



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# VLIV ANTIBAKTERIÁLNÍCH NANOMATERIÁLŮ NA VZNIK BAKTERIÁLNÍ REZISTENCE

INFLUENCE OF ANTIBACTERIAL NANOMATERIALS ON THE DEVELOPMENT OF BACTERIAL  
RESISTANCE

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Daniela Bábíková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Kristýna Šmerková, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1500/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Daniela Bábíková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Kristýna Šmerková, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Vliv antibakteriálních nanomateriálů na vznik bakteriální rezistence

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Rešerše na testování antimikrobiální aktivity.
- 2) Testování antibakteriální aktivity ZnO a nanočástic ZnO.
- 3) Stanovení minimální inhibiční koncentrace u vybraných bakteriálních kmenů.
- 4) Sledování vzniku rezistence vůči dvěma formám zinku.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

-----  
Daniela Bábíková  
student(ka)

-----  
Ing. Kristýna Šmerková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Bakteriální rezistence vůči antibiotikům je již dlouhá léta diskutovaným problémem. Antibiotika jsou používána v zemědělské prvovýrobě, konkrétně v chovu prasat. Vysoká koncentrace zinku se však dostává do půdního prostředí ve formě vedlejších zemědělských produktů. Dávky zinku působí na střevní bakterie prasat, ale i na mikroorganismy v prostředí a mohou vést ke vzniku rezistence vůči kovům, ale právě i vůči antibiotikům. Předložená práce se zabývá vlivem ZnO a nově používaných nanočástic (ZnO NPs) na bakterie *S. aureus*, methicilin-rezistentní *S. aureus* a *E. coli*. Získaná data této práce poukazují na vliv ZnO ve zvyšování minimální inhibiční koncentrace antibiotik a také na vznik rezistence u *E. coli*. Na základě biochemických testů byl také potvrzen efekt na změnu metabolických drah bakterií reagující s vybranými substráty. Opakovaná subkultivace bakterií s testovanými ZnO a ZnO NPs má zásadní dopad na citlivost bakterií k antibiotikům a mění i biochemické dráhy. Studie zabývající se problematikou dlouhodobého vlivu ošetřujících látek jsou zásadní pro vývoj moderních antibakteriálních složek.

## ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics is a long-discussed problem. The use of antibiotics in primary agricultural production, especially in pig breeding. High levels of zinc subsequently seeps into the soil in the form of secondary agricultural products. Doses of effect the intestinal bacteria of pigs, but also the microorganisms in the environment which can subsequently lead to the development of resistance to metals also antibiotics. This thesis deals with the effect of ZnO and newly used nanoparticles (ZnO NPs) on bacteria *S. aureus*, methicilin-resistant *S. aureus* and *E. coli*. Acquired data point to the effect of ZnO on minimal inhibition concentration of antibiotics and the development of resistance in *E. coli*. Based on biochemical tests, the change of metabolic pathways reacting with selected substrates was confirmed. Repeated subculture of bacteria with tested ZnO and ZnO NPs has on the susceptibility of bacteria to antibiotics and changes their biochemical pathways. Studies dealing with the issue of long-term effect on medicinal substances are essential for the development of modern antibacterial components.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Rezistence, oxid zinečnatý, nanočástice, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*.

## KEY WORDS

Resistance, zinc oxide, nanoparticles, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

BÁBÍKOVÁ, Daniela. *Vliv antibakteriálních nanomateriálů na vznik bakteriální rezistence*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/125217>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Kristýna Šmerková.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
Podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Kristýně Šmerkové, Ph.D. za umožnění měření na Mendelově univerzitě. Velké díky patří taktéž Ing. Kristýně Doležalíkové, Ph.D. za všechny rady při psaní teoretické části a za vedení celé experimentální části. Děkuji i všem ostatním, kteří mě v průběhu psaní bakalářské práce podporovali.

Obsah	
1 ÚVOD .....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Bakterie jako původci infekčních onemocnění.....	8
2.1.1 Významní zástupci bakteriálních infekcí.....	8
2.1.2 Antibiotická léčba bakteriální infekce .....	10
2.1.3 Vznik antibiotické rezistence u vybraných infekčních druhů.....	11
2.1.4 Četnost výskytu rezistence u infekčních onemocnění .....	14
2.2 Moderní komponenty pro léčbu bakteriální infekce.....	17
2.2.1 Nanotechnologie .....	17
2.2.2 Účinek nanočástic na bakteriální buňku .....	18
2.2.3 Vznik rezistence bakterií na vybrané kovy .....	20
2.3 Metabolismus bakterií .....	21
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
3.1 Použité mikroorganismy .....	22
3.2 Použité přístroje a pomůcky .....	22
3.3 Použitá media a chemikálie .....	22
3.3.1 MilliQ voda.....	22
3.3.2 Krevní agar .....	22
3.3.3 Mueller-Hinton médium .....	22
3.3.4 Kryomédium .....	23
3.3.5 DMSO .....	23
3.3.6 Testovaný materiál.....	23
3.4 Příprava roztoků ZnO a ZnO NPs .....	23
3.5 Příprava bakterií.....	23
3.6 Stanovení minimální inhibiční koncentrace .....	23
3.7 Vliv rozpouštědla DMSO na mikroorganismy .....	24
3.8 Opakovaná subkultivace bakterií.....	24
3.9 BD Phoenix M50 .....	24
3.10 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF .....	24
4 VÝSLEDKY A DISKUZE .....	26
4.1 Vliv DMSO na testované mikroorganismy .....	26
4.2 Opakovaná kultivace bakterií se subletálními koncentracemi ZnO a ZnO NPs .....	27

4.3 Test citlivosti bakterií k antibiotikům po subkultivaci se ZnO a ZnO NPs.....	29
4.3.1 <i>S. aureus</i> .....	29
4.3.2 MRSA .....	31
4.3.3 <i>E. coli</i> .....	33
4.4 Vliv zátěže ZnO a ZnO NPs na metabolismus bakterií .....	36
4.4.1 <i>S. aureus</i> .....	36
4.4.2 MRSA .....	38
4.4.3 <i>E. coli</i> .....	40
4.5 Změny v proteomice .....	42
4.6 Identifikace mikroorganismů vystavených účinkům ZnO a ZnO NPs.....	42
5 ZÁVĚR.....	44
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	45
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	52
8 PŘÍLOHY .....	53
8.1 Hmotnostní spektra.....	53

# 1 ÚVOD

Časté a opakované užívání léčiv (antibiotik či jiných ošetřujících látek) má vždy dopad na živé organismy v přírodě. Rozsáhlé nadužívání i nesprávné používání antibiotik vede k nezamýšleným důsledkům, které vyžadují rozsáhlé změny antibiotické politiky s cílem zmírnění užívání. V současnosti je evoluce mikrobiálních patogenů schopných odolávat léčbě antibiotiky považována za jednu z nejnaléhavějších krizí v oblasti veřejného zdraví. Antibiotická rezistence představuje také finanční břemeno světové ekonomiky. Nezávisle na jejich použití v oblasti lidského zdraví se antibiotika navíc hojně používají i při produkci hospodářských zvířat.

Antibiotická rezistence způsobená uvolňováním antibiotik do životního prostředí průmyslovými výrobci a chovateli získala menší pozornost než kontrolované uvolňování antibiotik z nemocnic. Nicméně, kontaminace antibiotiky z tohoto sektoru však může být enormní.

Ačkoliv je zinek esenciálním kovovým iontem, je ve vyšších koncentracích toxický. V mikrobiálním světě převládají různé mechanismy k překonání toxicity tohoto kovu, které vedou k ovlivnění dalších mechanismů bakteriální buňky, ať už se jedná o základní metabolické cykly či vznik zkřížené antibiotické rezistence. Používání oxidu zinečnatého (ZnO) v zemědělství a jeho rozšíření v humánní medicíně i v podobě ZnO nanočástic (ZnO NPs) může mít nežádoucí dopad na mikrobiom jak ošetřeného zvířete či člověka, tak i na mikroorganismy přítomné v prostředí, které jsou také součástí koloběhu látek v přírodě. Výsledky různých studií naznačují, že kontaminace kovů přítomná v životním prostředí může vyvolat rezistenci na antibiotika u jinak antibioticky citlivých kmenů bakterií, jsou-li vystaveny různým kovům, jako je například zinek v prostředí. Tyto bakterie, když přichází do styku s lidmi nebo zvířaty, se stávají patogenními a způsobují četná onemocnění odolná vůči lékům. Existuje tedy role kovů při šíření rezistence na antibiotika mezi bakteriemi.

Zinek je hojně využíván v celé řadě procesů a produktů. Zdrojem jeho uvolňování do půdy jsou často odpadní vody z čistíren odpadních vod, odtoků ze silnic nebo hnoje a kalu živočišné výroby. Roční aplikace hnojů a kalů pocházejících z farem, kde jsou zvířata léčena ZnO, může vést ke zvyšování hladiny zinku v půdě. Postupem času povede zvyšování koncentrace zinku v půdě ke změně ekosystému, což má za následek tvorbu bakteriální rezistence na antimikrobiální látky. Tato rizika spojená s životním prostředím a veřejným zdravím by však měla být vyvážena s přínosy pro zdraví zvířat, kterým je oxid zinečnatý podáván jako VMP (veterinary medicinal product) nebo doplňková látka používaná v moderní produkci prasat. V roce 2017, vzala Evropská komise do úvahy všechny zmíněné aspekty a rozhodla o zákazu přidavku vysokých dávek ZnO do krmiv. Po přechodném pětiletém období se počítá s úplným ukončením podání do června roku 2022.

Tato studie se tedy zabývá dlouhodobým vlivem ZnO a ZnO NPs na vybrané bakterie, u kterých byla sledována v závislosti na čase změna antibiotické citlivosti a změny metabolismu vybraných substrátů využívaných v komerčních, konfirmačních soupravách. Vzhledem ke krátké generační době, jsou bakterie ideálním modelovým příkladem pro studie zátěže organismů různými léčivy.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Bakterie jako původci infekčních onemocnění

#### 2.1.1 Významní zástupci bakteriálních infekcí

Bakteriální infekce jsou způsobeny různými bakteriemi napadajícími rostliny, živočichy i houby. Člověk je významným hostitelem pro bakterie rodu *Staphylococcus*, *Escherichia* a mnoha dalších. Bakterie jsou součástí střevního traktu všech živočichů, kde se podílejí na trávení potravy, syntéze vitamínů a tvoří i část imunitního systému. Dále tvoří i kožní mikroflóru, která patří k ochraně těla před toxiny nebo cizorodými organismy. Zároveň bakterie způsobují i závažná onemocnění díky své patogenitě, která může být podmíněna stavem imunitní soustavy organismu. V současné době se bakteriální infekce berou jako časté a nijak překvapivé onemocnění. Tyto bakteriální infekce provázejí nehojící se rány, celkové poruchy imunitního systému nebo také chronické gynekologické záněty. Bývají často způsobeny bakteriemi rodu *Staphylococcus* a *Streptococcus* [1], [2].

Objevení a používání antibiotik se považuje za jeden s nejvýznamnějších milníků medicíny. V dnešní době jsou antibiotika vyráběna chemickou syntézou nebo chemickou modifikací původních struktur. Tato antibiotika se používají zejména pro léčbu a prevenci infekčních onemocnění [3].

##### 2.1.1.1 Kožní infekce

Se stafylokokovými infekcemi se setkáváme velmi často. Některé zdroje uvádějí, že stafylokokové infekce tvoří až ¼ infekcí léčených v nemocničním prostředí. Mezi hlavní druhy způsobující infekci řadíme *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*. Tyto infekce mohou svým průběhem vést až k sepsi a zdraví ohrožujícímu stavu [4].

##### *Staphylococcus aureus*

U zdravých lidí je kůže i nosohltan kolonizován druhem *S. aureus*. Řadí se tak mezi členy běžné mikrobioty a pokud lidská imunita funguje správně, nehrozí žádné nebezpečí. V případě oslabení imunity se z neškodného organismu stává přední lidský patogen. Projevuje se infekcemi kůže a měkkých tkání. V závažnějších případech může dojít až k životu ohrožujícím systémovým onemocněním. Pro upřesnění se může jednat o hnisavá onemocnění, rané pooperační a pourazové infekce, mastitidu, sepsi a další [4], [5].



### *Staphylococcus epidermidis*

Tento druh může vyvolat závažné onemocnění u zvláště citlivých jedinců. Se svým hostitelem se snaží udržovat oboustranně prospěšný vztah. Dříve byl tento druh považován za neškodný. Dnes už se o něm s jistotou ví, že se jedná o důležitý oportunistický patogen. Nyní je nejčastější příčinou nosokomiálních infekcí. Zejména *S. epidermidis* představuje nejběžnější zdroj infekcí, se kterým se setkáváme ve zdravotnických zařízeních [6], [7].

### *Staphylococcus saprophyticus*

Mezi infekce způsobené tímto stafylokokem řadíme infekce močových cest, tedy konkrétně, zánět močového měchýře u mladých žen [8].

Infekce způsobené stafylokoky se jen zřídka rozvinou v život ohrožující nemoc, nicméně jejich četnost a skutečnost, že je velmi obtížné je léčit, představují velkou zátěž pro veřejné zdraví. Odhaduje se, že náklady na léčbu infekce cév krevního řečiště šplhají až do výšky 2 miliardy dolarů ročně. Náklady zvyšuje vzrůstající rezistence *S. epidermidis* i *S. aureus* na hojně používaná antibiotika a tvorba biofilmů – strukturovaná společenstva mikroorganismů. Bakterie v biofilmech vykazují o tři řády vyšší odolnost vůči působení antibiotik než bakterie planktonické. Mikroorganismy jsou schopny své biofilmy tvořit jak na povrchu tkání, tak i na umělých materiálech jako jsou protézy a podobné kloubní či kostní náhrady [7].

#### **2.1.1.2 Střevní infekce**

Infekce tenkého a tlustého střeva může být způsobena různými bakteriemi. Infekce se projevuje jako gastroenteritida nebo enterokolitida. Do skupiny bakteriální gastroenteritidy řadíme onemocnění jako břišní tyfus způsobený bakterií *Salmonella typhi*, cholera způsobenou *Vibrio cholerae* nebo také salmonelovou enteritidu, kterou způsobuje bakterie *Salmonella enteritidis*. Tyto nemoci se projevují bolestmi břicha, zvracením a průjmy. Dalším významným mikroorganismem působící člověku a ostatním živočichům nepříjemné potíže je bakterie *Escherichia coli*. Tato bakterie způsobuje infekci především u osob se sníženou imunitou. Infekce se projevuje průjmy, horečkou a bolestí břicha [9], [10].

#### *r. Salmonella*

Salmonelová enteritida, lidově řečeno salmonelóza, je zapříčiněna bakteriemi *S. typhimurium* nebo *S. enteritidis*. Toto onemocnění se řadí k jednému z nejčastějších střevních onemocnění u dětí i dospělých. Charakteristickým projevem této infekce jsou časté průjmy, ovšem bez přítomnosti krve. Někdy se vyskytuje i horečka a zvracení. Bakterie rodu *Salmonella* jsou velmi citlivé k antibiotikům a desinfekčním látkám. V poslední době se i u této bakterie objevuje řada multirezistentních kmenů. V rámci Evropské unie, měla Česká republika v roce 2006 největší počet nakažených pacientů bakteriemi rodu *Salmonella*. V dalších letech už nárůst není tak vysoký, ale i v poslední době se řadíme na přední příčky v počtu nakažených osob v rámci EU.

Nejvyšší počty nakažených se udávají v letních měsících, zejména v srpnu. Je to způsobeno vyššími teplotami, při kterých se této bakterii daří a mají vhodné podmínky pro pomnožení v rizikových potravinách [11], [12].

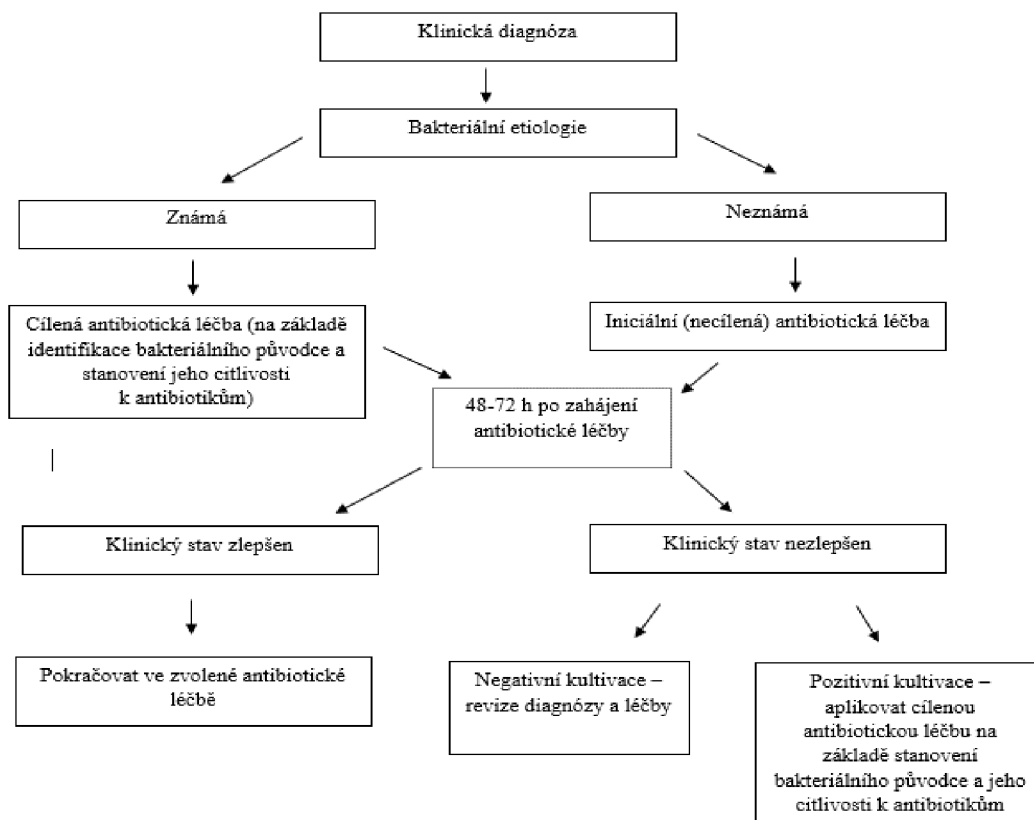
### *Escherichia coli*

Tato bakterie se běžně vyskytuje v trávicím ústrojí teplokrevných živočichů. V lidském těle se bakterie *E. coli* řadí k významným mikroorganismům střevní mikroflóry. Bakterie žijící ve střevech jsou důležitou součástí trávicích pochodů. Mezi další významné funkce řadíme jejich stimulaci imunitního systému, udržení střevní bariérové funkce a výživu sliznice trávicí trubice. Bakterie *E. coli* se podílí na syntéze vitamínu K, který je potřebný ke správné srážlivosti krve. Bakterie se může také vyskytovat v mase a mléce [13], [14].

