



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

Posouzení vhodnosti uhlíkové nanostruktury pro kolonizaci bakteriální populací

Bakalářská práce

Studijní program: B3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály

Autor práce: **Adéla Coufalová**
Vedoucí práce: Mgr. Petra Rosická





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

Examination of carbon nanostructure for the colonization of bacterial population

Bachelor thesis

Study programme: B3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942R002 – Nanomaterials

Author: **Adéla Coufalová**
Supervisor: Mgr. Petra Rosická



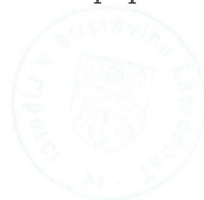
ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Adéla Coufalová**
Osobní číslo: **M13000148**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Posouzení vhodnosti uhlíkové nanostruktury pro kolonizaci bakteriální populace**
Zadávací katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracování odborných rešerší na téma: možnosti využití a aplikace povrchů s nanostrukturami; charakterizace nanopovrchů (drsnost, měrný povrch, využití mikroskopie aj.); možnosti uhlíkatých nanostruktur a jejich využití v biologických aplikacích.
2. Návrh uspořádání laboratorního experimentu (výběr vhodné bakteriální populace, výběr vhodných metodik měření).
3. Provedení experimentu, naměření fyzikálně-chemických a biologických parametrů (hodnocení povrchu materiálu pomocí AFM před kolonizací a po ní apod., hodnocení růstu a aktivity bakteriálních populací bez/v kontaktu s nanostrukturami apod.).
4. Posouzení vhodnosti uhlíkatých nanostruktur pro bakteriální populace (z hlediska růstu a aktivity buněk proliferace/restrikce, z hlediska změny povrchové struktury destrukce materiálu apod.).
5. Zhodnocení dosažených výsledků včetně popisu využití v reálné praxi.




Adéla Coufalová

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **cca 50 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**
Seznam odborné literatury:

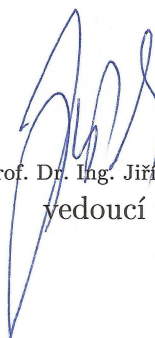
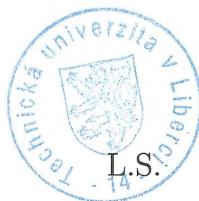
- [1] VASEASHTA, A. K., MIHAILESCU, I. N.: **Functionalized Nanoscale Materials, Devices and Systems**. Springer Science & Business Media, ISBN 978-1-4020-8903-9, 2008.
[2] SUTARIYA, V. B., PATHAK, Y.: **Biointeractions of Nanomaterials**. CRC Press, ISBN 978-1-4665-8238-5, 2014.
[3] NAZARPOUR, S.: **Thin Films and Coatings in Biology**. Springer Science & Business Media, ISBN 978-94-007-2592-8, 2013.
[4] WOLF, E. L.: **Applications of Graphene: An Overview**. Springer Science & Business Media, ISBN 978-3-319-03946-6, 2014.
[5] KATSNELSON, M. I.: **Graphene: Carbon in Two Dimensions**. Cambridge University Press, ISBN 978-0-521-19540-9, 2012.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Petra Rosická**
Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Lukáš Voleský**
Ostatní konzultanti: **Ing. Totka Bakalova, Ph.D.**
Dr. Lukasz Kaczmarek
Faculty of Mechanical Engineering, Lodz University of
Technology, Poland

Datum zadání bakalářské práce: **20. října 2015**
Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2016**



prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.
děkan



prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 20. října 2015

Prohlášení

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

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

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

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

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

Datum: 10. 5. 2016

Podpis: Coufalová

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Petře Rosické, Ing. Totce Bakalové Ph.D a Ing. Lucii Svobodové Ph.D. za odborné rady, vstřícnost a čas, který mi v průběhu zpracování mé bakalářské práce věnovaly.

Děkuji také Ing. Lukáši Voleskému a Ing. Pavlu Kejzlarovi Ph.D. za pomoc s analýzou mnou studovaných vzorků.

Zvláštní poděkování patří mé rodině a přátelovi za podporu během celého mého dosavadního studia.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá hodnocením tenkých vrstev TiCN nanesených na chirurgické oceli AISI 316. Vzorky byly připraveny v Centrální laboratoři aplikované fyziky na Bulharské akademii věd v Plovdivu, za použití metody PVD napařování elektrickým obloukem. Každá z osmi vrstev měla rozdílné podmínky depozice. Při depozici byl měněn poměr plynů, napětí, proud i doba depozice.

Bakalářská práce se skládá ze dvou na sebe navazujících částí. V první části jsou vyhodnoceny fyzikálně-chemické vlastnosti jednotlivých TiCN tenkých vrstev. Byly studovány vlastnosti, které mají vliv na přilnutí biologického materiálu na povrch studovaných vzorků (chemické složení, drsnost a hydrofilita). Dále byla studována chemická stálost, tloušťka vrstvy a adheze vrstvy k substrátu z důvodu potenciálního využití vzorků v medicínských aplikacích.

Druhá část této bakalářské práce je věnována vyhodnocení biologické interakce bakteriálního kmene *Escherichia coli* s povrchem studovaných vzorků. Byla především sledována ochota mikroorganismů kolonizovat jednotlivé vzorky.

Cílem bakalářské práce bylo určit, které z vlastností TiCN povrchů mají nejvýraznější vliv na adhezi mikroorganismů. Dále byla hledána spojitost mezi takovými vlastnostmi povrchu a parametry při nanášení vrstvy. Vzorky, které byly vyhodnoceny jako nejvhodnější pro kolonizaci bakteriální populací, byly na závěr diskutovány z hlediska chemické stálosti, tloušťky vrstvy a adheze vrstvy k substrátu.

Výrazný vliv na tvorbu biofilmu z hlediska fyzikálně-chemických parametrů měla hydrofobicita povrchu. Čím více byl vzorek hydrofobní, tím více bakterií se na jeho povrchu přichytilo. Vliv na tvorbu biofilmu měla také plošná drsnost povrchu.

Klíčová slova

tenké vrstvy, TiCN, implantáty, biokompatibilita, kolonizace bakteriální populací

Abstract

The subject of this bachelor thesis is classification of TiCN thin layers deposited on top of a surgical steel AISI 316. Samples were prepared in Central Laboratory of Applied Physics at Bulgarian Academy of Science in Plovdiv using PVD method of steaming by electric arc. Each of the eight thin layers had different deposition conditions. During the deposition the ratio of gasses as well as voltage, current and deposition times were altered.

Bachelor thesis consists of two related parts. In the first part the physical and chemical properties of particular layers are studied. The properties which have an impact on attachment of biological material on top of the studied samples were evaluated (chemical composition, roughness and hydrophilic properties). Further, the chemical stability, layer thickness and an adhesion of the layer to the substrate were studied due to potential use of the samples in medical applications.

Second part of the bachelor thesis is dedicated to the evaluation of the biological interaction of *Escherichia coli* bacterial strain with the surface of studied samples. In particular the wiliness of microorganisms colonizing the samples was studied.

The aim of this bachelor thesis was to establish which of the TiCN surface properties has the most important effect on microorganism adhesion. The relation between these properties and parameters of thin film production was analyzed. The samples which showed the best properties in view of bacterial colonization were discussed in aspects of chemical stability, layer thickness and adhesion of the layer to the substrate.

Significant impact on biofilm formation had hydrophobicity of the surface. More hydrophobic samples were more colonized by bacteria. Also surface roughness had influence on the biofilm formation.

Key words

thin layers, TiCN, implants, biocompatibility, bacterial population colonization

Obsah

Seznam obrázků, grafů a tabulek	10
Seznam použitých symbolů a zkratk.....	12
ÚVOD.....	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1. Tenké vrstvy	15
1.1.1. Systém tenká vrstva - substrát	15
1.1.2. Metody přípravy tenkých vrstev	15
1.1.3. Tenké uhlíkové vrstvy v medicíně	17
1.2. Interakce bakterií s povrchem.....	19
1.2.1. Biofilm.....	19
1.2.2. Teorie DLVO.....	21
1.2.3. Vliv povrchu na vznik a růst biofilmu.....	21
1.2.4. Environmentální faktory ovlivňující vznik a růst biofilmu.....	22
1.3. Metody pro hodnocení fyzikálně-chemických parametrů materiálu	25
1.3.1. Mikroskopie.....	25
1.3.2. Dynamická kapková metoda	27
1.3.3. Kalotest.....	28
1.3.4. Scratch test.....	28
1.3.5. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	28
1.4. Metody pro hodnocení biologické interakce s materiálem.....	29
1.4.1. Kultivační metody	29
1.4.2. Hodnocení pomocí SEM	31
2. MATERIÁLY A METODY	32
2.1. Popis studovaných vzorků	32
2.2. Měření fyzikálně-chemických parametrů vrstev TiCN	34
2.3. Měření biologické interakce s tenkými vrstvami.....	37

3. VÝSLEDKY A DISKUZE	40
3.1. Vliv depozice na fyzikálně-chemické parametry vrstev TiCN.....	40
3.1.1. Chemické složení.....	40
3.1.2. Drsnost.....	41
3.1.3. Hydrofilita a hydrofobicita povrchu	43
3.1.4. Tloušťka vrstvy.....	43
3.1.5. Adheze vrstvy k substrátu	43
3.1.6. Vyluhovatelnost.....	44
3.2. Biologická interakce s tenkými vrstvami.....	45
3.2.1. Kapkový test a test se suspenzí (1 hodina).....	45
3.2.2. Test se suspenzí (24 hodin)	46
3.2.3. Hodnocení pomocí SEM	47
4. ZÁVĚR	51
Seznam použité literatury	53

Seznam obrázků, grafů a tabulek

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Ternární fázový diagram systému uhlíku a vodíku.....	17
Obrázek 2: Růstová křivka buněčné kultury	20
Obrázek 3: Rozlišovací schopnost různých metod a rozsah použitelnosti	25
Obrázek 4: Ředění desítkovou řadou.....	30
Obrázek 5: Princip výpočtu drsnosti povrchu.....	34
Obrázek 6: Princip metody dopadající kapky.....	35
Obrázek 7: Princip kalotestu.....	35
Obrázek 8: Hranice kritického zatížení LC_1 , LC_2 , LC_3 vznikající při Scratch testu	36
Obrázek 9: Struktura povrchu.....	48
Obrázek 10: Vzniklé kolonie bakterie <i>Escherichia coli</i> po 24 hodinách.	48
Obrázek 11: Zkrystalizovaný fyziologický roztok na povrchu bakterií.	49
Obrázek 12: Vznikající kolonie bakterií.....	49
Obrázek 13: Vzorek nabíjející se v místech s vrstvou bakteriálního biofilmu.	50
Obrázek 14: Jednotlivé bakterie <i>Escherichia coli</i> po 1 hodině kontaktu.	50

Seznam grafů:

Graf 1: Kapkový test.....	45
Graf 2: Test se suspenzí - 1 hodina.....	45
Graf 3: Test se suspenzí - 24 hodin.....	46

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Minimální, optimální a maximální pH pro růst některých druhů bakterií... 23	
Tabulka 2: Minimální, maximální a optimální teplota pro růst bakterií..... 24	
Tabulka 3: Signály generované po prvním kontaktu elektronového svazku	26
Tabulka 4: Složení chirurgické oceli AISI 316 (Fedel a Deflorian 2016).....	32
Tabulka 5: Parametry depozice jednotlivých vrstev.....	32
Tabulka 6: Vzhled a obsah povrchu jednotlivých vzorků.	33
Tabulka 7: Snímky vzorků z optického mikroskopu, zvětšeno 500x.	33
Tabulka 8: Porovnání narostlých kolonií po 1 hodině kontaktu bakterií se vzorky.	39
Tabulka 9: Procentuální chemické složení jednotlivých vrstev.....	40

Tabulka 10: Vyhodnocení povrchů pomocí AFM.	41
Tabulka 11: Kontaktní úhel u jednotlivých povrchů.	43
Tabulka 12: Tloušťka jednotlivých vrstev.	43
Tabulka 13: Vyhodnocení Scratch testu.	44
Tabulka 14: Množství vylouhovaných prvků.	44
Tabulka 15: Množství vylouhovaného organického uhlíku.	44
Tabulka 16: Korelační koeficienty.	47

Seznam použitých symbolů a zkratek

θ	kontaktní úhel
a-C	amorfní uhlík
a-C:H	hydrogenovaný amorfní uhlík
AFM	Atomy Force Microscopy (mikroskopie atomárních sil)
CVD	Chemical Vapor Deposition (chemická depozice z par)
DLC vrstvy	Diamond Like-Carbon (uhlíkové vrstvy podobné diamantu)
DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek (vědci podílející se na teorii DLVO)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDX	Energy-dispersive X-ray (energieově disperzní analýza)
ESEM	Environmental scanning electron microscope (environmentální rastrovací elektronová mikroskopie)
HC polymery	uhlovodíkové polymery
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem)
KTJ	kolonie tvořící jednotky
LC ₁	zatížení v místě, kde došlo ke vzniku první trhliny
LC ₂	zatížení při výraznějším porušení vrstvy (př. odloupení)
LC ₃	zatížení v místě prvního odhalení substrátu.
MCF	jednotka McFarland
PECVD	Plasma-enhanced chemical vapor deposition (chemická depozice z par podporovaná plazmatem)
pH	Potential of Hydrogen (potenciál vodíku)
PVD	Physical Vapor Deposition (fyzikální depozice z par)
Ra	plošná drsnost povrchu

sccm	Standard Cubic Centimeters per Minute (kubický centimetr za minutu)
SEM (REM)	Scanning electron microscope (Rastrovací elektronová mikroskopie)
ta-C	tetragonální uhlík
ta-C:H	hydrogenovaný tetragonální uhlík
TiCN	karbonitrid titanu
TiN	nitrid titanu
TOC	Total Organic Carbon (celkový organický uhlík)
WDX	Wavelength-dispersive X-ray (vlnově disperzní spektrometrie)

ÚVOD

Tělní implantáty jsou běžnou součástí dnešní medicíny. Setkáme se s nimi v ortopedii, traumatologii, stomatologii i dalších lékařských oborech. Základním parametrem pro materiál určený k výrobě implantátu je jeho biokompatibilita a mechanická odolnost. Například kovové slitiny vykazují výborné mechanické vlastnosti, ale při jejich aplikaci občas dochází k negativní imunitní odpovědi organismu způsobené obsahem alergenních prvků ve slitině (Mitura 2005).

