotnictví. Ke sterilizaci zdravotnických prostředků mohou být používány pouze sterilizační přístroje za podmínek stanovených pro zdravotnické prostředky. Sterilizace je prováděna fyzikálními nebo chemickými metodami nebo jejich kombinací. Fyzikální sterilizace je prováděna vlhkým teplem, proudícím horkým vzduchem, plazmatem, UV zářením popřípadě radiací. Sterilizace vlhkým teplem (sytou vodní parou) v parních přístrojích je vhodná pro zdravotnické prostředky z kovu, skla, porcelánu, keramiky, textilu, gumy a plastů. Sterilizace cirkulujícím (proudícím) horkým vzduchem je určena pro zdravotnické prostředky z kovu, skla, porcelánu, keramiky a kameniny (Zákon č. 306/2012 Sb. 2012). Horkovzdušnou sterilizaci je také možné použít pro účely sterilizace léků především mastí a prášků. Další metoda sterilizace využívaná ve zdravotnictví je radiační, která využívá radioaktivní kobalt  $^{60}\text{Co}$ . Metoda je používána ke sterilizaci nových (případně expirovaných) předmětů z plastické hmoty, které působením ozáření nezmění svůj vzhled ani vlastnosti. Dále pro textilie, buničinu, šicí materiál, farmaceutické výrobky, radiovaccíny a radioantigeny. Sterilizace UV zářením je používána ke sterilizaci vzduchu, pracovních ploch a prostor zejména operačních sálů, piteven, odběrových místností. Jak již bylo zmíněno výše, ve zdravotnictví jsou aplikovány také chemické metody. Je to především sterilizace formaldehydem, která je používána u nástrojů a pomůcek, které nesnesou vysokou teplotu. Dále je používána sterilizace ethylenoxidem, která je aplikována na kovové kloubní náhrady (Mašková, 2015).

### 2.3.2 Využití v potravinářství

Své důležité zastoupení má sterilizace i v potravinářství. A to především v potravinářských obalech. Lehce sterilizovatelné jsou obaly skleněné, které mají vysokou chemickou odolnost, dobrou omyvatelnost a průhlednost (Štencl, 2013).

Ozon má po fluoru nejsilnější oxidační účinek. Tato vlastnost byla použita při sterilizaci pro potravinářské a zpracovatelské závody. Není zde nebezpečí zůstatku toxických zbytků, jako u sterilizačních metod na bázi chlóru. Na základě těchto výhod

se ozon používá při úpravě vody a ovzduší pro potravinářské výrobky. Používání ozonizované vody se rychle rozšiřuje v potravinářském průmyslu, zejména při dezinfekci potravinových povrchů, zařízení na zpracování potravin, přístrojů a nástrojů. Ozonizace vody zvyšuje trvanlivost potravin, které jsou jí ošetřeny. To samé zajišťuje balení potravin v ozonové ochranné atmosféře. Ozon je účinný jako sterilizační prostředek v potravinářském průmyslu pro zeleninu, ovoce, ryby a zpracování mořských produktů, obiloviny, cukrářské výrobky, maso a masné výrobky. Je důležité, aby se koncentrace ozonu lišila v závislosti na ošetřovaných materiálech, mikroorganismech a podmínkách prostředí (Naito a Takahara, 2006).

### **2.3.3 Ostatní využití**

Sterilizace je také vyžadována a tudíž hojně využívána v kosmickém průmyslu zejména při přípravě kosmických sond a celé další řady nejrůznějších materiálů, aby nedošlo ke kontaminaci vesmírného prostoru. Podobně je na tom automobilový průmysl, kde je často sterilní prostředí také nutné pro výrobu jednotlivých komponent, například brzd. Další využití spočívá ve sterilizaci polymerů, například termoplastů pro elektrotechniku a ve sterilizaci textilu. U textilu to je především sterilizace patientského, ložního a operačního prádla používaného v nemocnicích.

## **2.4 Metody sterilizace**

Metody sterilizace jsou základně děleny na fyzikální a chemické. Existuje celá řada sterilizačních metod a jejich vzájemných kombinací, které jsou dnes v praxi využívány. Mezi ty nejznámější fyzikální metody patří například sterilizace párou, UV zářením, plazmou, ultrazvukem, mikrovlnným zářením a radiací. Nejpoužívanější chemické metody zahrnují například sterilizaci etanolem, oxidem chloričitým, peroxidem vodíku, ethylenoxidem, ozonem, kyselinou peroctovou či formaldehydem.

### **2.4.1 Fyzikální metody**

#### ***a) Parní sterilizace***

Provádí se nasycenou vodní párou pod tlakem 170 – 300 kPa a rozmezí teploty 115 - 134 °C. Se zvyšující se teplotou tlak páry nad kapalinou roste. Doba sterilizace

je určena charakterem použití od 4 do 60 minut. Vyhláškou č. 306/2012 Sb. je dáno, že sterilizace při teplotě 121 °C (205 kPa) musí trvat nejméně 20 minut a při 134 °C (304 kPa) 10 minut. Pro nebalené kovové nástroje k okamžitému použití lze aplikovat zkrácený sterilizační program o teplotě 134 °C po dobu 4 minut. Celková expozice trvá přibližně hodinu. Výhodou sterilizace párou je dobrá schopnost pronikat do porézních materiálů. Sterilizační médium je nekarcinogenní a netoxické. Nasycená pára může vyvolat korozi kovových materiálů. Další nevýhodou je vysoká pořizovací cena sterilizátoru, avšak náklady na jednotlivé sterilizační cykly jsou velmi nízké (Mašková, 2015). Touto metodou lze sterilizovat i prášky, měkký parafin a glycerin. Je nevhodná pro plasty a látkové výrobky (SiLiNdiR a Özer, 2009).

### ***b) UV záření***

UV záření je elektromagnetické záření o vlnové délce kratší než viditelné světlo. Jeho zdrojem v přírodě je záření Slunce. UV záření lze generovat i uměle. Podle vlnové délky, účinku a výskytu rozeznáváme UVA, UVB a UVC záření. UVA záření má vlnovou délku 400 až 320 nm. Setkáváme se s ním zejména u terapeutických zářičů (např. léčba lupénky) a v soláriích. Hlavní negativní účinek je zrychlení procesu stárnutí kůže. UVB záření má vlnovou délku 320 až 280 nm. Způsobuje pozdní zhnědnutí kůže a působí přímo na DNA buněk. Paprsky s vlnovou délkou kratší než 300 nm mají baktericidní účinky a jsou užívány v germicidních zářičích (maximální baktericidní účinky byly zjištěny při vlnové délce 250 až 270 nm). Tyto zářiče jsou však pouze doplňkovou dezinfekční metodou.

Primárně je tato metoda využívána ke sterilizaci pracovních ploch a prostorů. Výhodou jsou nízké pořizovací a provozní náklady, spolehlivost a jednoduchost použití. UV záření lze aplikovat pouze na fotostabilní materiály. Germicidní lampy jsou využívány například v potravinářství, lázeňství, laboratořích a zdravotnictví (Mašková, 2015).

### ***c) Plazmová sterilizace***

Využívá plazmy vznikající ve vysokofrekvenčním elektromagnetickém poli, které ve vysokém vakuu působí na páry peroxidu vodíku nebo jiné chemické látky. Sterilizační parametry a podmínky sterilizace, jakož i druhy materiálu, který se tímto způsobem sterilizuje, jsou dány typem přístroje. Sterilizace plazmou není používána ke sterilizaci porézního a savého materiálu a materiálu vyrobeného na bázi celulózy. Sterilizace plazmou je ideální pro sterilizaci biomedicínských zařízení. Je méně toxická než při použití ethylenoxidu. Další podstatnou výhodou je krátká doba trvání sterilizační procedury (Bruchanov, 2005).

#### ***d) Ultrazvuk***

Principem této techniky je rozrušení buněk pomocí vysokofrekvenčního ultrazvuku. Akusticko-mechanické kmity pronikají do buněk, které začnou rezonovat, a tím se naruší integrita buněčné stěny. Vlivem ultrazvuku dochází k chemickým změnám ve struktuře buňky (Mašková, 2015).

#### ***e) Mikrovlnné záření***

Elektromagnetické záření reaguje s dipóly vody, které kmitají stejnou frekvencí jako mikrovlny. Tím dochází k rezonanci molekul, zvyšuje se jejich kinetická energie a tedy i teplota. Cytoplasma bakterií obsahuje 65 – 90 % vody. Mikrovlny pronikají přes buněčnou stěnu do buňky, kde dojde k reakci s molekulami vody a tepelnému ohřevu. Buňka vlivem vysoké teploty ztratí integritu a rozpadne se. Mikrovlnné záření nelze aplikovat na kovové předměty, jelikož kovy toto záření odrážejí (Mašková, 2015). Volné elektrony na povrchu se mohou rozkmitat a vzniká tak elektrický výboj.

#### ***f) Radiace***

U radiační sterilizace je používáno především gama záření. Jako zdroj gama záření se používá  $^{60}\text{Co}$ . Mechanismem účinku gama záření je ionizace vnitrobuněčné vody a vznik hydroxylových radikálů, které reakcí s důležitými molekulami poškozují buňku. Záření je používáno pro málo kontaminované předměty, které mohou být díky pronikavosti záření již zabalené. Ideální je proto pro ošetření právě vyrobených zdravotních pomůcek na jedno použití, antibiotik a jiných preparátů biologického původu. Tato metoda nesmí být použita v případě, že došlo ke kontaminaci virem HIV (Dvořáková, 2012).

### **2.4.2 Chemické metody**

#### ***a) Etanol***

Etanol je čirá, bezbarvá, těkavá kapalina s charakteristickým zápachem a chutí. Je zařazován mezi alkoholy. Jeho teplota tání je přibližně  $-114\text{ }^{\circ}\text{C}$  a teplota varu  $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Má baktericidní aktivitu a často je používán jako lokální desinfekční prostředek, jako rozpouštědlo a konzervační prostředek ve farmaceutických přípravcích.

Jak již bylo výše zmíněno, etanol se používá především pro desinfekci. Ale ve sterilizaci má také své využití, například u eloxovaných povrchů. Eloxování je postup zvyšování přirozené vrstvy oxidu, vytvořené na povrchu hliníku, když přijde do kontaktu

s kyslíkem. Po sterilizaci etanolem mají eloxované povrchy mnohem vyšší povrchovou energii než leštěný povrch (Zhao et al., 2010).

### ***b) Oxid chloričitý***

Oxid chloričitý je známý jako velmi účinné oxidační činidlo. Je to žlutý až načervenalý plyn s nepříjemným chlorovým zápachem. Při vdechování je toxický. Pro sterilizaci je mimo jiné využíván, protože jeho aplikací nevznikají žádné vedlejší potenciálně karcinogenní produkty. Navíc na účinek oxidu chloričitého si bakterie nemohou vytvořit resistenci, jelikož působí přímo na energetické centrum buňky - mitochondrie. Nejčastěji je používán v plynném skupenství, ale mnohdy také jako saturovaný vodný roztok.

Mimo sterilizaci povrchů je často používán při dezinfekci vody. Připravuje se přímo na úpravných vody např. reakcí chloritanu sodného s chlorem (chlornanem sodným) nebo kyselinou chlorovodíkovou. Vzniklý koncentrovaný roztok oxidu chloričitého je pak dávkován do pitné vody. Při vyšších hodnotách pH pitné vody se oxid chloričitý může přeměnit na chloritan, jehož koncentrace je v pitné vodě limitována (Janda et al., 2004). Mimo to je používán také na bělení.

### ***c) Peroxid vodíku***

Peroxid vodíku je anorganický peroxid skládající se ze dvou hydroxylových skupin spojených kovalentní jednoduchou vazbou. Je poměrně nestabilní a v roztoku se časem rozkládá, pokud nejsou stabilizovány např. přídavkem acetanilidu. Má úlohu oxidačního činidla, dezinfekčního prostředku, výbušniny, antimikrobiálního činidla, neurotoxinu, bělidla nebo také biomarkeru.

Peroxid vodíku není nebezpečný pro životní prostředí. Sterilizace s využitím peroxidu vodíku může být dosažena v časovém intervalu 28 až 74 minut. Při procesu není třeba větrání. Je vhodný pro sterilizaci materiálů citlivých na teplotu. Není vhodný pro sterilizaci kapalin (SiLiNdiR a Özer, 2009).

### ***d) Etylenoxid***

Je to bezbarvý jedovatý (karcinogenní) a hořlavý plyn. Etylenoxid je baktericidní, fungicidní<sup>1</sup> a sporicidní<sup>2</sup> dezinfekční prostředek. Je účinný proti většině mikroorganismů, včetně virů. Používá se jako fumigant<sup>3</sup> pro potraviny a textil a jako prostředek pro plynnou sterilizaci farmaceutických a chirurgických materiálů.

---

<sup>1</sup> Zneškodnění houbových organizmů

<sup>2</sup> Zneškodnění spor bakterií

<sup>3</sup> Těkavý pesticidní přípravek užívaný v plynném stavu k ničení chorob a škůdců

Pro sterilizaci se používají páry ethylenoxidu o teplotě 37 - 55 °C při tlaku vyšším než 20 kPa. Protože páry se vzduchem vybuchují, používá se někdy směs s inertním plynem (CO<sub>2</sub>). Tento postup je bezpečnější, ale dražší. Po ukončení cyklu je nutné sterilovaný materiál důkladně odvětrat, což může trvat i několik dní. Po odvětrání nezůstávají žádná rezidua. Díky tomu, že ethylenoxid proniká většinou umělých hmot, je možné sterilovat již zabalené předměty (Dvořáková, 2012).

Je vhodnější pro sterilizaci materiálů, které jsou citlivé na teplo. Nevýhodou je dlouhá doba sterilizace a nutnost kvalitní ventilace, jelikož v průběhu procesu vzniká etylenchlorhydrin, který je toxický (SiLiNdiR a Özer, 2009). Rovněž je vyžadováno kvalitní provzdušnění vysterilizovaného materiálu, aby se odstranily zbytky etylenchlorhydrinu.

#### ***e) Ozon***

Ozon je přírodní plyn a přirozeně se vyskytuje ve stratosféře ve výšce 25 – 35 km. Někdy je nazýván jako aktivní kyslík. Vzniká při interakci kyslíku s UV zářením. Ozon má velmi silné oxidační schopnosti a silný dezinfekční účinek, proto je využíván např. při úpravě vody, čištění vzduchu a zpracování potravin.

Ozon uvolňuje během rozpadu atomární kyslík, což je silné oxidační činidlo, které poté reaguje např. s thiolovými skupinami proteinů, čímž změní prostorovou konformaci. Silně účinkuje na bakterie, spory i neobalené viry a velmi dobře proniká i do porézních materiálů. Účinkuje i za nízkých teplot (Dvořáková, 2012).

#### ***f) Kyselina peroctová***

Kyselina peroctová je bezbarvá kapalina se silným, štiplavým zápachem. Používá se jako baktericid a fungicid, zejména při zpracování potravin; jako činidlo při výrobě glycerolu; jako oxidační činidlo pro přípravu epoxidových sloučenin; jako bělicí činidlo; sterilizační činidlo; a jako polymerační katalyzátor pro polyesterové pryskyřice.

Mechanismus sterilizace je obdobný jako u ozonu. Také zde dochází k inhibici důležitých buněčných struktur oxidací. Pro sterilizaci se používají páry 3% roztoku kyseliny peroctové v uzavřeném prostoru, kde se poté rozloží na netoxický peroxid vodíku a kyselinu octovou (Dvořáková, 2012).

Jedná se o méně škodlivý proces než například sterilizace parou a je kompatibilní s celou řadou materiálů - plastů, pryže a předmětů citlivých na teplo. Jelikož se jedná se o proces jednorázového použití, není zde riziko kontaminace (SiLiNdiR a Özer, 2009).

### ***g) Formaldehyd***

Formaldehyd je vysoce reaktivní plyn s desinfekčními a konzervačními účinky, který má široké využití také při výrobě pryskyřic a textilií.

U této metody se využívá odpařování plynu formaldehydu z formalínu (40% vodný roztok formaldehydu). V první fázi se z komory odsaje vzduch. Poté se formaldehyd smísí s vodní párou při teplotě 60 – 80 °C, vlhkost v komoře stoupne na 75-100 %. Velmi reaktivní molekuly formaldehydu účinně poškozují buněčnou stěnu. Sterilizace probíhá v podtlaku (Mašková 2015). Po ukončení sterilizace musí dojít k důkladnému odvětrání zbytkového formaldehydu. (Dvořáková, 2012).

Je vhodnější pro materiály, které jsou citlivé na vysoké teploty. Protože je toxický a karcinogenní, nemůže být použit pro sterilizaci tekutin (SiLiNdiR a Özer, 2009).

## **2.5 Metody hodnocení sterilizace**

Pro vyhodnocení, zda je vzorek sterilní, jsou používány především kultivační mikrobiologické metody, které jsou založeny na růstu bakteriálních kolonií na daném živném médiu za definovaných podmínek. Mimo těchto metod jsou pro hodnocení sterility využívány metody molekulární genetiky zacílené na analýzu nukleových kyselin.