Některé sérotypy *E. coli* patří k patogenům způsobující krvavé průjmy. Toto onemocnění nepatří mezi život ohrožující, ale jsou známy i případy, které skončily smrtí. Bakterie způsobuje dva typy onemocnění. První se řadí do skupiny extraintestinální, kam patří například onemocnění močových cest nebo infekce ran. Druhý typ se označuje jako intestinální infekce a je doprovázen průjmy. Účinnou prevencí proti těmto onemocněním se ukázalo užívání probiotik. V chovech hospodářských zvířat, zejména v chovech selat, snižuje výskyt průjmů způsobených enterohemoragickými *E. coli* produkci, a tak byla zejména do krmiv po odstavu selat přidávána antibiotika a v posledních letech, pro své antibakteriální účinky, oxid zinečnatý (ZnO) [13], **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**

### **2.1.2 Antibiotická léčba bakteriální infekce**

V dnešní době se považuje předepisování antibiotik na bakteriální infekci jako rutinní záležitost. Při této skutečnosti se však setkáváme s velmi závažnými následky ve formě bakteriální rezistence a tím i selháváním další antibiotické léčby. Jednou z nejčastěji diskutovaných možností v souvislosti s regulací zvyšování bakteriální rezistence, a s tím související problémy v léčbě onemocnění vyvolaných multirezistentními kmeny, je jednoznačně racionální užívání a předepisování antibiotik (*Obrázek 1*) [16].



Obrázek 1: Obecný algoritmus léčebného postupu bakteriálních onemocnění [16]

### 2.1.2.1 Důsledky antibiotické léčby

Antibiotická léčba nemá jen dopad v podobě vzniku bakteriální rezistence. Negativním dopadem užíváním antibiotik je i jejich koloběh v přírodě. Příkladem toho nám může být asijské znečištění jezer. Takto kontaminovaná voda je domovem mnoha živočichů, kteří se buď postupem času vodě přizpůsobí, nebo zemřou. Kontaminace těchto jezer je připisována odpadním vodám z čistíren odpadních vod. Ve vodách jezer se v největších koncentracích nacházejí látky sulfadiazin a sulfamethoxazol [17].

### 2.1.3 Vznik antibiotické rezistence u vybraných infekčních druhů

Pod pojmem rezistence rozumíme odolnost bakterie vůči antibakteriální látce, které je vystavena, tady antibiotikům. Máme ovšem dvě definice rezistence [18].

Klinická definice: „Původce infekce je rezistentní, je-li koncentrace antibiotik potřebná k jeho inhibici větší než hraniční koncentrace“ [19].

Genetická definice: „Kmen obsahuje geny rezistence k jednomu nebo více antibiotik, nemusí jít o rezistenci klinickou“ [19].

V současné době se o vzniku bakteriální rezistence vůči antibiotické látce hovoří jako o velkém problému, jak z hlediska medicínského, tak z hlediska vztahu k životnímu prostředí a zemědělství. Začne-li bakterie odolávat látce, na kterou byla původně citlivá, setkáváme se problémem bakteriální rezistence. S největší hrozbou bakteriální rezistence se setkáváme ve zdravotnictví. Zde se bavíme o bakteriích způsobující infekční onemocnění, které se ve většině případů řeší nasazením antibiotik. Je tedy na místě být obezřetní k užívání a předepisování antibiotik, aby nedošlo k vytvoření rezistence [18], [20].

### **2.1.3.1 Druhy bakteriální rezistence**

#### *Primární rezistence*

Primární rezistence je geneticky podmíněná necitlivost bakterie na dané antibiotikum bez předchozího kontaktu. To je umožněno chybějícím zásahovým místem v organismu bakterie pro dané antibiotikum. Odvíjí se od druhu a vlastností dané bakterie. Vykazuje-li jeden kmen daného druhu primární rezistenci, budou všechny kmeny daného druhu rezistentní. Jako příklad primární rezistence můžeme považovat některé gramnegativní bakterie, které jsou méně citlivé vůči působení penicilinu oproti grampozitivním bakteriím [20]. Například zástupce rodu *Mollicutes* jsou přirozeně odolní vůči beta-laktamovým antibiotikům. Tuto odolnost bakterie získala díky chybějící buněčné stěně, která je nahrazena třívrstvou membránou skládající se z bílkovin, fosfolipidu a cholesterolu [21].

#### *Sekundární rezistence*

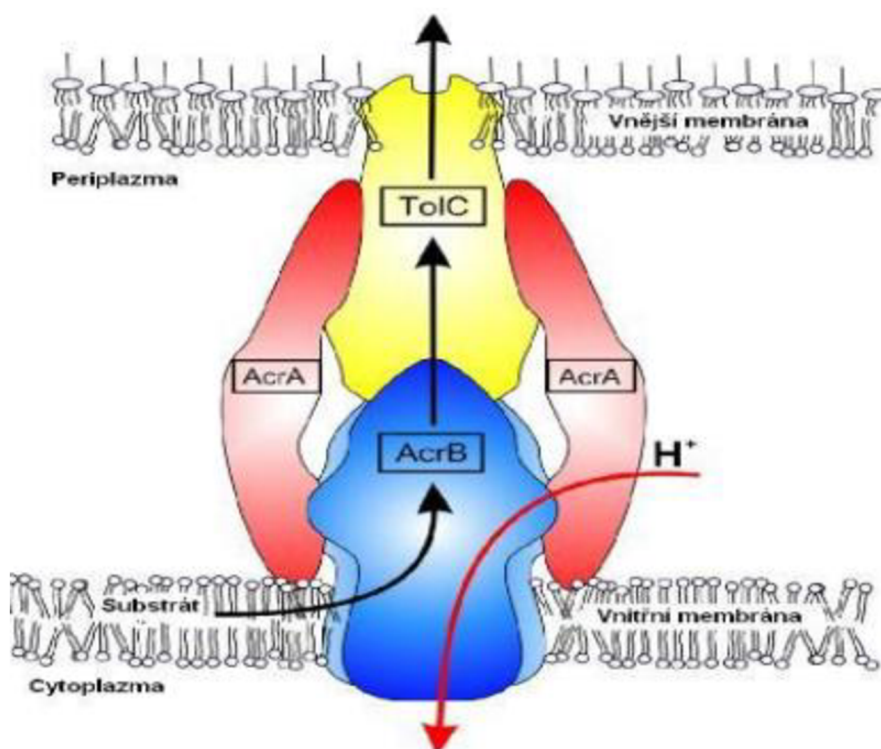
Sekundární rezistenci si organismus bakterie vytvoří v důsledku antibiotické terapie. Tuto terapii vnímáme jako vystavení bakterie pravidelným dávkám antibiotika, v delším časovém horizontu. Získaná rezistence vzniká sekundárním tlakem prostředí a je způsobena mutacemi genů na bakteriálním chromozomu nebo na plazmidu. Pokud by se organismus nepřizpůsobil, nastala by jeho smrt. Tato schopnost je přisuzována přítomnosti bioaktivních látek. V Evropské unii za poslední roky tento druh antibakteriální rezistence vzrostl v rozmezí od 10 % do 50 % [22], [23].

### **2.1.3.2 Mechanismus vzniku rezistence u bakterií**

Mechanismus vzniku rezistence se odvíjí od druhu bakterie a použitého antibiotika. Mezi projevy bakteriální rezistence na antibiotika řadíme změny v propustnosti antibiotik do buňky, změnu cílových molekul, enzymatické odbourání antibiotik a bakteriální efflux [24].

## Bakteriální efflux

Jako jedna z nejčastějších forem vzniku rezistence se považuje bakteriální efflux, který známe jako effluxní pumpu u bakterií. Tento protein je schopen odčerpát z bakteriální buňky například antibiotickou látku, ale také desinfekční prostředky. Tento proces je způsoben proteinem rezistentních bakteriálních kmenů. Jedním z nejznámějších proteinů s takovou funkcí je P-glykoprotein. Jako pohon effluxních pump zde funguje proteinový gradient na membráně. Antibiotická látka je z bakterie odčerpávána sekundárním transportem. Do cytoplasmy přichází proton a v opačném směru odchází antibiotická látka. Nejvíce informací máme o effluxní pumpě AcrAB-TolC u bakterie *E. coli* (Obrázek 2). Tato pumpa se řadí do skupiny RND (resistance-nodulation-division). RND skupina se vyznačuje širokou substrátovou specifitou. Umí rozeznat kromě antibiotické látky také barviva, detergenty nebo biocidní látky. Tato effluxní pumpa je soubor tří za sebou jdoucích proteinů procházející napříč buněčnou stěnou. První protein IEP (inner membrane efflux protein) AcrB zachytává substrát ve fosfolipidové dvojvrstvě, který dále předá proteinu OEP (outer membrane efflux protein) TolC ke konečnému vyloučení ven. Spolupráci mezi oběma proteiny zajišťuje přídatný protein PEN (periplasmic efflux protein) AcrA [23], [25], [26].



Obrázek 2: Effluxní pumpa u bakterie *E. coli* [26]

### **2.1.3.3 Rezistence u bakterií *E. coli* a *S. aureus***

Bavíme-li se o vzniku rezistence v souvislosti s *E. coli*, izolované z lidského pacienta, můžeme s jistotou říci, že největší podíl má nadužívání antibiotik. Může se jednat například o fluorochinoliny, antibiotika podávaná při léčbě močových cest, proti kterým si je *E. coli* schopna postupem času vytvořit rezistenci. Takto odolná bakterie se může bez problémů šířit mezi dalšími lidmi [19], [27].

V dnešní době je téměř 40 % bakterií rodu *Staphylococcus* odolných vůči penicilinu a toto číslo stále narůstá. Odolnost vůči často předepisovaným beta-laktamovým antibiotikům je důvodem vývoje stále nových antibakteriálních látek. Prognózy zabývající se stafylokokovou infekcí uvádějí, že za pár desítek let bude možné léčit tyto infekce pouze vankomycinem. Současná skutečnost ovšem je, že se už objevily izoláty *S. aureus* s rezistencí na vankomycin [28].

### **2.1.3.4 Důsledky bakteriální rezistence**

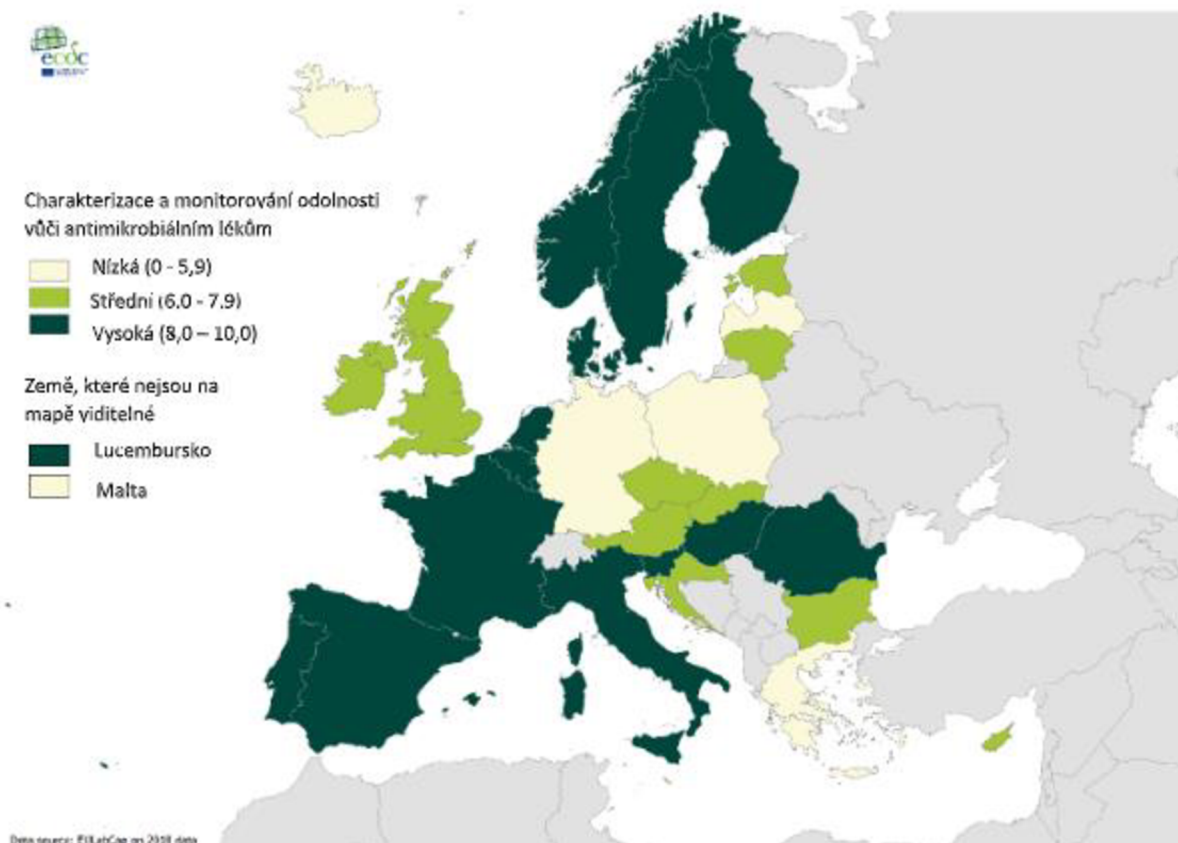
Bakteriální rezistence na antibiotika má své důsledky, mezi které patří riziko selhání antibiotické léčby. S tím jsou spojeny vyšší ekonomické náklady na léčbu a také prodloužení délky hospitalizace nemocného pacienta. Rezistentní bakterie dokáží přetrvat v lidském organismu i více než šest měsíců, aniž by se jakkoliv projeví. Organismus se tak stává nosičem rezistentních bakterií. Takový organismus je náchylnější ke vzniku infekce. Infekce způsobená rezistentní bakterií může v lidském organismu vyvolat sepsi neboli otravu krve, což je způsobeno neadekvátní odpovědí organismu na infekci. V konečném důsledku to může znamenat nevratná poškození nervové soustavy nebo i smrt pacienta [29], [30].

### **2.1.4 Četnost výskytu rezistence u infekčních onemocnění**

Již od roku 1998 je zaveden systém pro pravidelné sledování bakteriální rezistence a je využíván ve většině evropských států. Data o rezistentních bakteriích vyskytujících se v Evropě jsou shromažďována díky organizaci Evropské sítě pro dohled nad antimikrobiální rezistencí, můžeme se s ní také setkat se zkratkou EARS-Net (*Obrázek 3*) [31].

Pro Evropu jsou uveřejněna konkrétní data vyplývající ze sledování bakteriální citlivosti sedmi bakteriálních patogenů způsobujících infekce u lidí. Mezi tyto patogeny patří *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, některé druhy *Acinetobacter*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* [31].

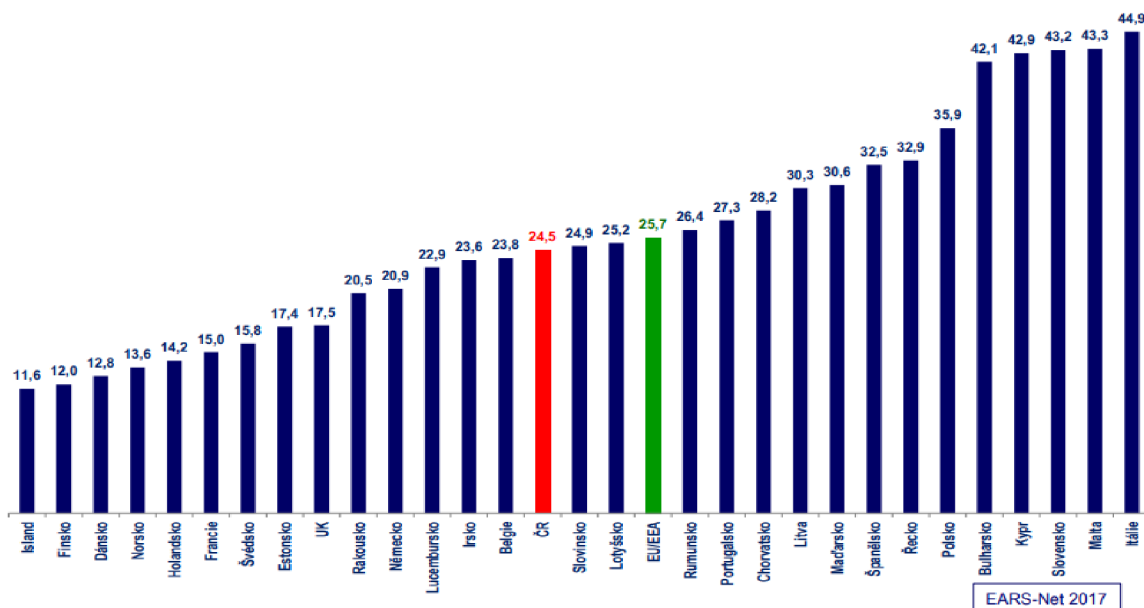
Přesná charakterizace a sledování antimikrobiální rezistence v populacích lidí je potřebná pro účely celoevropského dozoru, který informuje o opatřeních v oblasti veřejného zdraví s cílem zamezit mezinárodnímu přenosu patogenů odolných vůči více druhům léčiva [31].



Obrázek 3: Míra zmapovaných charakteristik a monitoringu rezistentních bakterií v jednotlivých zemích Evropy pro rok 2018 [31]

#### 2.1.4.1 Rezistence bakterie *E. coli* k fluorochinolinům v Evropě a v ČR

Antibiotika na bázi fluorochinolinů se v Evropě začaly hojně používat koncem 80. let 20. století. Rezistenci vykazují bakterie ze skupiny gramnegativních bakterií jako je například zmiňovaná bakterie *E. coli*, která způsobuje záněty močových cest. Jak je ukázáno na Obrázku 4, mezi Evropskými zeměmi jsou značné rozdíly. S nejnižším procentem bakterií rezistentních na fluorochinoliny se potýkají severské země. Naopak nejvyšší procenta hlásí Itálie a Malta. Bakteriální infekce způsobené bakterií *E. coli* v České republice jsou v 50 % případů rezistentní na fluorochinoliny. Podobných hodnot dosahují také bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae*. Toto číslo je v posledních deseti letech relativně konstantní. Česká republika patří v Evropě mezi země s vysokou rezistencí k fluorochinolonům [18], [31].