Řešením tohoto problému je pokrytí povrchu implantátu tenkou vrstvou. Docílí se tak zachování potřebných mechanických vlastností implantátu a zároveň je dosaženo potřebných chemických a biologických vlastností povrchu. Pro tyto účely se často využívají tenké uhlíkové vrstvy, protože jsou chemicky inertní a zároveň vykazují vysokou korozní odolnost a tvrdost (Tůmová et al. 2007). Kromě běžně využívaných DLC (uhlíkových vrstev podobných diamantu) se využívají také uhlíkové vrstvy s přidaným kovem jako například karbonitrid titanové (TiCN) tenké vrstvy.

Tato bakalářská práce se bude zabývat jak fyzikálně-chemickými vlastnostmi, tak biokompatibilitou právě zmíněných TiCN tenkých vrstev. Cílem praktické části je určení vlastností TiCN povrchů, které mají vliv na adhezi mikroorganismů a odhalení spojitosti mezi takovými vlastnostmi povrchu a parametry při nanášení vrstvy.

Jako příklad modelového živého organismu je zvolen bakteriální kmen *Escherichia coli*. Jedná se o první krok v pozorování biologické interakce. Pokud se provedené testy s bakteriemi ukáží jako vhodné pro pozorování biologické interakce s tenkými vrstvami, budou následovat pokusy s buňkami tkáňovými pro přesnější posouzení biokompatibility.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Tenké vrstvy

Za tenkou vrstvu označujeme vrstvu o tloušťce od několika desítek nanometrů až po jednotky mikrometrů. Tenká vrstva je obvykle nanášena na tzv. substrát a mění tak jeho fyzikální, mechanické i chemické vlastnosti. Nános tenké vrstvy se využívá pro zvýšení tvrdosti, odolnosti proti opotřebení, zabránění korozi a dalším nežádoucím chemickým reakcím. Mění také elektrické a optické vlastnosti materiálu. Díky tomu nalézají tenké vrstvy uplatnění například v elektrotechnice, strojírenství, optice či medicíně (Blažek 2015).

1.1.1. Systém tenká vrstva - substrát

Při charakterizaci vrstvy je třeba zohlednit všechny čtyři oblasti, do kterých rozdělujeme systém tenká vrstva - substrát (substrát, rozhraní substrát-vrstva, objemová část vrstvy a povrchová část vrstvy).

Pokud povrchová část vrstvy adsorbuje vodní páru, může vzniknout odlišné chemické složení oproti objemové části tenké vrstvy. Především dochází k vytvoření oxidů v důsledku kontaminace kyslíkem (Holmberg a Mathews 1994).

Objemová část vrstvy ovlivňuje mechanické, elektrické a tepelné vlastnosti. Tato část vrstvy je ovlivněna parametry depozičního procesu. Rozhraní mezi objemovou částí vrstvy a substrátem výrazně ovlivňuje adhezi tenké vrstvy.

Rostoucí vrstva může přebírat strukturu krystalové mřížky nebo orientaci substrátu, na který je deponována. Důležitými vlastnostmi je také tepelná vodivost a tepelná roztažnost substrátu. Obě tyto vlastnosti mají přímý vliv na pnutí ve vrstvě (Musil 2000).

1.1.2. Metody přípravy tenkých vrstev

Podle druhu substrátu se před samotnou depozicí mohou provádět úpravy řezných hran a chemické či iontové čištění. Pro dobré adhezní vlastnosti je příkládán velký důraz na vysokou čistotu povrchu substrátu.

Tenké vrstvy jsou vytvářeny pomocí depozice využívající atomy, ionty a molekuly ve formě par. Metody dělíme podle principu na chemické depozice z par (Chemical Vapor Deposition - CVD) a fyzikální depozice z par (Physical Vapor Deposition - PVD) (Ohring 2001).

Metoda CVD (Chemická depozice z par)

Při CVD metodě se využívá vysokých teplot 700 - 1000 °C a tlaků plynné atmosféry až 100 kPa. Na rozhraní mezi plazmatem a povrchem substrátu vzniká v důsledku chemických procesů tenká vrstva, jejíž tloušťka může být až 13 μm. Prvky jsou přiváděny k substrátu v plynné fázi a díky vysokým teplotám se rozkládají. Produkty rozkladu jsou ukládány na ohřátý povrch substrátu a působí jako katalyzátor. Aby se vytvořila tenká vrstva, je zapotřebí reaktivní plyn (N_2 , NH_4 , CH_4) a určité procento nosného plynu (Ar , H_2), který dopravuje plynnou směs k substrátu a ovlivňuje rychlost tvorby a adhezi tenké vrstvy (Foltýn 2008).

Nejčastěji je využíván buď reaktor s horkou stěnou, nebo reaktor se stěnou studenou. V prvním případě se udržuje stejná teplota stěny reaktoru a substrátu, což vede k tvorbě vrstvy i na stěně reaktoru a mohlo by vést k následné kontaminaci povlaku substrátu. Z tohoto důvodu se tato varianta používá pouze pro exotermické reakce. U takových vysoká teplota stěny reaktoru zabraňuje tvorbě povlaku na jejím povrchu. Druhý typ reaktoru, kdy je vyhříván pouze držák se substrátem, se používá pro reakce endotermické. Stěna komory je obvykle chlazená vodou a nedochází k nežádoucí tvorbě povlaku na stěně reaktoru (Foltýn 2008; Blažek 2015).

Metoda PVD (Fyzikální depozice z par)

Při PVD metodě se využívá vysokého vakua (0,1 až 1,0 Pa) při teplotách 150 - 500 °C. Při povlakování jsou uvolňovány atomy z tzv. terčů. Touto metodou se obvykle vytvářejí vrstvy s menší tloušťkou než metodou CVD.

Existují tři odlišné typy metody PVD. První z metod je napařování, kdy jsou částice uvolňovány z terče pomocí urychlených iontů argonu. Při dalším typu, napařování, jsou částice uvolňovány nízkonapěťovým obloukem, laserem, elektronovým paprskem nebo indukci. Následně jsou ionizovány a dochází k reakci s inertním a reaktivním plynem v komoře. Posledním typem je iontová implantace. Uvolněné ionizované částice jsou při této metodě elektrickým polem urychlovány směrem k povrchu substrátu.

Nevýhodou PVD je složitý vakuový systém a nutnost pohybovat povlakovaným předmětem pro docílení rovnoměrné vrstvy. Na druhou stranu se jedná o ekologicky šetrnou metodu, při které se neuvolňují žádné toxické látky (Foltýn 2008).

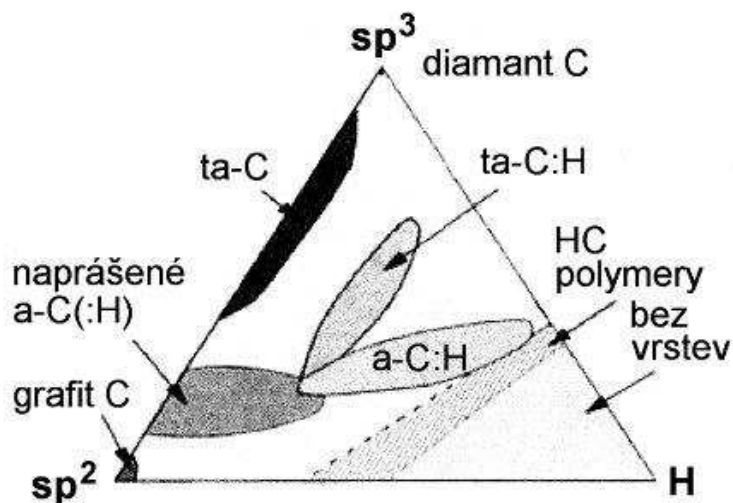
1.1.3. Tenké uhlíkové vrstvy v medicíně

Tenké vrstvy nalézají uplatnění například v oblasti kovových tělních implantátů. Slouží jako ochrana před alergickou reakcí lidského organismu na kovový implantát. Důležitá je pevnost vazby mezi substrátem a vrstvou, protože i nepatrné odhalení kovového podkladu by mohlo vyvolat alergickou reakci.

Uhlíkové vrstvy mají vysokou korozní odolnost, tvrdost a jsou zároveň chemicky inertní. Díky biokompatibilitě jsou uhlíkové nanovrstvy ideální pro povlaky kloubních implantátů. Jsou využívány především na místa, kde dochází k tření (Tůmová et al. 2007).

Uhlíkové vrstvy DLC Diamond Like-Carbon (Uhlíkové vrstvy podobné diamantu)

Poměr sp^2 a sp^3 konfigurace vazeb mezi atomy uhlíku ovlivňuje vlastnosti amorfních uhlíkových vrstev (DLC). Ternární fázový diagram na obrázku 1 zobrazuje několik druhů vznikajících tenkých vrstev v závislosti na obsahu sp^2 , sp^3 a vodíku. Pokud uhlík obsahuje malý počet sp^2 vazeb a neobsahuje téměř žádný vodík, označujeme ho jako amorfní uhlík (a-C). Taková konfigurace vzniká při magnetronovém naprašování. Uhlík obsahující sp^3 vazby a téměř žádný vodík se nazývá tetragonální uhlík (ta-C) a připravuje se buď laserovou ablací, nebo obloukovým naprašováním.



Obrázek 1: Ternární fázový diagram systému uhlíku a vodíku. Amorfní (a-C) a tetragonální uhlík (ta-C) s nízkým obsahem vodíku se nalézají při levé straně, hydrogenovaný amorfní (a-C:H) a hydrogenovaný tetragonální uhlík (ta-C:H) uprostřed. Zkratka HC polymery značí uhlovodíkové polymery (Jacob a Möller 1993).

Uprostřed diagramu leží oblast hydrogenovaného amorfního uhlíku (a-C:H) a hydrogenovaného tetragonálního uhlíku (ta-C:H). Takové vrstvy jsou připravovány metodou PECVD (speciální kombinace chemické a fyzikální metody) (Jacob a Möller 1993).

Tenké vrstvy TiCN

Alternativou DLC vrstev může být v medicínských aplikacích uhlíková vrstva s přidaným kovem. Takovým kovem může být titan v podobě TiCN (karbonitrid titano-*vé*) vrstvy, která byla vyhodnocena jako biokompatibilní, a proto vhodná pro tělní implantáty (Acton 2012). Ve srovnání s vrstvou TiN nabízí povlaky TiCN lepší výsledky pro jejich tvrdost a menší součinitel tření. Povlaky nejsou navzdory své tvrdosti křehké a zachovávají si dobrou houževnatost (Blažek 2015).

1.2. Interakce bakterií s povrchem

Bakterie můžeme z hlediska způsobu života rozdělit do dvou skupin. První skupinou je bakteriální plankton, tedy volně žijící bakterie, o kterých se poprvé zmiňuje nizozemský vědec Antoni van Leeuwenhoek v roce 1674 na základě svých mikroskopických pozorování. Do druhé skupiny řadíme bakterie, které preferují přilnavý způsob života - tedy adherentní bakterie (pro účely vyhodnocení vhodnosti testovaného povrchu pro kolonizaci bakteriální populací je třeba zvolit právě adherentní bakterie, jako je například bakterie *Escherichia coli* (Garrett et al. 2008).

1.2.1. Biofilm

Zhruba 99 % populace adherentních bakterií se nachází ve formě biofilmu v různých fázích růstu (Garrett et al. 2008). Bakterie se tvorbou mikrokolonií spojených extracelulární matrix chrání před vnějšími škodlivými vlivy, jako jsou například dezinfekční prostředky, antibiotika, teplota, náhlá změna pH apod. Zároveň dochází k rychlejší genové expresi, kterou stimuluje mezibuněčná komunikace uvnitř biofilmu (Costerton 2007).