### **2.5.1 Kultivační mikrobiologické metody**

Při analýze přítomnosti nežádoucích bakterií jsou prováděny tzv. kultivační metody. Bakterie jsou kultivovány na tekutých nebo pevných živných půdách. Zatímco tekuté půdy jsou složeny ze směsi živin rozpuštěných ve vodě, pevné živné půdy jsou složeny z živin obohacujících agarový gel. Tekuté půdy jsou používány spíše k pomnožení bakterií pro účely další diagnostiky. Výhodou tekutých médií je snadný přístup vody a živin, mikroorganismy v nich snáze rostou. Nevýhodou je růst mikroorganismů projevující se zakalením, sedimentem nebo blankou. V tekutém médiu nelze určit, zda se jedná o čistou kulturu nebo směs více druhů, rodů. Na pevných půdách tvoří bakterie nejčastěji uchovávané v Petriho miskách nakupení biomasy tzv. kolonie. Výhodou kultivace na pevném médiu na Petriho misce je možnost pozorování izolovaných kolonií (klonů jedné buňky), tedy izolovaných kmenů. Předpokladem kultivace je, že jedna buňka se může na pevném médiu namnožit na kolonii buněk. Pro stanovení celkového počtu životaschopných buněk je používána jednotka KTJ, tedy kolonie tvořící jednotku.



## 2.5.2 Metody molekulární genetiky

Jelikož méně než 1% mikroorganismů přítomných v mnoha prostředích je snadno kultivovatelných (Amann et al., 1995), došlo k rozvoji molekulární genetiky umožňující identifikaci i nekultivovatelných mikroorganismů.

### *a) Izolace DNA*

Znalost mikrobiální rozmanitosti v přírodních ekosystémech je již dlouho omezena, protože pouze menšina přirozeně se vyskytujících mikrobů může být kultivována pomocí standardních technik. Nedávno bylo vyvinuto několik protokolů pro extrakci nukleových kyselin přímo z matrice. Protokoly zahrnují hlavní extrakční postupy, které se v současné době používají pro získání mikrobiální DNA ze vzorků. Způsoby izolace DNA mohou zahrnovat extrakci buněk nebo přímou lýzu v závislosti na tom, zda jsou mikrobiální buňky izolovány z matrice. Protokol extrakce obecně zahrnuje tři kroky: buněčnou lýzu, která může být chemická, mechanická a enzymatická, odstranění buněčných fragmentů, precipitaci a purifikaci nukleových kyselin. Přímé metody lýzy jsou častěji používány než metody extrakce buněk, protože jsou méně časově náročné a poskytují lepší využití. Při přímé lýze se však také extrahují nečistoty, které mají negativní účinek na extrakt DNA. V důsledku toho je vyžadován rozsáhlejší krok čištění. Obvykle se používají nejméně čtyři typy čištění: koncentrační gradient chloridu cesného při centrifugaci, chromatografie, elektroforéza a dialýza a filtrace. Roztok chloridu cesného se používá proto, že při jeho koncentraci 1,6 až 1,8 g/ml je jeho hustota blízká hustotě DNA. Po několikahodinové centrifugaci při vysokých otáčkách a přetížení kolem 100 000 G se vytvoří koncentrační gradient, kdy vyšší koncentrace je u dna zkumavky. Tento gradient se vytvoří rovnovážným působením protichůdných procesů: difuze a působení odstředivé síly. Makromolekuly DNA potom mohou být odděleny na základě různých proporcí AT : GC: pár AT je lehčí než pár GC, tedy dva různé typy DNA se stejnou délkou ale různým poměrem AT : GC mohou být ultracentrifugací v koncentračním gradientu CsCl odděleny tak, že molekuly s vyšším obsahem párů AT jsou dále od dna a s vyšším obsahem párů GC jsou blíže ke dnu zkumavky. K odstranění všech kontaminantů by se mohlo doporučit, aby se v závislosti na matici prostředí kombinovalo několik postupů čištění. Účinnost extrakce a čištění závisí na vlastnostech vzorku prostředí a každý krok extrakčního postupu musí být upraven pro každý vzorek. Pomocí získané DNA je prováděna detekce specifických organismů nebo posouzení celkové struktury mikrobiálních komunit (Roose-Amsaleg et al., 2001).

Buněčná lýza je obecně obzvláště důležitým krokem při extrakci DNA. Je navržena tak, aby uvolnila DNA porušením buněčné stěny a membrán mikroorganismů. V některých výzkumech byl zahrnován krok promývání vzorku před lýzou, aby se odstranily rozpustné inhibitory a extracelulární DNA (Tsai et al., 1991; Tsai a Olson, 1991). Buňky mohou být narušeny chemickými, enzymatickými nebo mechanickými postupy. Buněčná lýza může být provedena inkubací s detergentem nebo lytickými enzymy, buď inkubací s isothiokyanátem guanidia nebo různými mechanickými úpravami. Nejpoužívanějším detergentem je dodecylsulfát sodný (SDS). Další používaný detergent je pufr sulfátu sodného. Chemická nebo enzymatická lýza jsou relativně šetrné, ale neproniknou úplně do vzorků nebo sedimentů (Holben et al., 1988; Pitcher et al., 1989). Lysozym je nejběžněji používaným enzymem pro hydrolýzu neuropeptidů polysacharidovou složkou stěny bakteriální buňky, která dodává buňce tuhost a osmotickou ochranu. Nukleové kyseliny mohou být také uvolněny některými proteázami<sup>4</sup>, jako je například proteináza K (Porteous a Armstrong, 1991). Vzorky, u nichž ani lýza detergentem, ani enzymatické štěpení není efektivní, jsou zpracovávány mechanicky. Tento jev může způsobit extrémně rezistentní buněčná stěna. Mechanická lýza je prováděna tepelným šokem, homogenizací kuliček z příslušných materiálů, mikrovlnným ohřevem nebo ultrazvukem (Volossiuk et al., 1995). Ultrazvuk je účinným prostředkem pro uvolňování bakterií. Mikrovlnný ohřev je velmi účinný pro gram-pozitivní bakterie, ale zahřívání musí být mírné, protože nukleové kyseliny mohou být poškozeny (Picard et al., 1992). Pro větší efektivitu (množství DNA) je používána kombinace chemické a mechanické lýzy. Podle (Gray a Herwig, 1996) je to proces homogenizace a následné inkubace v pufru SDS (high salt – SDS).

Mnoho výzkumníků provedlo klasickou deproteinizaci v organických rozpouštědlech: fenol, fenol-chloroform a chloroform-isoamylalkohol (Ogram et al., 1987; Tsai a Olson, 1991). Proteiny mohou být také vysoleny za použití nasycených roztoků solí, jako je chlorid sodný, chlorid draselný, octan amonný, octan draselný nebo octan sodný (Holben et al., 1988). Proteiny se sráží během centrifugace při nízké rychlosti a nukleové kyseliny se izolují v supernatantu. Nukleové kyseliny se koncentrují srážením s etanolem, isopropanolem nebo polyetylglykolem (PEG). Místo etanolu lze použít PEG nebo isopropanol pro snížení celkového objemu vzorku (Ogram et al., 1987).

Ultracentrifugace koncentračního gradientu chloridu cesného (CsCl) byla použita v některých prvních molekulárních studiích mikrobiální DNA (Holben et al., 1988).

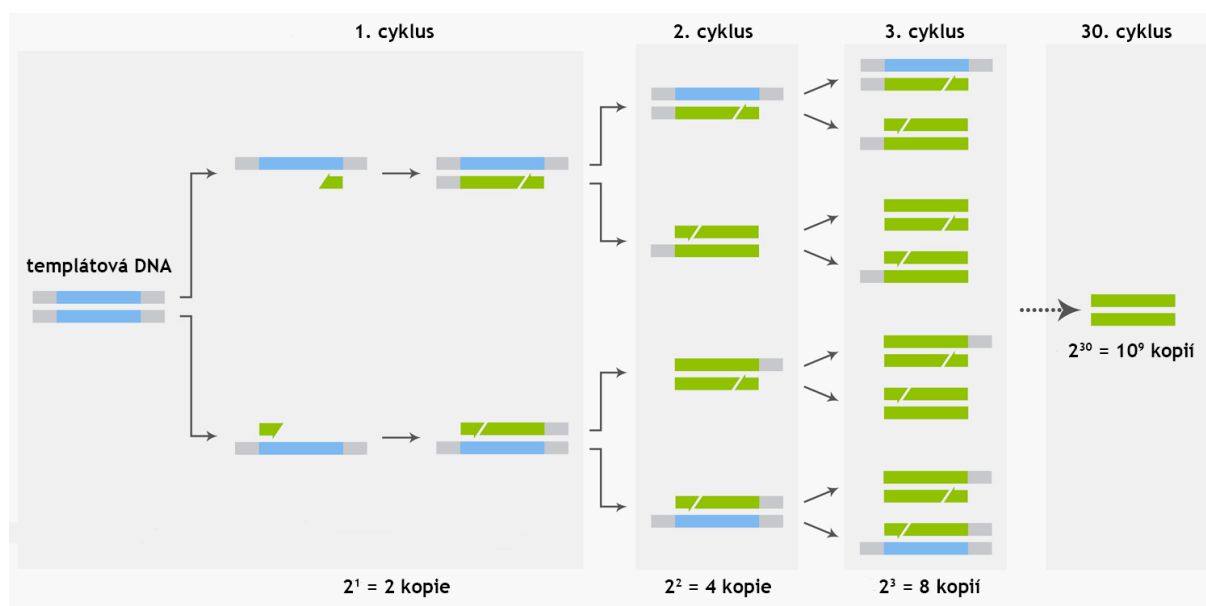
---

<sup>4</sup> Proteáza je skupina enzymů, které štěpí proteiny.

CsCl a ethidium bromid se přidají ke vzorkům a různé složky lyzátu (proteiny, polysacharidy, chromozomální nebo plazmidová DNA, RNA) se během centrifugace přesouvají do stabilních zón koncentračního gradientu tvořeného CsCl v závislosti na jejich koncentraci (viz první odstavec). Postup je však pracný a časově náročný (vzorky mohou být odstředěny při 150 000 x g po dobu 48 hodin). Tato metoda také neposkytuje vždy čisté vzorky a velká množství DNA mohou být ztracena (Ogram et al., 1987).

### **b) Polymerázová řetězová reakce**

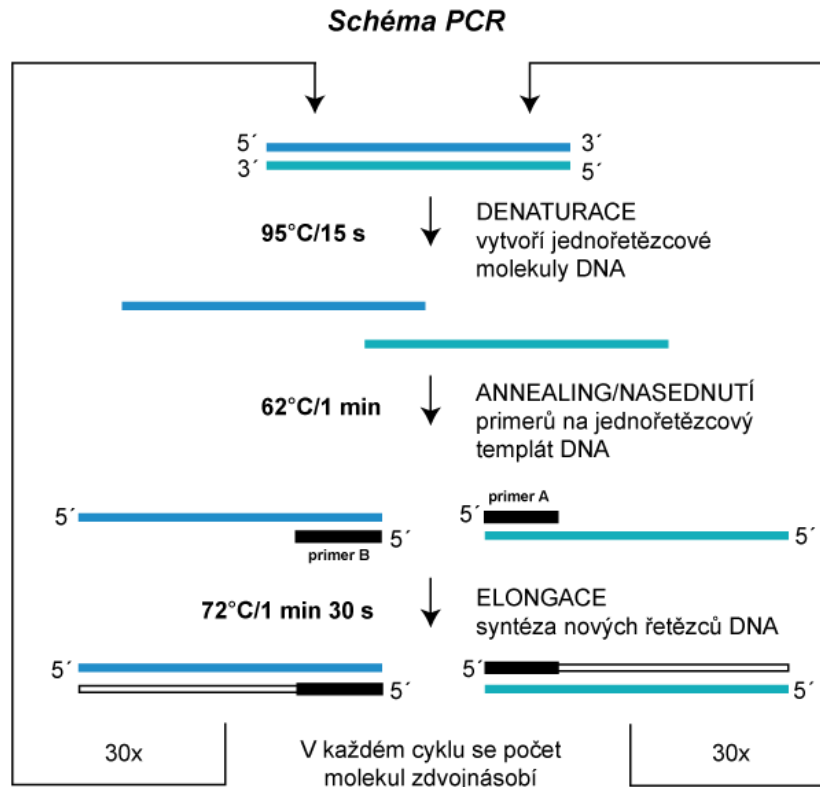
Silný a všestranný způsob amplifikace<sup>5</sup> DNA, známý jako polymerázová řetězová reakce (PCR), poskytuje přístup klonování DNA, zejména u organismů, jejichž úplná sekvence genomu je známa. Technika může selektivně amplifikovat jakoukoliv nukleotidovou sekvenci. Na rozdíl od replikace buněčné DNA, která amplifikuje veškerou DNA buňky během replikačního cyklu, PCR cílí amplifikaci pro replikaci pouze segmentu DNA ohraničeného dvěma primery, které určují, kde DNA polymeráza začíná replikaci. Tam, kde je dvoušroubovice DNA rozvinutá, probíhá proces amplifikace. RNA primery, které „nasedají“ na vlákna DNA, řídí syntézu nových vláken. Jejich syntézu katalyzuje termostabilní DNA polymeráza od 5' konce k 3' konci vždy začínající od primerů. Následně vzniká nový komplementární řetězec k templátové DNA. Z počátku je přítomno velmi malé množství požadovaného úseku DNA. Po určitém počtu cyklů v závěru reakce je přítomno již několik miliard kopií vybrané DNA (Alberts et al., 2015). Princip amplifikace DNA je uveden na Obr. 2.



**Obr. 2:** Schéma cyklů amplifikace DNA. Převzato z (Thermo Fisher, 2019).

<sup>5</sup> Proces přípravy mnoha kopií určitého úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

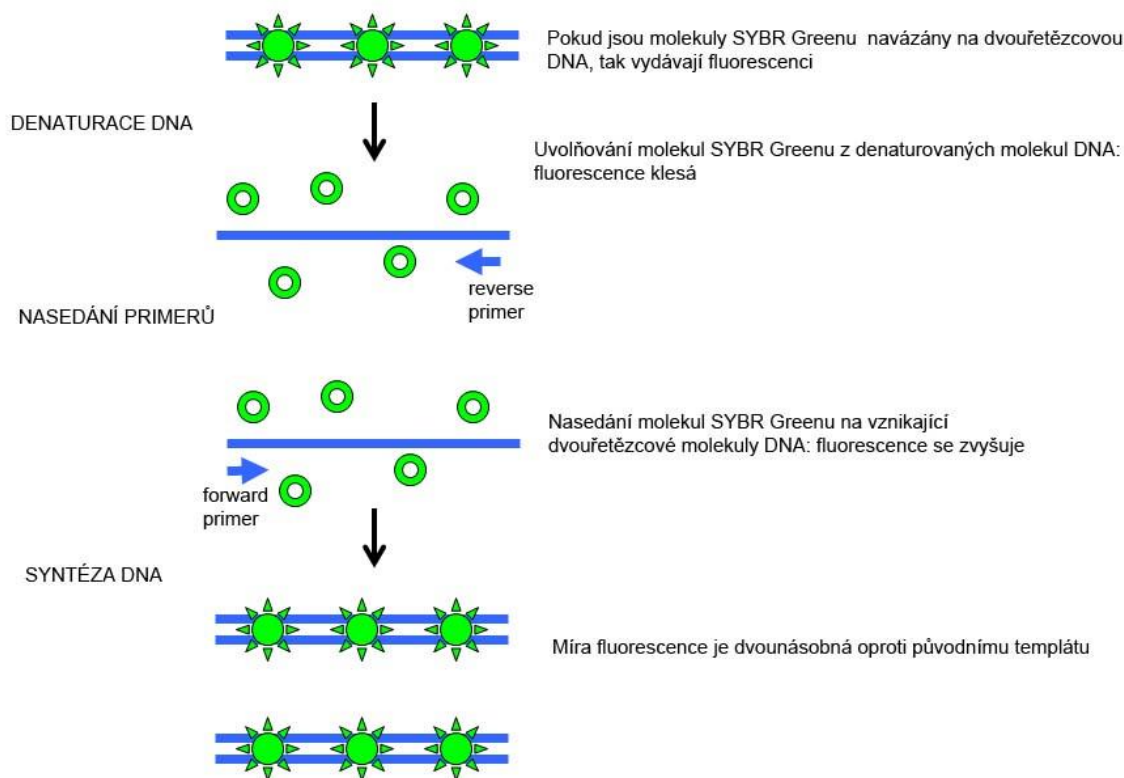
Každý cyklus PCR zahrnuje tři kroky: denaturaci, nasednutí primerů (annealing) a syntézu DNA (extension), z nichž každá probíhá při jiné teplotě (Obr. 3). Při nejvyšší teplotě probíhá denaturace. Primery jsou přítomny v přebytku nad templátem. To je důležité, protože každý nově vytvořený řetězec DNA začíná z primeru. První krok procesu zahrnuje oddělení vláken cílové DNA zahřátím na téměř var. Dvouřetězcová molekula DNA se po dobu 20-30 sekund zahřívá na teplotu 94-98 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v dvouřetězcové molekule DNA a k rozvolnění této dvoušroubovice. Vznikají tak dvě jednořetězcové molekuly DNA, na které mohou v dalším kroku nasednout primery. Dále se roztok ochladí na teplotu, kterou upřednostňuje komplementární sekvence DNA, na které se navzájem nacházejí a vytvářejí páry bází, což je proces zvaný annealing. Teplota se sníží na 50-65°C, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA/primer se váže DNA polymeráza. Ve třetím kroku procesu DNA polymeráza replikuje DNA prodloužením z 3' konce primeru, čímž se vytvoří nový řetězec DNA. Na konci prvního cyklu je dvojnásobné množství molekul DNA, stejně jako v buněčné replikaci. Teplota použitá v této fázi závisí na použité DNA polymeráze. Nejběžnější Taq polymeráza má optimum aktivity při 72-80 °C. V PCR se proces opakuje, obvykle mezi 25 a 30 cykly. Počet kopií se zvyšuje exponenciálně (Ahern et al., 2016).