Obrázek 4: Rezistence bakterie *E. coli* k fluorochinolinům (%) v Evropě [31]

#### 2.1.4.2 Rezistence bakterie *S. aureus* v Evropě a v ČR

Dle dat shromážděných organizací EARS-Net se výskyt rezistentních bakterií *S. aureus* v evropských státech pohybuje od 1 do 50 %. Nejnižší četnost výskytu je v severských státech, jako je Norsko, Dánsko nebo Švédsko. Naopak nejvyšší výskyt zaznamenávají státy v oblasti středoziemního moře. Od začátku sledování v roce 1998 vzrostla prevalence *S. aureus* v České republice trojnásobně (z 3,8 % v roce 2000 až na 12,8 % v roce 2005). Kvůli velkým nárůstům rezistence byly zaváděny mnohá opatření ve většině evropských států. Díky tomu se evropský průměr, který měl v roce 2012 hodnotu 18,8 %, snížil a v roce 2017 na 16,8 %. V České republice se podíl rezistentních *S. aureus* prakticky nezměnil a od roku 2005 zůstává okolo 13 % [32].



## **2.2 Moderní komponenty pro léčbu bakteriálních infekcí**

### **2.2.1 Nanotechnologie**

Nanotechnologie v dnešní době zasahují do širokého spektra odvětví. Ať už mluvíme o uhlíkových nanotrubicích ve strojírenství nebo o nanovlákních v oděvním průmyslu, jedno mají společné – rozměr nano. Mluvíme-li o nanorozměrech pohybujeme v rozměrech jedné miliardtiny metru -  $10^{-9}$  m [33].

#### **2.2.1.1 Historie nanotechnologií**

Teoretická historie nanotechnologií se začala psát již ve 4. století, kdy Řekové vyráběli poháry obohacené práškovým kovem. Nedávno bylo prokázáno, že ve struktuře pohárů jsou přítomny částice o velikosti nanorozměru. První poznatky o nanotechnologiích přinesl v roce 1959 americký profesor teoretické fyziky Richard Phillips Feynman ve své přednášce “There’s Plenty of Room at the Bottom” („Tam dole je spousta místa“). V nadcházejících desítkách let byly objeveny nové metody mikroskopie a tím se lidé mohli ještě více přiblížit do nanosvětla. Od počátku 90. let se začalo s experimenty s nanomateriály, které pokračují dodnes [34].

#### **2.2.1.2 Rozdělení nanotechnologií**

Každá publikace rozděluje nanotechnologie trochu jiným způsobem. Nejčastěji se setkáváme s rozdělením do osmi hlavních skupin. První skupinou jsou nanomateriály, pod které spadají nanoprášky a nanočástice. Druhá skupina nese název nanotechnologie pro ukládání a přenos informací, makro a nanoelektronika. Do této skupiny patří nanofotonika, magnetické materiály, bioelektronika, MEMS (micro-Electro-Mechanical Systems) a NEMS (nano-Electro-Mechanical Systems). Třetí skupina se zaměřuje na nanobiotechnologii a nanomedicínu, pod které spadá zapouzdření léků, tkáňové inženýrství, analýza DNA a také biokompatibilní materiály a vrstvy. Čtvrtá skupina se zabývá nanotechnologií pro aplikaci v senzorech. Pátá skupina má označení nanotechnologie pro chemické technologie a zpracování a sem jsou zařazeny filtrace, membrány, molekulová síta a také elektrody s nanostrukturními povrchy. Šestá skupina se zabývá dlouhodobým výzkumem se širokou aplikací. Do této skupiny se řadí kvantová fyzika, kvantové jevy v nanorozměrech, nanofyzika a ultra-precizní inženýrství. Sedmá skupina se zaměřuje na přístroje, zařízení a výzkum. Tato oblast zahrnuje analytické přístroje, výrobu nanoprášků a také ultra-precizní obrábění a nanometrologii. Poslední skupina zahrnuje zdravotní, ekologické a sociální aspekty nanotechnologií [33], [35].

### 2.2.1.3 Nanotechnologie v medicíně

V posledních letech se nanotechnologie uplatňují v medicíně stále častěji. Nanomedicína propojuje medicínu, strojírenství, chemii, materiálové inženýrství a farmakologii v jeden velký celek. Velká budoucnost je stále v nanofarmakologii. Nanoléčiva mohou lépe cílit a působit v potřebných místech. Na bázi nanočástic bylo pro klinické účely schváleno pouze malé množství léků. Jako první nanoléčivo bylo schváleno FDA (Food and Drug Administration) v r. 1995 léčivo s názvem Doxil. Léčivo obsahuje látku doxorubicin. Dnes se tyto léky používají při léčbě karcinomu prsu. Od roku 1995 do roku 2017 schválilo FDA používání 50 nanoléčiv. Celý obor nanomedicíny je v počátcích a většina výzkumů zůstává stále v laboratorní fázi [36].

### 2.2.1.4 Možná rizika využívání nanotechnologií

Nanotechnologie pro nás přináší obrovské množství využití. V medicíně se setkáváme s využitím u lékařské diagnostiky, regenerace tkání nebo u syntézy léčiv a s ním spojený jejich transport na cílené místo. Tyto klady lze ale vyvážit průnikem nebezpečných nanočástic do buněk nebo nebiokompatibilních nanostruktur. Stále výraznější používání nanomateriálů vstupuje i do životního prostředí. Musíme mít na paměti, že nanomateriály představují riziko jak pro pevninskou vodu, ale také pro moře a oceány [37], [38].

Rizika spojená s nanotechnologiemi můžeme rozdělit do 4 skupin [38].

1. Zdravotní aspekty — vliv částic na lidské tělo
2. Environmentální riziko — částice ohrožující životní prostředí zejména ve vodě a půdě
3. Společenské hledisko — pohled společnosti na rychle se rozvíjející odvětví
4. „Grey-goo“ — specifická rizika, která jsou spojena se spekulativními vizemi o molekulární nanotechnologii

## 2.2.2 Účinek nanočástic na bakteriální buňku

### 2.2.2.1 Antibakteriální vlastnosti nanočástic oxidu zinečnatého

Nanočástice oxidu zinečnatého nachází své uplatnění v potravinářství, medicíně a mnoha dalších odvětvích s rizikem šíření bakteriálních nákaz. Použití nanočástic oxidu zinečnatého představuje slibnou alternativu k chemickým konzervantům. Díky jejich antibakteriální a slunečné ochraně se stává součástí opalovacích krémů a antibakteriálních gelů. Účinnost nezávisí jen na koncentraci částic, ale také na jejich modifikaci, disperzitě a jejich velikosti. ZnO NPs vykazují selektivní toxicitu vůči bakteriím (např. *S. aureus*, *Bacillus subtilis*) a plísním (např. *Aspergillus*) a mají minimální vliv na lidské buňky. Antibakteriální aktivita souvisí s jejich velikostí. Menší částice vykazují lepší výsledky i díky jejich specifitějšímu povrchu. Aktivita je částečně závislá i na tvaru a krystalové struktuře nanočástic [39], [40], [41].

### 2.2.2.2 Mechanismus působení nanočástic zinku

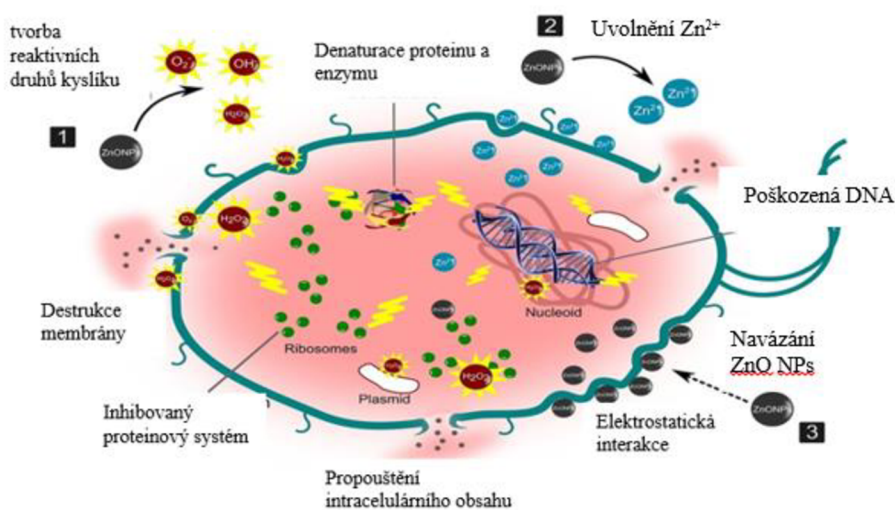
V ZnO NPs nacházíme významný potenciál, oproti jiným kovovým nanočásticím jsou levné, silně aktivní i v malém množství a pro člověka jsou méně toxické. Nanočástice mají oproti ZnO větší antibakteriální aktivitu, což je způsobeno nanorozměry a povrchovým napětím, díky kterým je umožněna lepší interakce s bakterií. Přítomnost oxidu zinečnatého u bakterie *S. aureus* způsobuje vyšší citlivost na vankomycin. Ještě lepší antimikrobiální vlastnosti vykazují ZnO NPs při použití s enzymem pankreatinem, který eliminuje toxické vlastnosti zinku [42], [43].

Přestože o nanočásticích zinku už víme poměrně mnoho informací, přesný mechanismus účinku ještě není zcela objasněn. Předpokládá se, že ZnO NPs cílí na buněčnou stěnu bakterie, což vede k oxidativnímu poškození buňky a celkovému narušení její činnosti. Úplné protržení buněčné membrány vede k hlubšímu kontaktu se ZnO NPs a následné inhibici růstu buněk [42].

Ještě není zcela objasněno, jakou roli hrají  $Zn^{2+}$  ionty. Předpokládá se, že navázáním  $Zn^{2+}$  iontů na membránu mikroorganismu se prodlouží lag fáze růstového cyklu [44].

Předpokládá se, že antibakteriální vlastnosti by mohli mít souvislost s fotokatalytickou aktivitou. ZnO je schopen absorbovat UV i viditelné světlo, které způsobuje oddělení náboje, vytvoření  $h^+$  v pásnu valence a  $e^-$  v pásnu vodivosti. Na povrchu ZnO vznikají volné hydroxylové radikály  $OH\cdot$ . Mohou vznikat z vody nebo hydroxylových iontů. Elektrony redukují  $O_2$  na superoxidový anion  $O_2^{\cdot-}$ . Získané radikály mohou vyvolat peroxidaci lipidů v membráně a následně poškodit DNA nebo způsobit oxidaci katalytických center aminokyselin a bílkovin [45].

Působení ZnO NPs na bakteriální buňku vede také ke změně membránového potenciálu (Obrázek 5). Změna membránového potenciálu se uvádí jako počátek poškození bakterie, který může vést k buněčné smrti [42].



Obrázek 5: Předpokládaná antibakteriální aktivita ZnO NPs [46].

(1) tvorba reaktivních druhů kyslíku za pomoci ZnO NPs; (2) uvolnění  $Zn^{2+}$  z ZnO NPs; (3) přímá interakce ZnO NPs s membránou

### **2.2.3 Vznik rezistence bakterií na vybrané kovy**

Již v dřívějších dobách lidé věděli o antimikrobiálních účincích těžkých kovů, zejména tedy stříbra. V druhé polovině dvacátého století byly detekovány první bakteriální rezistence vůči těžkým kovům. Jednalo se o bakterie *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Postupem času byla prokázána jistá souvislost mezi antibiotickou a kovovou rezistencí. Dalším stupněm vývoje rezistence je odolnost vůči nanočásticím kovů, které mají v této formě zvýšenou antimikrobiální aktivitu [47].

#### **2.2.3.1 Bakterie rezistentní vůči zinku**

Oxid zinečnatý se přidává do krmiva zemědělským zvířatům, nejčastěji je využívám u selat. Používá se hlavně pro zrychlení růstu odstavených selat od matek s cílem zvýšené produkce. Toto odstavení vede ke změnám v morfologii střeva, snížení účinnosti střevní bariéry s následným rizikem vzniku průjmů a infekcím způsobených *E. coli*. Významná organizace, jako je Výbor pro léčivé přípravky pro veterinární použití, poukazuje na to, že v důsledku společné rezistence může použití oxidu zinečnatého podporovat rozvoj antimikrobiální rezistence. Ukázalo se, že vysoké dávky suplementace zinkem zvyšují podíl bakterií *E. coli* a *Salmonella* odolných vůči více léčivům, což jsou dva nejdůležitější patogeny v chovu prasat. Vzhledem k nepříznivému vlivu zinku na životní prostředí bude jeho užívání do roku 2022 postupně ukončeno. V takovémto případě je třeba hledat alternativy v podobě nanočástic oxidu zinečnatého, s cílem snížení potřebné koncentrace v dávkách krmiva. I tato látka sebou nese jisté riziko pro životní prostředí [48].

Zinek je stále běžně využívám v různých odvětvích a bakterie se mu snaží více přizpůsobit. Bakterie obsahující regulátor odezvy BaeR (extracytoplazmatický systém, regulující reakce na stres) snáze odolá útoku kovovými ionty. Výzkum čínské univerzity, poukazuje, že promotorová oblast T6SS regulovaná BaeR je rozhodující proto, aby se bakterie stala odolnou vůči toxickým dávkám zinku. Regulátor odezvy BaeR je schopen aktivovat exprese genů kódujících transportéry, periplazmatický protein a další. Tyto geny byly zapojeny do bakteriální fyziologické odpovědi včetně rezistence na léčiva, stresové reakce buněčné stěny a rezistence na kovy [49].

#### **2.2.3.2 Bakterie rezistentní vůči stříbru**

Nejen zinek, ale i nanočástice stříbra si v posledních letech získaly svou popularitu díky stále více se rozšiřující bakteriální rezistenci na antibiotika. Což omezuje účinnost antibiotik u infekčních onemocnění. Budou-li někdy nahrazena antibiotika stříbrnými nanočásticemi ukáže čas. Je však potřeba už teď uvažovat nad otázkou vývoje bakterií a jejich rezistencí vůči stříbru [50].

Dle studie Panáček a kol. (2018) bylo prokázáno, že bakterie jsou schopny se přizpůsobit prostředí obsahující stříbrné nanočástice díky produkci proteinu flagellinu. Při uvolnění proteinu do okolního prostředí se nanočástice stříbra začnou shlukovat a ztrácí své antibakteriální účinky proti gramnegativním bakteriím [50], [51].

## 2.3 Metabolismus bakterií

Metabolismus je soubor rozkladných a skladebných procesů, při nichž se přeměňuje hmota, informace a energie. Tyto procesy se dělí na dvě skupiny, anabolismus a katabolismus. Metabolismus může sloužit jako kritérium pro rozdělení bakterií. Z nutričního nebo metabolického hlediska existují tři hlavní fyziologické typy bakterií: heterotrofy (nebo chemoorganotrofy), autotrofy (nebo chemolithotrofy) a fotosyntetické bakterie (nebo fototrofy) [52].

Bakteriální buňka je vysoce specializovaný transformátor energie. Chemická energie vytvářená oxidací substrátů je zachována tvorbou sloučenin s vysokou energií, jako je ADP (adenosindifosfát), ATP (adenosintrifosfát) a dalších. Bakterie, tak jako savčí a rostlinné buňky, používají jako primární zdroj energie ATP nebo vysokoenergetickou fosfátovou vazbu. Bakterie také využívají vitaminy B-komplexu jako funkční koenzymy pro mnoho oxidačně-redukčních reakcí, potřebných pro přeměnu energie [53].

Na základě biochemických reakcí mezi metabolity bakterií a substráty lze provádět konfirmační testy pro stanovení druhu bakterie. Pro *S. aureus* je typickou reakcí přítomnost vázané koagulázy. Jedná se o povrchový protein, který reaguje s fibrinogenem králičí plazmy a mění se na fibrin. Tato reakce se projevuje shlukováním buněk stafylokoka a tvorbou vloček. Pro cílovou identifikaci *S. aureus* je možné využít i komerční test STAPHYtest 16 (24). V soupravě lze provádět vyšetření pomocí šestnácti (čtyřiceti) biochemických testů. Testy se hodnotí vizuálně nebo přístrojově. Celá soustava pracuje na základě biochemických reakcí se substráty, jako jsou například kyselina ze sorbitolu,  $\beta$ -glukosidáza, ornithindekarboxyláza a mnoho dalších. Obdobou STAPHYtest 16 (24) je ENTEROtest 16(24) pro identifikaci enterobakterií. Biochemická konfirmace bakterií vždy byla a je základním potvrzením typických metabolických vlastností daného druhu testované bakterie [53],[54].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité mikroorganismy

V experimentální části práce byly použity mikroorganismy z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno). Jako grampozitivní bakterie byly zvoleny k testování *S. aureus* CCM 4223, methicilin-rezistentní *S. aureus* CCM 7110 a jako gramnegativní byla testována *E. coli* CCM 7929.

### 3.2 Použité přístroje a pomůcky

- Destičky NUNC pro imunologii, C96 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Kyvety Semi-Micro Cuvettes PS (Biosigma, Itálie)
- Phoenix M50 (BD, USA)
- Inkubovaná třepačka PST-60HL-4 (Biosan, Lotyšsko)
- Ultraspec 10 Cell Density Meter (Biochrom, UK)
- Ultrazvuková čistička Laboratory 3 Dual (ESCON - Ultrazvuk HK, Česká republika)
- Inkubátor INCUCCELL 111 - ECO line (BMT Medical Technology s.r.o., Česká republika)
- Airstream Biohazard box class II (Esco, Singapur)
- Autokláv Tuttnauer 3870 ELPV (Tuttnauer, Izrael)
- Běžné laboratorní sklo a laboratorní pomůcky

### 3.3 Použitá média a chemikálie

#### 3.3.1 MilliQ voda

Deionizovaná voda byla připravena pomocí reverzní osmózy přístroje Aqual 25 (Brno, Czech Republic). Deionizovaná voda byla dále čištěna pomocí MilliQ Direct QUV s UV lampou. Odpor byl 18 M $\Omega$ . pH bylo měřené pomocí pH meter WTW inoLab (Weilheim, Germany).

#### 3.3.2 Krevní agar

Kultivace sbírkových bakterií a bakterií z jednotlivých subkultivačních kroků byla prováděna na Columbia krevním agaru s 5% beraní defibrinovanou krví (LabMediaServis, Česká republika).

#### 3.3.3 Mueller-Hinton médium

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace bylo použito živné médium Mueller Hinton médium (MH, Thermo Fisher Scientific, USA) obsahující masovou infuzi, kaseinový hydrolyzát a kukuřičný škrob. Medium bylo připraveno v poměru 42 g na litr destilované vody.

### **3.3.4 Kryomédium**

Pro zamrazení bakterií z jednotlivých subkultivací bylo použito kryomédium Tryptone Soy Broth (Thermo Fisher Scientific, USA) s 15% glycerolem (Sigma-Aldrich, USA).

### **3.3.5 DMSO (dimethylsulfoxid)**

Roztok DMSO (Sigma-Aldrich, USA) byl použit pro zvýšení rozpustnosti ZnO a ZnO NPs ve finální koncentraci 0,1%.