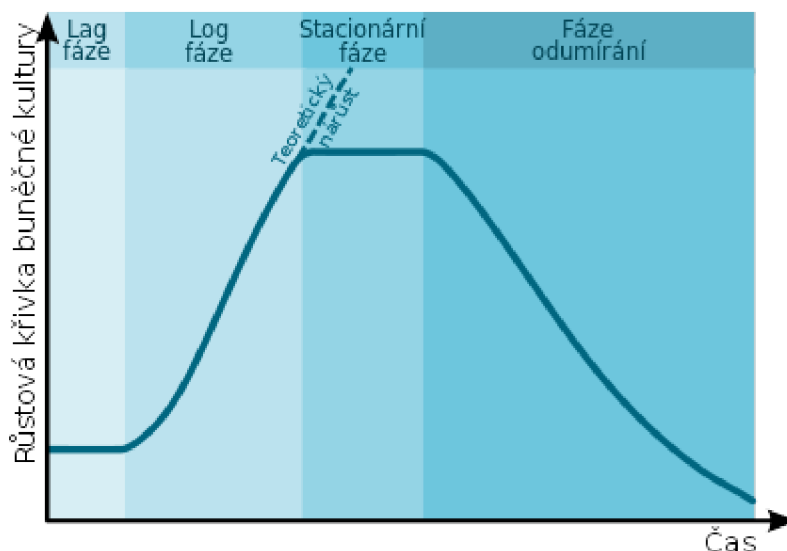
Fáze růstu biofilmu

První nastává při tvorbě biofilmu reverzibilní adheze, kdy se bakterie obsažené v kapalině dostávají k povrchu, a to buď pomocí fyzikálních sil, nebo například pomocí bičíků. Přilnavost těchto bakterií k testovanému povrchu závisí na mnoha faktorech a růst biofilmu se řídí řadou fyzikálních, chemických a biologických procesů.

Následně se většina bakterií adsorbuje na povrch. Znamená to, že bičíky, fimbrie či pili, překonaly fyzikální odpudivé síly elektrické dvojvrstvy. V této fázi bakterie už nejsou snadno oddělitelné od povrchu a fáze se proto nazývá Ireverzibilní adheze (Garrett et al. 2008).

Po lag fázi, kdy se bakterie ještě nemnoží tak rychle a enzymaticky se připravují na růst v novém prostředí, následuje fáze rychlého exponenciálního růstu, která trvá až do vyčerpání živin (obrázek 2). Binární dělení (neboli příčné dělení) je zahájeno zdvojením chromozomu. Buňka se protáhne a uprostřed vznikne přepážka z plazmatické membrány a buněčné stěny. Z jedné mateřské bakterie vzniknou dvě dceřiné. Při optimálních podmínkách a dostatku živin je doba generace u bakterie *E. coli* zhruba 20 minut (Jelínek a Zicháček 2014).

Nejprve dochází k růstu biofilmu do stran (podél povrchu) a až poté ho rozšiřují dceřiné bakterie do objemu (tj. 3D). Po vyčerpání zásob dochází ke stacionární fázi, během které se zpomaluje rychlost dělení, až dojde k fázi odumírání, kdy je počet odumřelých buněk vyšší než buněk nově vzniklých (Rosypal 2003, Marshall 1994).



Obrázek 2: Růstová křivka buněčné kultury (Komorniczak 2011).

Struktura biofilmu

Prostor mezi jednotlivými buňkami vyplňuje extracelulární matrix. Vznikají mikrokolonie obalené extracelulárním matrix a protkané sítí otevřených vodních kanálků. Tyto kanálky slouží k dodávce živin a odstraňování odpadních látek. O vlastnostech biofilmu jako celku nejvíce vypovídá složení matrix, protože buňky se chovají více jako pevné částice a voda v kanálkách jako kapalina.

Tloušťka biofilmu se pohybuje v řádu desítek mikrometrů. Pokud se biofilm nachází v prostředí bohatém na živiny, bývá plochý a ne tolik strukturovaný. Naopak biofilm v podmínkách pro bakterie nepříznivých tvoří jednoduché věže nebo se formuje do tvaru houby a tato uskupení jsou hustě protkána kanálky (Costerton, 2007).

Specifika biofilmu *Escherichia coli*

U gramnegativní bakterie *Escherichia coli* je aktivní pohyb podpořen zařízením, které umožňuje této bakterii aktivní pohyb v kapalném prostředí (Pratt a Kolter 1999). Při ireverzibilní adhezi byl u kmene *E. coli* prokázán vliv tří tříd fimbrií - fimbrie 1. typu, curli a konjugativní pili. (Romeo 2008). Avšak Prigent-Combaret a jeho spolupracovníci (2000) dokázali, že bičíky nejsou nezbytně nutné k přisednutí bakterie

k povrchu a nemají vliv na další rozvoj biofilmu. Bičík je pro tvorbu biofilmu postradatelný především u kmenů, které vytváří konjugativní plazmid. V takových případech je pravděpodobné, že silné adherentní faktory nahrazují aktivní pohyb při počáteční interakci mezi bakterií a povrchem.

1.2.2. Teorie DLVO

Bakterie jsou hlavní složkou biofilmu a jejich velikost je od 0,5 do 2 μm , což se rovná velikosti koloidních částic. Byla proto vytvořena teorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek), která popisuje van der Waalovy síly, sterické a elektrostatické interakce působící mezi bakteriemi a povrchem. Van der Waalova přitažlivá síla je dominantní v blízkosti povrchu. Při působení této síly nemohou být částice odděleny z povrchu Brownovým pohybem, a proto nastává nevratná adheze. Naopak Coulombické interakce nastávají ve větší vzdálenosti od povrchu, kde van der Waalovy síly prudce klesají (Hori a Matsumoto 2010).

1.2.3. Vliv povrchu na vznik a růst biofilmu

Adheze bakterií závisí mimo jiné na vlastnostech povrchu, který bakterie kolonizují. Schopnost bakterií uchytit se na povrchu závisí především na drsnosti, topografii a smáčivosti povrchu. Dále také na jeho chemickém složení.

Topografie povrchu

Drsnost povrchu, značená R_a , je definována jako jemně rozložené odchytky a nerovnosti, které tvoří konečný povrchový vzor.

Pomocí světelné a elektronové mikroskopie bylo prokázáno, že nepravidelnosti povrchu mají pozitivní efekt na uchycování bakterií. V proláklínách jsou bakterie chráněny před smykovými silami, a to zajistí bakterii dostatečný čas pro nevratnou adhezi k povrchu.

Výzkum, který provedl Robert Taylor (1998), ukázal, že při zvýšení drsnosti podkladu z hodnoty 0,04 μm na 1,24 μm se bakteriální adheze výrazně navýšila. Následné zvýšení drsnosti na 7,89 μm vedlo ke snížení přilnavosti. Adheze byla ale stále vyšší než u hladkého povrchu (Taylor et al. 1998).

I další studie potvrdily, že morfologie povrchu má vliv na růst organismů na povrchu. Například buňky *E. coli* mají tendenci se rovnat na poškrábaném povrchu, kde šířka drážek je přibližně 700 nm (podobně jako příčný průměr bakterie, který je přibliž-

ně 500 nm, ale kratší než je podélný průměr bakterie 2 - 3 μm). Pokud velikost a tvar těchto škrábanců odpovídá zmíněným parametrům, je adheze bakterií výrazně zvýšena. Pokud jsou však nerovnosti na povrchu menší, či výrazně větší než tyto rozměry, bakterie nemusí být schopná se rýhám přizpůsobit (Seddiki et al. 2014).

Předpokládá se, že topografie povrchu má na adhezi bakterií větší vliv, než fyzikálně chemické interakce jako je volná povrchová energie či hydrofobicita (Taylor et al. 1998).

Hydrofilita a hydrofobicita

Další vlastností, která má vliv na vznik biofilmu je hydrofobicita či hydrofilita povrchu a s tím související volná povrchová energie. Většina mikroorganismů adhezuje lépe na hydrofobní povrchy než na hydrofilní. Tento jev souvisí s hydrofobicitou povrchu samotných bakterií, která je způsobena proteiny a lipidy na povrchu buňky. Se snižující se hydrofobitou pevného povrchu se schopnost hydrofobních bakterií kolonizovat povrch snižuje (Palmer et al. 2007).

1.2.4. Environmentální faktory ovlivňující vznik a růst biofilmu

Vznik a růst biofilmu je také ovlivněn mnoha parametry prostředí (resp. kapaliny), ve kterém se bakterie vyskytují. Mezi takové parametry patří především obsah rozpuštěného kyslíku, koncentrace vodíkových iontů (hodnota pH) a teplota prostředí.

Vliv kyslíku

Odpověď organismu na kyslík v prostředí (rozpuštěný kyslík ve vodě) závisí na obsahu enzymů v buňce, které s O_2 reagují. Distribuce těchto enzymů v buňkách určuje schopnost bakterie existovat v přítomnosti O_2 . Při rozkladu kyslíku vzniká peroxid (H_2O_2), superoxid (O_2^-) a malé množství toxických volných radikálů. U aerobních a aerotolerantních anaerobních bakterií brání akumulaci smrtelného množství superoxidu tři enzymy: superoxid dismutasa, peroxidasa a katalasa (Kenneth 2012).

Vliv pH

Pro každý druh bakterií existuje optimální pH, při kterém je růst bakterií nejvíce podporován (tabulka 1). Podle hodnoty optimálního pH dělíme bakterie na acidofilní (kyselé prostředí), neutrofilní (pH 6-8) a alkalofilní (zásadité prostředí). Změna pH mů-

že mít výrazný vliv na růst bakterií, a proto je často využívána při výrobě čisticích a dezinfekčních prostředků (Garrett et al. 2008).

Bakterie reagují na změnu pH pomocí procesů, které regulují aktivitu proteinů spojených s různými dalšími procesy jako je protonová translokace či degradace aminokyselin (Olson 1993). Alkalické sloučeniny vznikají hydrolyzou močoviny na amoniak a oxid uhličitý. Některé druhy bakterií mohou vytvořit ochranný zásaditý oblak pro neutralizaci kyselějšího prostředí (Liu et al. 2015).

Studie prokázaly, že postupné zvyšování kyselosti prostředí znamená větší šanci na přežití buněk v roztoku, než tomu bylo při náhlém zvýšení kyselosti. To značí, že bakterie obsahují mechanismy, které umožňují bakteriální populaci adaptovat se na malé změny okolního prostředí. Některé buněčné procesy se však přizpůsobují změně pH velmi obtížně. Jedná se především o vylučování exopolymerních látek (polysacharidů). Optimální hodnota pH pro výrobu polysacharidů se u jednotlivých druhů liší, pro většinu bakterií se pohybuje kolem pH 7 (Garrett et al. 2008).

Tabulka 1: Minimální, optimální a maximální pH pro růst některých druhů bakterií (Kenneth 2012a).

Bakterie	Minimální pH	Optimální pH	Maximální pH
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	0,5	2,0-2,8	4,0-6,0
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	1,0	2,0-3,0	5,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4,0-4,6	5,8-6,6	6,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,2	7,0-7,5	9,3
<i>Escherichia coli</i>	4,4	6,0-7,0	9,0
<i>Clostridium sporogenes</i>	5,0-5,8	6,0-7,6	8,5-9,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,6	6,6-7,0	8,0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6,5	7,8	8,3
<i>Nitrobacter</i> sp	6,6	7,6-8,6	10,0

Vliv teploty

U bakterií rozlišujeme také minimální, optimální a maximální růstovou teplotu (tabulka 2). Podle teplotního optima se bakterie dělí na psychrofilní (do 20 °C), mezofilní (20–40 °C), termofilní (40 °C a více) a případně také hypertermofilní s optimem kolem 80 °C (Votava 2005).

Optimální teplota pro organismus je spojena se zvýšeným příjmem živin, což vede k rychlé tvorbě biofilmu. Metabolismus živin je závislý na přítomnosti enzymů, které

řídí mnoho fyziologických a biochemických procesů bakterií. Teplota prostředí koreluje s reakční rychlostí enzymů (Garrett et al. 2008).

Vliv teploty na vznik biofilmu je sporný. Fletcher (1977) zaznamenal vliv teploty na vznik biofilmu u mořských druhů *Pseudomonas*, kdy se adhezní vlastnosti tohoto druhu snižovaly s poklesem teploty. Ve svém výzkumu to připisuje zmenšení bakteriálního povrchu při nižší teplotě. Herold a Zottola (1988) pozorovali přítomnost bičků v závislosti na teplotě prostředí. Při 30 °C byl u bakterie pozorován jeden bičík, při 21 °C dva až tři bičíky a při 10 °C již několik bičků. Narůstající počet bičků měl za následek zvýšenou počáteční interakci mezi bakteriemi a substrátem. Zvyšovala se tak adheze a pravděpodobnost vzniku biofilmu.

Tabulka 2: Minimální, maximální a optimální teplota pro růst některých druhů bakterií (Kenneth 2012a).