**Obr. 3:** Schéma prvního kroku amplifikace. Převzato z (Mendelova univerzita v Brně, 2019).

### c) Real-time kvantitativní PCR (qPCR)

Real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce umožňuje přesnou kvantifikaci specifických nukleových kyselin v komplexní směsi, i když je výchozí množství ve velmi nízké koncentraci. Toho je dosaženo sledováním amplifikace cílové sekvence v reálném čase za použití fluorescenční technologie (Fraga et al., 2014). Měření amplifikace DNA v průběhu reakce v reálném čase je velkým rozdílem oproti klasické PCR. To umožňuje kvantifikaci počátečních množství cílových úseků DNA prostřednictvím počtu amplifikačních cyklů požadovaných pro překročení prahové hranice fluorescenčního signálu (threshold). Fluorescenční signál je vyobrazen pomocí amplifikační křivky. Zdroj fluorescence je tvořen fluorescenčními barvivy nebo sondami (Obr. 4). Nejpoužívanějším barvivem je SYBR Green. Čím více kopií cílové DNA je přítomno na začátku experimentu, tím méně cyklů PCR je zapotřebí k překročení zmíněné prahové hranice. Jedná se o nepřímou úměru tzv. Ct hodnoty. Ct hodnota reflektuje cyklus, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí, které se v reakci vyskytuje. Tato fluorescence je zaznamenána detektorem. Číslo daného cyklu je vyjádřeno právě jako Ct hodnota. Pomocí této hodnoty je vypočítána relativní kvantifikace DNA a může být porovnávána s relativní kvantifikací referenčního vzorku (Pabinger et al., 2014).



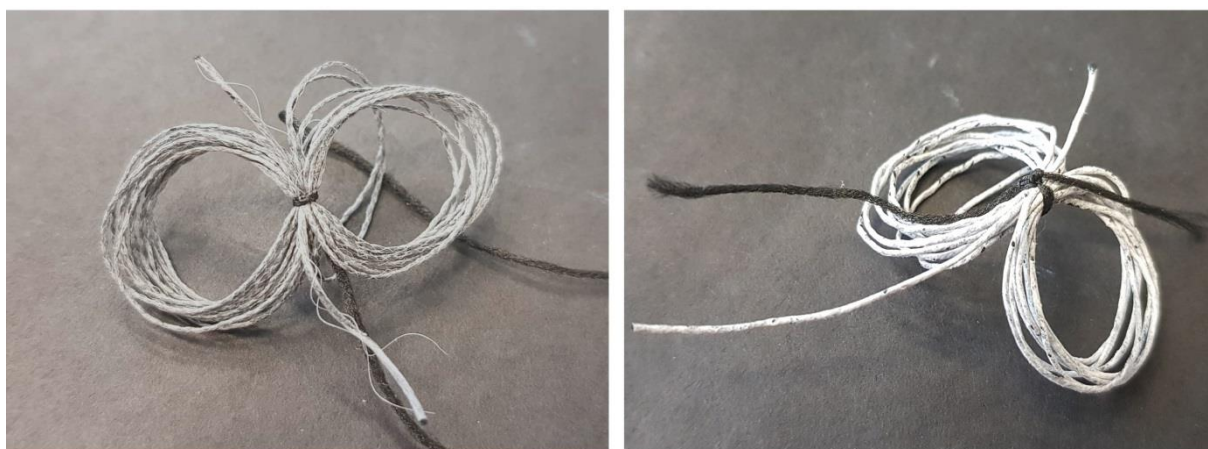
**Obr. 4:** Proces navázání fluorescenčního barviva (LabGuide.cz, 2014).

## 3. Experimentální část

### 3.1 Příprava nosičů

Pro sterilizační metody byly v rámci této práce připraveny dva typy nanovláknenných nosičů. Lišily se hustotou nanovláknenného nánosu a způsobem výroby. Nanovláknenná vrstva byla vyrobena pomocí elektrostatického zvlákňování z volné hladiny ve vysokonapětovém elektrickém poli - electrospinningem stejnosměrným (DC) a střídavým (AC) proudem. První typ měl hustotu nanovláken 10 dtex (plošná hustota  $1,12 \text{ g/cm}^2$ , rychlost výroby 108 m/min) a druhý byl vyroben s podstatně větší hustotou nanovláken 165 dtex. Základní vlákno byla nosná nit z polyesterového hedvábí SLOTERA (označení: 167f 25x1x1), na kterou byla nanosená polyuretanová nanovláknna (Larithane 1083) vyrobená buď DC nebo AC electrospinningem. Polyuretan byl zvolen, protože je oděruvzdorný, pevný a pružný, ale zejména umožňuje snadnou mikrobiální kolonizaci, zejména díky své hydrofobní povaze a vysokému poměru povrchů k objemu (Kříklavová et al., 2010). Na nosná vlákna s nanovláknennou vrstvou vyrobenou prostřednictvím DC electrospinningu byl navíc umístěn křížový tangenciální ovin z polyamidu 6, jehož funkcí bylo zpevnění a mechanická stabilizace nanovláknenné vrstvy. Finální vlákno bylo navíc kompaktnější, tudíž nedocházelo k deformaci nanovláknenné vrstvy vlivem roztažnosti materiálu nosného vlákna.

Nosiče byly vyráběny ve formě kruhového uspořádání. Nosná nit s daným nanovláknenným nánosem byla navíjena na tyč o průměru 1,6 cm. V rámci jednoho nosiče byl použit 1 m nosného vlákna. Výsledné tvarové varianty jsou uvedeny na obrázku 5.



**Obr. 5:** Fotografie DC nosiče (vlevo) a AC nosiče (vpravo).

## 3.2 Metody sterilizace nosičů

Pro účely testování sterilizaci nanovláčkových nosičů bylo vybráno několik metod. Ty zahrnovaly tři fyzikální a čtyři chemické metody.

U všech sterilizačních metod byla manipulace s nosičem vždy prováděna sterilní pinzetou, aby nedošlo k jejich sekundární kontaminaci. Destilovaná voda používaná pro proplach nosičů po jejich sterilizaci chemickými metodami byla předem vysterilizována v autoklávu stejně jako všechny používané kádinky a zkumavky.

### 3.2.1 Fyzikální metody

Mezi fyzikální metody, které byly využity v rámci této bakalářské práce, patří sterilizace párou prostřednictvím autoklávu, světelná sterilizace UV zářením a sterilizace ultrazvukem.

#### *a) Autokláv*

Sterilizace párou proběhla v suchém stavu a v destilované vodě. Pro obě varianty byl zvolen stejný program autoklávu. Teplota byla nastavena na 121 °C a tlak odpovídal 211 kPa. V programu byly také 2 fáze sušení s dobou 2 minut.

Nejprve byla provedena sterilizace párou v suchém stavu. Nanovláčkový nosič byl umístěn do suché 100ml laboratorní skleněné láhve a po uzavření nádoby byl vložen do autoklávu, kde proběhla sterilizace podle stanoveného sterilizačního programu. Sterilizace v destilované vodě byla provedena s novým nosičem a za stejných podmínek (totožný sterilizační program) jako sterilizace v suchém stavu. Nanovláčkový nosič byl ponořen do sterilní destilované vody ve 100ml laboratorní skleněné láhvi a po uzavření nádoby byl vložen do autoklávu.

#### *b) UV záření*

Nanovláčkový nosič byl umístěn na sterilní hodinové sklo, které bylo vloženo do PCR boxu. Zde proběhla sterilizace pomocí UV záření o vlnové délce 254 nm po dobu 30 minut.

#### *c) Ultrazvuk*

Nanovláčkový nosič byl vložen do 100ml suché laboratorní skleněné láhve a po hermetickém uzavření nádoby byl umístěn do vodní lázně v ultrazvukové čističce na 15 minut. Frekvence byla nastavena na 35 kHz a sterilizace byla provedena při teplotě 20 °C. Posléze proběhla metoda v destilované vodě s jiným nosičem, kde byl postup stejný,

jako v suchém stavu, až na ponoření nosiče do sterilní destilované vody ve 100ml laboratorní skleněné láhvi.

Všechny nanovlákněné nosiče byly po sterilizaci uchovávány ve sterilních 100ml skleněných lahvích a sterilních PE sáčcích při -80 °C.

### **3.2.2 Chemické metody**

Mezi chemické metody, které byly využity v rámci této bakalářské práce, patří sterilizace absolutním etanolem, peroxidem vodíku a vodným roztokem oxidu chloričitého.

#### ***a) Absolutní etanol***

Do sterilní 50ml zkumavky bylo napipetováno 50 ml absolutního ethanolu. Nanovlákněný nosič byl ponořen do absolutního ethanolu po dobu minimálně 5 minut, během kterých byl obsah zkumavky zvortexován. Po uplynutí doby expozice byl nosič promyt ve třech kádinkách se sterilní destilovanou vodou pro odstranění reziduí sterilizační látky.

#### ***b) Peroxid vodíku***

Do sterilní 50ml zkumavky bylo napipetováno 50 ml 30% peroxidu vodíku, do něhož byl následně umístěn nanovlákněný nosič. Zkumavka byla vortexována po dobu 5 minut, což zároveň odpovídá době expozice se sterilizačním činidlem. Poté byl nosič ze zkumavky vyjmut a třikrát promyt ve sterilní (vždy nové) destilované vodě.

#### ***c) Roztok oxidu chloričitého***

Poslední chemická metoda, testovaná v rámci této bakalářské práce, byla sterilizace vodným roztokem oxidu chloričitého o koncentraci 0,5 %. Ten byl připraven přesně podle protokolu dodavatele (TwinOxide, 2019).

Do sterilní 50ml zkumavky bylo napipetováno 50 ml 0,5% vodného roztoku oxidu chloričitého, do něhož byl následně umístěn nanovlákněný nosič po dobu minimálně 5 minut. Během těchto 5 minut byla zkumavka zvortexována. Po uplynutí doby expozice byl nosič promyt ve třech kádinkách se sterilní destilovanou vodou.

#### ***d) Ozon na sucho***

Nanovlákněné nosiče byly umístěny do skleněné průtočné kolony, ke které byl připojen zdroj plynného ozonu. Expozice nanovlákněných nosičů ozonu trvala 30 minut. Vývoj ozonu byl zajištěn pomocí generátor ozonu OT6 (firma Ozontech), řada



ANIHILATOR, který produkuje ozon ze vzduchu. Produkce ozonu byla udržována na 10 g/h, což odpovídá koncentraci ozonu 2 obj. %.

### ***e) Ozon v destilované vodě***

Nanovláknenné nosiče byly umístěny do skleněné kolony naplněné fyziologickým roztokem. Ke koloně byl připojen zdroj plynného ozonu z generátoru ozonu OT6 (firma Ozontech), řada ANIHILATOR, který produkuje ozon ze vzduchu. Produkce ozonu byla udržována na 10 g/h, což odpovídá koncentraci ozonu 2 obj. %. Nosiče byly exponovány po dobu 30 minut.

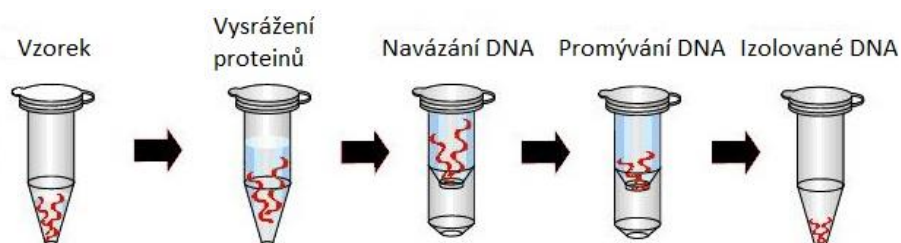
## **3.3 Molekulární genetické metody**

Molekulární genetika byla použita pro přesnější pohled na účinnost sterilizačních metod. Prostřednictvím izolované DNA je možné detekovat i mikroorganismy, které nejsou kultivovatelné, čímž byly zanalyzovány všechny možnosti výskytu životaschopných mikroorganismů.

### **3.3.1 Izolace DNA**

Pro izolaci DNA z nanovláknenných nosičů byl použit komerčně dostupný izolační kit FastDNA Spin Kit for soil (MP Biomedicals, USA).

Nejprve byl do zkumavky Lysing Matrix E vložen nosič, ze kterého bylo izolováno DNA.



**Obr. 6:** Schéma hlavního postupu izolace DNA

Následně byla provedena homogenizace a lýza buněk. Do zkumavky Lysing Matrix E bylo přidáno 122  $\mu$ l MT pufru a 978  $\mu$ l pufru fosfátu sodného. Vzhledem k tomu, že každý nosič měl rozdílnou hmotnost a objem, množství pufru fosfátu sodného se do zkumavky se vzorkem ne vždy vešlo. V těchto případech bylo tedy napipetováno menší

množství, ale takové, aby zkumavka byla plná. Poté byl vzorek homogenizován ve zkumavkovém homogenizátoru BeadBlaster 24 dvakrát po dobu 40 s při rychlosti 6,0 m/s s pauzou mezi cykly 30 s. Proběhlo mechanické narušení buněčných stěn mikroorganismů a uvolňování nukleových kyselin do ochranného pufu. Po homogenizaci byl vzorek centrifugován na centrifuze Smart R17 při rychlosti 14 000 x g po dobu 10 minut. Poté bylo do každé čisté 2ml Eppendorfovy zkumavky napipetováno 250  $\mu$ l precipitačního činidla PPS. Posléze byl ze zkumavky Lysing Matrix E přenesen supernatant obsahující uvolněný obsah buněk do 2ml Eppendorfovy zkumavky obsahující 250  $\mu$ l precipitačního činidla PPS. Zkumavka byla 10krát ručně promíchána opakovaným otočením dnem vzhůru. Proběhlo oddělení rozpuštěných nukleových kyselin od buněčných zbytků a flokulace micel obsahujících proteiny. Poté byla zvortexována suspenze Binding Matrix obsahující SiO<sub>2</sub> kuličky, a následně byla napipetována po 1 ml do 15ml zkumavek. Vzorek se supernatantem byl stočen v centrifuze po dobu 5 minut při rychlosti 14 000 x g. Proběhlo vysrážení proteinů.

Následoval proces navázání DNA. Supernatant zbavený proteinových nečistot byl přenesen do 15ml zkumavky obsahující 1 ml suspenze Binding Matrix. Tato zkumavka se vzorkem byla umístěna na 2 minuty na tzv. kývačku, kde byl obsah pomalu promíchán. Následně proběhla sedimentace SiO<sub>2</sub> kuliček, při stání zkumavek po dobu minimálně 3 minut. Nukleové kyseliny se navázaly na matici oxidu křemičitého v přítomnosti chaotropních solí<sup>6</sup>. Po sedimentaci bylo z 15ml zkumavky opatrně odebráno 600  $\mu$ l supernatantu tak, aby nedošlo k odebrání SiO<sub>2</sub> kuliček s navázanou DNA. Zbytek vzorku ve zkumavce byl promíchán na vortexu. Poté bylo přeneseno 750  $\mu$ l vzorku do kolonky umístěné ve sběrné zkumavce ze soupravy SPIN Filter tube. Tato zkumavka byla centrifugována při rychlosti 14 000 x g po dobu 1 minuty. Následně byla vyjmuta kolonka, obsah sběrné zkumavky byl vyprázdněn a kolonka byla umístěna zpět do zkumavky. Zbytek vzorku v 15ml zkumavce byl promíchán na vortexu a poté bylo přeneseno maximálně 750  $\mu$ l do kolonky ve vyprázdněné sběrné zkumavce. Vzorek ve SPIN Filter tube byl znovu centrifugován při rychlosti 14 000 x g po dobu 1 minuty. Sběrná zkumavka byla následně opět vyprázdněna. Postup pipetování vzorku z 15ml zkumavky do kolonky, vyprázdňování sběrné zkumavky, centrifugace a vyprázdnění SPIN Filter tube byl opakován, dokud v počáteční zkumavce nezbyl žádný vzorek.

Následovalo promytí DNA. Do kolonky SPIN Filter tube bylo přidáno 500  $\mu$ l promývacího roztoku SEWS-M. Vzorek byl opatrně promíchán pipetou a následně 1 minutu

---

<sup>6</sup> Vytěsňují z molekul DNA/RNA molekuly vody čímž potlačuje jiné než iontové interakce (guanidin hydrochlorid – potlačuje vodíkové vazby a hydrofobní interakce uvnitř molekul DNA/RNA a nebo proteinů)

centrifugován při rychlosti 14 000 x g. Poté byla sběrná zkumavka vyprázdněna a vzorek byl znovu centrifugován při stejné rychlosti po dobu 2 minut. Promytí roztokem SEWS-M odstraňuje centrifugací nečistoty, zatímco DNA je stále navázáno na kuličky oxidu křemičitého.

Postup izolace pokračoval ředěním DNA. Kolonka ze SPIN Filter tube byla přenesena do sběrné zkumavky Catch Tube. Peletka s DNA byla sušena v otevřených zkumavkách při laboratorní teplotě po dobu 5 minut, aby se odpařil zbytkový etanol z promývacího roztoku. Po 5 minutách bylo přidáno do kolonky 100  $\mu$ l DES a opatrným promícháním byla peletka pipetou resuspendována. Poté byl vzorek inkubován po dobu 5 minut při teplotě 55 °C v inkubátoru. Vyčištěné nukleové kyseliny se vymyly z SiO<sub>2</sub> s porušením kationtového můstku, protože promývací roztok rehydratuje jak oxid křemičitý, tak DNA. Následně proběhla centrifugace po dobu 2 minut při rychlosti 14 000 x g.

Na závěr byla kolonka ze SPIN Filter tube odebrána a sběrná zkumavka Catch Tube, která obsahovala vzorek izolované DNA, byla uzavřena. Celý postup byl prováděn pro 22 různě sterilizovaných nanovláknenných nosičů. Pokud se část pipety neobsahující špičku dotkla stěny zkumavky, byla následně očištěna etanolem, aby nedošlo k nechtěné kontaminaci a narušení izolačního postupu.