### **3.3.6 Testovaný materiál**

Testovaným materiálem byly ZnO a ZnO NPs (Sigma-Aldrich, USA) o molární hmotnosti 81,39 g/mol pro obě testované látky. Velikost ZnO NPs výrobce uvádí < 100 nm.

Agary, kultivační média, voda a veškeré pomůcky byly vždy před používáním sterilovány v autoklávu.

## **3.4 Příprava roztoků ZnO a ZnO NPs**

4 mg ZnO a 4 mg ZnO NPs byly naředěny MiliQ vodou a DMSO, tak aby finální koncentrace částic v roztoku byla 4 mg/ml a koncentrace DMSO 0,1%. Roztok byl 5 minut sonikován v ultrazvukové lázni.

## **3.5 Příprava bakterií**

Vybrané bakterie byly rozetřeny křížovým roztěrem na krevní agar a inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C. Narostlá bakteriální kultura byla dále ředěna v MH médiu na absorbanci  $OD_{600} = 0,1$  AU a potom ještě 100 ×.

## **3.6 Stanovení minimální inhibiční koncentrace**

Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) ZnO a ZnO NPs bylo prováděno diluční bujónovou metodou v MH médiu v mikrotitrační destičce jak bylo popsáno v publikaci dle (Hasselmann a Buber-Weg, 2003). Jedná se o metodu kultivace bakterií s různými koncentracemi ZnO a ZnO NPs podobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Růst bakterií byl stanoven pomocí spektrofotometru, kdy byla destička proměřena před a po kultivaci. Dle hodnot absorbance u jednotlivých koncentrací ZnO a ZnO NPs byla stanovena MIC. Výsledky měření byly zaznamenány do tabulky [55].

### 3.7 Vliv rozpouštědla DMSO na mikroorganismy

Při používání DMSO jako rozpouštědla, bylo nutné zjistit jeho vliv na růst bakterií. Vliv DMSO byl stanoven metodou MIC.

### 3.8 Opakovaná subkultivace bakterií

Bakterie byly opakovaně vystaveny subletální koncentraci ZnO a ZnO NPs. Kultivace byla prováděna v deseti kultivačních opakováních v mikrotitračních deskách. Opakovaná bakteriální kultivace se zátěží subletálními koncentracemi ZnO a ZnO NPs byla prováděna v trojím opakování. Počáteční koncentrace ZnO a ZnO NPs byla 4 mg/ml. Tento roztok byl zředěn půleným ředěním. Konečné testované koncentrace byly 2000, 1000, 500, 250 a 125 mg/l. V každém kroku byly bakterie se ZnO a ZnO NPs kultivovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Po každé kultivaci byla stanovena MIC ZnO a ZnO NPs, jako nejnižší koncentrace, která je schopná inhibice růstu bakterií. Po kultivaci bylo odebráno 10 µl vzorku z jamky se subletální koncentrací ZnO a ZnO NPs. Toto množství bylo rozetřeno na krevní agar a kultivováno 24 hodin při teplotě 37 °C. Vedle subkultivace bakterií se ZnO a ZnO NPs byly stejným způsobem připraveny kontroly, které byly také subkultivovány v deseti krocích vždy se sterilní MilliQ. Takto připravené bakterie byly použity k dalšímu kultivačnímu kroku a souběžně zamrazeny v kryomédiu.

### 3.9 BD Phoenix M50

Pomocí biochemických testů, podobných soustavám STAPHYtest a ENTEROtest, byla přístrojem BD Phoenix M50 vyhodnocena identifikace bakterií a stanovena citlivost k vybraným antibiotikům u přes noc narostlé bakteriální kultury z 0., 5. a 10. opakované kultivace se subletálními koncentracemi ZnO a ZnO NPs na krevním agaru. Identifikace je prováděna pomocí panelů, ve kterých probíhají biochemické testy na konvenčních, chromogenních a fluorogenních substrátech. Konkrétně se jedná o substráty: arginin-arginin-AMC (A\_ARARR), L-arginin-AMC (A\_LARGH), L-leucin-AMC (A\_LLEUH), kyselina L-pyroglytamová-AMC (A\_LPYR), 4MU-BD-galaktosid (M\_BDGAL), 4MU-N-acetyl-BD-glukosaminid (M\_NAG), 4MU-AD-glukosid (P\_ADGLU), glycin-prolin-AMC (A\_GLPRB), L-histidin-AMC (A\_LHIST), L-fenylalanin-AMC (A\_LPHET), L-tryptofan-AMC (A\_LTRY), 4MU-BD-glukuronid (M\_BDGLC), 4MU-fosfát (M\_PHOS), L-alanin-AMC (A\_LALT), L-isoleucin-AMC (A\_LISO), L-prolin-AMC (A\_LPROB), metionin-AMC (A\_META), 4MU-BD-celobiosid (M\_BDCEL), kolistin (C\_CLST), polymyxin B (C\_PXB), kyselina D-glukonová (C\_DGUA), kyselina 3-metylglutarová (C\_3MGA), D-fruktóza (C\_DFRU), kyselina iminodioctová (C\_IMN), kyselina  $\alpha$ -ketoglutarová (C\_KGA), D-manitol (C\_DMNT), kyselina 3-metyladipová (C\_MAA), thymidin (C\_THY+), alanin-alanin-PNA (N\_ALALH), L-prolin-PNA (N\_LPROT), valin-alanin-PNA (N\_VAALA), PNP-fosfát (P\_PHOL), dextróza (R\_DEX), D-trehalóza (R\_DTRE), N-acetyl-galaktosamin (R\_NGU), metyl- $\alpha$ -glukosid (R\_MGP), D-sacharóza (R\_DSUC), maltóza (R\_MAL),  $\beta$ -gentiobióza (R\_BGEN), D-tagatóza (R\_DTAG), maltotrióza



(R\_MTT), močovina (S\_URE), eskulin (T\_ESC), glutaryl-glycin-arginin-AMC (A\_GUGAH), glycin-AMC (A\_GLYB), L-glutamová kyselina-AMC (A\_LGTA), lysin-alanin-AMC (A\_LYALD), acetát (C\_ACT), malonát (C\_MLO), adonitol (C\_ADO), kyselina tiglová (C\_TIG), citrát (C\_CIT),  $\gamma$ -L-glutamyl-PNA (N\_LGGH), ornitin (S\_ORN), BIS (PNP) fosfát (P\_BPHO), PNP-BD-glukosid (P\_BDGLU), D-galaktóza (R\_DGAL), sorbitol (R\_DSBT), L-arabinóza (R\_LARA), maltulóza (R\_MTU), D-galaktóza (R\_DGUA), L-ramnóza (R\_LRHA), N-acetyl-galaktosamin (R\_NGA),  $\beta$ -alóza (R BALL), D-fruktóza (R\_DFRU), metyl-B-glukosid (R\_MBGU), kyselina galakturonová (R\_GRA), D-melibióza (R\_DMLB). Touto cestou lze identifikovat grampozitivní a gramnegativní bakterie. Pomocí biochemických testů byly v naší studii pozorovány metabolické změny u testovaných bakterií v závislosti na jejich opakované subkultivaci se subletálními koncentracemi ZnO a ZnO NPs [56].

Na testovacím panelu BD Phoenix M50 bylo provedeno také stanovení antimikrobiální citlivosti (C) a rezistence (R) k antibiotikům. Testovací panely jsou rozděleny do 3 skupin dle testovaných bakterií na grampozitivní, gramnegativní bakterie a streptokoky. Podle vybrané skupiny testovaných bakterií jsou na panelu umístěna různá antibiotika v koncentračních řadách (*Tabulky 2 - 4*). Antimikrobiální citlivost je založena na měření kontinuálních změn redoxních indikátorů a turbidity v přítomnosti mikroorganismu a zaznamenávána je hodnota MIC a bakterie je pomocí softwaru přístroje vyhodnocena jako citlivá (C) nebo rezistentní (R) [56].

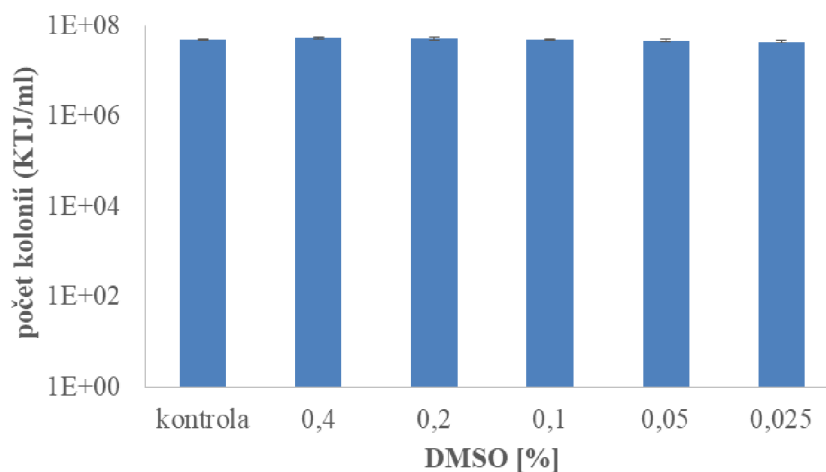
### **3.10 Hmotnostní spektrometrie MALDI–TOF (matrix assisted laser desorption/ionization – time-of-flight)**

Přes noc narostlé bakteriální kultury z 0., 5. a 10. opakované kultivace se subletálními koncentracemi ZnO a ZnO NPs na krevním agaru, byly nanášeny v duplikátech na terčíky MALDI desky (MTP 384 leštěná ocelová deska) a ponechány pro osušení na vzduchu při pokojové teplotě. Každý terčík s nanášenou bakteriální kulturou byl pokryt 1  $\mu$ l matricového roztoku kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové. Spektra byla měřena na MALDI–TOF/TOF Bruker v rozsahu m/z 2–20 kDa.

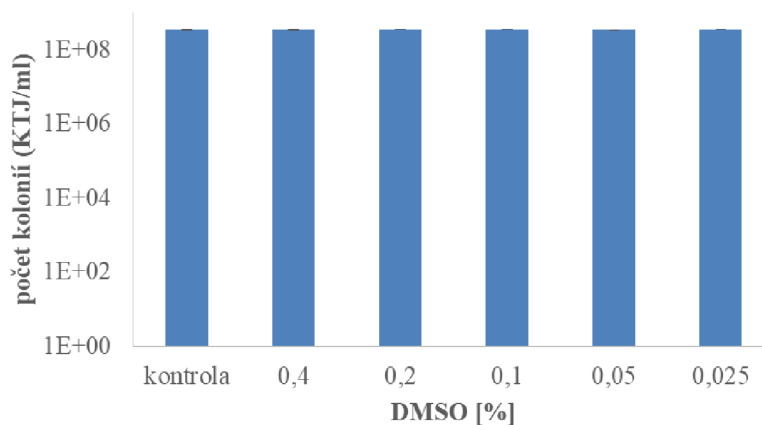
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Vliv DMSO na testované mikroorganismy

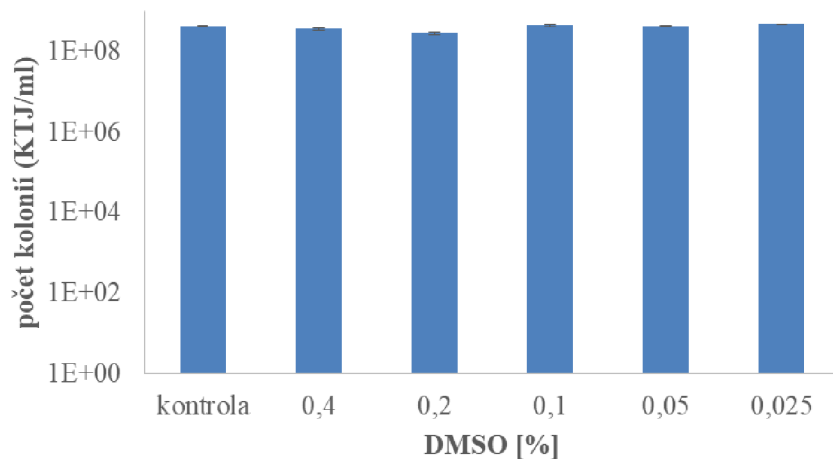
Kultivace bakterií s rozpouštědlem DMSO prokázala, že rozpouštědlo neovlivňuje růst testovaných bakterií (Obrázky 6 - 8). DMSO o koncentraci 0,1 % může být v naší studii použito pro rozpuštění ZnO a ZnO NPs.



Obrázek 6: Vliv DMSO na bakterie *S. aureus*



Obrázek 7: Vliv DMSO na bakterii *E. coli*



Obrázek 8: Vliv DMSO na bakterii MRSA

#### 4.2 Opakovaná kultivace bakterií se subletálními koncentracemi ZnO a ZnO NPs

Metodou opakované kultivace bakterií byl pozorován vývoj bakteriální odolnosti vůči ZnO a ZnO NPs. Hodnoty MIC se pohybovaly od 250 do 2000 mg/l (Tabulka 1). Bylo provedeno deset za sebou jdoucích subkultivačních kroků s bakteriemi *S. aureus*, methicilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA) a *E. coli*. Pro každý kultivační krok byla stanovena hodnota MIC.

První testovaná bakterie, *S. aureus*, vykazuje stejnou hodnotu MIC 250 mg/l v 1. kultivačním kroku pro ZnO i ZnO NPs. Pro 2. krok byla tedy použita subletální koncentrace 125 mg/l. Ve 2. kroku nenastaly žádné změny oproti 1. kroku. Pro 3. krok byla tedy opět použita subletální koncentrace 125 mg/l. Ve 3. kultivačním kroku MIC poklesla na 125 mg/l rovněž pro oba ZnO a ZnO NPs. Během dalších kultivačních kroků se u bakterie *S. aureus* hodnota MIC pro ZnO již nezměnila. U částic ZnO NPs nastala změna v 8. subkultivačním kroku, kdy se MIC zvýšila na 250 mg/l. V následujících kultivacích se MIC vrátila na hodnotu 125 mg/l.

Druhou testovanou bakterií byla MRSA. Při kultivaci se ZnO byla hodnota MIC v 1. kultivačním kroku 500 mg/l. Pro 2. krok byla použita subletální koncentrace 250 mg/l. MIC u ZnO u 2. kroku klesla na 250 mg/l. Na této hodnotě MRSA zůstává až do posledního, 10. kultivačního kroku. Bakterie MRSA, která byla kultivována s částicemi ZnO NPs, má konstantní MIC, 250 mg/l, od 0. po 10. kultivační krok.

Poslední sledovanou bakterií byla *E. coli*. V 1. kultivačním kroku je hodnota MIC 500 mg/l jak pro ZnO, tak pro ZnO NPs. Ve 2. kultivačním kroku se MIC pro obě částice zvyšuje na 1000 mg/l. Ve 3. kultivačním kroku se MIC snižuje na původních 500 mg/l. Další nárůst MIC, na 1000 mg/l, se projevuje v 5. kroku. Pro částice ZnO NPs je tato hodnota konstantní do 8. kroku. U ZnO se objevuje v 6. kultivačním kroku pokles na 500 mg/l. V 7. kroku se MIC ZnO opět zvyšuje na 1000 mg/l. Pro ZnO a ZnO NPs nastává další zvýšení MIC na 2000 mg/l v 9. pasáži. V 10. pasáži MIC pro ZnO i ZnO NPs zůstávají na hodnotě 2000 mg/l.

Tabulka 1: Minimální inhibiční koncentrace ZnO a ZnO NPs po opakované subkultivaci s testovanými bakteriemi

Subkultivační krok	MIC (mg/l)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>S. aureus</i> + ZnO	250	250	125	125	125	125	125	125	125	125
<i>S. aureus</i> + ZnO NPs	250	250	125	125	125	125	125	250	125	125
MRSA + ZnO	500	250	250	250	250	250	250	250	250	250
MRSA + ZnO NPs	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
<i>E. coli</i> + ZnO	500	1000	500	500	1000	500	1000	1000	2000	2000
<i>E. coli</i> + ZnO NPs	500	1000	500	500	1000	1000	1000	1000	2000	2000

## 4.3 Test citlivosti bakterií k antibiotikům po subkultivaci se ZnO a ZnO NPs

### 4.3.1 *S. aureus*

U opakovaně zatížené bakterie *S. aureus* subletálními koncentracemi ZnO a ZnO NPs byla testována citlivost na vybraná antibiotika pomocí přístroje BD Phoenix M50 s panely pro grampozitivní bakterie. Testovány byly bakteriální kultury *S. aureus* z 0., 5. a 10. kultivačního kroku (Tabulka 2). Vystavení bakterie *S. aureus* látkám ZnO a ZnO NPs o subletálních koncentracích nevedlo ke změně citlivosti na vybraná testovaná antibiotika ani po 10. opakování subkultivace v porovnání s kontrolou, u které s narůstajícím počtem subkultivací také nedocházelo ke změnám. U zvolené sbírkové bakterie *S. aureus* byla navíc potvrzena citlivost ke všem testovaným antibiotikům. Hodnoty breakpointu jednotlivých antibiotik odpovídají aktuálním normám EUCAST (European society of clinical microbiology and infectious diseases) pro humánní medicínu [57]

Tabulka 2: Test citlivosti na vybraná antibiotika s uvedenými hodnotami MIC (mg/l) pro bakterii *S. aureus* vystavené vlivu subletálních koncentrací ZnO a ZnO NPs v 0., 5. a 10. subkultivaci

Antibiotikum	Kontrola			ZnO			ZnO NPs		
	0.	5.	10.	0.	5.	10.	0.	5.	10.
Gentamicin	$C \leq 1$	$C \leq 1$	$C \leq 1$	$C \leq 1$	$C \leq 1$	$C \leq 1$	$C \leq 1$	$C \leq 1$	$C \leq 1$
Imipenem	$C \leq 2$	$C \leq 2$	$C \leq 2$	$C \leq 2$	$C \leq 2$	$C \leq 2$	$C \leq 2$	$C \leq 2$	$C \leq 2$
Ceftarolin	$C 0,25$	$C 0,25$	$C 0,25$	$C 0,25$	$C 0,25$	$C 0,25$	$C 0,25$	$C 0,25$	$C 0,25$
Penicilin G	$C 0,125$	$C 0,125$	$C 0,125$	$C 0,125$	$C 0,125$	$C 0,125$	$C 0,125$	$C 0,125$	$C 0,125$
Oxacilin	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$
Daptomycin	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	$C \leq 1/19$	$C \leq 1/19$	$C \leq 1/19$	$C \leq 1/19$	$C \leq 1/19$	$C \leq 1/19$	$C \leq 1/19$	$C \leq 1/19$	$C \leq 1/19$
Teicoplanin	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$
Vancomycin	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$
Clindamycin	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$
Erythromycin	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$
Kyselina fusidová	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$
Linezolid	$C 1$	$C 1$	$C 1$	$C 1$	$C 1$	$C 1$	$C 1$	$C 1$	$C 1$
Mupirocin	$C \leq 256$	$C \leq 256$	$C \leq 256$	$C \leq 256$	$C \leq 256$	$C \leq 256$	$C \leq 256$	$C \leq 256$	$C \leq 256$
Fosfomicin w/G6P	$C \leq 16$	$C \leq 16$	$C \leq 16$	$C \leq 16$	$C \leq 16$	$C \leq 16$	$C \leq 16$	$C \leq 16$	$C \leq 16$
Ciprofloxacin	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$
Moxifloxacin	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$
Tetracyclin	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$	$C \leq 0,5$
Tigecyclin	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$	$C \leq 0,25$

### 4.3.2 MRSA

Opakovaně zatížená bakterie MRSA látkami ZnO a ZnO NPs byla testována stejně jako *S. aureus* na citlivost k vybraným antibiotikům a stejně tak nedocházelo k posunu MIC MRSA k vybraným antibiotikům v závislosti na opakovanou subkultivaci se ZnO a ZnO NPs v porovnání s kontrolní skupinou (*Tabulka 3*). Bakterie nemění svou citlivost k vybraným antibiotikům ani po 10ti subkultivačních krocích se subletálními koncentracemi ZnO a ZnO NPs. U sbírkové bakterie MRSA byla navíc potvrzena rezistence k antibiotikům imipenem, ampicilin, penicilin G, oxacilin, clindamycin, erythromycin, ciprofloxacin a moxifloxacin. Hodnoty breakpointu jednotlivých antibiotik odpovídají aktuálním normám EUCAST (European society of clinical mikrobiology and infectious diseases) pro humánní medicínu [57].