Bakterie	Minimální teplota [°C]	Optimální teplota [°C]	Maximální teplota [°C]
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	30-37	45
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	4	35	41
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	30-37	45
<i>Escherichia coli</i>	10	37	45
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	25	37	42
<i>Thermus aquaticus</i>	40	70-72	79
<i>Methanococcus jannaschii</i>	60	85	90
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	70	75-85	90
<i>Pyrobacterium brockii</i>	80	102-105	115

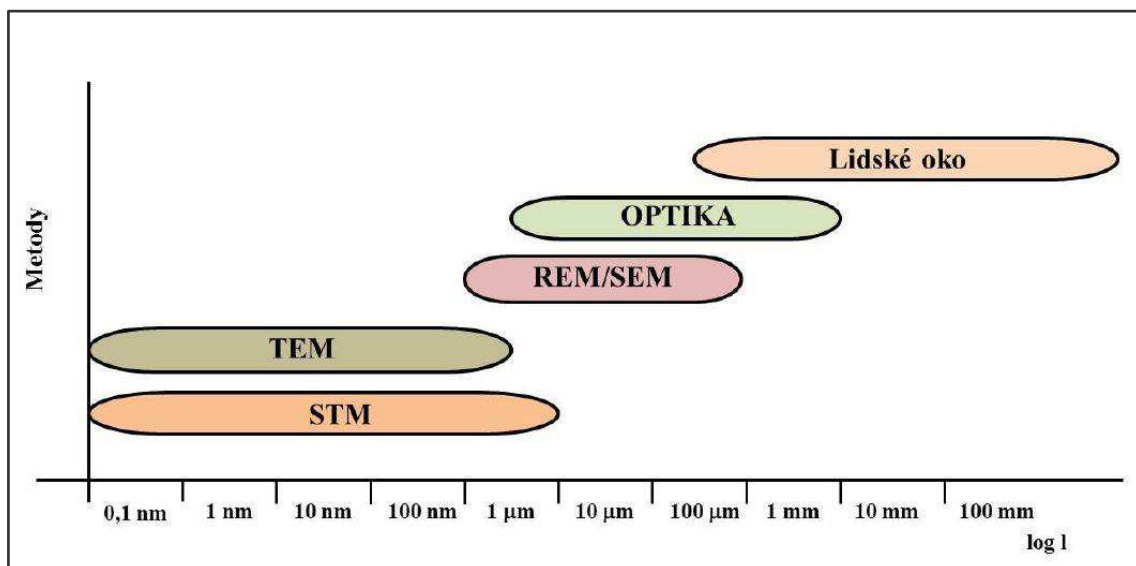
1.3. Metody pro hodnocení fyzikálně-chemických parametrů materiálu

Existuje velké množství fyzikálně-chemických vlastností materiálu (hustota, modul pružnosti, tažnost, stlačitelnost, pevnost, topografie povrchu, drsnost, tvrdost, ohybový modul, deformace, tření apod.), avšak pouze některé z těchto vlastností jsou spojovány s přilnavostí bakterií k danému povrchu. Mezi takové řadíme především drsnost, topografii a chemické složení vzorku. Topografické vlastnosti mohou být studovány například pomocí různých druhů mikroskopie. K odhalení chemického složení vzorku slouží např. elektronově disperzní analýza či hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem pro stanovení vyluhovatelnosti vzorku.

1.3.1. Mikroskopie

Při charakterizaci materiálů jsou mikroskopické metody využívány jako primární neinvazivní metody k zjištění základních vlastností. Mikroskopické metody poskytují důležité kvantitativní informace o struktuře, složení, defektech, distribuci fází či velikostech zrn (Barabaszová 2012).

Druh mikroskopie volíme podle potřebné rozlišovací schopnosti (obrázek 3). Rozlišovací schopností rozumíme minimální vzdálenost dvou ještě rozlišitelných bodů. Zatímco u lidského oka je tato vzdálenost 0,2 mm, světelná mikroskopie nám poskytuje rozlišení 0,2 μm a elektronová mikroskopie dokonce 0,1 nm.



Obrázek 3: Rozlišovací schopnost různých metod a rozsah použitelnosti zvětšujících zařízení. STM - Scanning Tunneling Microscope (řádovací tunelový mikroskop), TEM - transmisní elektronový mikroskop, REM/SEM - Scanning Electron Microscope (rastrovací elektronový mikroskop) (Barabaszová 2012).

Optická mikroskopie

Optická mikroskopie nachází široké uplatnění v průmyslových, výzkumných i klinických laboratořích především díky nenáročnosti na přístrojové vybavení a snadnému ovládání (Vodárek 2012). Optický mikroskop se skládá z optické soustavy, osvětlovací soustavy, mechanického a záznamového zařízení.

Osvětlovací soustava zajišťuje osvětlení pozorovaného předmětu. Optickým mikroskopem můžeme pozorovat předměty průhledné (světlo prochází vzorkem) i neprůhledné (tzv. metoda odraženého světla). Kromě toho je v obou případech možné konstruovat osvětlovací soustavu pro práci v tmavém nebo ve světlém poli.

Pokud chceme docílit velkého zvětšení, využíváme k tomu vhodný objektiv a na vzorek aplikujeme imerzní olej (Barabaszová 2012).

Elektronová mikroskopie

Elektronový mikroskop využívá k zobrazování předmětů svazek elektronů, urychlených pomocí elektrického pole a místo skleněných čoček používá čočky elektromagnetické (Watt 1997). Signály generované po prvním kontaktu primárního elektronového svazku se zkoumaným vzorkem jsou popsány v tabulce 3.

Tabulka 3: Signály generované po prvním kontaktu primárního elektronového svazku se zkoumaným vzorkem (Christidis et al. 2011).

Signál	Energetická řada signálu	Hloubka průniku	Příklady poskytujících informací
Zpětně odražené elektrony	> 50 eV	> 100 nm	Chemické složení, povrchová topografie.
Charakteristické rentgenové záření		0,1 - 3 μm	Rentgenová spektra, kvantitativní analýza, snímky elementární analýzy.
Sekundární elektrony	0 – 50 eV	1 - 10 nm	Topografické snímky o vysokém rozlišení.
Katodoluminiscence	1 – 4 eV	20 nm	Defekty.
Augerovy elektrony	100 – 1,5 eV	< 20 Å	Povrch, kvantitativní složení a chemická analýza.

Skenovací (rastrovací) elektronový mikroskop (SEM/REM)

Obraz je při skenovací elektronové mikroskopii tvořen pomocí sekundárního signálu zpětně odražených nebo sekundárních elektronů. Předností skenovací elektronové mikroskopie je velká hloubka ostrosti. Podmínkou pro získání přesných dat je správná příprava vzorků. Vzorek by měl být vodivý, aby nedocházelo k nabíjení elektrony. Zajištění vodivosti bývá realizováno pomocí vakuového naprašování, které probíhá při nižším vakuu (10^{-4} Pa), kdy je naprašována vrstva slitiny Au/Pd. Zároveň musí být vzorek stabilní v elektronovém záření a nesmí obsahovat vodu. (Barabaszová 2012).

Elektronová mikroanalýza

Skenovací elektronová mikroskopie umožňuje kromě studování struktury a morfologie materiálů rovněž elektronovou mikroanalýzu, která poskytuje informaci o chemickém složení. Existují dva způsoby, jak získat informaci o složení a struktuře vzorku, a to prostřednictvím rentgenového záření s využitím vlnově disperzního spektrometru (WDX) nebo pomocí energiově disperzní analýzy (EDX).

U EDX dochází při dopadu fotonů rentgenového záření na polovodičový detektor k fotoefektu. Počet vzniklých fotoelektronů je úměrný energii dopadajícího kvanta záření. Kvalitativní analýza spočívá v přiřazení píků v EDX spektrech odpovídajícím prvkům na základě jejich charakteristické energie (Vodárek 2012).

Mikroskopie atomárních sil (AFM)

AFM mikroskopie (atomy force microscopy) je založena na rozložení atomárních sil na povrchu vzorku; dosahuje vysokého rozlišení, kdy při vhodných podmínkách lze zobrazit i jednotlivé atomy. Velkou výhodou mikroskopu atomárních sil je, že je možné měřit i nevodivé vzorky, jelikož tato metoda nevyužívá průchodu proudu (Yao a Wang 2006). Mikroskopie AFM nám umožňuje například vykreslit 3D model, nebo vypočítat plošnou drsnost vymezené plochy povrchu.

1.3.2. Dynamická kapková metoda

Vlastnost kapaliny přilnout k povrchu pevných látek se nazývá smáčivost. Smáčivost vybraných modelových povrchů lze studovat např. dynamickou kapkovou metodou na aparatuře umožňující zobrazení a měření kontaktního úhlu na rozhraní. Kontaktní úhel udává kvantitativní vyjádření rozsahu smáčivosti pevných látek kapalinami. Úhel

smáčení je jednou z mála přímo měřitelných vlastností fázového rozhraní pevná látka-kapalina (Krásný 2010).

1.3.3. Kalotest

Princip kalotestu spočívá ve vybroušení kulového vrchlíku až na substrát, za pomoci otáčející se ocelové kuličky potřené diamantovou brusnou pastou. Pomocí této metody je díky mikroskopickému proměřování průmětu vybroušeného vrchlíku vypočtena tloušťka vrstvy. Oblast použití je obvykle pro vrstvy tloušťky 1-100 μm . Optimální drsnost povrchu pro měření by měla být $R_a < 0,4 \mu\text{m}$. Alternativní metodou může být například měření tloušťky vrstev na příčném metalografickém výbrusu pomocí optických nebo elektronových mikroskopů (Blažek 2015).

1.3.4. Scratch test

Scratch test (nebo-li vrypová zkouška) je prováděn za účelem zjištění adheze povlaků k substrátu. Nejčastěji je při měření využíván lineární růst zatížení, ale lze zvolit i jiné druhy zatěžování, např. při konstantní síle, se skokovým přírůstkem zátěžné síly aj. Kromě měření aplikované normálové síly je Scratch tester vybaven také snímačem tangenciální (třecí) síly, snímačem hloubky penetrace hrotu a detektorem akustické emise. Přístroj je také vybaven optickým mikroskopem (Cének 2014).

1.3.5. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je analytická metoda vhodná pro stanovení stopových množství prvků. Tato metoda je kombinací indukčně vázaného plazmatu (ICP) jako zdroje iontů a hmotnostní spektrometrie (MS) k jejich detekci (Krajčovičová 2009).

1.4. Metody pro hodnocení biologické interakce s materiálem

Biologická interakce s materiálem byla vyšetřována pomocí mikrobiologických metod. Při mikrobiologické práci je zapotřebí zvýšené opatrnosti, protože v prostředí laboratoře se vyskytuje množství mikroorganismů, které by při kontaktu s pozorovanými vzorky znehodnotily námi naměřená data. Důležité je proto dodržovat zásady aseptické práce, což znamená především používání sterilních pomůcek a zamezení kontaminace vzorků mikroorganismy z ovzduší (otevírat sterilní potřeby jen na nezbytně nutnou dobu).

1.4.1. Kultivační metody

Kultivační metody dělíme na kvalitativní a kvantitativní (Bursová 2014). V této práci byly využity především kvantitativní metody, které zkoumají množství množících se buněk cílového mikroorganismu ve studovaném vzorku. Výsledky byly vyhodnoceny metodou počítání KTJ (kolonie tvořící jednotky).

Inokulace bakterií

Inokulace znamená přenesení bakteriální kultury do tekuté půdy. Opálenou zchlazenou kličkou nabere materiál a ponoříme kličku do média. Otřením o stěnu zkumavky s následným zatřepáním rozptýlíme nanesené bakterie. Takto vytvořenou suspenzi dáme inkubovat do optimální teploty pro daný bakteriální kmen (využívají se tzv. inkubátory).

Koncentrace bakterií

Před aplikací bakteriální suspenze na studovaný vzorek je třeba dosáhnout určité počáteční koncentrace bakterií v bakteriální suspenzi. Optická hustota vzorku souvisí s koncentrací bakterií v roztoku. Měření optické hustoty pomocí spektrofotometru je jednoduchá a nedestruktivní metoda, je však nevhodná pro vzorky s obsahem bakterií vyšším než 10^7 buněk na mililitr (Kenneth 2012b). Pro detekci bakterie *Escherichia coli* se doporučuje vlnová délka 600 nm (Biotek 2008).

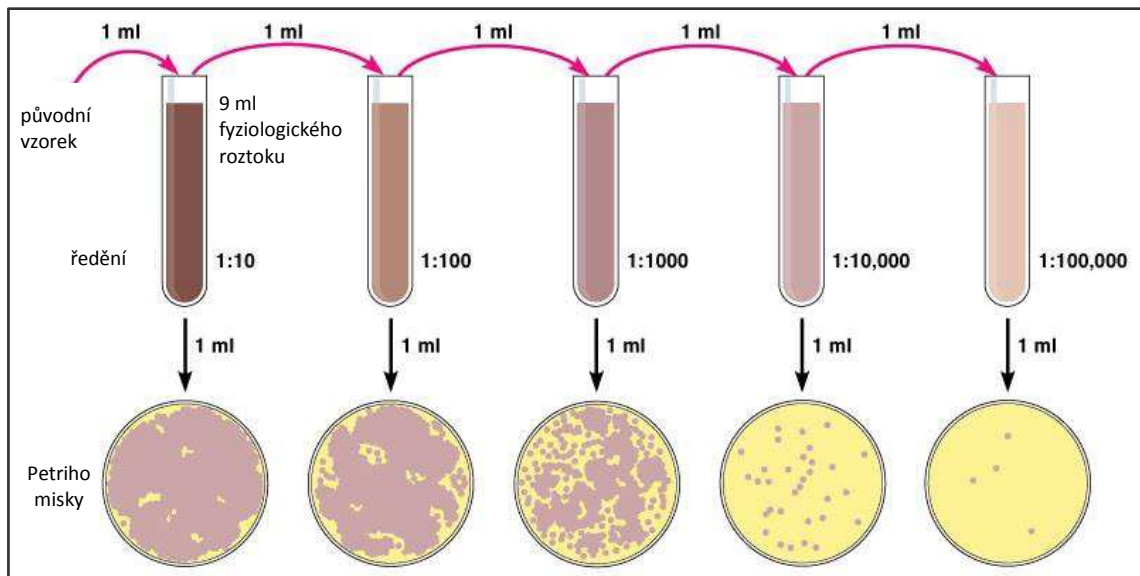
Pro vyjádření koncentrace bakterií v suspenzi se využívá McFarlandova standardu. McFarlandova stupnice je určena pro odhad koncentrace gramnegativních bakterií, jako je například *E. coli* (Sutton 2006). Při vlnové délce 600 nm odpovídá hodnota 1 MCF absorpenci 0,257 a přibližně 3×10^8 KTJ/ml. (McFarland 1907; Sutton 2006).