### **3.3.2 Měření koncentrace DNA**

Po úspěšné izolaci DNA bylo provedeno měření její koncentrace. Proces byl proveden pomocí přístroje Qubit® 2.0 a soupravy Qubit® dsDNA Assay Kit. Měření probíhalo na základě fluorescence, ke které dochází při navázání fluorescenčního barviva na DNA. Nejprve bylo pomocí standardů z kitu nakonfigurováno zařízení. Následně bylo do speciální zkumavky napipetováno 190  $\mu$ l ředícího roztoku a 10  $\mu$ l vzorku. Poté byla směs promíchána na vortexu po dobu přibližně 3 sekund a rychle centrifugována. Po dvouminutovém stání zkumavek byla měřena koncentrace DNA pomocí fluorometru.

### **3.3.3 Real-time PCR**

Nejprve bylo navrženo umístění vzorků do 96 jamkové PCR destičky. Vzorky DNA byly naředěny a zvortexovány. Pro každý testovaný primer musela být testována i slepá kontrola (NTC) – místo vzorku DNA byla k reakční směsi přidána PCR voda (1  $\mu$ l), která byla použita pro přípravu směsi. Každý vzorek byl testován v duplikátu, stejně

jako slepá kontrola. PCR UV boxy byly použity pro bezpečnou manipulaci s primery. Všechny použité plastové nástroje byly sterilní.

Před použitím byly rozmrazeny testované primery. Následně začala příprava reakční směsi. Nejprve byla do čistých 1,5ml zkumavek v chladícím stojánku napipetována PCR voda. Daný primer byl vortexován a centrifugován, poté přidán do patřičné zkumavky s PCR vodou. Následovalo přidání fluorescenčního barviva SYBR Green I Master (SybrM) do směsi PCR vody a primeru. Směs byla zvortexována. Posléze byl připraven chladící stojánek s destičkou a fólií. Podle návrhu rozložení vzorků v destičce bylo napipetováno do každé jamky 9  $\mu$ l reakční směsi. Poté bylo přidáno do dvou jamek od každého primeru 1  $\mu$ l PCR vody jako negativní kontrola. PCR destička byla zakryta PCR fólií. Následně byl zapnut UVP box na 40 minut pro důkladnou dezinfekci. Chladící stojánek s destičkou a fólií byl přesunut do vydezinfikovaného UVP boxu.

Z PCR destičky byla odstraněna fólie. Poté byl napipetován 1  $\mu$ l vzorku DNA pod okraj jamky v duplikátu podle návrhu destičky. Fólie byla umístěna zpět a destička byla utěsněna. Následně byly odtrženy okraje fólie a destička byla zcentrifugována. Po centrifugaci byla zapnuta další dezinfekce UV světlem po dobu 30 minut. Po uběhnutí doby dezinfekce byla destička vložena do termocykleru, kde byl nastaven a spuštěn příslušný program qPCR analýzy, která trvala přibližně 1 hodinu a 35 minut (Tabulka 1). Po skončení analýzy byla destička vytažena, zkontrolována a v případě žádné kontaminace uložena na další použití. Poté byla analýza pomocí softwarového návodu vyexportována do poznámkového bloku (Ct hodnoty).

**Tab. 1:** Program qPCR analýzy

Programy	Počet cyklů	Mód analýzy	Cílová teplota [°C]	Doba [mm:ss]	Rychlost ohřívání [°C·s <sup>-1</sup> ]	Poznámka
<b>Počáteční denaturace</b>	1	žádný	95	05:00	4,4	-
<b>PCR amplifikace</b>	45	kvantifikace	95	00:10	4,4	-
			55-60	00:15	2,2	-
			72	00:20	4,4	detekce fluorescence
<b>Křivka tání</b>	1	analýza křivky tání	98	continuous	0,06	detekce fluorescence
<b>Chlazení</b>	1	žádný	40	00:10	2	-

Nakonec bylo provedeno testování kvality vzorků určením přítomnosti inhibitorů, které mohou způsobit částečné zpomalení průběhu reakce až její úplné zastavení. Vzorky byly vhodně naředěny a podrobeny qPCR analýze. Poté proběhlo porovnání  $C_t$  hodnot.

### 3.4 Kultivační mikrobiologické metody

Kromě molekulárně genetických metod byly k hodnocení sterility použity kultivační mikrobiologické metody.

Za tímto účelem byl připraven tzv. Plate Count Agar (PCA). Jedná se o médium používané primárně pro aerobní mikroorganismy. Pro přípravu byl použit enzymový hydrolyzát kaseinu, kvasnicový extrakt, dextróza a agar. Všechny složky byly smíchány a následně klávkovány při 121 °C po dobu minimálně 20 minut. Poté bylo naváženo 6,25 g PCA do Fisher láhve, která byla dolita 300 ml destilované vody.

Nezbytná byla také příprava fyziologického roztoku, který byl složen z chloridu sodného a destilované vody (2,55 g NaCl ve 300 ml destilované vody).

Na Petriho misku s živným médiem bylo napipetována 0,2 ml vzorku, který byl pomocí sterilní skleněné tyčinky rozetřen po povrchu. Již vyrobený Plate Count Agar (PCA) byl použit jako vhodné kultivační prostředí. Podle očekávaného výsledného počtu kolonií (15 – 300) byl zvolen stupeň ředění. Desetinásobným ředěním vzorku byly naočkovány i další agarové plotny. Po zaschnutí při laboratorní teplotě byly misky dnem vzhůru umístěny

do inkubátoru. Inkubace probíhala aerobně nebo anaerobně při 22 a 36 °C po dobu 48 hodin. Po uplynutí doby inkubace byly spočítány kolonie a tím byl stanoven počet mikroorganismů v mililitru nebo gramu vzorku.

### **3.5 Charakterizace nanovláken**

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo nalézt sterilizační metodu, která bude dostatečně účinná, ale nebude mít negativní vliv na strukturu nanovláčenné vrstvy. Za tímto účelem bylo provedeno tzv. materiálové vyhodnocení účinku sterilizačních metod. Pomocí optického a elektronového mikroskopu byly pořizovány snímky nanovláčenné vrstvy při různém zvětšení. Tím bylo umožněno porovnávání strukturálních změn jednotlivých nosičů podle provedených sterilizačních metod.

Pro první typ snímků byl použit optický mikroskop Olympus BX51M, na kterém byly fotografie pořizovány při zvětšení 100× a 200×. Pro detailní studium strukturálních změn nanovláčenné vrstvy byl využit skenovací elektronový mikroskop Carl Zeiss Ultra Plus. Snímky byly pořizeny při zvětšení 100×, 500× a 2500×.

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Vliv na strukturu nanovláknenné vrstvy

#### 4.1.1 Nosiče sterilizované fyzikálními metodami

Na Obr. 7-10 jsou uvedeny snímky z optického a elektronového mikroskopu DC a AC nanovláknenného nosiče, které byly sterilizovány fyzikálními metodami. První dvojice snímků je referenční, tedy nesterilizovaný nosič.

Největší změna byla zaznamenána při sterilizaci autoklávem v destilované vodě za teploty 121 °C a tlaku 211 kPa. U DC nosiče ponořeného v destilované vodě a sterilizovaného v autoklávu došlo ke kompresi křížového tangenciálního polyamidového ovinu. Vlivem toho se nosná nit s nanovláknennou vrstvou viditelně zdeformovala. Dále došlo k roztavení nanovláknenné vrstvy na velké části povrchu nosného vlákna, což způsobila vysoká teplota. Byla pozorována také změna barvy nanovláknenné vrstvy, a to z šedé k fialovo-červené. U metody autoklávu na sucho (DC nosič) byl výsledek podobný až na změnu barvy. Téměř žádná změna barvy či struktury nebyla zaznamenána u sterilizace UV zářením a ultrazvukem v destilované vodě i v suchém stavu.

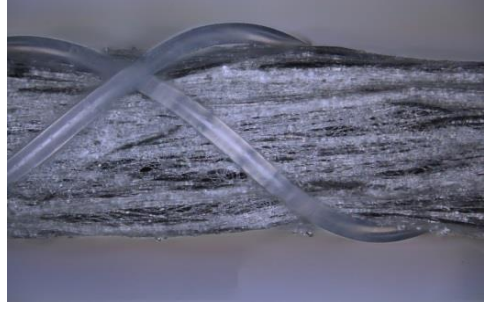
U AC nosičů byly změny barvy a struktury podobné. Jelikož AC nosiče nedisponovaly křížovým ovinem, nedocházelo při sterilizaci autoklávem v destilované vodě a v suchém stavu k jeho kompresi a následné deformaci vlákna. Barva byla změněna z bílé na fialovou. Tak jako u DC nosičů nebyla téměř žádná změna barvy nebo struktury zaznamenána u UV záření a ultrazvuku.

Na snímcích z elektronového mikroskopu (SEM) jsou lépe vidět jednotlivé shluky vláken. Proto jsou tyto snímky dobré pro popis struktury. Nejsou na nich však vidět změny v barvě, které jsou pozorovány u optického mikroskopu. Největší strukturní deformace je vidět pomocí SEM u sterilizace autoklávem a ozonem v destilované vodě i na sucho.

100x

200x

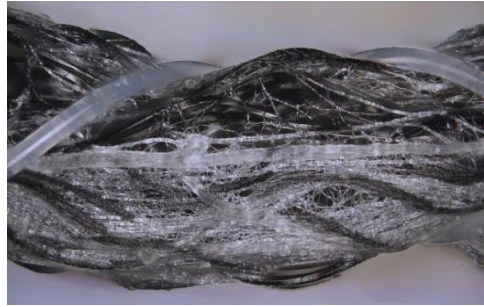
NESTERILIZOVANÝ



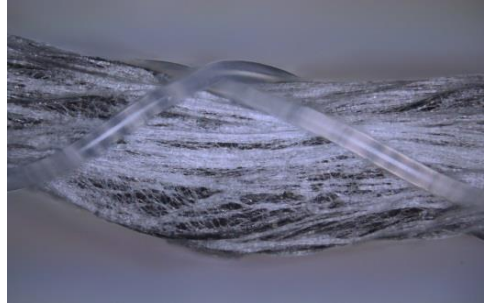
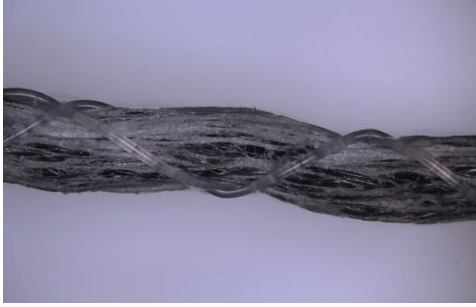
AUTOKLÁV  
V DESTILOVANÉ  
VODĚ



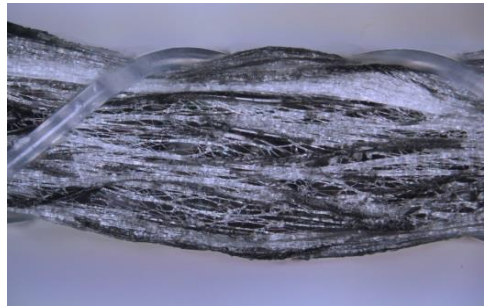
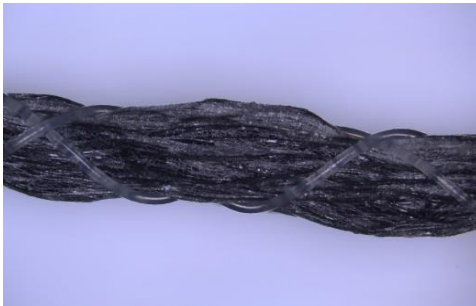
AUTOKLÁV NA  
SUCHO