Tabulka č. 3: Test citlivosti na vybraná antibiotika s uvedenými hodnotami MIC (mg/l) pro bakterii MRSA vystavené vlivu subletálních koncentrací ZnO a ZnO NPs v 0., 5. a 10. subkultivaci

Antibiotikum	Kontrola			ZnO			ZnO NPs		
	0.	5.	10.	0.	5.	10.	0.	5.	10.
Gentamicin	C < 4	C < 4	C < 4	C < 4	C < 4	C < 4	C < 4	C < 4	C < 4
Imipenem	R > 8	R > 8	R > 8	R > 8	R > 8	R > 8	R > 8	R > 8	R > 8
Ampicilin	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1
Penicilin G	R > 0,25	R > 0,25	R > 0,25	R > 0,25	R > 0,25	R > 0,25	R > 0,25	R > 0,25	R > 0,25
Oxacilin	R > 2	R > 2	R > 2	R > 2	R > 2	R > 2	R > 2	R > 2	R > 2
Daptomycin	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19
Teicoplanin	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1
Vancomycin	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1
Clindamycin	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1
Erythromycin	R > 2	R > 2	R > 2	R > 2	R > 2	R > 2	R > 2	R > 2	R > 2
Kyselina fusidová	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5
Linezolid	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1	C 1
Mupirocin	C ≤ 256	C ≤ 256	C ≤ 256	C ≤ 256	C ≤ 256	C ≤ 256	C ≤ 256	C ≤ 256	C ≤ 256
Fosfomycin w/G6P	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16
Ciprofloxacin	R > 4	R > 4	R > 4	R > 4	R > 4	R > 4	R > 4	R > 4	R > 4
Moxifloxacin	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1	R > 1
Tetracyckin	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5
Tigecycklin	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25



### 4.3.3 *E. coli*

Stejně jako u *S. aureus* a MRSA, tak i u *E. coli* byla testována citlivost k antibiotikům po 0., 5. a 10. subkultivaci se ZnO a ZnO NPs pomocí přístroje BD Phoenix M50 s panely pro gramnegativní bakterie. Bylo stanovováno, zda-li ZnO a ZnO NPs ovlivňují překročení hranice breakpointů mezi citlivostí a rezistencí a posun MIC pro dané antibiotikum (Tabulka 4). Opakovaná zátěž bakterie *E. coli* subletálními koncentracemi nanočástic ZnO NPs neovlivnila oblast citlivosti a rezistence ani nedošlo ke zvýšení MIC po 0., 5. ani 10. subkultivaci. Zatímco zátěž *E. coli* ZnO způsobila změny v MIC pro určitá antibiotika a došlo i k přechodu hranice breakpointu za vzniku rezistence ke gentamicinu. Tento přechod citlivosti na rezistenci se projevil při 10. subkultivaci *E. coli* se subletální koncentrací ZnO (1000 mg/l). U 0. a 5. subkultivace *E. coli* se ZnO nedošlo ke změně citlivosti ke gentamicinu oproti kontrole. U dalších aminoglykosidových antibiotik, amikacin a tobramycin, došlo v 10. kroku subkultivace *E. coli* se ZnO k nárůstu MIC z 1 na 2 mg/l. Tato hodnota se nachází stále v oblasti citlivosti pro tato antibiotika. Zvýšená hodnota MIC byla stanovena i pro beta-laktamové antibiotikum ze skupiny karbapenemů, imipenem. Z hodnoty 0,25 mg/l, která byla stanovena u všech kontrolních subkultivačních kroků, došlo ke zvýšení MIC na 1 mg/l po 10. subkultivaci *E. coli* se ZnO. Tato hodnota spadá stále do citlivé oblasti tohoto antibiotika. Posun MIC nastal i u cefalosporinů. Z konstantních hodnot 0,5 mg/l pro ceftazidim a 0,13 mg/l pro cefotaxim u kontrol, došlo působením subletální koncentrace ZnO na *E. coli* v 10. kroku subkultivace, ke zvýšení MIC na 1 mg/l pro ceftazidim a na 0,5 mg/l pro cefotaxim, což také odpovídá hodnotám v oblasti citlivosti. Další zvýšení MIC nastalo u aminopenicilinových antibiotik. Pro ampicilin došlo u *E. coli* ke zvýšení MIC z 2 na 4 mg/l v 10. subkultivačním kroku se ZnO a u amoxicilinu s inhibitorem beta-laktamázy, kyselinou klavulanovou, dochází ke zvýšení MIC z 4/2 na 8/2 mg/l, v porovnání s kontrolní *E. coli*. Opakované vystavení bakterie *E. coli* subletálním koncentracím testovaných zinků vede ke zjištění, že ZnO způsobuje vznik rezistence ke gentamicinu a zvýšení MIC u antibiotik amikacin, tobramycin, imipenem, ceftazidim, ampicilin a amoxicilin-clavulanate, zatímco u ZnO NPs nedošlo po opakované kultivaci s *E. coli* k výskytu bakteriální rezistence ani k posunu MIC vůči vybraným antibiotikům.

Tabulka 4: Test citlivosti na vybraná antibiotika s uvedenými hodnotami MIC (mg/l) pro bakterii *E. coli* vystavené vlivu subletálních koncentrací ZnO a ZnO NPs v 0., 5. a 10. subkultivaci

Antibiotikum	Kontrola			ZnO			ZnO NPs		
	0.	5.	10.	0.	5.	10.	0.	5.	10.
Amikacin	C ≤ 4	C ≤ 4	C ≤ 4	C ≤ 4	C ≤ 4	C 8	C ≤ 4	C ≤ 4	C ≤ 4
Gentamicin	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1	R4	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1
Tobramycin	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1	C 2	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1
Ertapenem	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25
Imipenem	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C 1	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25
Meropenem	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13
Cefuroxim	C ≤ 2	C ≤ 2	C ≤ 2	C ≤ 2	C ≤ 2	C ≤ 2	C ≤ 2	C ≤ 2	C ≤ 2
Ceftazidim	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C 1	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5
Cefotaxim	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13	C 0,5	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13	C ≤ 0,13
Cefepime	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1	C ≤ 1
Ampicilin	C ≤ 2	C ≤ 2	C ≤ 2	C ≤ 2	C ≤ 2	C 4	C ≤ 2	C ≤ 2	C ≤ 2
Piperacilin	C ≤ 4	C ≤ 4	C ≤ 4	C ≤ 4	C ≤ 4	C ≤ 4	C ≤ 4	C ≤ 4	C ≤ 4
Amoxicilin-Clavulanate	C 4/2	C 4/2	C 4/2	C 4/2	C 4/2	C 8/2	C 4/2	C 4/2	C 4/2
Piperacilin-Tazobactam	C ≤ 4/4	C ≤ 4/4	C ≤ 4/4	C ≤ 4/4	C ≤ 4/4	C ≤ 4/4	C ≤ 4/4	C ≤ 4/4	C ≤ 4/4
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19	C ≤ 1/19
Fosfomycin w/G6P	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16	C ≤ 16
Ciprofloxacin	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25	C ≤ 0,25
Levofloxacin	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5
Tigecyclin	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5	C ≤ 0,5

Zinek ve formě  $Zn^{2+}$  je kofaktorem pro enzymy ze skupiny oxidoreduktáz, hydroláz a kináz. Kinázy umožňují zprostředkování signálu pro aktivaci specifického genu. Může se jednat i o gen pro rezistenci. Změna fosforylovaného stavu je jeden z hlavních mechanismů, který je využíván v živých organismech pro řízení aktivity proteinů prostřednictvím signalizační kaskády. Proteiny, které jsou kódovány specifickými geny rezistence, mají charakteristickou strukturu. Takovéto proteiny obsahují vazebné místo pro nukleotid. Většinou toto místo zprostředkovává vazbu ATP (adenosintrifosfát) nebo GTP (guanosintrifosfát). Je tedy zřejmé, že podstatnou součástí molekulárního mechanismu rezistence je vazba nukleotidfosfátů na odpovídající protein [58], [59].

Dle výše zmíněných poznatků lze usuzovat, že oxid zinečnatý ovlivňuje kinázy, které se nacházejí u *E. coli*. Dále by se dalo předpokládat, že každému antibiotiku náleží určitý protein, který je dále kódován genem rezistence. Vlivu ZnO podléhá ve větší míře bakterie *E. coli*. To si lze částečně vysvětlit přítomností genu pro kódování alkoholdehydrogenázy s přítomností ligandu  $Zn^{2+}$ . U bakterie *S. aureus* tento gen chybí. *S. aureus* obsahuje pouze dehydrogenázy bez ligandu  $Zn^{2+}$ . Na tomto základě si lze vysvětlit citlivost *E. coli* na zátěž ZnO. Tuto hypotézu je nutno potvrdit prostřednictvím molekulárně biologických metod v dalších studiích [60].

## 4.4 Vliv zátěže ZnO a ZnO NPs na metabolismus bakterií

### 4.4.1 *S. aureus*

Opakovaná zátěž bakterií testovanými ZnO a ZnO NPs vykazují vliv na změnu metabolismu určitých substrátů (*Tabulka 5*).

Prvním substrátem, u kterého došlo ke změně metabolismu v důsledku subkultivace u bakterie *S. aureus*, je kyselina D-glukonová (C\_DGUA). Reakce tohoto substrátu s bakterií *S. aureus* se projevuje redukcí látek na bázi resazurinu. Vystavení *S. aureus* částicím ZnO NPs v 5. a 10. kultivaci způsobuje změnu metabolismu bakterie u DGUA. U 5. a 10. kultivace *S. aureus* se subletální koncentrací ZnO NPs, reakce kyseliny D-glukonové s bakterií již neprobíhá, zatímco v 0. kroku a u subkultivačních kroků kontroly je reakce pozitivní. Změna metabolismu kyseliny glukonové může nacházet souvislost s meziproductem metabolismu, kyselinou D-glukuronovou. Kyselina D-glukuronová je součástí mnoha významných složek v organismu, například glykosaminoglykanů a proteoglykanů. Tvorba této kyseliny spočívá v oxidaci glukózy. Oxiduje se zde primární hydroxylová skupina. Před samotnou oxidací je potřeba převést molekulu glukózy do aktivní formy UDP-glukózy. Kyselina D-glukuronová se podílí na vylučování nerozpustných látek, jako jsou bilirubin nebo xenobiotika. Oxidace kyseliny D-glukonové je u bakterie *S. aureus* řízena genem *BTN44\_13425*. Při vystavení ZnO NPs mohlo dojít k zhasnutí tohoto genu a pozastavení celé oxidace. Tato biochemická reakce je ovlivňována pouze v případě ZnO NPs. To může být způsobeno antimikrobiální aktivitou ZnO NPs [58], [60].

Druhý substrát, u kterého se projevil změna reaktivity, je maltotrióza (R\_MTT) u bakterie *S. aureus*. Utilizace tohoto sacharidu se začíná projevovat u *S. aureus* v 5. a 10. kultivačním kroku se subletální koncentrací ZnO. U kontroly a 0. kroku ke zkvašování MTT nedochází. U bakterie, která byla vystavena ZnO NPs se využití MTT projevuje až v 10. pasáži. Při kvašení je upřednostňována glukóza jako zdroj uhlíku a energie. Naproti tomu maltotrióza bývá spotřebována až v pozdních fázích kvašení. Rychlost, s jakou probíhá utilizace maltotriózy je limitována rychlostí jejího transportu do buňky. Bakterie, které jsou schopny využít maltotriózu, mohou přežít v prostředí bez glukózy. Pro bakterii *S. aureus*, utilizaci maltotriózy za přítomnosti  $\alpha$ -amilázy, spouští gen *malA*. Oxid zinečnatý v porovnání s nanočásticemi dokáže tento proces spustit dříve. Je pravděpodobné, že ke spouštění tohoto genu došlo přímým vlivem ZnO a ZnO NPs [58], [62], [63].

U ostatních substrátů se fenotypově neprojevila žádná změna v biochemických reakcích v porovnání s kontrolní skupinou.

Tabulka 5: Reakce bakterie *S. aureus* vystavené subletálními koncentracemi ZnO, ZnO NPs a kontrola v 0., 5. a 10. subkultivačním kroku se substráty panelu BD Phoenix M50

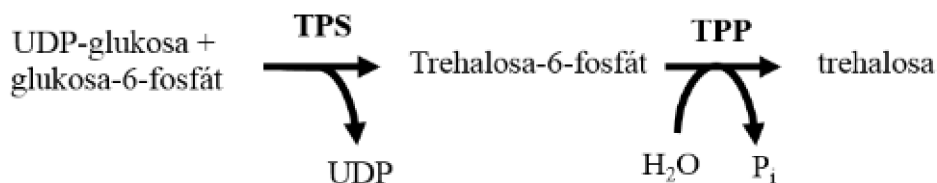
	Kontrola			ZnO			ZnO NPs		
	0.	5.	10.	0.	5.	10.	0.	5.	10.
A_ARARR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LAEGH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LLEUH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LPYR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_3MGA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C_DGUA	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C_KGA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C_THY	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M_BDGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M_NAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N_ALALH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P_ADGLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_DEX	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R_DTRE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_NGU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_MGP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_GLPRB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LHIST	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LPHET	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LTRY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_CLST	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C_DMNT	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C_MAA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M_ADGLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M_BDGLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M_PHOS	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N_LPROT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P_PHOL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_DSUC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R_MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S_URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LALT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LISO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LPROB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_META	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_DFRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C_IMN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_PXB	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M_BDCEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M_BDGLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-

M_PHOT	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N_VAALA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_BGEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_DTAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_MTT	-	-	-	-	+	+	-	-	+
T_ESC	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.4.2 MRSA

V případě bakterie MRSA ovlivňuje opakované působení ZnO a ZnO NPs reakci bakterie se substráty 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid (P\_ADGLU), D-trehalóza (R\_DTRE), D-sacharóza (R\_DSUC) a maltotriózou (R\_MTT) (Tabulka 6). Při reakci substrátu 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid s bakterií MRSA z 5. a 10. subkultivace při zatížení ZnO byla reakce negativní, zatímco v 0. kroku a u 0., 5., a 10. kroku v případě kontroly byla reakce pozitivní. V případě vystavení ZnO NPs se reakce zastavila až v 10. subkultivačním kroku. 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid je substrátem  $\alpha$ -D-glukosidázy. Glukosidáza je hydrolytický enzym, který katalyzuje počáteční reakci trimmingu N-glykanu. V první části procesu N-glykosylace je glukosidáza připojena na cílový protein a v dalších krocích podléhá dodatečným úpravám. Celá tato dráha je kódována genem *aglA* [58], [64].

Změna fermentace substrátu D-trehalóza (R\_DTRE) se projevila z pozitivní na negativní reakci již v 5. a 10. subkultivačním kroku pro ZnO a pro ZnO NPs až v 10. kroku. Sacharid D-trehalózu může bakterie využít jako zdroj energie, díky čemuž mohou přežít zamrazení a nedostatek živin. Pro biosyntézu trehalózy je známo 5 běžných biosyntetických drah. U bakterií se vyskytuje biosyntetická dráha OtsA-OtsB (osmoregulatory trehalose synthesis A - osmoregulatory trehalose synthesis B). Dráha OtsA-OtsB probíhá takto: UDP-glukóza (uridindisfosfatglukóza) + glukóza-6-fosfát  $\rightarrow$  urididifosfát (UDP) + trehalóza-6-fosfát  $\rightarrow$  trehalóza + anorganický fosfát (Pi), přičemž přenesení glukozové jednotky na glukóza-6-fosfát katalyzuje enzym trehalózafosfátsyntáza (TPS) a oddělení fosfátu z trehalóza-6-fosfátu katalyzuje enzym trehalózafosfátfosfatáza (TPP) (Obrázek 9). Tato metabolická dráha je kódována geny *mall\_1* a *treA*, které zřejmě podléhají zátěži ZnO a ZnO NPs a v důsledku toho zamezí této biochemické reakce [58], [65].



Obrázek č. 9: Schéma biosyntézy trehalózy [65]

Další změny biochemických reakcí proběhly pouze u zátěže ZnO. Utilizace D-sacharózy (R\_DSUC) přestala probíhat u bakterie MRSA, která byla vystavena 10. subkultivačnímu kroku ZnO. D-sacharóza slouží jako zdroj energie pro mnoho druhů bakterií. U bakterie *S. aureus* je sacharóza štěpena enzymem sacharóza-6-fosfát hydroláza. Tento enzym katalyzuje hydrolýzu sacharózy na fruktózu a glukózu. Gen kódující fermentaci D-sacharózy u bakterie *S. aureus* je

*scrB*. Je tedy možné, že ZnO ovlivňuje přímo tento gen anebo dochází k vyblokování enzymu a v důsledku toho je celá reakce zastavena [58].