Stanovení kultivovatelných mikroorganismů

Tato metoda umožňuje stanovit pouze množství životaschopných a množících se mikroorganismů, proto se výslednému číslu dává jednotka KTJ (kolonie tvořící jednotky). Metoda je založena na izolaci mikroorganismů z prostředí a jejich následném ředění ve vhodném médiu (Trögl 2008).

Ředění se provádí desítkovou řadou (obrázek 4). 1 ml vzorku se přenese do zkumavky s 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Obsah ve zkumavce se důkladně promíchá a z této se odebere 1 ml a přenese se do následující zkumavky s 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Tento postup se opakuje dle očekávaného obsahu mikroorganismů ve vzorku, aby se dosáhlo potřebného zředění. Za počítatelný rozsah se bere 30 300 KTJ na jednu Petriho misku (Goldman a Green 2008).

Následně se ze zkumavek vynese 1 ml vzorku na Petriho misku, zaleje se agarem, pečlivě promíchá krouživými pohyby a po zchladnutí se vloží dnem vzhůru do inkubátoru s požadovanou teplotou. Po inkubaci při optimálních podmínkách se po určité době spočítají vzniklé KTJ a přepočítají se buď na objem, nebo na povrch vzorku.



Obrázek 4: Ředění desítkovou řadou (Pearson Education 2008).

1.4.2. **Hodnocení pomocí SEM**

Pro biologické vzorky, tedy vlhké a elektricky nevodivé materiály, se běžně využívá environmentální rastrovací elektronová mikroskopie (ESEM) (Knowles 1995). Pokud je však biofilm uchycen na vodivém podkladu, je možné využít skenovací elektronovou mikroskopii (SEM), která poskytuje kvalitativní informace o biofilmu ve vysokém rozlišení (Beech et al. 1996). Vysoké rozlišení elektronového mikroskopu umožňuje vyhodnotit velikost a vzhled buněk a také zda se bakterie usazují spíše v povrchových nerovnostech či naopak (Marrie a Costerton 1984).

2. MATERIÁLY A METODY

2.1. Popis studovaných vzorků

Bylo studováno 8 vzorků tenkých vrstev TiCN nadeponovaných na oceli. Jako kontrola bylo u mikrobiologických testů využíváno mikroskopické podložní sklíčko. Sklo bylo zvoleno jako kontrola, protože je inertní a biologicky neaktivní.

Depozice vrstev

Vrstvy TiCN byly deponovány na chirurgickou ocel AISI 316, která je velmi odolná vůči korozi a nízký obsah uhlíku umožňuje její dobrou řeznou obrobiteľnost. Obsah prvků v tomto druhu oceli je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4: Složení chirurgické oceli AISI 316 (Fedel a Deflorian 2016).

Obsah prvků [hm%]							
C	Pb	Sb	Mn	Si	Cr	Ni	Mo
0,035	0,04	0,03	2,0	0,75	16,0 - 18,0	10,0 - 15,0	2,0 - 3,0

Celkem bylo testováno osm vzorků (S-01 až S-08) připravených v Centrální laboratoři aplikované fyziky na Bulharské akademii věd v Plovdivu, za použití metody PVD napařování elektrickým obloukem (Cathodic Arc Plasma Deposition). Podmínky depozice jednotlivých druhů vrstev jsou uvedeny v tabulce 5.









Tabulka 5: Parametry depozice jednotlivých vrstev.

	Vzorek							
	S-01	S-02	S-03	S-04	S-05	S-06	S-07	S-08
Poměr plynů C₂H₂/N₂ [sccm]	11/180	20/160	30/140	30/140	30/140	75/150	75/150	93/80
Napětí U [V]	- 40	- 40	- 40	- 60	- 40	- 40	- 40	- 40
Proud I [A]	85	85	85	85	125	85	125	85
Doba depozice t [min]	120	120	120	120	120	120	120	60

Vzhled a velikost vzorků

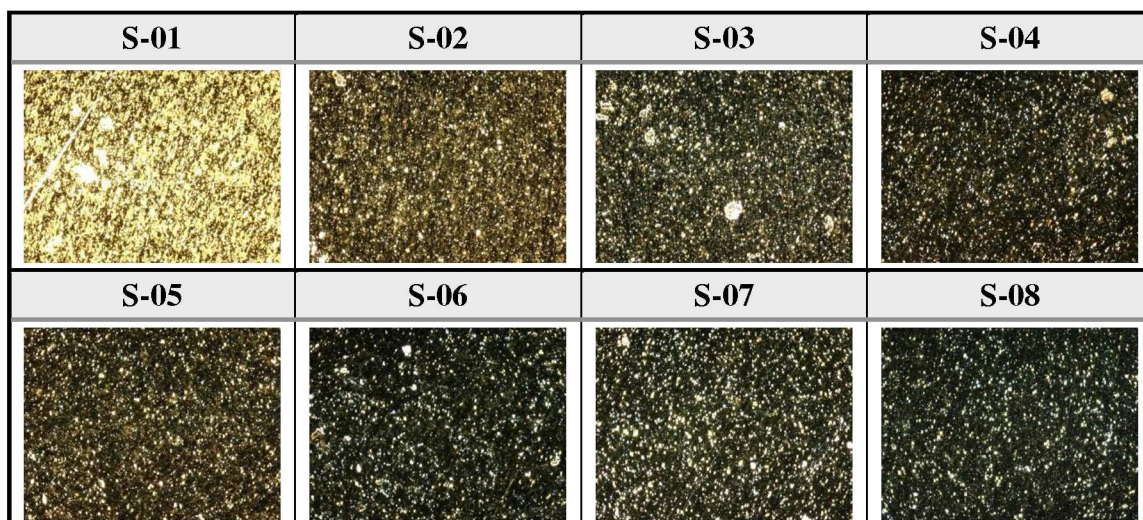
Již při pozorování pouhým okem jsou rozdíly v depozici vrstev znatelné odlišným zabarvením jednotlivých vzorků. Vzorky byly změřeny pomocí posuvného měřítka a byl vypočítán jejich povrch (tabulka 6), ke kterému byly později vztahovány výsledky biologických testů (především počet KTJ na cm^2 vzorku).

Tabulka 6: Vzhled a obsah povrchu jednotlivých vzorků.

Číslo vzorku	S-01	S-02	S-03	S-04
				
Obsah povrchu [cm^2]	17,39	17,39	17,39	14,07
Číslo vzorku	S-05	S-06	S-07	S-08
				
Obsah povrchu [cm^2]	14,07	14,07	17,39	17,39

Optická mikroskopie byla provedena pro identifikaci homogenity vrstev. Vzorky byly nafoceny na optickém mikroskopu značky Olympus BX51M při 500 násobném zvětšení (tabulka 7). Bylo použito přídavné světlo a stejný expoziční čas i vyvážení bílé pro všechny vzorky.

Tabulka 7: Snímky vzorků z optického mikroskopu, zvětšeno 500x.



2.2. Měření fyzikálně-chemických parametrů vrstev TiCN

Chemické složení

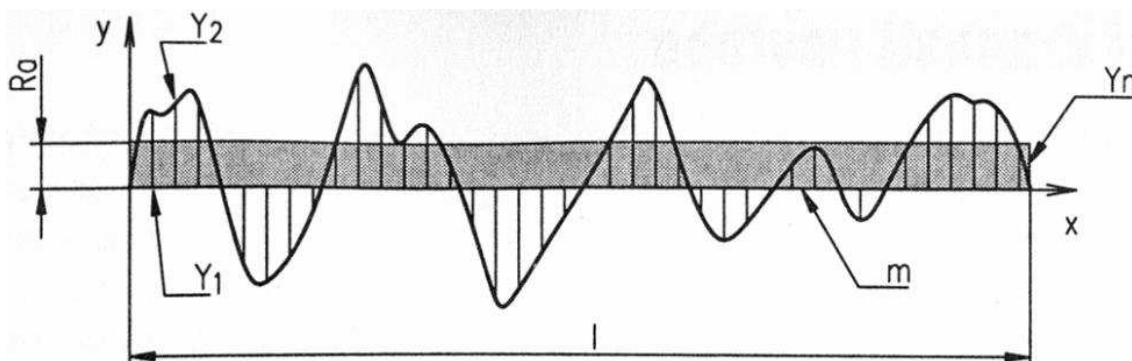
Analýza chemického složení povrchu byla provedena na rastrovacím elektronovém mikroskopu Carl Zeiss ULTRA Plus pomocí EDX analýzy. Mikroskop je vybaven mikroanalytickým systémem Oxford. Obsahy jednotlivých prvků v atomárních procentech jsou uvedeny v tabulce 9 (str. 39).

Drsnost povrchu

Drsnost povrchu byla vyhodnocena pomocí mikroskopie atomárních sil, při které byl využit tzv. nekontaktní režim. Pro toto měření byl použit přístroj JPK Nanowizard 3 a naměřená data byla následně zpracována v softwaru Gwyddion 2.40. Na skenované ploše 10 x 10 μm byla vyhodnocena plošná drsnost povrchu R_a (obrázek 5, tabulka 10 - str. 40).

Rovnice pro výpočet drsnosti R_a (Šňupárek 2016):

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| = \frac{|y_1| + |y_2| + |y_3| + \dots + |y_{n1}|}{n}$$

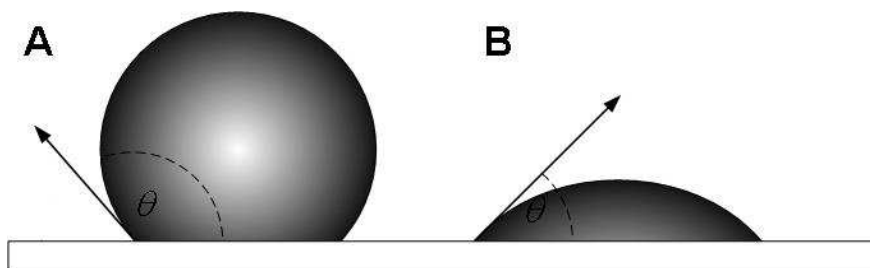


Obrázek 5: Princip výpočtu drsnosti povrchu (Šňupárek 2016).

Hydrofilita a hydrofobicita povrchu

Na vzorek upevněný na pohyblivé podložce v měřicím zařízení byla vždy aplikována kapka o objemu 3,5 μl. Pomocí kamery byla kapka vyfotografována a následně byl matematicky vyhodnocen kontaktní úhel tzv. tečnovou metodou. Test smáčivosti byl proveden na přístroji Surface Energy Evaluation System (See System) a na každém vzorku byl vyhodnocen průměrný kontaktní úhel z deseti kapek (tabulka 11, str. 42).

Vznikne-li úhel o velikosti 90 - 180° je povrch nesmáčivý (tj. hydrofobní, obrázek 6A). Je-li úhel v rozmezí 0 - 90°, jedná se o povrch smáčivý (tj. hydrofilní, obrázek 6B). (Falhar 2016).



Obrázek 6: Princip metody dopadající kapky (Falhar 2016)

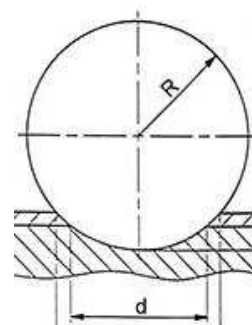
Tloušťka vrstvy

Po vybrušení kulového vrchlíku pomocí rotující kuličky, se vrstva projeví jako mezikruží (obrázek 7). Geometrie mezikruží slouží k výpočtu tloušťky tenké vrstvy. Tato metoda se nazývá kalotest a vyhodnocení této metody bylo realizováno prostřednictvím integrovaného softwaru na optickém mikroskopu Carl Zeiss Axio Imager. Naměřené tloušťky jednotlivých vrstev jsou uvedeny v tabulce 12 (str. 42).

Rovnice pro výpočet tloušťky vrstvy (Zábranský 2010):

$$t = \sqrt{R^2 - D^2} - \sqrt{R^2 - d^2}$$

- t.....tloušťka tenké vrstvy
- R.....poloměr vybrušovací koule
- D.....vnější poloměr mezikruží
- d.....vnitřní poloměr mezikruží

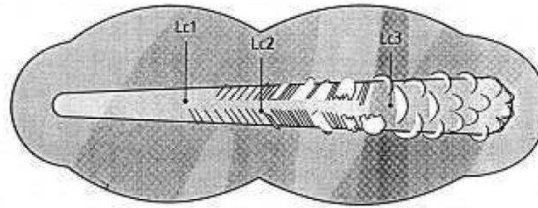


Obrázek 7: Princip kalotestu

Adheze vrstvy k substrátu

Pomocí vrypové zkoušky Scratch test (k měření byl využit přístroj CETR UMT Multi-Specimen Test System) byla vyhodnocena adheze tenké vrstvy k substrátu. Vyhodnocovaným parametrem je kritické zařazení hrotu, tedy zatížení, při kterém dochází k odtržení vrstvy (obrázek 8). Během prvních 5 sekund hrot vyvinul zatížení 2 N. Následně bylo po dobu 100 sekund zatížení zvyšováno na hodnotu 60 N. Kritické zatížení bylo vyhodnoceno pomocí optického mikroskopu a doplněno o záznamy průběhu nor-

málové síly a koeficientu tření. Na každém vzorku byl test proveden třikrát. Průměry naměřených kritických zatížení hrotu jsou uvedeny v tabulce 13 (str. 43).