ULTRAZVUK  
V DESTILOVANÉ  
VODĚ

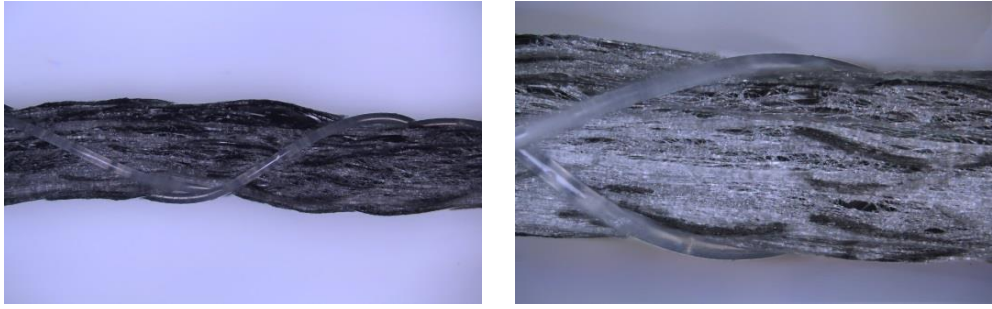


ULTRAZVUK NA  
SUCHO

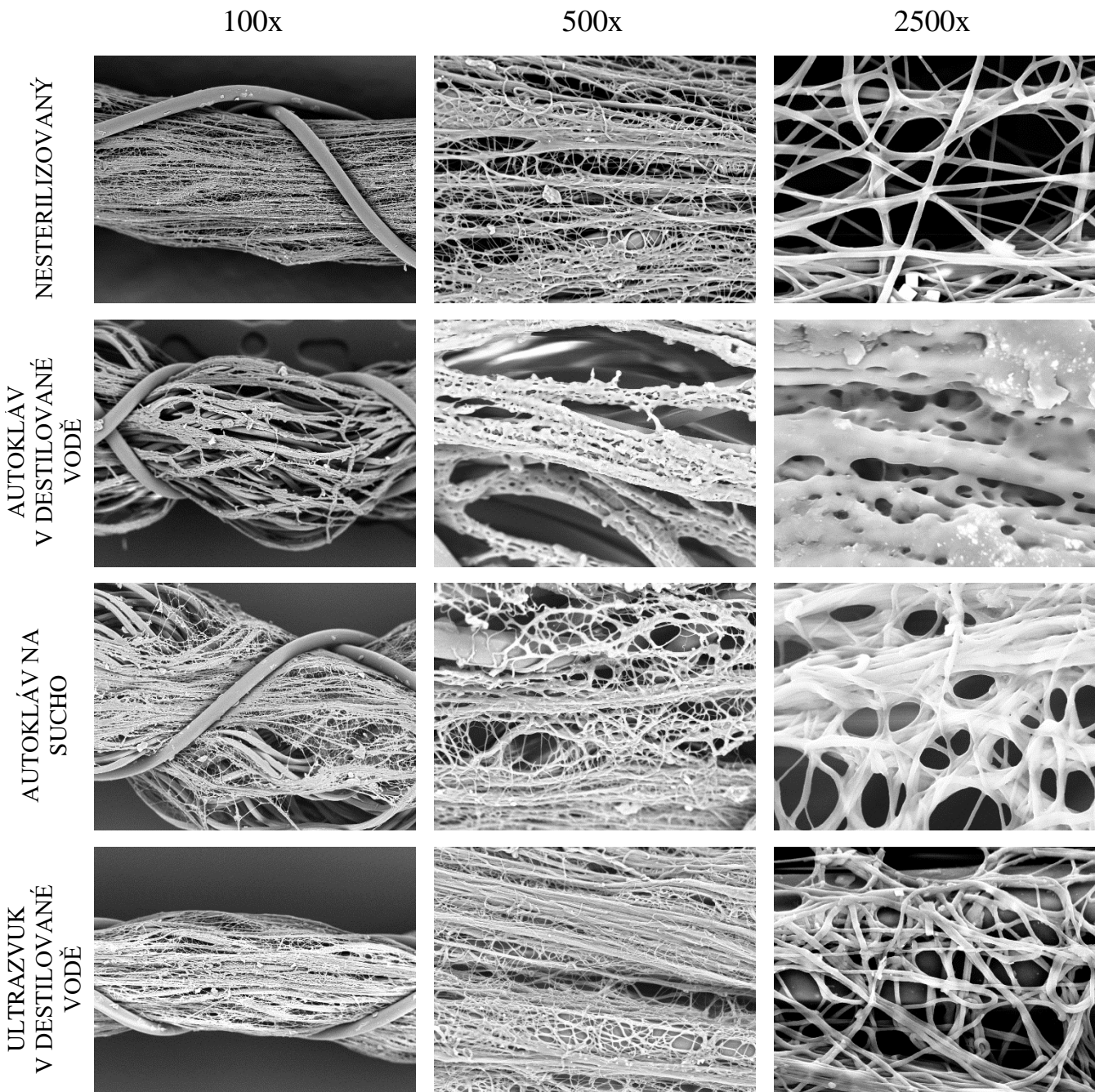


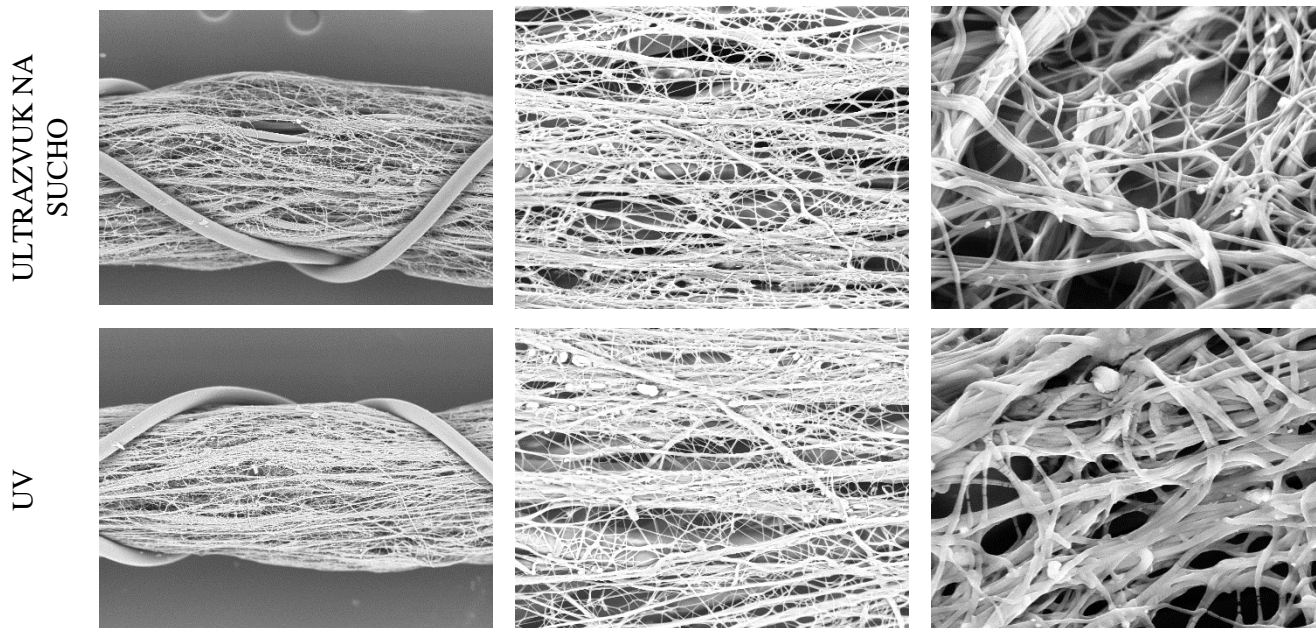


UV

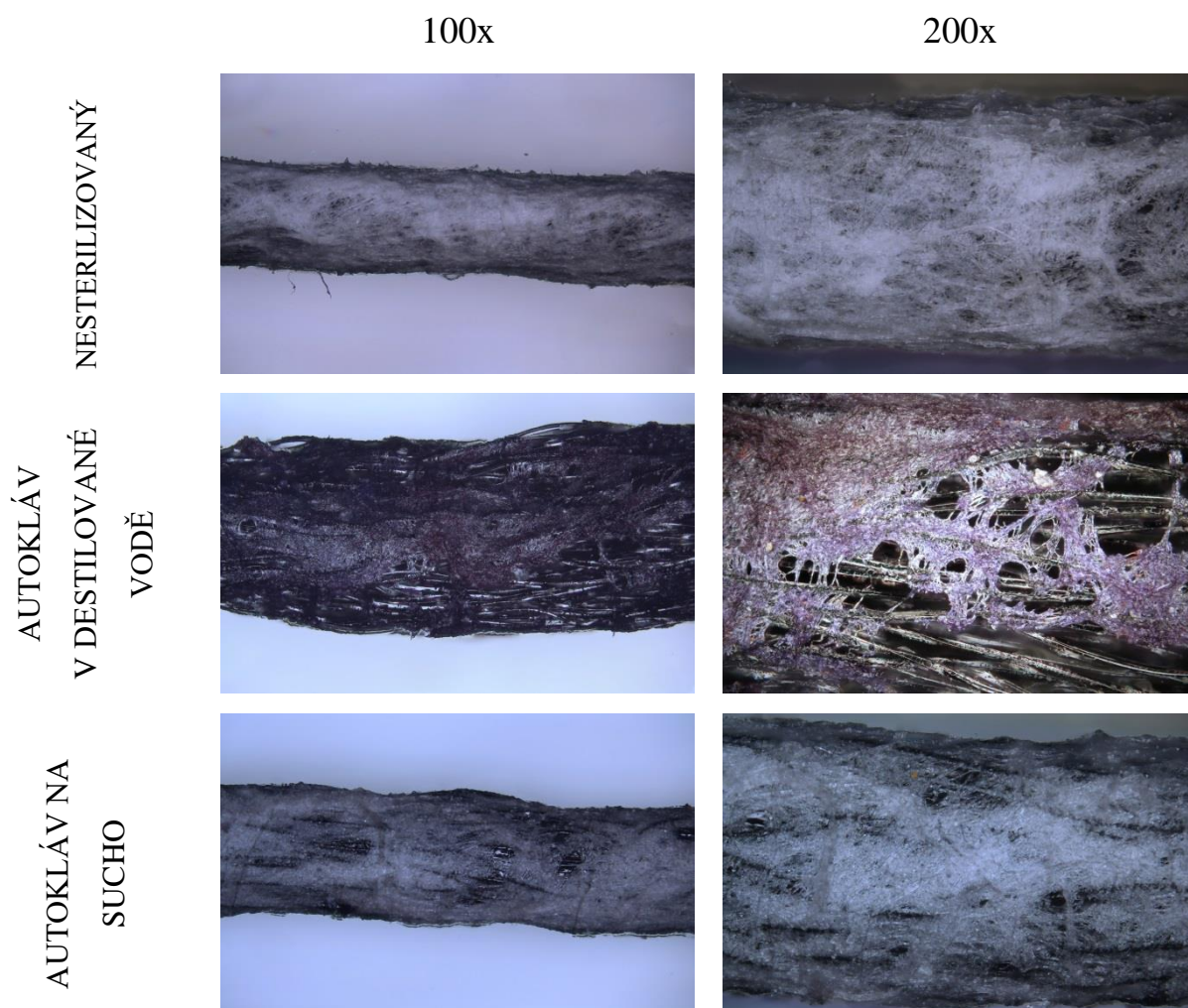


**Obr. 7:** Snímky DC nosičů z optického mikroskopu, které prošly sterilizací fyzikálními metodami

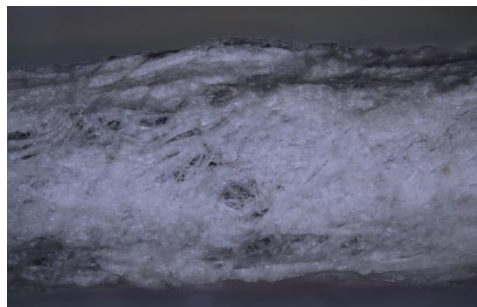
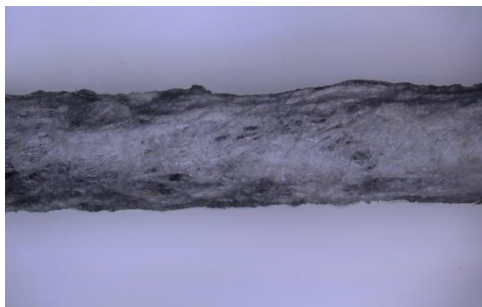




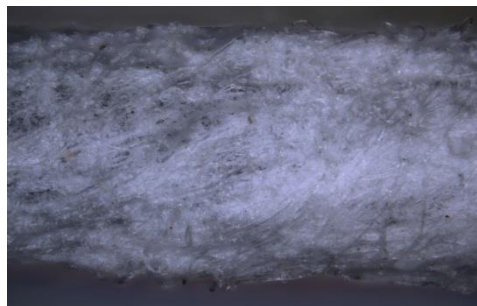
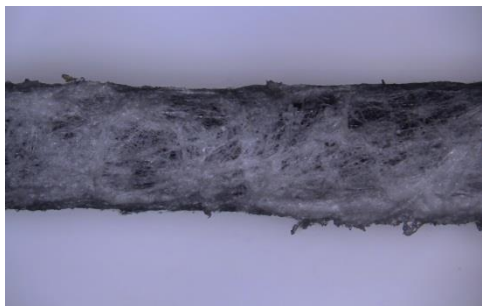
**Obr. 8:** Snímky DC nosičů z elektronového mikroskopu (SEM), které prošly sterilizací fyzikálními metodami



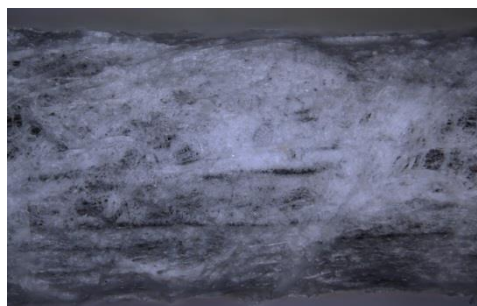
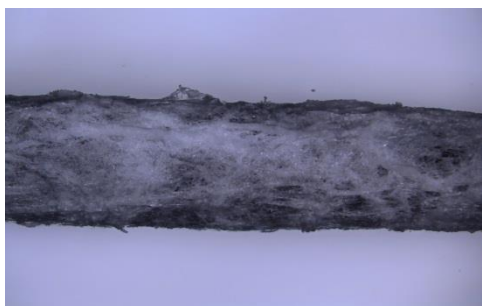
ULTRAZVUK  
V DESTILOVANÉ  
VODĚ



ULTRAZVUK NA  
SUCHO



UV



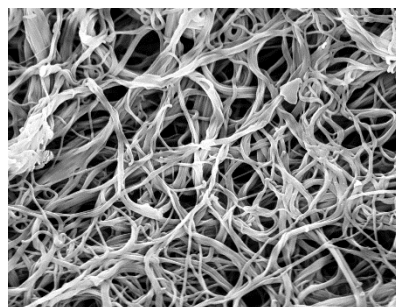
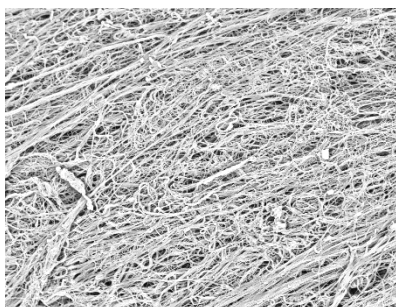
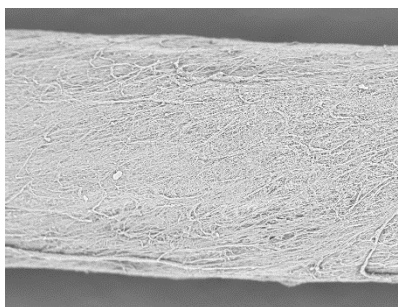
**Obr. 9:** Snímky AC nosičů z optického mikroskopu, které prošly sterilizací fyzikálními metodami

100x

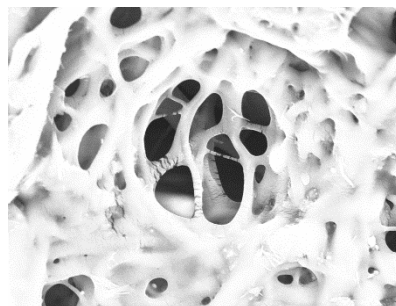
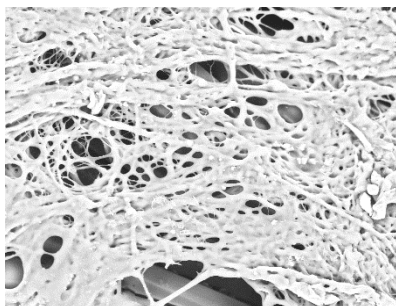
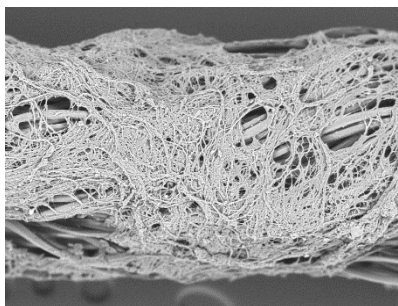
500x

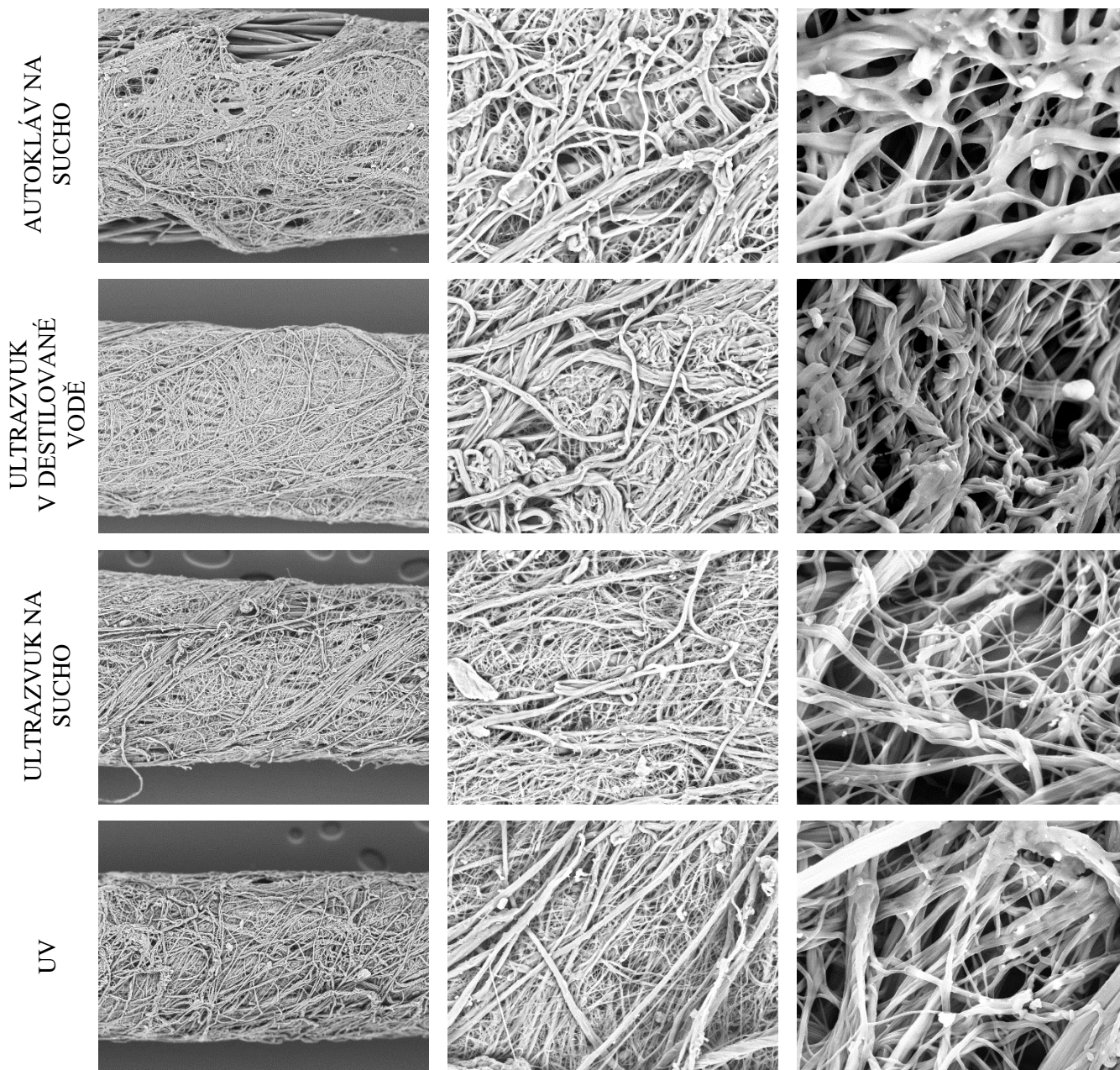
2500x

NESTERILIZOVANÝ



AUTOKLAV  
V DESTILOVANÉ  
VODĚ



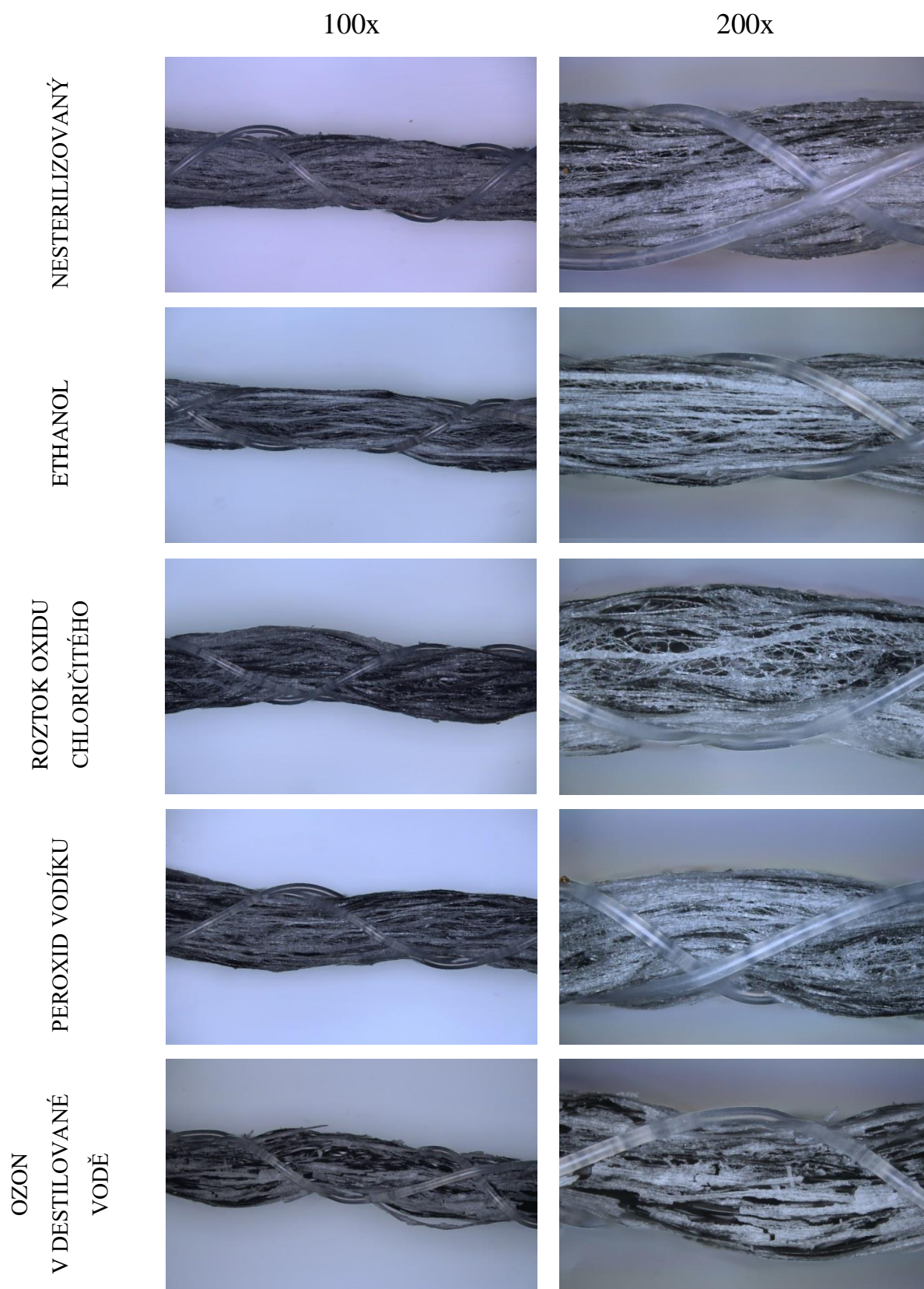


**Obr. 10:** Snímky AC nosičů z elektronového mikroskopu (SEM), které prošly sterilizací fyzikálními metodami

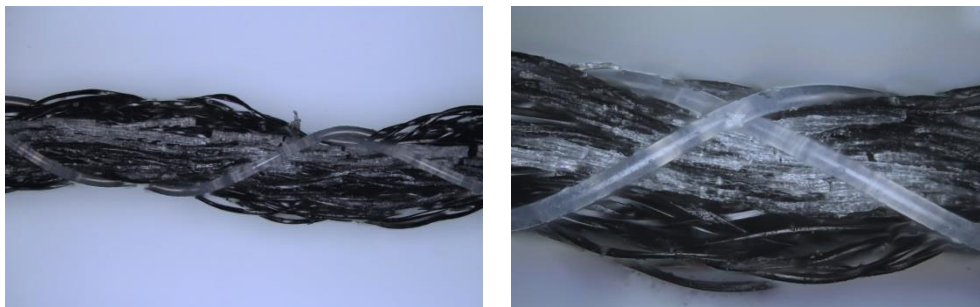
#### 4.1.2 Nosiče sterilizované chemickými metodami