Poslední substrát, který vykazuje změnu po subkultivaci MRSA se ZnO je maltotrióza (R\_MTT). Utilizace tohoto substrátu se projevuje u 10. subkultivačního kroku MRSA se ZnO. U kontrol, 0. a 5. pasáže ZnO je tato reakce negativní. Jak již bylo zmíněno u bakterie *S. aureus*, schopnost využití maltotriózy je velmi přínosná v nepřítomnosti glukózy. U MRSA je metabolismus maltotriózy rovněž kódován genem *mala*. Ve srovnání s *S. aureus* trvá ovlivnění reakce s maltotriózou u odolnější MRSA déle a u MRSA není tento metabolismus ovlivněn ZnO NPs v rámci testovaných 10ti subkultivačních kroků jako u *S. aureus* [58], [62], [63].

U ostatních substrátů nenastala žádná biochemická změna v porovnání s kontrolní skupinou.

Tabulka 6: Reakce bakterie MRSA vystavené subletálními koncentracemi ZnO, ZnO NPs a kontrola v 0., 5. a 10. subkultivačním kroku se substráty panelu BD Phoenix M50

	Kontrola			ZnO			ZnO NPs		
	0.	5.	10.	0.	5.	10.	0.	5.	10.
A_ARARR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LAEGH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LLEUH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LPYR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_3MGA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C_DGUA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C_KGA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C_THY	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M_BDGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M_NAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N_ALALH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P_ADGLU	+	+	+	+	-	-	+	+	-
R_DEX	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R_DTRE	+	+	+	+	-	-	+	+	-
R_NGU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_MGP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_GLPRB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LHIST	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LPHET	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LTRY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_CLST	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C_DMNT	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C_MAA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M_ADGLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M_BDGLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M_PHOS	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N_LPROT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P_PHOL	+	+	+	+	+	+	+	+	+

R_DSUC	+	+	+	+	+	-	+	+	+
R_MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S_URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LALT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LISO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LPROB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_META	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_DFRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C_IMN	+	+	+	+	-	-	+	+	+
C_PXB	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M_BDCEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M_BDGLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M_PHOT	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N_VAALA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_BGEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_DTAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_MTT	-	-	-	-	-	+	-	-	-
T_ESC	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.4.3 *E. coli*

Zátěž ZnO a ZnO NPs na bakterie vykazuje vliv na změnu metabolismu určitých substrátů i u zástupce gramnegativních bakterií, *E. coli*. Při biochemickém testování bakterie *E. coli*, subkultivované se ZnO a ZnO NPs, byla patrná jediná změna, a to u využití sorbitolu (R\_DSUC) (Tabulka 7). V případě zátěže látkou ZnO byla reakce s tímto substrátem v 0. a 5. kroku negativní. V 10. kroku již *E. coli* se sorbitolem reaguje. U ZnO NPs tato látka reaguje s bakterií již v 5. i 10. kroku. Sacharid sorbitol je mezistupněm v polyolové dráze. Jedná se o přeměnu glukózy na fruktózu. V této dráze je glukóza redukována na sorbitol a ten je následně oxidován enzymem sorbitoldehydrogenázou na fruktózu. Kofaktorem této reakce je NAD<sup>+</sup> (nikotinamidinnukleotid), který se mění na NADH (nikotinamidadeninnukleotid). Tyto kofaktory mají přímou vazbu s tolerancí na oxidativní a antibiotický stres. Nadměrná aktivace této dráhy zvyšuje intracelulární a extracelulární koncentrace sorbitolu, dále má za následek zvýšené koncentrace reakčních forem kyslíku a snižování koncentrací oxidu dusnatého a glutathioninu. Každá z těchto odchylek může poškodit buňku [58], [66].

Dlouhodobé vystavení *E. coli* látkám ZnO a ZnO NPs mohlo vést ke vzniku oxidativního stresu v buňce, který se projevil nefunkcí kofaktoru NAD<sup>+</sup> a enzymu sorbitoldehydrogenázy. Enzym sorbitoldehydrogenáza je řízen genem *gutB\_2* a může docházet ke zhášení či snížení genové exprese tohoto genu dlouhodobým účinkem ZnO a ZnO NPs a dráha tedy nemůže plnohodnotně probíhat.

U ostatních substrátů nenastala žádná biochemická změna při opakované zátěži *E. coli* subletálními koncentracemi ZnO a ZnO NPs.



Tabulka 7: Reakce bakterie *E. coli* vystavené subletálním koncentracím ZnO, ZnO NPs a kontrola v 0., 5. a 10. subkultivačním kroku se substráty panelu BD Phoenix M50

	Kontrola			ZnO			ZnO NPs		
	0.	5.	10.	0.	5.	10.	0.	5.	10.
A_ARARR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A_GUGAH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LLEUH	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A_LPYR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_ACT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_CLST	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_MLO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M_NAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P_BDGLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_BGEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_DGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_DSBT	-	-	-	-	-	+	-	+	+
R_LARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R_MTU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_ORN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A_GLYB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LGTA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LPROB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LYALD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_KGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_MBGU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_NGU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A_GLPRB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LATGH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LPHET	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A_LTRY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_DMNT	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C_PXB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N_LGGH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P_BPHO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_DEX	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R_DGUA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R_DSUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_LRHA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R_NGA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S_URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_TIG	-	-	-	-	-	-	-	-	-

N_LPROT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R BALL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_DFRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R_DMLB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_GRA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T_ESC	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.5 Změny v proteomice

Testované bakterie byly analyzovány na MALDI–TOF hmotnostním spektrometru. Ani u jedné z testovaných bakterií není po subkultivaci s ZnO a ZnO NPs výrazná změna poměru m/z hmotnostního spektra. Změna se odehrává v intenzitě signálu u bakterií *S. aureus* a MRSA, které byly vystaveny ZnO NPs. Zde se poměr intenzity píku pohybuje mezi 6845 a 6888 Da. I přes tuto skutečnost oxid zinečnatý ani jeho forma nanočástic výrazně neovlivňuje bakteriální proteomiku během 10krát opakované zátěži subletálními koncentracemi ZnO a ZnO NPs (*Příloha: Obrázky 1 – 9*).

#### 4.6 Identifikace mikroorganismů vystavených účinkům ZnO a ZnO NPs

Identifikace použitých bakterií je považována za ukazatel čistoty vzorků a také ukazatele významné změny, ovlivňující genomickou strukturu bakterie. Opakovaná subkultivace bakterií se subletálními koncentracemi ZnO a ZnO NPs může vzhledem k výsledkům biochemických konfirmací ovlivňovat moderní metody identifikace bakterií. Byla porovnána identifikace probíhající na základě biochemických reakcí pomocí BD Phoenix M50 a hmotnostní spektrometrie MALDI–TOF. Ani jeden způsob identifikace bakterií se ale neodchýlil od původní bakterie, se kterou bylo pracováno. Oba druhy identifikace mají vysokou přesnost (*Tabulky 8 – 10*).

Tabulka 8: Identifikace kontrolních bakterií *E. coli* (EC), *S. aureus* (SAU) a MRSA

	Kontrola								
	0. pasáž			5. pasáž			10. pasáž		
Původní mikroorganismus	EC	SAU	MRSA	EC	SAU	MRSA	EC	SAU	MRSA
BD Phoenix M50	EC	SAU	SAU	EC	SAU	SAU	EC	SAU	SAU
MALDI - TOF	EC	SAU	SAU	EC	SAU	SAU	EC	SAU	SAU

Tabulka 9: Identifikace bakterií *E. coli* (EC), *S. aureus* (SAU) a MRSA vystavených ZnO

	Subkultivace ZnO								
	0. pasáž			5. pasáž			10. pasáž		
Původní mikroorganismus	EC	SAU	MRSA	EC	SAU	MRSA	EC	SAU	MRSA
BD Phoenix M50	EC	SAU	SAU	EC	SAU	SAU	EC	SAU	SAU
MALDI - TOF	EC	SAU	SAU	EC	SAU	SAU	EC	SAU	SAU

Tabulka 10: Identifikace bakterií *E. coli* (EC), *S. aureus* (SAU) a MRSA vystavených ZnO NPs

	Subkultivace ZnO NPs								
	0. pasáž			5. pasáž			10. pasáž		
Původní mikroorganismus	EC	SAU	MRSA	EC	SAU	MRSA	EC	SAU	MRSA
BD Phoenix M50	EC	SAU	SAU	EC	SAU	SAU	EC	SAU	SAU
MALDI - TOF	EC	SAU	SAU	EC	SAU	SAU	EC	SAU	SAU

## 5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zpracována v reakci na aktuální omezení používání vysokých koncentrací ZnO v zemědělství a hledání nových alternativ, citlivějších k životnímu prostředí a veřejnému zdraví. Do roku 2022 bude legislativou zakázáno používání vysokých dávek ZnO jako veterinárně léčivého přípravku. Dosavadní používání ZnO v zemědělství ponese dlouhodobý dopad na životní prostředí a organismy v něm. ZnO v současné době představuje riziko spojené s tvorbou rezistence na antimikrobiální látky, zejména u bakterie *S. aureus*. Spojení ZnO a *S. aureus* není náhodná. Gen *CzcC*, který kóduje odolnost proti zinku a kadmium se u *S. aureus* nachází ve stejném mobilním genetickém základu SCCmec, jako gen pro kódování rezistence vůči methicilinu. Z čehož vyplývá, že tyto látky se mohou vzájemně ovlivňovat a vést k tvorbě dalších rezistencí [67].

U tří testovaných bakterií (*S. aureus*, MRSA a *E. coli*) byla provedena 10ti kroková subkultivace se subletálními koncentracemi ZnO a ZnO NPs a byl sledován vývoj MIC u vybraných antibiotik a také byla pozorována změna metabolické aktivity u vybraných substrátů v závislosti na subkultivaci se zmíněnými látkami.

Pro testované grampozitivní bakterie *S. aureus* a MRSA, provedený test citlivosti k vybraným antibiotikům neprokázal zvýšení hodnoty MIC ani posun do oblasti rezistence pro žádné antibiotikum v závislosti na 10ti krokovou subkultivaci s látkami ZnO a ZnO NPs. V případě 10ti krokové subkultivační zátěže ZnO, došlo u bakterie *E. coli* k vytvoření rezistence na gentamicin a u dalších antibiotik (amikacin, tobramycin, imipenem, ceftazidim, ampicilin a amoxicilin-clavulanate) vzrostly hodnoty MIC. Použití ZnO NPs neovlivnilo v rámci 10ti krokové subkultivace antibiotickou citlivost. Tuto skutečnost je nutno ověřit provedením studie s vyšším počtem subkultivací. Nicméně, dle našich výsledků, se ZnO NPs jeví jako šetrnější alternativa z hlediska šíření antibiotické rezistence.

Z výsledků biochemických testů vyplývá, že ZnO NPs více ovlivňuje biochemické procesy u bakterií *S. aureus* spojené se substráty maltotrióza a kyselina D-glukonová. ZnO u bakterie *S. aureus* ovlivňuje jen kyselinu D-glukonovou. Biochemické procesy u bakterie MRSA zase více podléhají účinkům ZnO. Procesy, které jsou ovlivněny ZnO u MRSA jsou spojeny se substráty 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid, D-trehalóza, D-sacharóza a maltotrióza. Substráty D-sacharóza a maltotrióza jsou ovlivněny i ZnO NPs. U bakterie *E. coli* je ovlivněna jen dráha spojená s využitím sorbitolu oběma testovanými látkami. Biochemickým screeningem u vybraných substrátů jsme potvrdili, že látky ZnO a ZnO NPs ovlivňují základní metabolické dráhy organismů a tak může být výrazně narušena jejich úloha, která by mohla mít zásadní dopad nejen na životní prostředí.

Sledování vlivu používání zinku v zemědělství a dalších odvětvích je třeba věnovat pozornost a zajistit eliminaci rizika dopadu jeho vlivu na mikroorganismy v prostředí. Snaha pro minimalizaci zátěže prostředí reziduálními polutanty by se měla odrazit v podobě dlouhodobě srovnatelných výnosů a ochoty spolupráce přírody s člověkem.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] DE BARBEYRAC, Bertille a Christiane BÉBEAR, 2005. Histoire naturelle des infections à Chlamydiaphysiopathologie des infections à Chlamydia: Conséquences diagnostiques et thérapeutiques Chlamydial pathogenesis: Diagnostic and therapeutic consequences [online]. **12**(1), 26–31. Dostupné z: 10.1016/S0929-693X(05)80007-7
- [2] ELLIOTT, Tom, Anna CASEY, Peter LAMBERT a Jonathan SANDOE, 2015. *Medical Microbiology and Infection*. 5. B.m.: Wiley-Blackwell. Lecture Notes. ISBN 978-1-4443-3465-4.
- [3] STIBOROVÁ, Hana, Adéla BAČÁKOVÁ, Lucie MUSILOVÁ a Kateřina DEMNEROVÁ, 2018. Od přirozeného fenoménu výskytu genů rezistence k antibiotikům v životním prostředí ke vzniku multirezistentních kmenů. *Chemické listy* [online]. (112), 833–839. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3239/3210>
- [4] SHOEN, Hanna, Sasha ROSE, Stephen RAMSEY, Helio DE MORAIS a Luis BERMUDEZ, 2019. Analysis of Staphylococcus infections in a veterinary teaching hospital from 2012 to 2015. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* [online]. **66**, 101–332. Dostupné z: doi:10.1016/j.cimid.2019.101332
- [5] CONG, Yanguang, Sijin YANG a Xiancai RAO, 2020. Vancomycin resistant Staphylococcus aureus infections: A review of case updating and clinical features. *Journal of Advanced Research* [online]. **21**, 169–176. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2019.10.005
- [6] MICHAEL, Otto, 2009. Staphylococcus epidermidis – the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol* [online]. **7**, 555–567. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2182
- [7] VOTAVA, Miroslav, 2002. Mikrobiální biofilm a jeho význam v lékařství. *Praktický lékař* [online]. **82**(9), 522–525. Dostupné z: <https://www.medvik.cz/bmc/link.do?id=bmc02017877>
- [8] ČERNOHORSKÁ, Lenka a Miroslav VOTAVA, 2010. Staphylococcus saprophyticus, jeho rezistence k vybraným antibiotikům a tvorba biofilmu u kmenů izolovaných z moče. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie, Praha: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně* [online]. **53**(2), 88–91. Dostupné z: [http://www.prolekare.cz/epidemiologie?confirm\\_rules=1](http://www.prolekare.cz/epidemiologie?confirm_rules=1)
- [9] RAINETOVÁ, Petra, 2017. Virové střevní infekce – virové gastroenteritidy. *Pediatric v praxi* [online]. **18**(1), 44–49. Dostupné z: doi:10.36290/ped.2017.009

- [10] AMBROŽOVÁ, Helena, 2009. Průjmová onemocnění z pohledu klinika. *Interní medicína pro praxi* [online]. **11**(3), 380–383. Dostupné z: [https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200909-0004\\_Prujmova\\_onemocneni\\_z\\_pohledu\\_klinika.php](https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200909-0004_Prujmova_onemocneni_z_pohledu_klinika.php)
- [11] DE JONG, Birgitta a Karl EKDAHL, 2006. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries. *BMC Public Health* [online]. **10**(6). Dostupné z: doi:10.1186/1471-2458-6-4
- [12] GRIMONT, Patrick a François-Xavier WEILL, 2009. Antigenic formulae of the salmonella serovars. *World Health Organization* [online]. **9**. Dostupné z: [https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng\\_0.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf)
- [13] LUKEŠ, Milan, 2003. Escherichia coli (Escherichia coli kmen Nissle 1917, sérotyp O6:K5:H1) jako probiotikum v klinické praxi. *Remedia* [online]. (4). Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Aktuality/Escherichia-coli-Escherichia-coli-kmen-Nissle-1917-serotyp-O6-K5-H1-jako-probiotikum-v-klinicke-praxi/6-E-dF.magarticle.aspx>
- [14] SHENG, Lina, Zheng ZHANG, Gang SUN a Luxin WANG, 2020. Light-driven antimicrobial activities of vitamin K3 against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis. *Food Control* [online]. **114**, 109–225. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2020.107235
- [15] KOČIOVÁ Silvia, Kristýna DOLEŽELÍKOVÁ, Pavel HORKÝ, Sylvie SKALIČKOVÁ, Daria BAHOLET, Lucie BOZDĚCHOVÁ, Eva VÁCLAVKOVÁ, Jaroslava BELKOVÁ, Pavel NEVRKLA, Jiří SKLÁDANKA, Tomáš DO, Ondřej ZÍTKA, Yazan HADDAD, Pavel KOPEL, Luděk ŽŮREK, Vojtěch ADAM a ŠMERKOVÁ, Kristýna, 2020. Zinc phosphate-based nanoparticles as alternatives to zinc oxide in diet of weaned piglets. *Journal of animal science and biotechnology* [online]. **11**(1), 59. Dostupné z: doi:10.1186/s40104-020-00458-x
- [16] LOCHMANNOVÁ, Jindra, Milan KOLÁŘ a Karel URBÁNEK, 2004. Antibiotická léčba bakteriálních infekcí z pohledu klinika, mikrobiologa a farmakologa. *Interní medicína pro praxi*. **21**, 15–20.
- [17] LI, Lu, Dan LIU, Qian ZHANG, Kang SONG, Xiaohong ZHOU, Zhi TANG a Xu ZHOU, 2019. Occurrence and ecological risk assessment of selected antibiotics in the freshwater lakes along the middle and lower reaches of Yangtze River Basin. *Journal of Environmental Management* [online]. **273**, 109–396. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2019.109396
- [18] NYČ, Otakar a Pavla URBÁŠKOVÁ, 2017. Rezistence k fluorochinolonům v Evropě a v ČR. In: [online]. Společnost pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP. Dostupné z: [https://www.cls.cz/dokumenty/prednaska\\_Nyc.pdf](https://www.cls.cz/dokumenty/prednaska_Nyc.pdf)

- [19] QUAH, Stella, 2016. *International Encyclopedia of Public Health* [online]. 2. vyd. B.m.: Academic Press. ISBN 978-0-12-803708-9. Dostupné z: <https://www.elsevier.com/books/international-encyclopedia-of-public-health/quah/978-0-12-803678-5>
- [20] SPÍŽEK, Jaroslav, 1999. Rezistence na antibiotika: Je třeba hledat nové látky a nové postupy. *Vesmír* [online]. **78**(27). Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-1/rezistence-antibiotika.html>
- [21] JULÁK, Jaroslav, 2016. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vyd. ISBN 978-80-246-3210-0.
- [22] TORACCHIO, Sonia a Marzio LEONARDOR, 2003. Primary and secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated in central Italy during the years 1998–2002. *Digestive and Liver Disease* [online]. **35**(8), 541–545. Dostupné z: [doi:10.1016/S1590-8658\(03\)00265-2](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(03)00265-2)
- [23] MEOUCHE, Imane a Mary DUNLOP, 2018. Heterogeneity in efflux pump expression predisposes antibiotic-resistant cells to mutation. *Science* [online]. **362**(6415), 686–670. Dostupné z: [doi:10.1126/science.aar7981](https://doi.org/10.1126/science.aar7981)
- [24] WRIGHT, Gerard D, 2003. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. **7**(5). Dostupné z: [doi:10.1016/j.cbpa.2003.08.0047](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.0047)
- [25] HRICOVÁ, Kristina a Milan KOLÁŘ, 2014. Efluxní pumpy bakterií - role v rezistenci na antibiotika a jejich možné inhibitory. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* [online]. **20**(4), 116–120. Dostupné z: <https://www.medvik.cz/bmc/link.do?id=bmc15004138>
- [26] PIDDOCK, Laura, 2006. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **19**(2), 382–402. Dostupné z: [doi:10.1128/CMR.19.2.382-402.2006](https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006)
- [27] OBOLSKI, Uri, Eynat DELLUS-GUR, Gideon STEIN a Lalich HADANY, 2016. Antibiotic cross-resistance in the lab and resistance co-occurrence in the clinic: Discrepancies and implications in *E. coli*. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. **40**, 155–161. Dostupné z: [doi:10.1016/j.meegid.2016.02.017](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.017)
- [28] GATADI, Srikanth, Sidharth CHOPRA, Srinivas NANDURI a Y.V. MADHAVI, 2019. Promising antibacterial agents against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic Chemistry* [online]. **92**. Dostupné z: [doi:10.1016/j.bioorg.2019.103252](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103252)
- [29] VOTAVA, Miroslav, 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. B.m.: NEPTUN.