Obrázek 8: Hranice kritického zatížení LC_1 , LC_2 , LC_3 vznikající při Scratch testu. (Sosnová 2006)

- LC_1 - zatížení v místě, kde došlo ke vzniku první trhliny
- LC_2 - zatížení při výraznějším porušení vrstvy (př. odloupenutí)
- LC_3 - zatížení v místě prvního odhalení substrátu

Vyluhovatelnost

Každý ze vzorků byl vložen do sterilní skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem. V každé lahvi bylo 50 ml fyziologického roztoku (0,9 % roztok chloridu sodného) s pH upraveným na hodnotu 7,4 za účelem simulace pH lidské krve (MedicineNet 2014). Po šedesáti dnech byl z roztoku proveden rozbor pomocí emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (přístrojem Perleim Elmer - Optima 2100 DV) a byla detekována stopová množství vylouhovaných prvků Cr, Ni a Ti v různých poměrech (tabulka 14, str. 43).

Cílem tohoto měření bylo zjistit, zda je tenká vrstva nanosená na povrchu dostatečnou ochranou zabraňující uvolňování prvků ze substrátu (tzn. oceli) do roztoku.

2.3. Měření biologické interakce s tenkými vrstvami

Výběr vhodného mikroorganismu

Bakteriální druh pro laboratorní testy biologické interakce s materiálem by měl splňovat dvě základní podmínky - nesmí být patogenní a zároveň by měl vytvářet biofilm.

Escheichia coli je tyčinkovitá bakterie pohybující se pomocí bičičků. Tato bakterie netvoří spory, je fakultativně anaerobní a řadíme ji mezi gramnegativní. Přirozeně se vyskytuje ve střevní mikroflóře živočichů i člověka, kde je díky tvorbě vitamínu K prospěšná. Naopak v pitné vodě je indikátorem fekálního znečištění. *Escherichia coli* je ve velké míře využívána jako modelový organismus pro biologické testy v medicíně i biotechnologiích (Du et al. 2007). Patří také k jednomu z nejčastěji studovaných kmenů bakterií v souvislosti s tvorbou biofilmu (Sedláček 2007; Romeo 2008).

Příprava bakteriální suspenze

Bakterie *Escherichia coli* (označení kmene CCM č. 3954) byla z pevného živného média naočkována do 30 ml sóji (Soyabean Casei Digest Medium od firmy HIEDIA) a následně inkubována při 37 °C v inkubátoru Incucell od firmy BMT Medical Technology. Na základě předchozího experimentálního ověření, byla jako nejvhodnější koncentrace bakterií pro kultivační testy zvolena hodnota 0,1 MCF. Po hodině inkubace byla suspenze naředěna sójou tak, aby její absorbance při vlnové délce 600 nm a velikosti kyvety 10 mm odpovídala hodnotě 0,026. Tato hodnota byla naměřena spektrofotometrem Hach Lange DR 6000.

Během zvolených testů biologické interakce byly využívány různé druhy skleněného laboratorního nádobí (Erlenmeyerovy baňky, kádinky, uzavíratelné baňky, zkumavky) a kovové pinzety. Tyto pomůcky byly před testy sterilizovány hodinu při teplotě 170 °C. Dále bylo při testech využito mnoho jednorázových plastových pomůcek, jako jsou centrifugační zkumavky, špičky a Petriho misky.

Měření kultivačními metodami

Bakteriální suspenzí v následujících odstavcích je míněna bakteriální suspenze o absorbanci 0,026, jejíž příprava je popsána výše.

Kapkový test

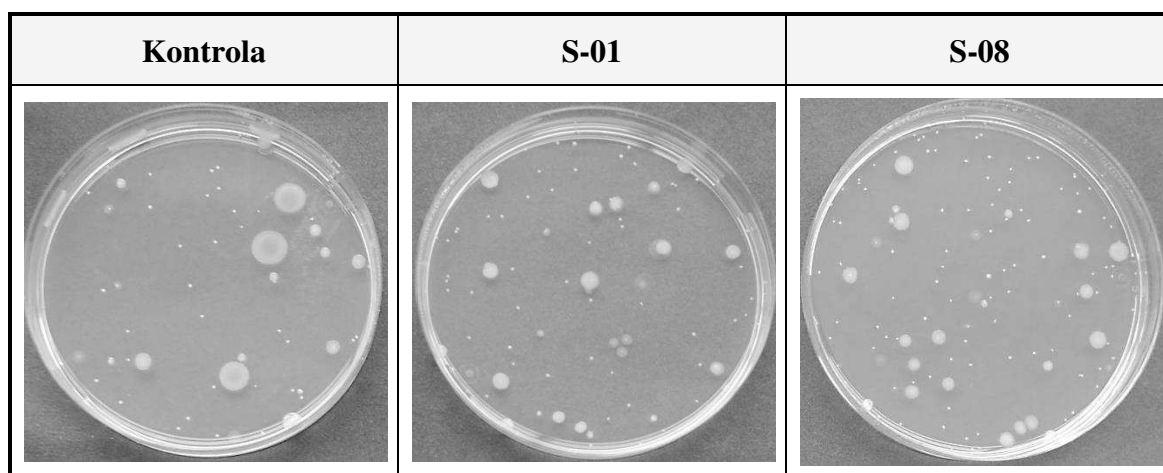
Vzorky byly očištěny navlhčenou buničinou v acetonu a vysušeny v sušárně (Venticell BMT Medical Technology) při teplotě 70 °C po dobu 30 minut za účelem likvidace nežádoucích nečistot (prachu, mikroorganismů apod.) na povrchu vzorku. Po vychladnutí bylo na každý vzorek nanášeno automatickou pipetou značky Eppendorf 100 µl bakteriální suspenze. Kapalina byla špičkou rovnoměrně rozetřena po celé ploše vzorku. Nádoby se vzorky byly překryty filtračním papírem, aby bylo zamezeno kontaminaci mikroorganismy z ovzduší. Bakterie byly ponechány v kontaktu s povrchem hodinu při laboratorní teplotě. Po uplynutí stanoveného času byla suspenze ze vzorku setřena sterilní vatovou tyčinkou. Bakterie byly z vatové tyčinky vytřepávány po dobu 30 minut při 250 otáčkách za minutu do 5 ml fyziologického roztoku. Byla využita třepačka Heidolph unimax X1010. Následně bylo provedeno desítkové ředění do 5. řádu. Po zalití agarem (Plate Count Agar without Dextrose od firmy BIO-RAD) byly Petriho misky inkubovány 48 hodin při teplotě 37 °C (inkubátor Incucell BMT Medical Technology). Narostlé kolonie jsou v tabulce 8. Celé měření bylo provedeno v triplikátu. Počet kolonií je znázorněn v grafu 1 na str. 44.

Test se suspenzí

Test se suspenzí byl proveden ve dvou různých časech kontaktu bakterií s povrchem vzorku. V prvním případě byl vzorek v kontaktu s bakteriemi 1 hodinu; v druhém případě 24 hodin.

Vzorky byly očištěny navlhčenou buničinou v acetonu a vysušeny v sušárně Venticell (BMT Medical Technology) při teplotě 70 °C po dobu 30 minut. Do devíti sterilních Erlenmeyerových baněk bylo pipetou Eppendorf pipetováno 15 ml bakteriální suspenze a do každé vložen jeden ze vzorků včetně kontroly. Bakterie byly ponechány v kontaktu s povrchem hodinu při teplotě 37 °C (inkubátor Incucell BMT Medical Technology). Vzorek byl následně vyndán sterilní pinzetou z bakteriální suspenze, opláchnut 2 ml fyziologického roztoku z každé strany a vložen do plastové centrifugační zkumavky typu Falcon o objemu 50 ml s 15 ml fyziologického roztoku. Zkumavky se vzorky byly vloženy na třepačku Heidolph unimax X1010 a třepány 30 minut při 250 otáčkách za minutu. Z vytřepané suspenze bylo provedeno desítkové ředění do 4. řádu a po inkubaci 48 hodin při teplotě 37 °C (inkubátor Incucell BMT Medical Technology) byl vyhodnocen počet kolonií (graf 2, str. 44). Celé měření bylo provedeno v triplikátu.

Tabulka 8: Porovnání narostlých kolonií po 1 hodině kontaktu bakterií se vzorky.



Při druhém pokusu byl postup téměř totožný. Byla pouze prodloužena doba kontaktu bakteriální suspenze se vzorkem na 24 hodin a ředění bylo provedeno až do 6. řádu (graf 3, str. 45).

Hodnocení pomocí SEM

Vzorek byl ponechán v kontaktu s bakteriální suspenzí 1 hodinu a 24 hodin v 37 °C. Poté byl vzorek opláchnut 2 ml fyziologického roztoku z každé strany a vysušen nad plamenem.

Hodnocení povrchu bylo provedeno pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu Carl Zeiss ULTRA Plus. Byla volena různá zvětšení, napětí 2 a 7,5 kV. Bylo využito zobrazení pomocí sekundárních elektronů.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

U vzorku S-02 došlo již při prvních biologických testech k narušení vrstvy, a proto nebyl tento vzorek vyhodnocován ani zahrnut do korelací. Chirurgická ocel použitá jako substrát pro vzorek S-02 byla nejspíše nedostatečně očištěna před depozicí vrstvy TiCN.

Při vyhodnocování získaných dat byla nejprve provedena korelace mezi naměřenými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a parametry při nanášení vrstev.

V druhé polovině praktické části byla vyhodnocena biologická interakce a data získána z mikrobiologických testů byla vztažena k vlastnostem vrstev. V diskuzi jsou komentována pouze ta data, která vykazují významnější korelaci s biologickými testy. Vlastnosti, které dle získaných výsledků nemají na kolonizaci bakteriální populace vliv, jsou v tabulkách uvedena, ale není jim věnována hlubší pozornost. Cílem bylo potvrzení či vyvrácení teorií o vlivu vlastností povrchu na vznik a růst biofilmu (viz str. 20 - 21) a zároveň určení, který ze studovaných vzorků TiCN tenkých vrstev (S01 - S08) je nejvhodnějším povrchem pro kolonizaci bakteriální populací.

Vzorky, které byly vyhodnoceny jako nejvhodnější pro kolonizaci bakteriální populací, byly na závěr diskutovány z hlediska chemické stálosti, tloušťky vrstvy a adheze vrstvy k substrátu, kvůli jejich potenciálnímu využití například jako kloubní implantáty.

3.1. Vliv depozice na fyzikálně-chemické parametry vrstev TiCN

3.1.1. Chemické složení

Chemické složení bylo nejvíce ovlivněno průtokem plynů při depozici. Čím větší průtok acetyleny při depozici, tím větší bylo procentuální zastoupení uhlíku a kyslíku v chemickém složení tenké vrstvy TiCN. Naopak se zvyšujícím se průtokem dusíku vzniká vyšší procentuální zastoupení dusíku a titanu v nanesené vrstvě. Procentuální chemické složení vzorků je v tabulce 9.

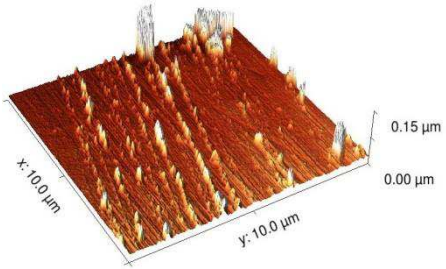
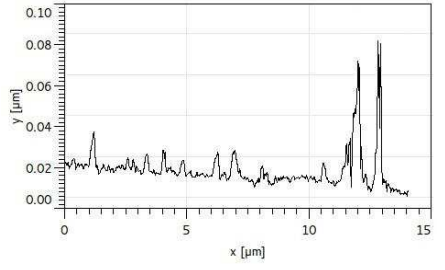
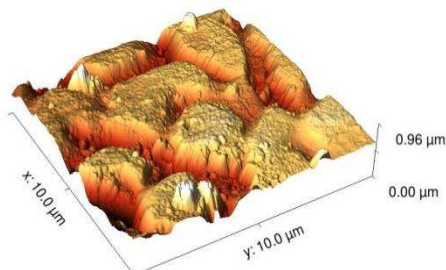
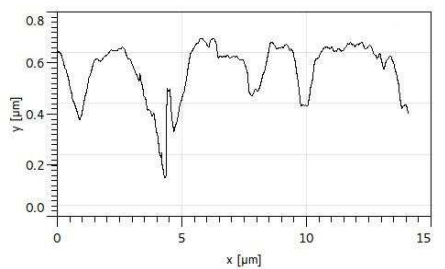
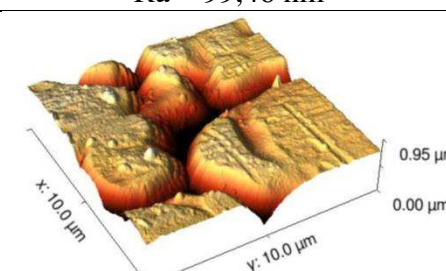
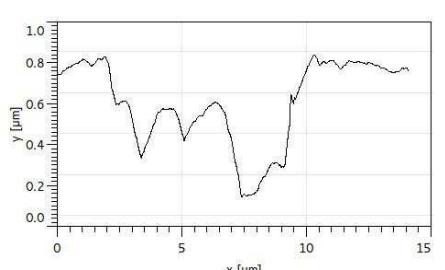
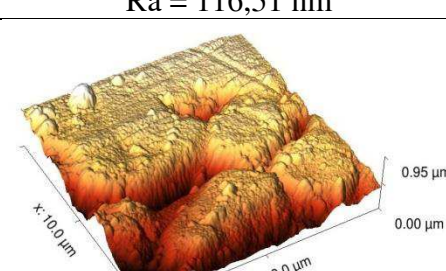
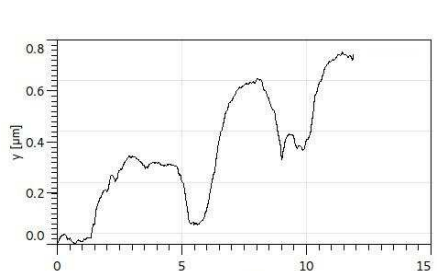
Tabulka 9: Procentuální chemické složení jednotlivých vrstev.