Po sterilizaci chemickými metodami byly změny velmi podobné jak u DC, tak u AC nosičů. Snímky nanovláken z optického a elektronového mikroskopu jsou uvedeny na Obr. 11 – 14. Největší změnu vykazovala sterilizace ozonem v destilované vodě i v suchém stavu. Nanovláčková vrstva velmi zkrhla a začala se uvolňovat z nosné nitě. Na velké části povrchu nosného vlákna se nanovláčková vrstva oddělila již při samotném procesu sterilizace. Kde nanovláčková vrstva zůstala, došlo k jejímu oddělení i při sebemenším mechanickém působení. Po sterilizaci etanolem, roztokem oxidu

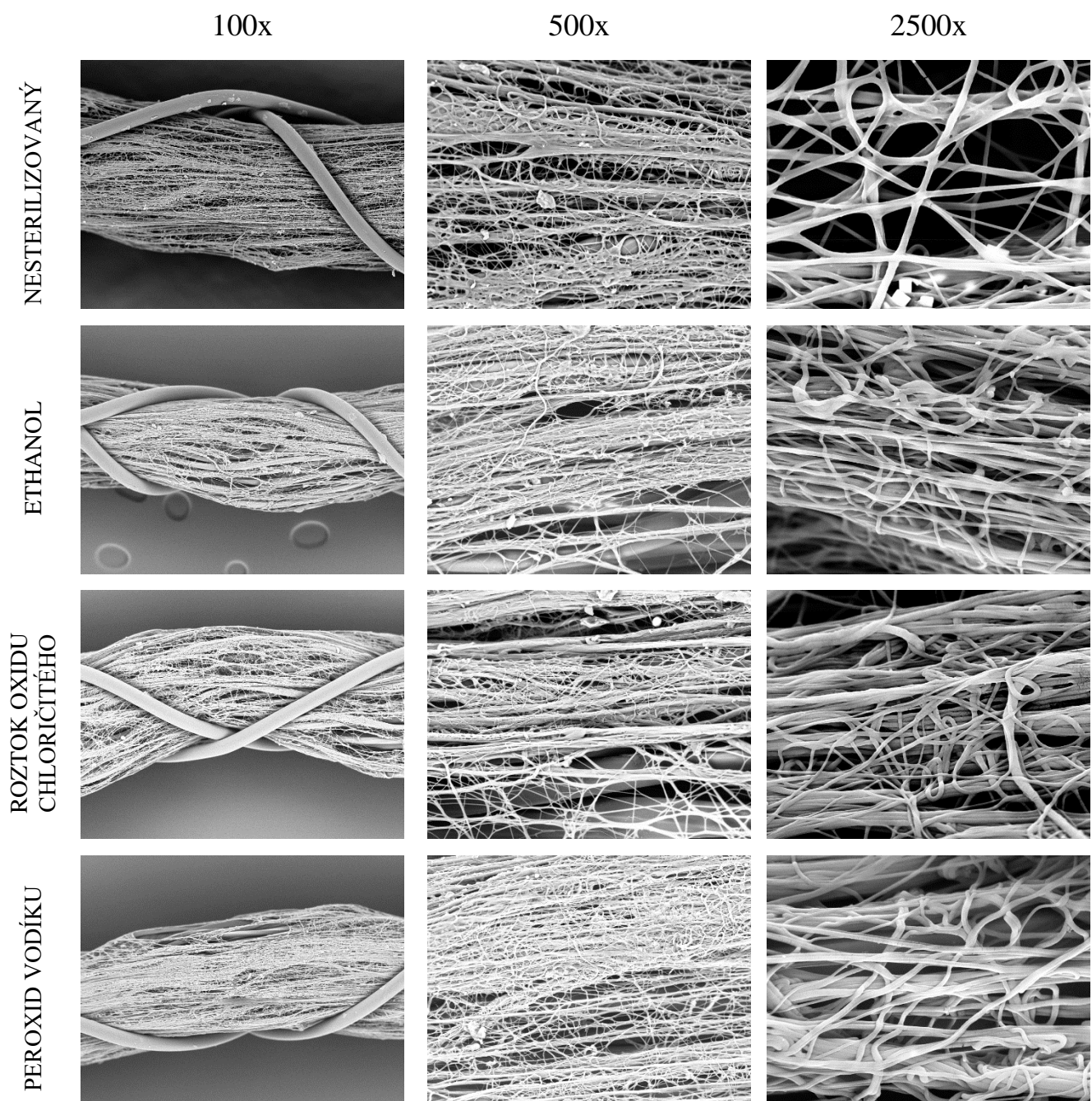
chlorigitého a peroxidem vodíku byly změny ve struktuře a barvě detekovatelné až při velkém zvětšení na snímcích z elektronového mikroskopu (SEM). Vlákná se nepatrně shlukla k sobě, u nesterilizovaného vzorku byla tedy jednotlivá vlákénka dále od sebe.



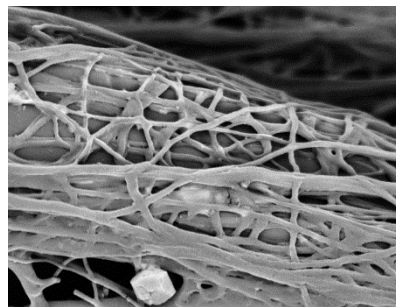
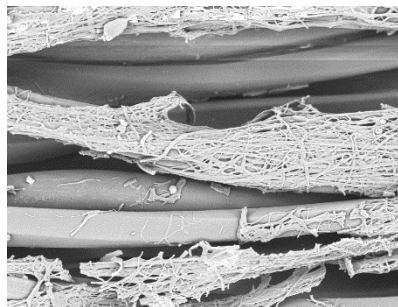
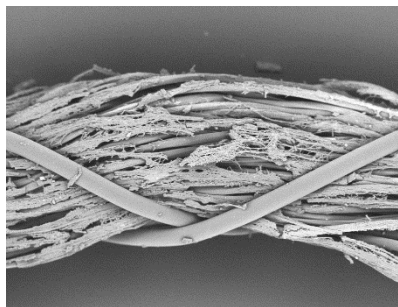
OZON NA SUCHO



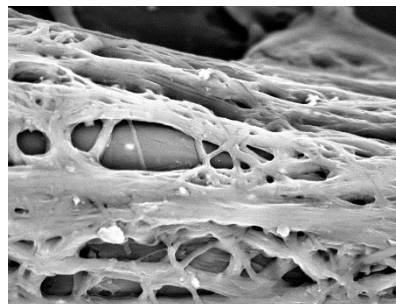
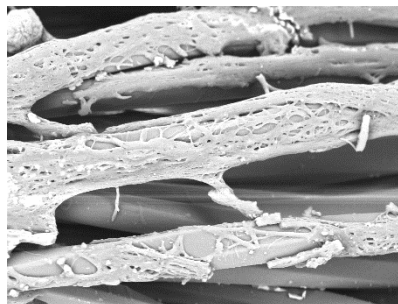
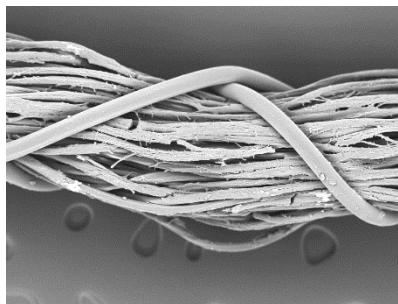
**Obr. 11:** Snímky DC nosičů z optického mikroskopu, které prošly sterilizací chemickými metodami



OZON  
V DESTILOVANÉ  
VODĚ



OZON NA SUCHO

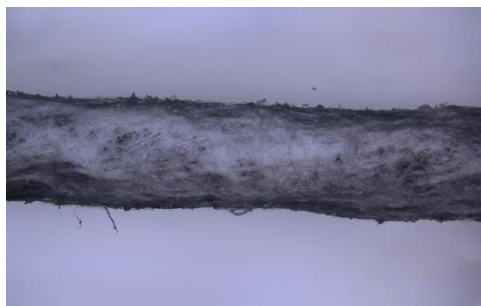


**Obr. 12:** Snímky DC nosičů z elektronového mikroskopu (SEM), které prošly sterilizací chemickými metodami

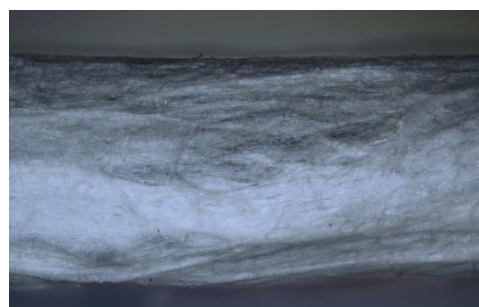
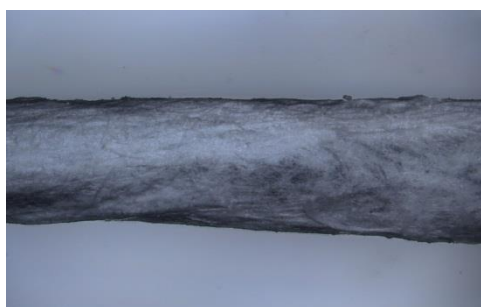
100x