- [30] Sepse - otrava krve. 2018 *Ústřední vojenská nemocnice* [online]. Dostupné z: <https://www.uvn.cz/cs/sepse-otrava-krve>
- [31] *European Centre for Disease Prevention and Control*. 2018
- [32] HABALOVÁ, Kateřina a Helena ŽEMLIČKOVÁ, 2017. Meticilin-rezistentní stafylokoky: přehled terapie a antibiotická rezistence. *Remedia*.
- [33] WERNER, Matthias, Ingo Matthias BARBRÉ a Mario MARKANOVIČ, 2010. Nanotechnologie. *Vakuum in Forschung und Praxis* [online]. Dostupné z: doi:10.1002/vipr.201000429
- [34] PLESKAČ, Matěj, 2016. Historie a současnost nanotechnologií. *Nanoprotech & Inproducts* [online]. Dostupné z: <https://www.nanoprotech.cz/historie-a-soucasnost-nanotechnologie/>
- [35] KUBÍNEK, Roman a Vendula STRÁNSKÁ, Univerzita Palackého. *Úvod do problematiky nanotechnologií* [online]. Univerzita Palackého. Dostupné z: <http://exfyz.upol.cz/didaktika/oprlz/nanotechnologie.pdf>
- [36] WU, Lin-Ping, Danyang WANG a Zibiao LI, 2020. Grand challenges in nanomedicine. *Materials Science and Engineering: C* [online]. **106**. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.110302
- [37] ZHU, Yi, Xianli LIU, Yali HU, Rui WANG, Ming CHEN, Jianhua WU, Yanyan WANG, Shuang KANG, Yan SUN a Mengxi ZHU, 2019. Behavior, remediation effect and toxicity of nanomaterials in water environments. *Environmental Research* [online]. **174**, 54–60. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2019.04.014
- [38] BARABASZOVA, Karla, 2006. *Nanotechnologie a nanomateriály*. B.m.: Ostrava: Tiskárna Schenk. ISBN 80-248-1210-X.
- [39] VITTAL, Ravishankar a Jamuna BAI, 2011. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. *Communicating Current Research and Technological Advances* [online]. 197–209. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.459.8922>
- [40] SINGH, Priyanka a Arun NANDA, 2013. Antimicrobial and antifungal potential of zinc oxide nanoparticles in comparison to conventional zinc oxide particles. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* [online]. **5**(11), 457–463. Dostupné z: <https://www.researchgate.net>



- [41] ZHANG, Lingling, Yulong DING, Malcolm POVEY a David YORK, 2008. ZnO nanofluids – A potential antibacterial agent. *Progress in Natural Science* [online]. **18**(8), 939–944. Dostupné z: doi:10.1016/j.pnsc.2008.01.026
- [42] BANERJEE, Satarupa, Kumari VISHAKHA, Shatabdi DAS, Moumita DUTTA, Debolina MUKHERJEE, Jyotsna MONDAL, Sandhimita MONDAL a Arnab GANGULI, 2020. Antibacterial, anti-biofilm activity and mechanism of action of pancreatin doped zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **190**. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2020.110921
- [43] XIE, Yanping, Yiping HE, Peter IRWIN, Tony JIN a Xianming SHI, 2011. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Food Microbiology* [online]. **77**(7). Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02149-10
- [44] LI, Qilin, Shaily MAHENDRA, Delina LYON, Lena BRUNET, Michael LIGA, Dong LI a Pedro J.J. ALVAREZ, 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research* [online]. **42**(18), 4591–4602. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2008.08.015
- [45] ZVEKIĆ, Dušan, Vladimir SRDIĆ, Milan MATAVULJ a Maja KARAMAN, 2011. Antimicrobial properties of ZnO nanoparticles incorporated in polyurethane varnish. *Processing and Application of Ceramics 2* [online]. **5**(1), 41–45. Dostupné z: doi:10.2298/PAC1101041Z
- [46] YUSOF, Mohd a Abdul RAHMAN, 2019. Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* [online]. Dostupné z: doi:10.1186/s40104-019-0368-z
- [47] WESLEY, Alexander, 2009. History of the Medical Use of Silver. *Surgical Infections* [online]. **10**(3), 289–292. Dostupné z: doi:doi.org/10.1089/sur.2008.9941
- [48] PENG, Shifu, Ana HERRERO-FRESNO, John OLSEN a Anders DALSGAARD, 2020. Influence of zinc on CTX-M-1  $\beta$ -lactamase expression in *Escherichia coli*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [online]. **22**, 613–619. Dostupné z: doi:10.1016/j.jgar.2020.06.004
- [49] HU, Linlin, Chenchen WANG, Wenjia LU, Hao LU, Huanchun CHEN a Chen TAN, 2020. BaeSR activates type VI secretion system expression in porcine extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* to enhance bacterial resistance to zinc stress. *Wenjia* [online]. **147**. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2020.104357

- [50] PANÁČEK, Aleš, Libor KVÍTEK, Monika SMÉKALOVÁ, Renata VEČEŘOVÁ, Milan KOLÁŘ, Magdalena RÖDEROVÁ, Filip DYČKA, Marek ŠEBELA, Robert PRUCEK, Ondřej TOMANEC a Radek ZBOŘIL, 2018. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology* [online]. **13**, 65–71. Dostupné z: doi:10.1038/s41565-017-0013-y
- [51] GUNAWAN, Cindy, Wey Yang TEOH, Christopher MARQUIS a Rose AMAL, 2013. Induced Adaptation of *Bacillus* sp. to Antimicrobial Nanosilver. *Small* [online]. **9**(21), 3554–3560. Dostupné z: doi:10.1002/sml.201300761
- [52] BARON, Samuel, 1996. *Medical Microbiology* [online]. 4. vyd. B.m.: University of Texas Medical Branch at Galveston; ISBN 0-9631172-1-1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>
- [53] MITCHELL, Jennifer, Anne TRISTAN a Timothy J. FOSTER, 2004. Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiology* [online]. **150**(11). Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.27337-0
- [54] TOBIŠKA, Patrik. *STAPHYtest 24: Diagnostický seznam* [online]. B.m.: Brno: Erba Lachema s.r.o. Dostupné z: <https://adoc.tips/mikrobalni-identifikace.html>
- [55] HASSELMANN, Cornelia a Martin BUBER-WEG. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. Germany, 2003, 26 August 2003, **9**(8) [cit. 2020-04-17]. ISSN 1469-0691. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>
- [56] BD: BD Phoenix™ M50 instrument [online]. USA. Dostupné z: <https://www.bd.com/en-us/offerings/capabilities/microbiology-solutions/identification-and-susceptibility-testing/bd-phoenix-automated-identification-and-susceptibility-testing-system/bd-phoenix-m50-instrument>
- [57] PHILLIPS, Ian, Gunnar KAHLMETER a Rafael CANTON, 2020. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. *European society of clinical microbiology and infectious diseases* [online]. Dostupné z: <https://eucast.org/>
- [58] APWEILER, Rolf a Ewan BIRNEY, 2002. The Universal Protein Resource. *Uniprot* [online]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/>
- [59] RAKETTE, Sonja, Stefanie DONAT, Knut OHLSEN a Thilo STEHLE, 2012. Structural Analysis of *Staphylococcus aureus* Serine/Threonine Kinase PknB. *PLoS ONE* [online]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0039136

- [60] KING, Robert C., William D. STANSFIELD, a Pamela K. MULLIGAN, 2007. *A Dictionary of Genetics*. 8. vyd. B.m.: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-530761-0.
- [61] FONTANA, Josef a Petra LAVRÍKOVÁ, 2013. Pentózový cyklus, metabolismus fruktózy, galaktózy a kyseliny glukuronové. *Funkce buněk a lidského těla* [online]. Dostupné z: <http://fbt.cz>
- [62] ŠÁRKA, Evžen, Petra SMRČKOVÁ a Lenka SEILEROVÁ, 2013. Rezistentní a pomalu stravitelný škrob. *Chemické listy* [online]. **107**, 929–935. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/585>
- [63] ZASTROW, Claudio R., Christian HOLLATZ, Pedro Soares DE ARAUJO a Boris Ugarte STAMBUK, 2001. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. **27**, 34–38. Dostupné z: [doi:10.1038/sj.jim.7000158](https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000158)
- [64] BARKER, Megan K a David R ROSE, 2013. Specificity of Processing  $\alpha$ -glucosidase I is guided by the substrate conformation: crystallographic and in silico studies. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. Dostupné z: [doi:10.1074/jbc.M113.460436](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460436)
- [65] ELBEIN, Alan D., Irena PASTUSZAK, David CARROLL a Y.T. Pan, 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* [online]. **13**(4). Dostupné z: [doi:10.1093/glycob/cwg04714602423](https://doi.org/10.1093/glycob/cwg04714602423)
- [66] KOTAS, Rudolf a Zdeněk AMBLER, 2012. Patofyziologie diabetické neuropatie. *Diabetická neuropatie* [online]. **13**, 7–11. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2012/90/03.pdf>
- [67] JENSEN, John, Niels Christian KYVSGAARD a Antonio BATTISTI, 2018. Environmental and public health related risk of veterinary zinc in pig production - Using Denmark as an example. *Environment International* [online]. **114**, 181–190. Dostupné z: [doi:10.1016/j.envint.2018.02.007](https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.007)

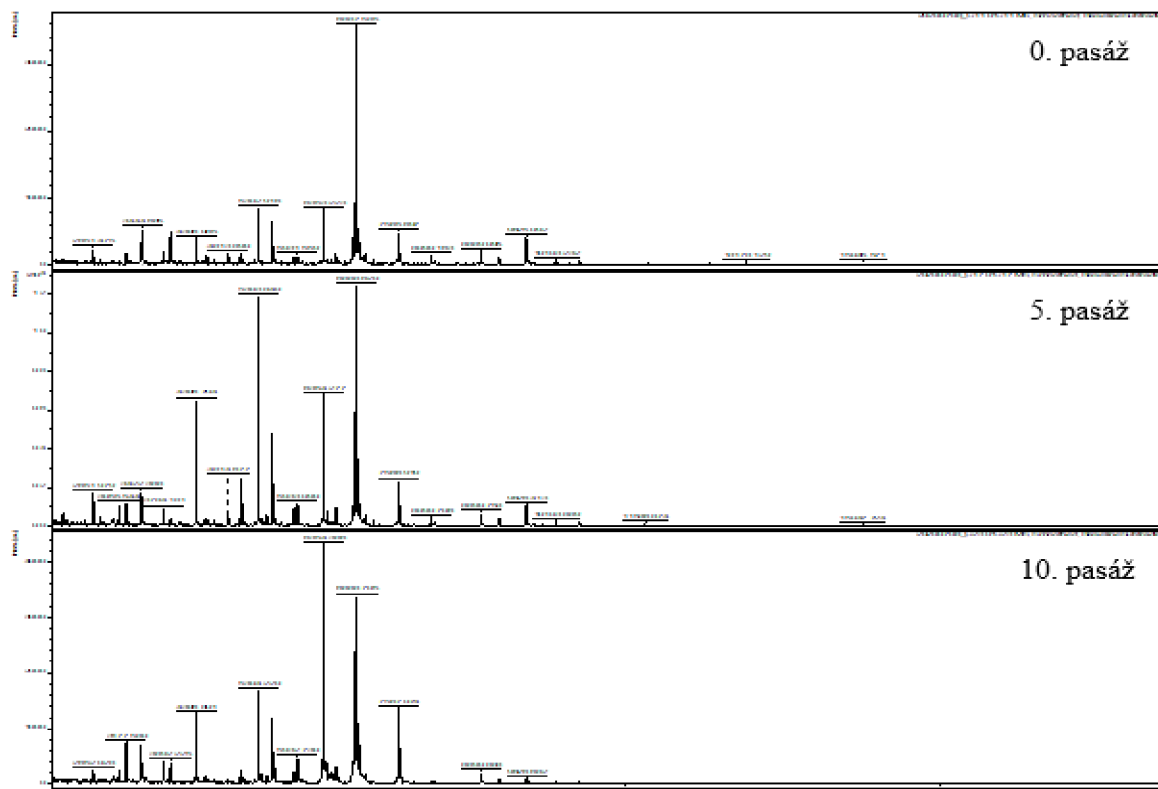
## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ZnO	oxid zinečnatý
ZnO NPs	nanočástice oxidu zinečnatého
VMP	veterinary medicinal product
RND	resistence-nedulation-division
IEP	inner membrane efflux protein
OEP	outer membrane efflux protein
PEN	periplasmic efflux protein
EARS-Net	Evropské sítě pro dohled nad antimikrobiální rezistencí
MEMS	micro-Electro-Mechanical Systems
NEMS	nano-Electro-Mechanical Systems
FDA	Food and Drug Administration
ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
MIC	minimální inhibiční koncentrace
R	rezistence
C	citlivost
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption/ionization – time-of-flight
EUCAST	European society of clinical mikrobiology and infectious diseases

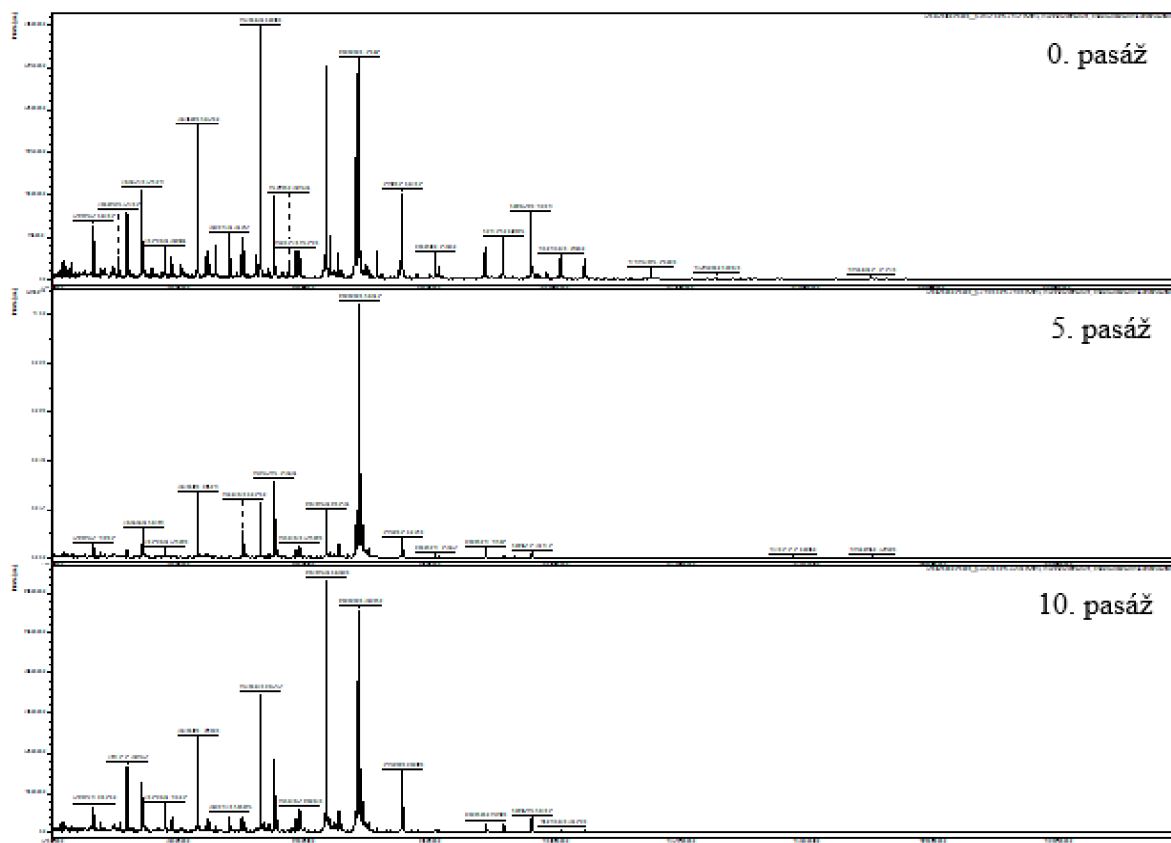
## 8 PŘÍLOHY

### 8.1 Hmotnostní spektra

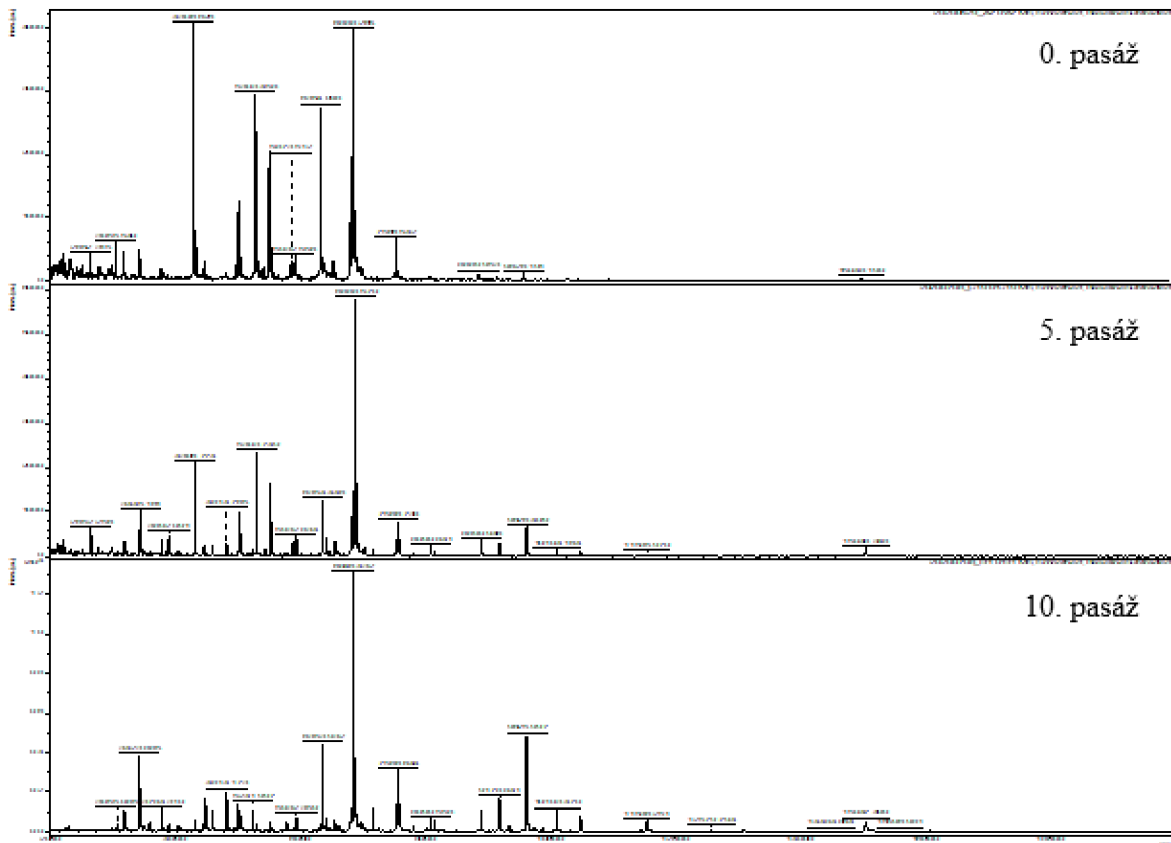
Hmotnostní spektra z analyzátoru MALDI-TOF, pro bakterie *S. aureus*, MRSA a *E. coli*, které byly vystaveny opakované zátěži ZnO a ZnO NPs.