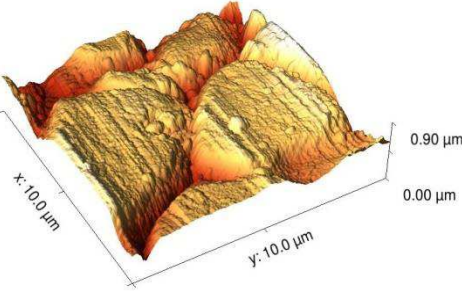
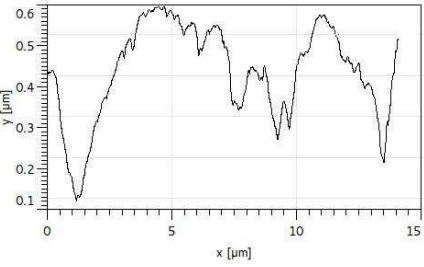
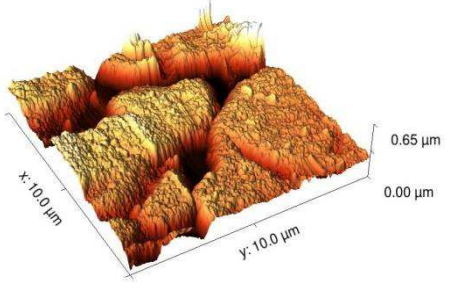
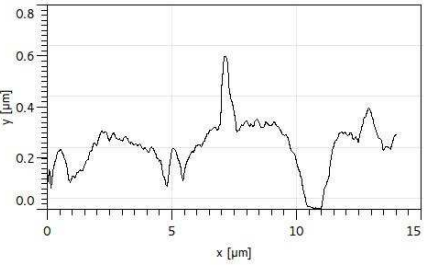
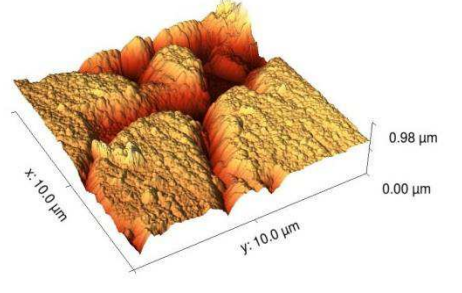
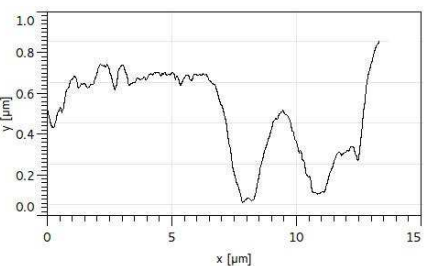
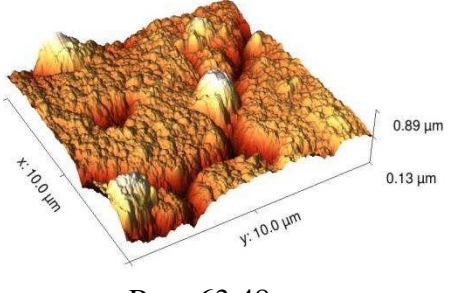
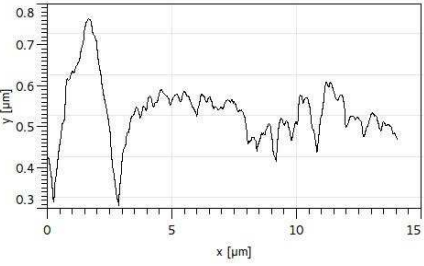
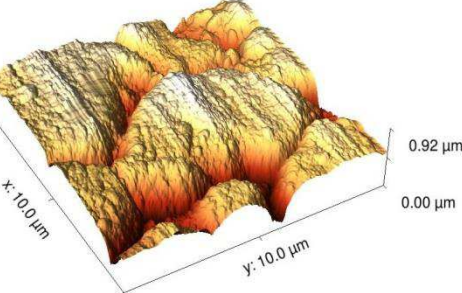
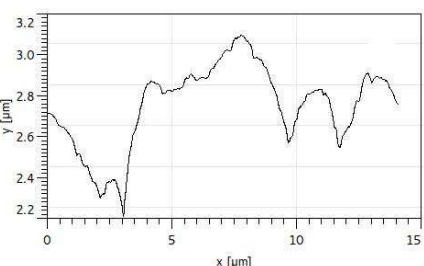
[%]	Vzorek							
	S-01	S-02	S-03	S-04	S-05	S-06	S-07	S-08
C	9,00	23,08	32,80	30,42	23,15	46,96	38,33	53,09
N	41,21	28,14	30,73	31,69	34,60	22,07	26,25	12,73
O	2,52	10,84	6,93	5,35	3,44	10,37	7,00	20,24
Ti	47,26	37,95	29,54	32,53	38,81	20,59	28,42	13,94

3.1.2. Drsnost

Jediným parametrem depozice, který podle naměřených dat ovlivnil plošnou drsnost povrchu, byl proud. U většiny vzorků byl proud při procesu nanášení vrstvy 85 A. Pouze u vzorků S-05 a S-07 byl proud vyšší, a to 125 A. Právě u těchto dvou vzorků byla drsnost nejnižší ze všech osmi studovaných vzorků. Větší proud měl tedy za následek méně drsný povrch. Pro možnost posouzení morfologie jednotlivých povrchů byly vytvořeny 3D a 2D profily (tabulka 10).

Tabulka 10: Vyhodnocení povrchů pomocí AFM.

Vzorek	3D profil	2D profil
K	 <p>Ra = 4,28 nm</p>	
S-01	 <p>Ra = 99,46 nm</p>	
S-02	 <p>Ra = 116,51 nm</p>	
S-03	 <p>Ra = 151,95 nm</p>	

Vzorek	3D profil	Drsnost povrchu
S-04	 <p data-bbox="544 618 756 651">Ra = 104,11 nm</p>	
S-05	 <p data-bbox="544 965 756 999">Ra = 73,25 nm</p>	
S-06	 <p data-bbox="544 1301 756 1339">Ra = 141,27 nm</p>	
S-07	 <p data-bbox="544 1630 756 1666">Ra = 63,48 nm</p>	
S-08	 <p data-bbox="544 1989 756 2024">Ra = 118,61 nm</p>	

3.1.3. Hydrofilita a hydrofobicitá povrchu

Dle definice spadají všechny testované povrchy mezi hydrofilní. Největší hydrofilita byla naměřena u kontroly v podobě mikroskopického podložního sklíčka a u vzorku S-01. Nejméně hydrofilní byly vzorky S-02 a S-05. Naměřené kontaktní úhly jsou uvedeny v tabulce 11. Dle provedených korelací neměl žádný z parametrů depozice výrazný vliv na tuto vlastnost povrchu.

Tabulka 11: Kontaktní úhel u jednotlivých povrchů.

[°]	Vzorek								
	K	S-01	S-02	S-03	S-04	S-05	S-06	S-07	S-08
θ	33,84	47,80	72,86	61,35	58,47	68,86	56,23	51,55	57,52

3.1.4. Tloušťka vrstvy

Podle naměřených dat závisí tloušťka nadeponované vrstvy na proudu použitém při depozici. Čím vyšší proud, tím větší tloušťka TiCN vrstvy. U vzorků S-05 a S-07, kdy byl proud při nanášení vyšší, než u ostatních vzorků, byla vrstva nejtlustší (až 2,38 μm). Tloušťky karbonitrid titanových vrstev u jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12: Tloušťka jednotlivých vrstev.

[nm]	Vzorek							
	S-01	S-02	S-03	S-04	S-05	S-06	S-07	S-08
t	664,2	718,2	1020,0	734,2	1534,4	1265,0	2382,8	1370,5

3.1.5. Adheze vrstvy k substrátu

Adheze vrstvy k substrátu (tabulka 13) závisela, stejně jako předchozí vlastnosti, na proudu použitém při depozici. Čím vyšší proud při depozici, tím větší adheze TiCN tenké vrstvy k substrátu. Největší adheze odpovídala vzorkům S-05 a S-07, dále potom vzorkům S-06 a S-08.

Charakteristika kritických míst při vyhodnocování vrypu:

- LC_1 - zatížení v místě, kde došlo ke vzniku první trhliny
- LC_3 - zatížení v místě prvního odhalení substrátu.

Tabulka 13: Vyhodnocení Scratch testu.

[N]	Vzorek							
	S-01	S-02	S-03	S-04	S-05	S-06	S-07	S-08
LC ₁	7,5	7,2	7,5	7,5	8,5	8,1	8,5	7,8
LC ₃	9,6	9,3	9,1	9,5	10,8	10,0	10,7	10,0

3.1.6. Vyluhovatelnost

Po šedesáti dnech vyluhování vzorků byl v roztoku detekován chrom, nikl a titan (tabulka 14). Množství vylouhovaného chromu a niklu bylo výrazně vyšší u vzorku S-05, a to o jeden až dva řády oproti vzorkům ostatním.

Bylo také stanoveno množství vylouhovaného organického uhlíku (tabulka 15). Vyluhovatelnost uhlíku se u většiny vzorků pohybovala kolem hodnoty 2,5 mg/l, až na vzorek S-03, u kterého byla naměřena hodnota 4,1 mg/l a vzorek S-08, ze kterého se vylouhovalo dokonce 14,1 mg/l. V případě dusíku byly téměř všechny vzorky pod hranicí detekce (méně než 1 mg/l); pouze ze vzorku S-08 se vylouhovalo 1,9 mg/l dusíku.

Tabulka 14: Množství vylouhovaných prvků.

[mg/l]	Vzorek							
	S-01	S-02	S-03	S-04	S-05	S-06	S-07	S-08
Cr	0,0013	0,0013	0,0029	0,0019	0,6551	0,0135	0,0211	0,0038
Ni	0,0004	0,0002	0,0045	0,0425	0,3420	0,0435	0,0348	0,0107
Ti	0,0002	0,0003	0,0003	0,0013	0,0001	0,0023	0,0011	0,0008

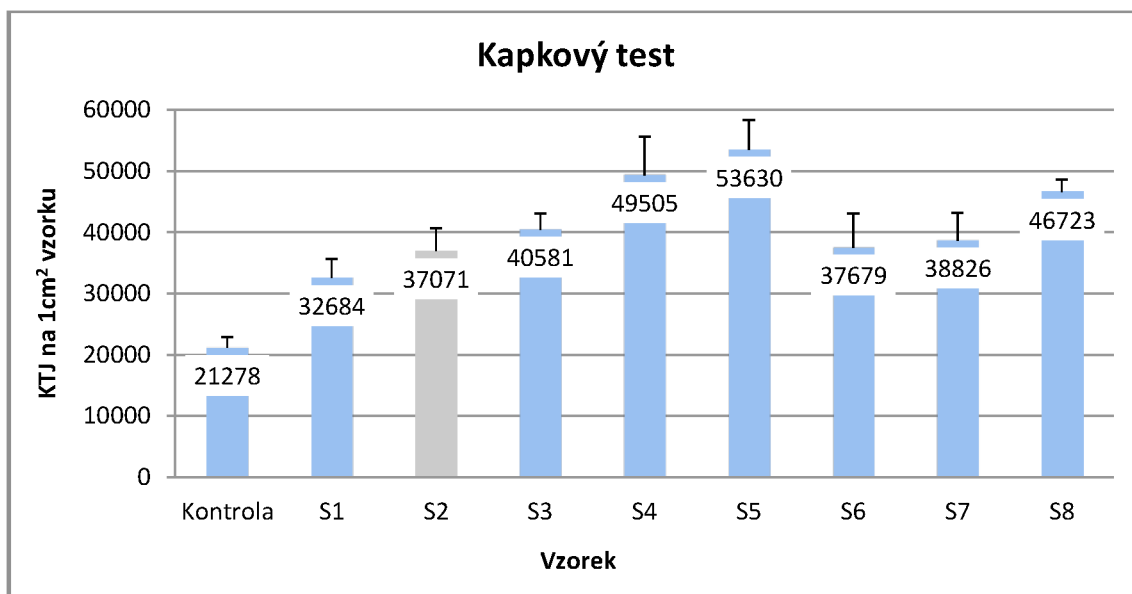
Tabulka 15: Množství vylouhovaného organického uhlíku.