200x

NESTERILIZOVANÝ



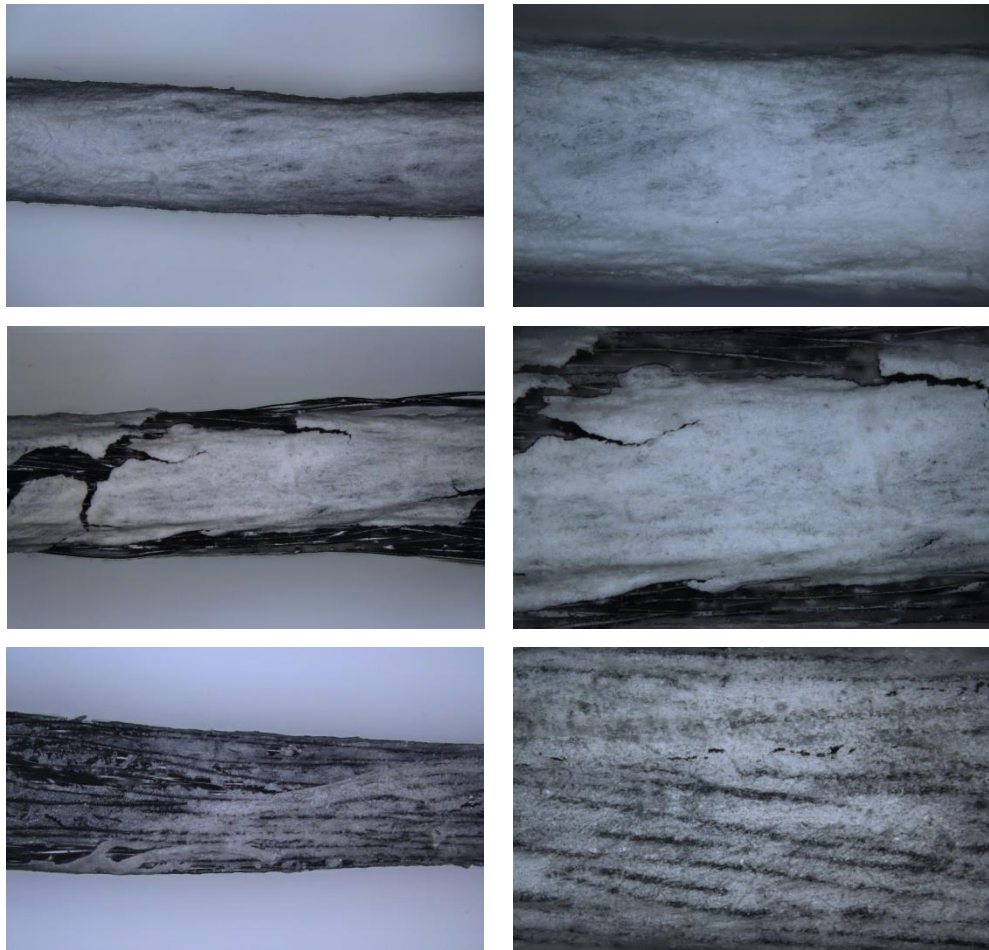
ETHANOL



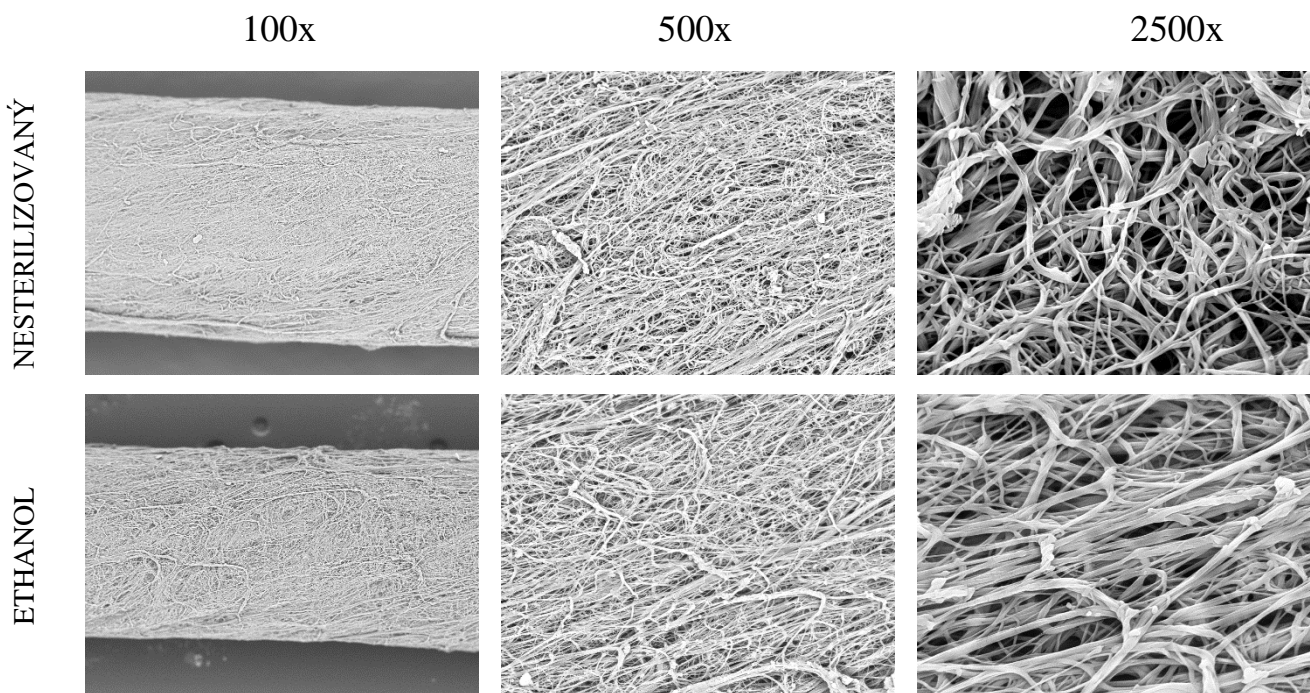
ROZTOK OXIDU  
CHLORÍČITÉHO



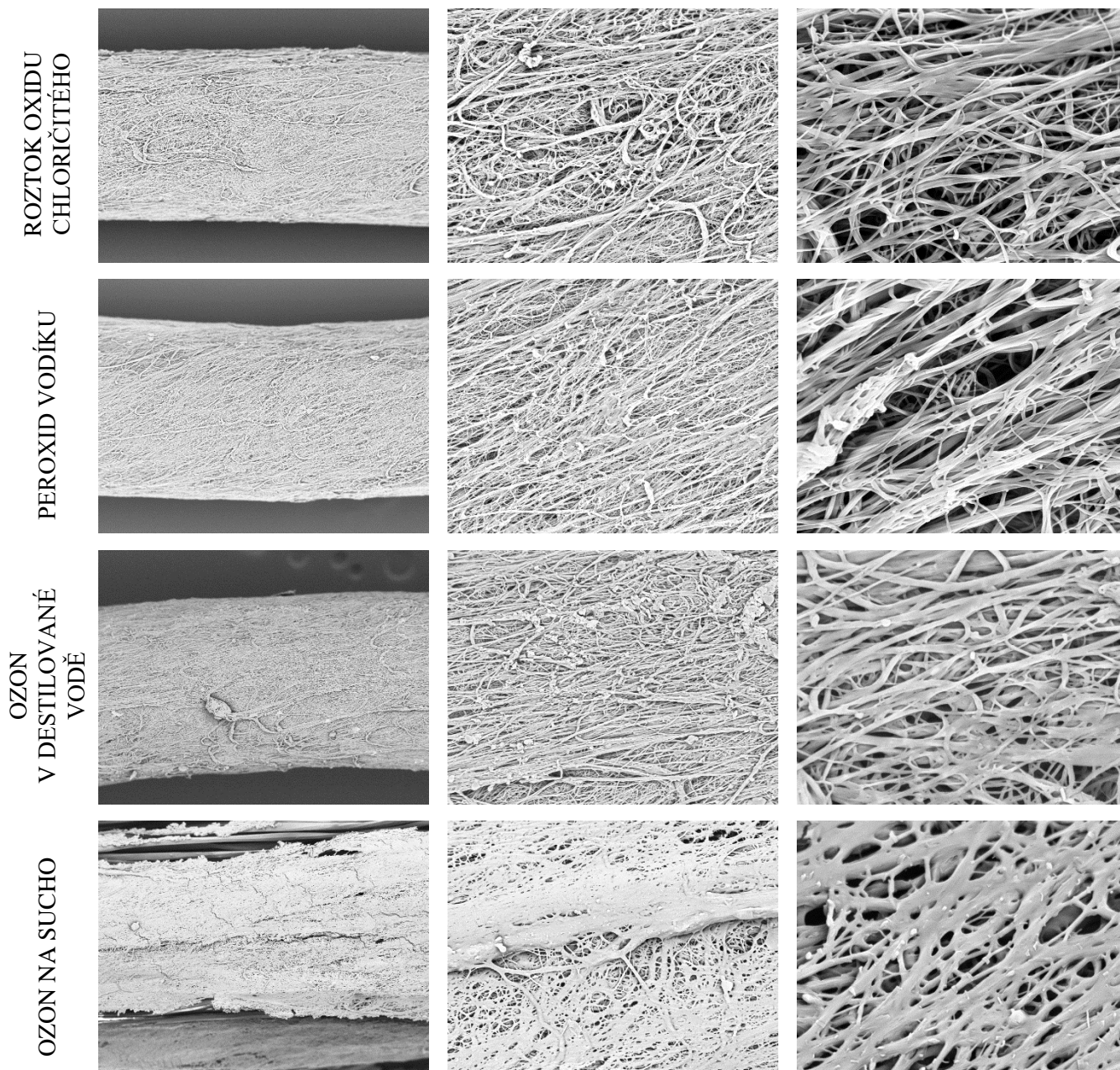
OZON  
 V DESTILOVANÉ  
 VODĚ  
 PEROXID VODÍKU  
 OZON NA SUCHO



**Obr. 13:** Snímky AC nosičů z optického mikroskopu, které prošly sterilizací chemickými metodami







**Obr. 14:** Snímky AC nosičů z elektronového mikroskopu (SEM), které prošly sterilizací chemickými metodami

## 4.2 Výsledky kultivačních mikrobiologických metod

Jedním ze způsobů vyhodnocení sterility nanovláknenných nosičů byla kultivace mikroorganismů na agarových plotnách. Výsledky této metody jsou uvedeny v Tab. 2. V rámci této práce bylo vykultivováno celkem 22 vzorků z nanovláknenných nosičů, z nichž polovina byla typu DC a polovina typu AC. Kultivace byla zacílena na aerobní i anaerobní skupiny kultivovatelných mikroorganismů.

Na nesterilizovaných nosičích byly detekovány pouze kolonie aerobních mikroorganismů narostlých při 36 °C. Ostatní hodnoty těchto nosičů byly nulové. Další nulové hodnoty vykazaly vzorky nanovlákněných nosičů sterilizované autoklávem, UV zářením, roztokem oxidu chloričitého, peroxidem vodíku a ozonem. Tyto metody vyšly tedy z hlediska počtu kultivovatelných bakterií nejlépe.

Po sterilizaci nanovlákněných nosičů ultrazvukem v suchém stavu byly zjištěny kolonie aerobních i anaerobních mikroorganismů při obou teplotách. Největší stanovená hodnota u této metody byla na AC nosiči u anaerobních mikroorganismů při 36 °C. Výsledky po sterilizaci ultrazvukem na sucho byly velmi rozdílné s výsledky sterilizace ultrazvukem v destilované vodě. Metoda s destilovanou vodou způsobila, že vyrostly pouze aerobní mikroorganismy při vyšší teplotě a to na více jak dvojnásobné množství v porovnání se suchým stavem. U sterilizace etanolem byly počty mikrobiálních kolonií nejvyšší. Byly detekovány obě skupiny mikroorganismů, ovšem nejvíce kolonií narostlo při teplotě 36 °C za aerobních podmínek.

Jako nejvhodnější sterilizační metody, hodnocené na základě kultivačních mikrobiologických metod, se jeví sterilizace autoklávem, UV zářením, roztokem oxidu chloričitého, peroxidem vodíku a ozonem. Za méně účinné metody pro nanovlákněné nosiče testované v rámci této bakalářské práce lze považovat sterilizaci ultrazvukem a etanolem. AC nosič vykázal téměř vždy nižší hodnoty kultivovatelných kolonií v porovnání s DC nosičem, a to u každé metody. Výjimkou byla metoda ultrazvuku v suchém stavu, kde počet anaerobních mikroorganismů po inkubaci za teploty 36 °C převyšoval počet detekovaný u DC nosiče. Obecně lépe dopadly chemické sterilizační metody, u kterých, kromě etanolu, nebyly detekovány žádné kolonie kultivovatelných mikroorganismů.

**Tab. 2:** Počty heterotrofních kultivovatelných mikroorganismů (KTJ/ml) pro jednotlivé sterilizační metody a typy nanovlákných nosičů

Typ nosiče	Metoda sterilizace	Aerobní [KTJ/ml]		Anaerobní [KTJ/ml]	
		22 °C	36 °C	22 °C	36 °C
DC	Původní	0	7,30E+01	0	0
AC		0	1,40E+01	0	0
DC	Autokláv na sucho	0	0	0	0
AC		0	0	0	0
DC	Autokláv v destil. vodě	0	0	0	0
AC		0	0	0	0
DC	UV	0	0	0	0
AC		0	0	0	0
DC	Ultrazvuk na sucho	9,70E+01	9,27E+01	4,55E+00	4,55E+00
AC		9,09E+00	5,00E+01	4,55E+00	2,05E+02
DC	Ultrazvuk v destil. vodě	0	2,14E+02	0	0
AC		0	1,32E+02	0	0
DC	EtOH	0	8,27E+02	5,00E+01	0
AC		0	4,55E+02	0	0
DC	ClO <sub>2</sub>	0	0	0	0
AC		0	0	0	0
DC	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	0	0	0
AC		0	0	0	0
DC	Ozon na sucho	0	0	0	0
AC		0	0	0	0
DC	Ozon v destil. vodě	0	0	0	0
AC		0	0	0	0

### 4.3 Výsledky molekulárně genetických analýz

Molekulárně genetické metody byly použity pro detekci přítomnosti veškerých, tzn. kultivovatelných i nekultivovatelných bakterií. Celý proces zahrnoval izolaci přítomné DNA, změření její koncentrace a qPCR analýzu. U všech sterilizačních metod jsou jednotlivé koncentrace cílové DNA a Ct hodnoty uvedeny pro oba typy nosičů v Tab. 3 a na Obr. 15 - 17.

Bylo zjištěno, že již u nesterilizovaných nanovlákných nosičů byla koncentrace DNA velmi nízká. Konkrétně u AC nosiče byla koncentrace DNA pod mezí detekce, tedy pod 0,0005 ng/μl („too low“). U nosičů po sterilizaci byly koncentrace DNA obecně

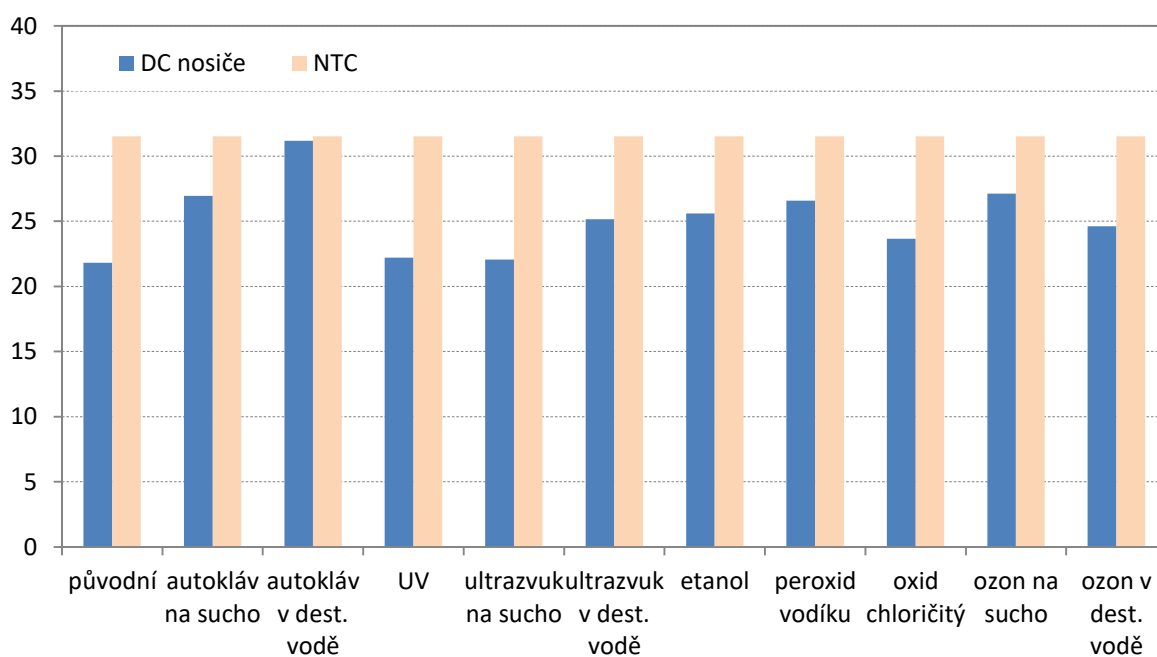
velmi nízké či pod mezí detekce. Výjimku tvořil AC nosič sterilizovaný roztokem oxidu chloričitého, kde byla naopak detekována mírně vyšší koncentrace DNA v porovnání s nesterilizovaným nosičem.

**Tab. 3:** Přehled Ct hodnot a koncentrací DNA zjištěných na obou typech nanovlákných nosičů po jejich expozici jednotlivým sterilizačním metodám

Typ nosiče	Metoda sterilizace	Hmotnost nosiče	Koncentrace DNA [ng/g <sub>nosiče</sub> ]	Ct hodnota
DC	původní	0,098	135	21,82
AC		0,207	too low	29,39
DC	autokláv na sucho	0,214	too low	26,96
AC		0,474	too low	29,02
DC	autokláv v destil. vodě	0,602	too low	31,19
AC		0,838	too low	29,58
DC	UV	0,101	23,2	22,22
AC		0,216	too low	26,85
DC	ultrazvuk v suchém stavu	0,103	29,5	22,07
AC		0,210	10,1	24,33
DC	ultrazvuk v destil. vodě	0,330	3,03	25,16
AC		0,641	too low	26,27
DC	EtOH	0,419	too low	25,60
AC		0,571	too low	25,47
DC	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,359	too low	26,58
AC		0,571	too low	26,56
DC	ClO <sub>2</sub>	0,354	7,12	23,66
AC		0,593	48,2	19,29
DC	Ozon na sucho	0,138	too low	27,12
AC		0,222	17,1	23,57
DC	Ozon v destil. vodě	0,342	6,14	24,62
AC		0,526	too low	29,23

Intepretace získaných Ct hodnot je založena na nepřímé úměře. Čím vyšší je Ct hodnota, tím nižší je množství cílové DNA ve vzorku a naopak. Jak již bylo zmíněno výše, nanovlákné nosiče obsahovaly malý počet bakterií už před sterilizací. Na základě výsledků Ct hodnot se jako vhodná metoda ukázala sterilizace párou v destilované vodě, kde byly Ct hodnoty nejvyšší, tedy nejnižší koncentrace cílové DNA. Avšak z hlediska vlivu této metody na strukturu a charakter nanovlákné vrstvy nelze metodu doporučit, jelikož byl pozorován značný destruktivní vliv právě na nanovláknou vrstvu.

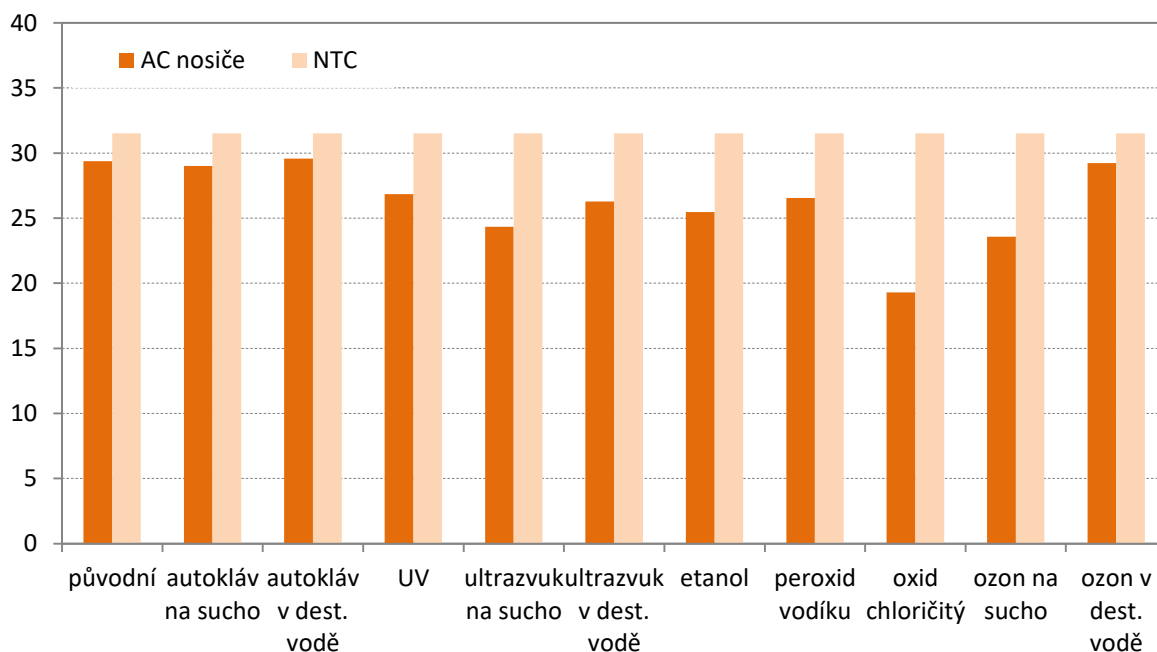
## DC nosiče



**Obr. 15:** Ct hodnoty přímeru U16SRT na DC nosičích u jednotlivých sterilizačních metod s výsledky negativní kontroly

U AC nosiče před sterilizací byla Ct hodnota v porovnání s negativní kontrolou podobná. Vzhledem k velmi malému počtu bakterií na tomto nesterilizovaném nosiči byly po sterilizaci zjištěny jen nepatrné rozdíly v množství bakteriální biomasy, které se pohybovalo v rozmezí chyby stanovení. Malé množství bakterií přítomných na nanovlákných nosičích již před sterilizací mohlo být způsobeno přítomností antimikrobiálních látek pocházejících z iniciace a terminace polymerizace polyuretanu nebo z přípravy nanovlákné vrstvy.