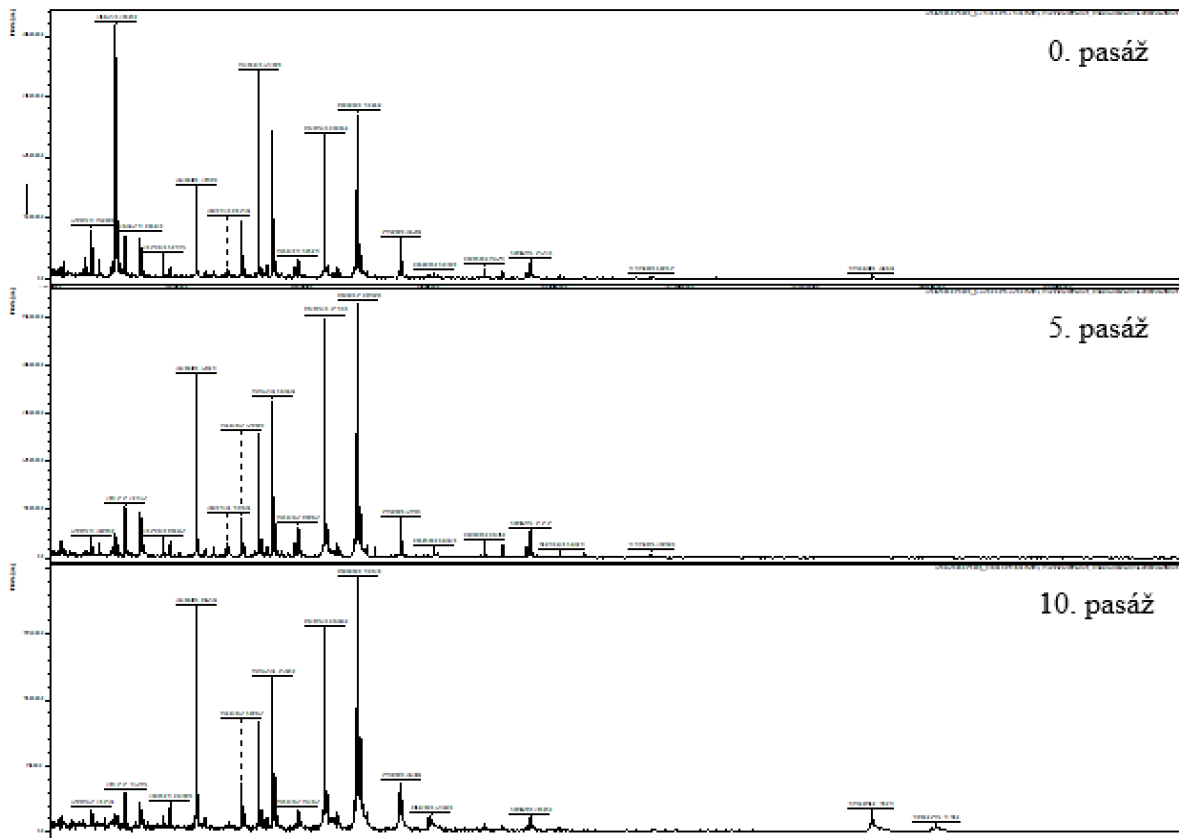
Obrázek 1: Hmotnostní spektra kontroly bakterie *S. aureus*

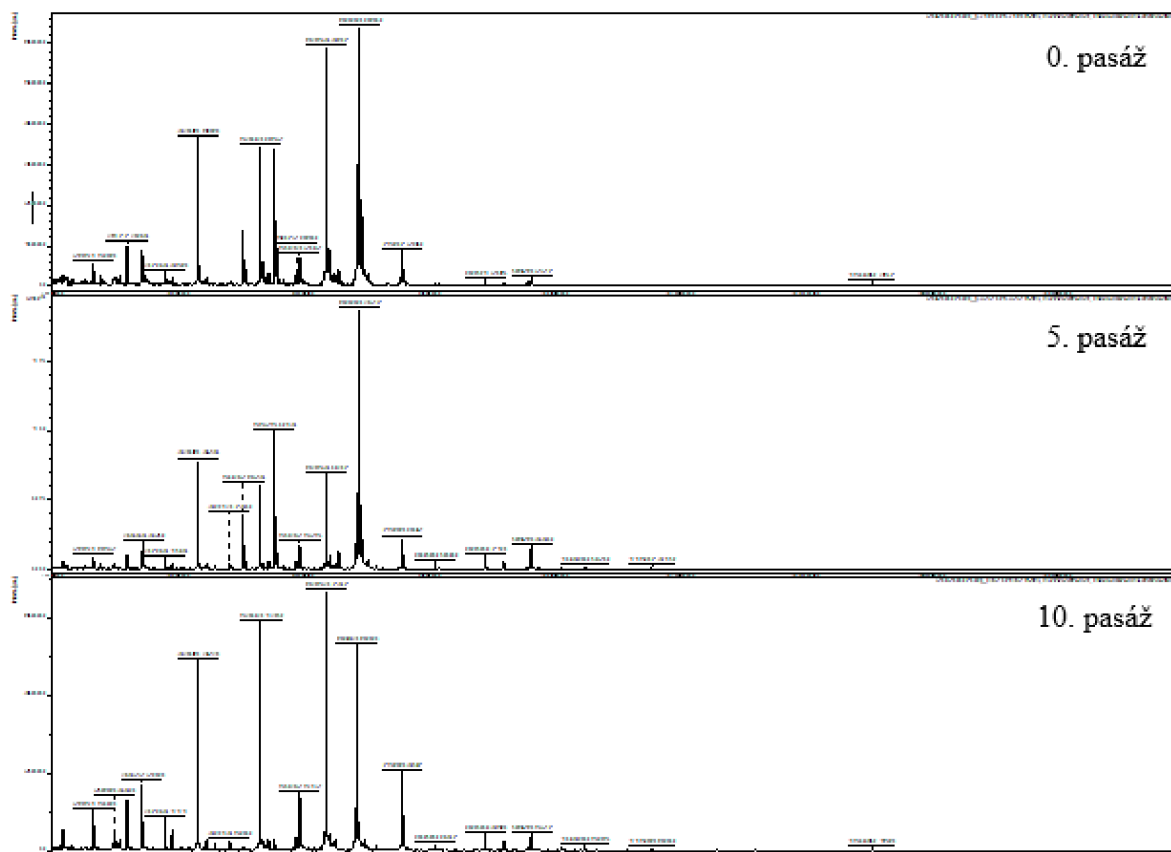


Obrázek 2: Hmotnostní spektra bakterie *S. aureus* vystavené ZnO

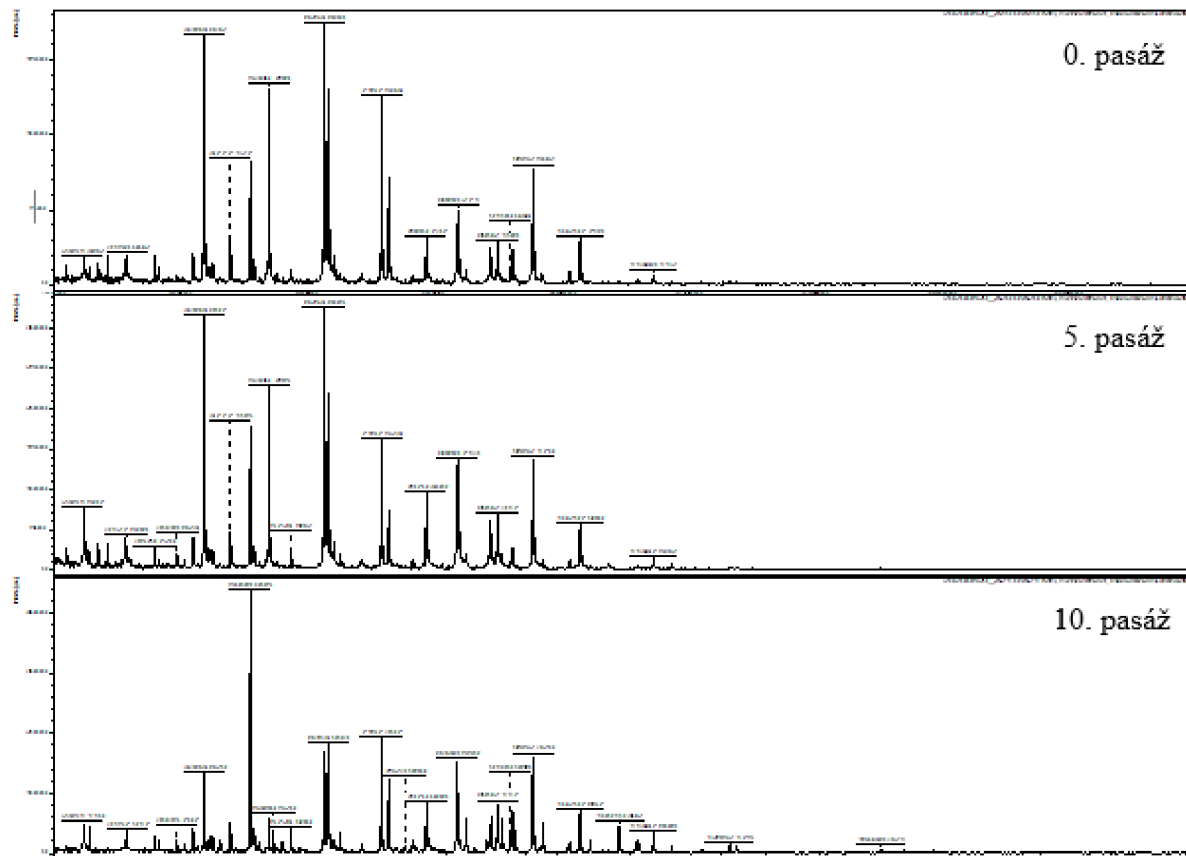


Obrázek 3: Hmotnostní spektra bakterie *S. aureus* vystavené ZnO NPs



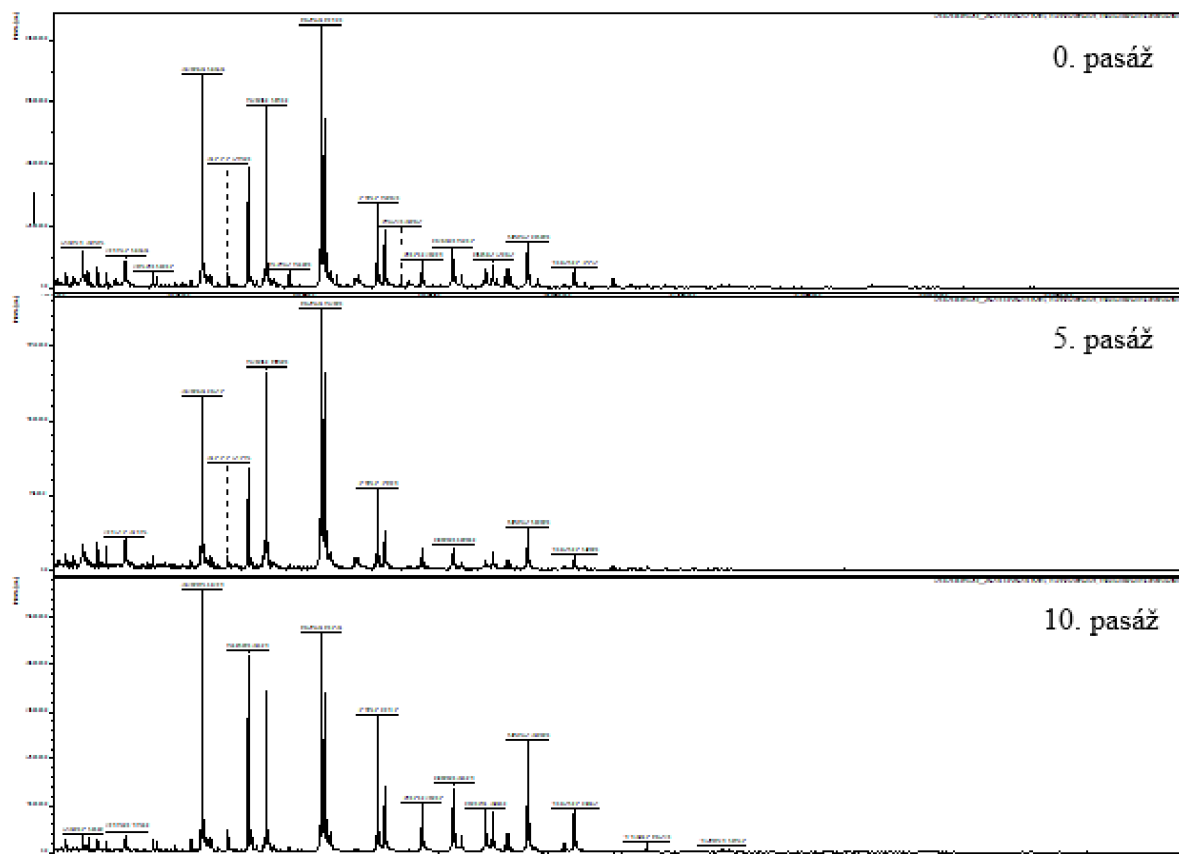


Obrázek 6: Hmotnostní spektra bakterie MRSA vystavené ZnO NPs

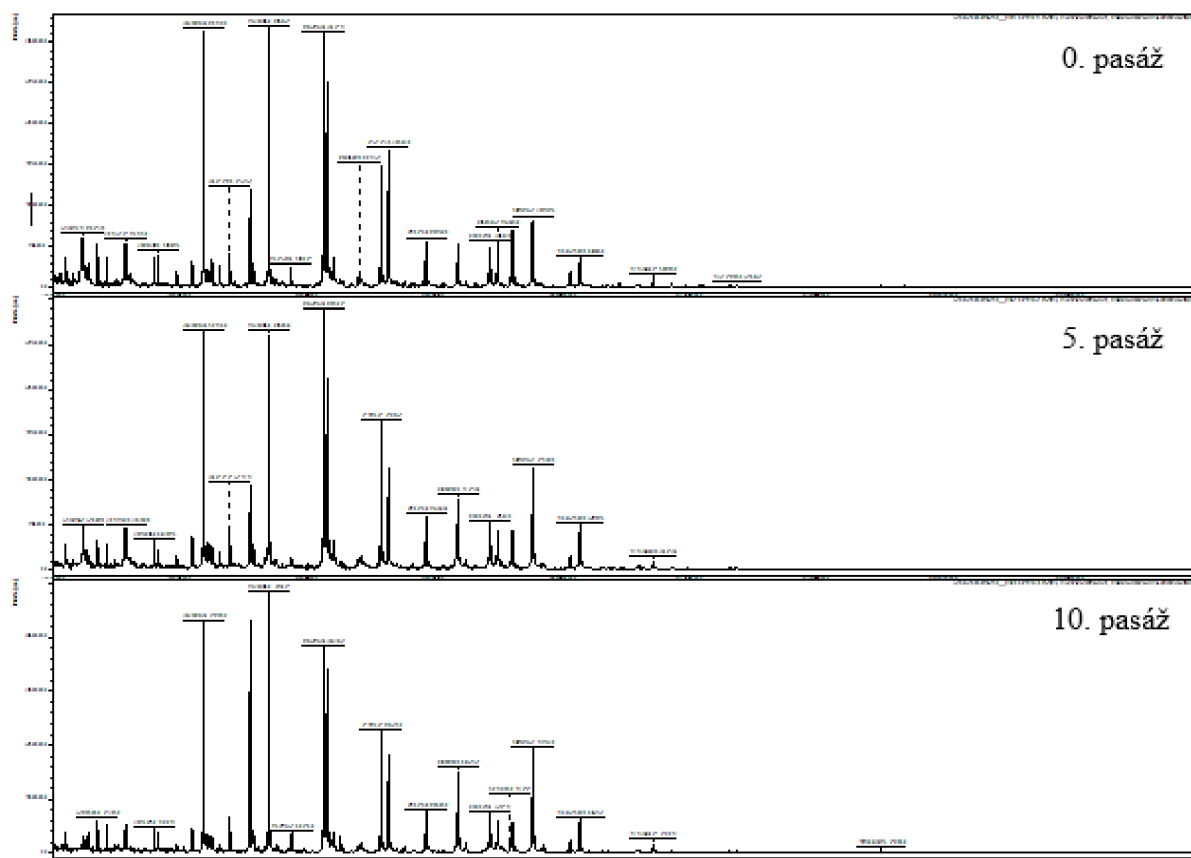


Obrázek 7: Hmotnostní spektra kontroly bakterie E. coli





Obrázek 8: Hmotnostní spektra bakterie *E. coli* vystavené ZnO



Obrázek 9: Hmotnostní spektra bakterie *E. coli* vystavené ZnO NPs