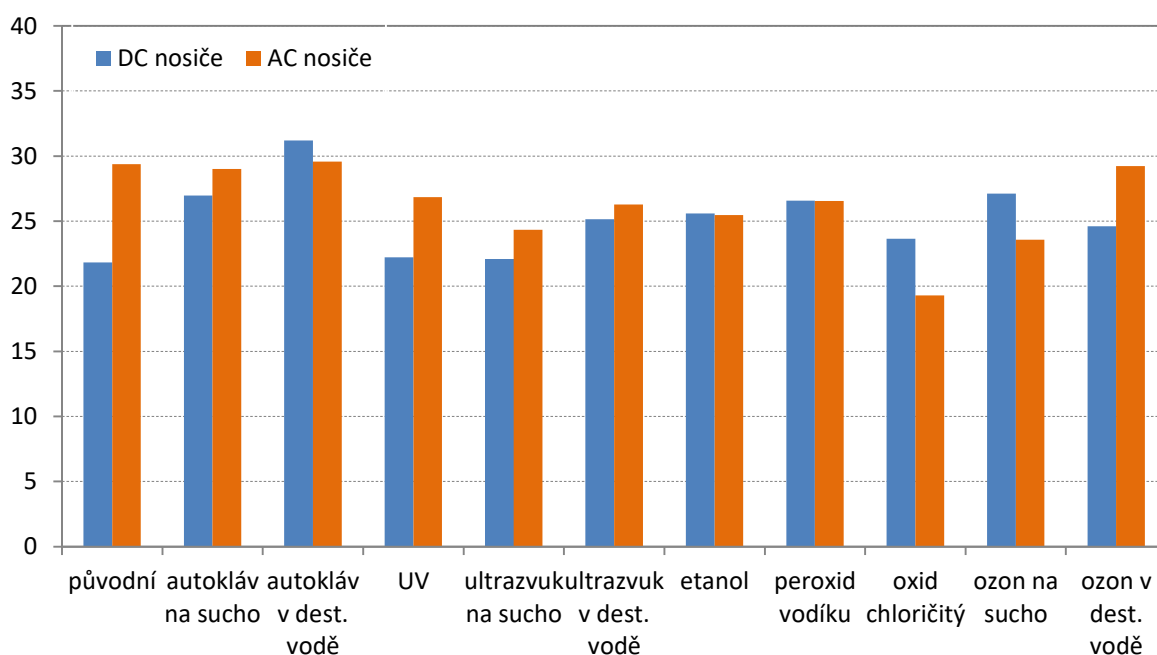
## AC nosiče



**Obr. 16:** Ct hodnoty primeru U16SRT na AC nosičích u jednotlivých sterilizačních metod s výsledky negativní kontroly

Na Obr. 17 je uvedeno porovnání Ct hodnoty zjištěných na obou typech nanovlákněných nosičů. Rozdíl u jednotlivých sterilizačních metod pro DC a AC nosič je patrný a navíc lze porovnat hodnoty s původními, tedy nesterilizovanými, nosiči. Pokud je například porovnán vzorek z AC nosiče po jednotlivých sterilizačních metodách, je vidět, že Ct hodnoty nabývají téměř vždy menších hodnot. Jedinou výjimkou je sterilizace autoklávem v destilované vodě. U DC nosičů jsou Ct hodnoty v porovnání s původním vzorkem vždy vyšší. Velmi podobné si jsou hodnoty DC a AC nosiče u sterilizace etanolem a peroxidem vodíku.

## DC a AC nosiče



**Obr. 17:** Porovnání Ct hodnot primeru U16SRT DC a AC nosičů u jednotlivých sterilizačních metod

Kromě analýzy Ct hodnot byla spočítána relativní kvantifikace vzorků, která popisuje relativní změnu množství daného primeru (U16SRT) vůči referenčnímu vzorku.

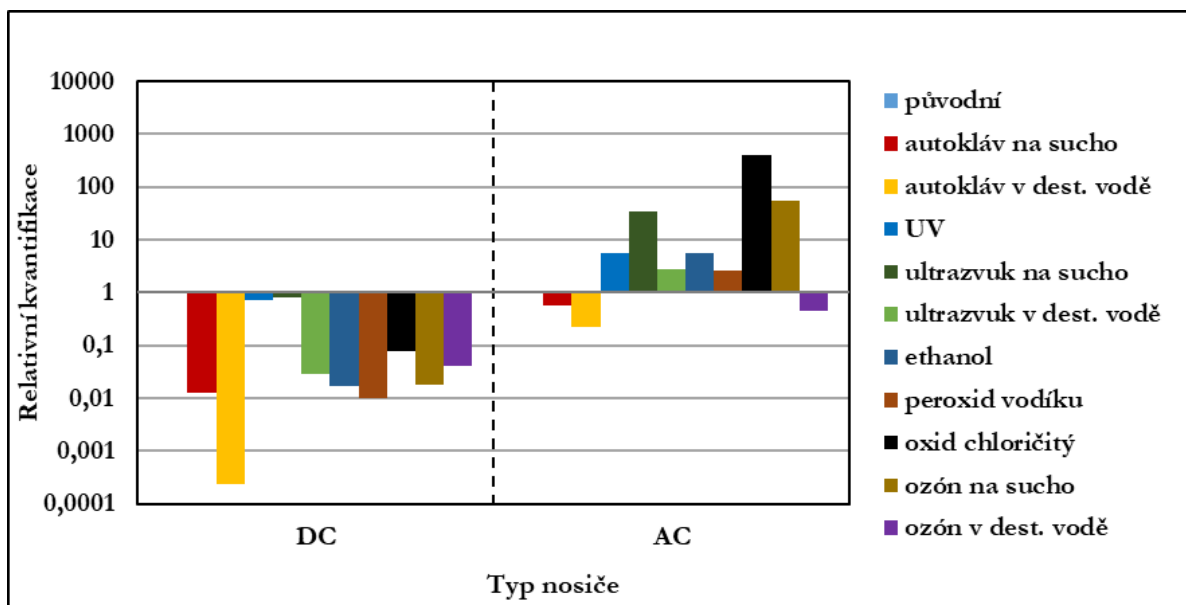
$$\text{relativní kvantifikace} = EF^{-(Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{ref}})}$$

$EF$  ... účinnost primeru ( $EF_{U16SRT} = 2,004$ )

$Ct_{\text{sample}}$  ... průměrná Ct hodnota vzorku (normalizovaná na množství vzorku)

$Ct_{\text{ref}}$  ... průměrná Ct hodnota referenčního vzorku (normalizovaná na množství vzorku)

Hodnoty relativní kvantifikace byly porovnávány s referenčním vzorkem, jehož relativní kvantifikace je 1. Jako referenční vzorek byl zvolen původní DC a AC nosič. U DC nosičů je viděn pokles množství biomasy téměř u všech sterilizačních metod kromě UV záření a ultrazvuku v suchém stavu. Největší pokles u tohoto typu nanovláčkových nosičů byl zaznamenán po sterilizaci autoklávem v destilované vodě. Na AC nosičích byl v mnoha případech zjištěn naopak mírný nárůst biomasy, nejvíce však po sterilizaci ozonem na sucho, roztokem oxidu chloričitého a ultrazvukem v suchém stavu. Naopak pokles biomasy u tohoto typu nosiče byl zaznamenán po sterilizaci autoklávem v obou stavech a ozonem v destilované vodě.



**Obr. 18:** Relativní kvantifikace DC a AC nosičů u jednotlivých metod v porovnání s původními nosiči

Porovnáním Ct hodnot s nulovými hodnotami KTJ zjištěnými kultivačními metodami je patrné, že ačkoliv tyto vzorky neobsahovaly žádné kultivovatelné mikroorganismy, byla na nosičích zjištěna přítomnost nekultivovatelných mikroorganismů. To indikuje porovnání s původními vzorky, kde byly Ct hodnoty nižší. Podle nepřímé úměry měly tyto vzorky s nižší Ct hodnotou větší množství cílené DNA, tudíž více tzv. nekultivovatelných mikroorganismů.

Výsledky z kultivačních mikrobiologických a molekulárně genetických metod vyšly nejlépe po sterilizaci autoklávem v destilované vodě. U této sterilizační metody byl však zjištěn značně negativní vliv na nanovláknennou vrstvu a strukturu jednotlivých nanovláken. Metoda proto nemůže být považována za vhodnou pro účely sterilizace nanovláknenných nosičů biomasy. Podobné výsledky byly dosaženy také u sterilizace ozonem v obou stavech (mokrém a suchém prostředí). U roztoku oxidu chloričitého a UV záření byly sice počty kultivovatelných bakterií nulové, ale Ct hodnoty a koncentrace DNA byly nižší v porovnání s původními vzorky. Ct hodnoty nabyly nižších čísel a koncentrace DNA byla naopak vyšší.

Po vyhodnocení a interpretaci všech dosažených výsledků se jako nejlepší sterilizační metoda ze všech testovaných metod jeví sterilizace prostřednictvím peroxidu vodíku. Sterilizace peroxidem vedla k efektivní eliminaci přítomného mikrobiálního znečištění a zároveň měla minimální nebo žádný vliv na nanovláknennou vrstvu.



## 5. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo porovnání efektivity a účinku vybraných sterilizačních metod na nanovláknenné nosiče biomasy a na základě toho vybrat tu nejvhodnější. Za vhodnou metodu sterilizace byla považována ta, která vytvoří sterilní prostředí bez mikroorganismů a zároveň způsobí minimální nebo žádné změny struktury nanovláknenné vrstvy nosiče biomasy.

Změny struktury nanovláknenné vrstvy byly hodnoceny na základě snímků pořízených optickým a elektronovým mikroskopem. Nejvýznamnější strukturální změna byla zjištěna u nosičů po sterilizaci párou (v autoklávu) a ozonem v destilované vodě i v suchém stavu. Minimální poškození nanovláknenné vrstvy bylo zaznamenáno u metody sterilizace ultrazvukem v destilované vodě i v suchém stavu, UV zářením, etanolem, roztokem oxidu chloričitého a peroxidem vodíku.

První metodou hodnocení sterility nanovláknenné vrstvy byly kultivační mikrobiologické metody. Nulový počet kultivovatelných mikroorganismů byl zjištěn u nanovláknenných nosičů, které byly sterilizovány autoklávem a ozonem v obou stavech, UV zářením, roztokem oxidu chloričitého a peroxidem vodíku.

Druhou metodou byly molekulárně genetické metody pro zjištění přítomnosti kultivovatelných i nekultivovatelných mikroorganismů. Na základě Ct hodnot se jako nejefektivnější metoda sterilizace jevila sterilizace autoklávem v suchém i mokřém stavu. Nejnižší koncentrace DNA byly detekované na nanovláknenných nosičích po sterilizaci autoklávem, etanolem a peroxidem vodíku.

Po porovnání všech sterilizačních metod na základě stanovených výsledků bylo již možné provést konečné hodnocení. Jako nejefektivnější byla z provedených metod vyhodnocena sterilizace peroxidem vodíku. Kombinace sterilizačního účinku a vlivu na nanovláknennou vrstvu zde byla na základě podmínek uvedených v úvodu tohoto závěru nejvhodnější.

Výzkum v této oblasti bude i nadále pokračovat. Sterilizace peroxidem vodíku byla sice v rámci práce stanovena jako nejvhodnější, ovšem Ct hodnoty detekované u této metody by měly ideálně nabývat ještě vyšších hodnot. Pokračování výzkumu by mělo zahrnovat opakované provedení sterilizačních metod, případné zařazení dalších metod či jejich vzájemných kombinací za různých podmínek.

## Seznam literatury

AHERN, Kevin, Indira RAJAGOPAL a Taralyn TAN, 2016. *Biochemistry Free For All* [online]. 2016. Dostupné

z: <http://biochem.science.oregonstate.edu/files/biochem/ahern/Biochemistry%20Free%20for%20All%20Final.compressed.pdf>

ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, David MORGAN, Martin RAFF, Keith ROBERTS, Peter WALTER, John WILSON a Tim HUNT, 2015. *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group. ISBN 978-0-8153-4432-2.

AMANN, R. I., W. LUDWIG a K. H. SCHLEIFER, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **59**(1), 143–169. ISSN 0146-0749.

BAUME, A.S., P.C. BOUGHTON, N.V. COLEMAN a A.J. RUYS, 2016. Sterilization of tissue scaffolds. In: *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds* [online]. B.m.: Elsevier, s. 225–244 [vid. 2019-01-18]. ISBN 978-1-78242-087-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-78242-087-3.00010-9

BLEVINS, Steve M. a Michael S. BRONZE, 2010. Robert Koch and the „golden age“ of bacteriology [online]. (9), 14, 744–751. ISSN 1201-9712. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijid.2009.12.003

BMT MEDICAL TECHNOLOGY S.R.O., 2019. Historie BMT Medical Technology s.r.o. *BMT* [online]. Dostupné z: <https://www.bmt.cz/historie-bmt-medical-technology-sro>

BRUCHANOV, Martin, 2005. *Fyzikální metody v medicíně II.* [online]. 2005. Dostupné z: [http://bruxy.regnet.cz/fel/02FM1/plazmova\\_sterilizace.pdf](http://bruxy.regnet.cz/fel/02FM1/plazmova_sterilizace.pdf)

DVOŘÁKOVÁ, Hana, 2012. *Využití plazmatu pro sterilizaci.* Brno. Masarykova univerzita.

FRAGA, Dean, Tea MEULIA a Steven FENSTER, 2014. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* [online]. **8**(1), 10.3.1-10.3.40. ISSN 1948-3430. Dostupné z: doi:10.1002/9780470089941.et1003s08

GRAY, J. P. a R. P. HERWIG, 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(11), 4049–4059. ISSN 0099-2240, 1098-5336.

HOLBEN, William E., Janet K. JANSSON, Barry K. CHELM a James M. TIEDJE, 1988. DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(3), 703–711. ISSN 0099-2240, 1098-5336.

JANDA, Václav, Pavel PECH a Martina PECHOVÁ, 2004. Disinfection of water and its undesirable by-products. *Kvasný Průmysl* [online]. **50**(11), 335–340. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2004022

KŘIKLAVOVÁ, Lucie, Tomáš DUB a Tomáš LEDERER, 2010. THE USE OF NANOFIBER CARRIERS FOR BIOLOGICAL TREATMENT OF GROUNDWATER CONTAMINATED WITH PHENOLS. 7.

LABGUIDE.CZ, 2014. *LabGuide.cz – Průvodce laboratoří* [online] [vid. 2019-04-02]. Dostupné z: <https://labguide.cz/>

MAŠKOVÁ, Vendula, 2015. *Zhodnocení metod, postupů a účinností sterilizačních technik zdravotnických materiálů* [online]. Liberec. Technická univerzita v Liberci. Dostupné z: [http://knihovna-opac.tul.cz/diplomovaPrace.php?id\\_dipl=31510](http://knihovna-opac.tul.cz/diplomovaPrace.php?id_dipl=31510)

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ, 2019. *Genetika zvířat* [online] [vid. 2019-04-23]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/print.php?page=1485&typ=html](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1485&typ=html)

NAITO, Shigezo a Hirofumi TAKAHARA, 2006. Ozone Contribution in Food Industry in Japan. *Ozone: Science & Engineering* [online]. **28**(6), 425–429. ISSN 0191-9512. Dostupné z: doi:10.1080/01919510600987347

OGRAM, Andrew, Gary S. SAYLER a Tamar BARKAY, 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **7**(2), 57–66. ISSN 0167-7012. Dostupné z: doi:10.1016/0167-7012(87)90025-X

PABINGER, Stephan, Stefan RÖDIGER, Albert KRIEGNER, Klemens VIERLINGER a Andreas WEINHÄUSEL, 2014. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomolecular Detection and Quantification* [online]. **1**(1), 23–33. ISSN 2214-7535. Dostupné z: doi:10.1016/j.bdq.2014.08.002

PICARD, C., C. PONSONNET, E. PAGET, X. NESME a P. SIMONET, 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(9), 2717–2722. ISSN 0099-2240, 1098-5336.

PITCHER, D. G., N. A. SAUNDERS a R. J. OWEN, 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* [online]. **8**(4), 151–156. ISSN 1472-765X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x

PODSTATOVÁ, Hana, 2005. Nové vademecum sterilizace. **2011**(1), 4–7. ISSN 1802-0542.

PORTEOUS, L. Arlene a John L. ARMSTRONG, 1991. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method. *Current Microbiology* [online]. **22**(6), 345–348. ISSN 1432-0991. Dostupné z: doi:10.1007/BF02092152

ROOSE-AMSALEG, C. L., E GARNIER-SILLAM a M HARRY, 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology* [online]. **18**(1), 47–60. ISSN 0929-1393. Dostupné z: doi:10.1016/S0929-1393(01)00149-4

SANDLE, Tim, 2013. *Sterility, sterilisation and sterility assurance for pharmaceuticals* [online]. B.m.: Woodhead Publishing Limited [vid. 2018-10-29]. ISBN 978-1-907568-38-1. Dostupné z: doi:10.1533/9781908818638

SİLİNDİR, Mine a A Yekta ÖZER, 2009. Sterilization Methods and the Comparison of E-Beam Sterilization with Gamma Radiation Sterilization. 12.

ŠTENCL, Jiří, 2013. *Balení potravin* [online]. Brno. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/13-BP\\_e-opora2.pdf](https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/13-BP_e-opora2.pdf)

THERMO FISHER, 2019. PCR Basics. *Thermo Fisher* [online] [vid. 2019-04-23]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>

TS03 INC., 2013. Způsob sterilizace. Québec, 2601979. 12. červen 2013.

TSAI, Y. L. a B. H. OLSON, 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(4), 1070–1074. ISSN 0099-2240, 1098-5336.

TSAI, Yu-Li, Marie J. PARK a Betty H. OLSON, 1991. Rapid Method for Direct Extraction of mRNA from Seeded Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(3), 765–768. ISSN 0099-2240, 1098-5336.

TWINOXIDE, 2019. *TwinOxide – TwinOxide Česká Republika* [online]. [vid. 2019-02-22]. Dostupné z: <https://twinoxide.cz/>

VOLOSSIOUK, T., E. J. ROBB a R. N. NAZAR, 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(11), 3972–3976. ISSN 0099-2240, 1098-5336.

ZÁKON Č. 306/2012 SB., 2012. *306/2012 Sb. Vyhláška o podmínkách předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a o hygienických požadavcích...* [online]. 2012. [vid. 2019-03-01]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2012-306>

ZHAO, Lingzhou, Shenglin MEI, Wei WANG, Paul K. CHU, Zhifen WU a Yumei ZHANG, 2010. The role of sterilization in the cytocompatibility of titania nanotubes. *Biomaterials* [online]. **31**(8), 2055–2063. ISSN 0142-9612. Dostupné z: [doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.103](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.103)