[mg/l]	Vzorek							
	S-01	S-02	S-03	S-04	S-05	S-06	S-07	S-08
TOC	2,2	2,3	4,1	2,7	2,5	2,8	2,4	14,1

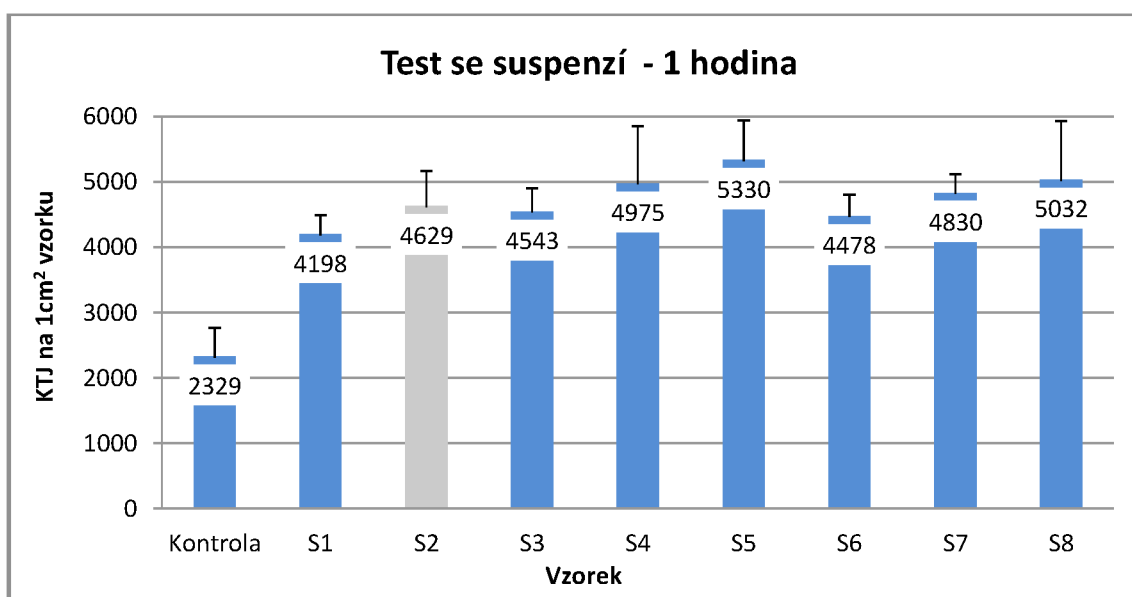
3.2. Biologická interakce s tenkými vrstvami

3.2.1. Kapkový test a test se suspenzí (1 hodina)

Byly provedeny dvě kultivační metody, během nichž byly bakterie v kontaktu s povrchem po dobu jedné hodiny - kapkový test a test se suspenzí. Počet KTJ na 1 cm² vzorku je znázorněn v grafech 1 a 2. Výsledky těchto dvou metod spolu korelovaly na 91 %. Povrch vzorku S-05 byl kolonizován nejvíce, dále pak vzorek S-04 a S-08.



Graf 1: Kapkový test (U vzorku S-02 došlo již při prvních biologických testech k narušení vrstvy, a proto nebyl tento vzorek vyhodnocován ani zahrnut do korelací.)



Graf 2: Test se suspenzí - 1 hodina (U vzorku S-02 došlo již při prvních biologických testech k narušení vrstvy, a proto nebyl tento vzorek vyhodnocován ani zahrnut do korelací.)

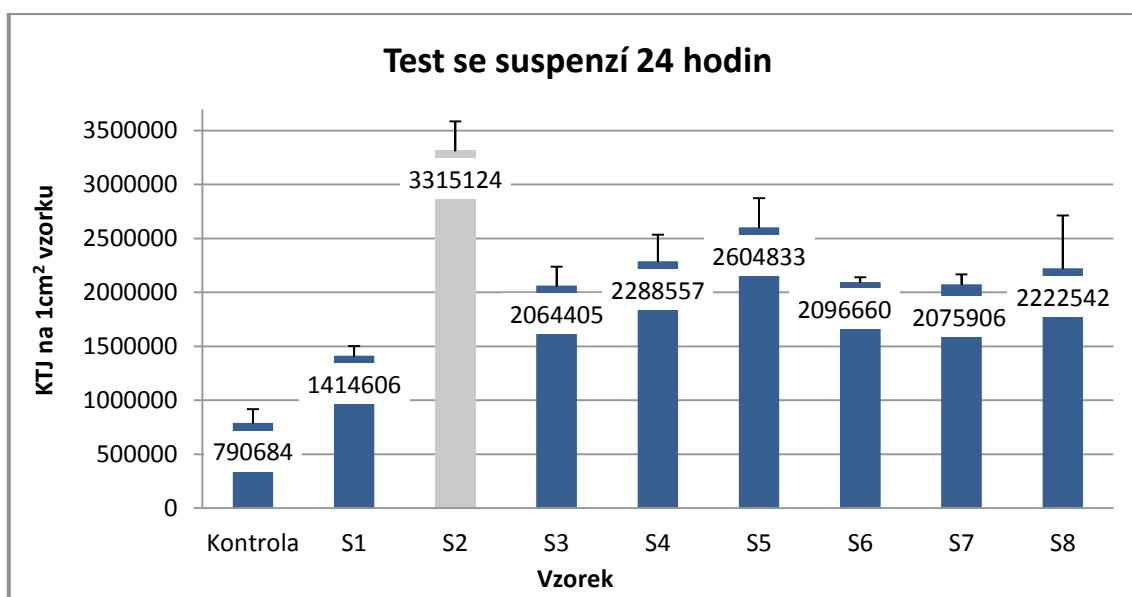
Analýza chemického složení povrchu byla provedena pomocí EDX analýzy na rastrovacím elektronovém mikroskopu. Podle naměřených dat nelze žádný z chemických prvků obsažených na povrchu vrstvy označit za rozhodující při kolonizaci bakteriální populací.

Drsnost povrchu je jedním z parametrů, který by měl tvorbu bakteriálního biofilmu na povrchu podporovat (viz kapitola 1.2.3. *Vliv povrchu na vznik a růst biofilmu*). V případě, že do vyhodnocení souvislosti drsnosti s tvorbou biofilmu zahrnujeme i kontrolní vzorek v podobě sklíčka, vyjde nám korelační koeficient vysoký (0,46 pro kapkový test a 0,60 pro test se suspenzí). Podložní sklíčko má mnohonásobně nižší plošnou drsnost než ostatní vzorky a zároveň byl povrch sklíčka znatelně méně kolonizován, než vzorky oceli s vrstvou TiCN.

Největší vliv měla hydrofilnost povrchu. Čím větší kontaktní úhel, tedy čím méně hydrofilní povrch vzorku, tím lépe bakterie k povrchu adherují, a to korelačním koeficientem 0,90 - 0,93. Potvrzuje to teorii, že bakterie lépe adherují k povrchům hydrofobním, o které mluví Palmer (2007). Korelační koeficienty jsou uvedeny v tabulce 16 (str. 46).

3.2.2. Test se suspenzí (24 hodin)

Dále byl proveden test se suspenzí, při němž byly bakterie v kontaktu s povrchem po dobu 24 hodin. Počet vzniklých kolonií na 1 cm² vzorku je znázorněn v grafu 3.



Graf 3: Test se suspenzí - 24 hodin (U vzorku S-02 došlo již při prvních biologických testech k narušení vrstvy, a proto nebyl tento vzorek vyhodnocován ani zahrnut do korelací.)

Povrch vzorku S-05 byl i po 24 hodinách nejvíce kolonizován, dále opět vzorky S-04 a S-08. Vyšší korelační koeficient byl naměřen v souvislosti testu s plošnou drsností povrchu, a to 0,56. Více se začalo projevovat i chemické složení povrchu. Pro obsah uhlíku ve vrstvě byl naměřen korelační koeficient 0,42. Naopak pro obsah dusíku -0,35 a pro obsah titanu -0,37.

Stejně jako u hodinových kultivačních testů vyšel nejvyšší korelační koeficient 0,95 u hydrofilnosti povrchu. Čím méně hydrofilní povrch, tím více byl kolonizován bakteriální populací.

Porovnání korelačních koeficientů se nachází v tabulce 16.

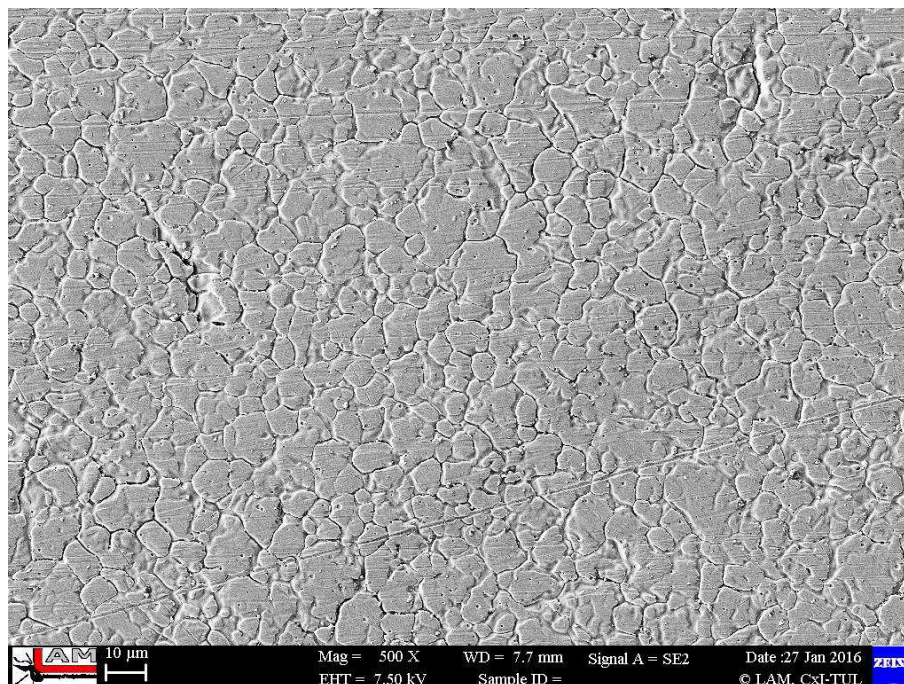
Tabulka 16: Korelační koeficienty mezi chemickým složením, plošnou drsností povrchu, hydrofilitou a mikrobiologickými kultivačními testy.

Korelační koeficienty				
		Kapkový test	Suspenze 1 h	Suspenze 24 h
Chemické složení povrchu	C	0,16	0,27	0,42
	N	-0,16	-0,29	-0,35
	O	0,11	0,20	0,19
	Ti	-0,14	-0,23	-0,37
Plošná drsnost		0,46	0,60	0,56
Hydrofilita povrchu		0,93	0,90	0,95

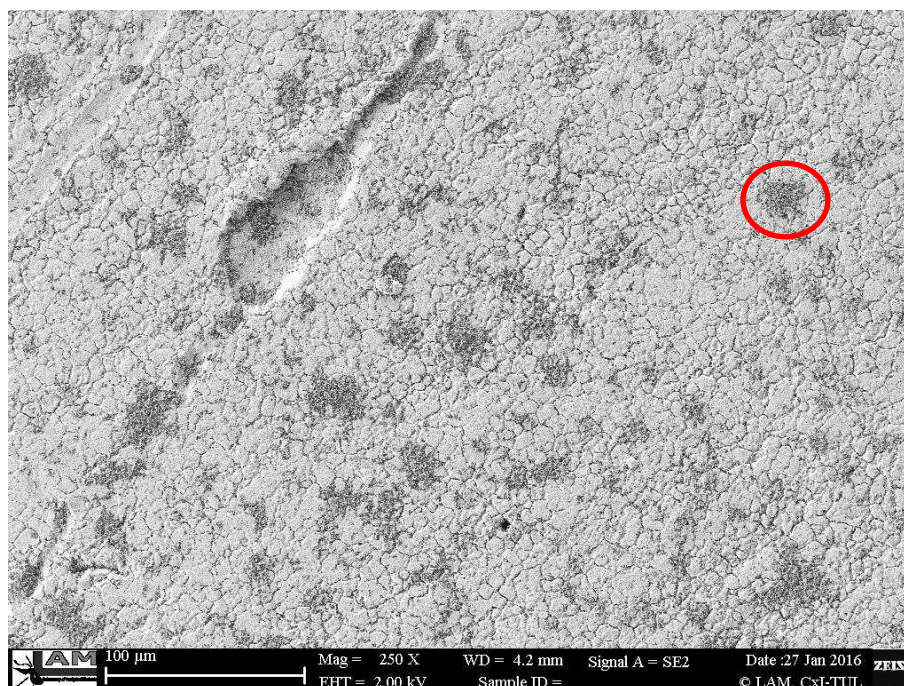
3.2.3. Hodnocení pomocí SEM

Díky vysokému rozlišení byla detailněji zobrazena struktura povrchu (obrázek 9). Při zvětšení 250x byly jasně zřetelné vznikající kolonie (obrázek 10). Při větším zvětšení (2500x) byly viditelné jednotlivé bakterie. Při sušení nad ohněm však sůl (z fyziologického roztoku) zkrystalizovala a ulpěla na bakteriích (obrázek 11). Proto byl test proveden znovu a oplach byl proveden destilovanou vodou (obrázek 12). Pokud byl biofilm již příliš silný, vznikla silná nevodivá vrstva a vzorek se začal v takových místech nabíjet. To se na snímku projevilo přsvícenou oblastí (obrázek 13).

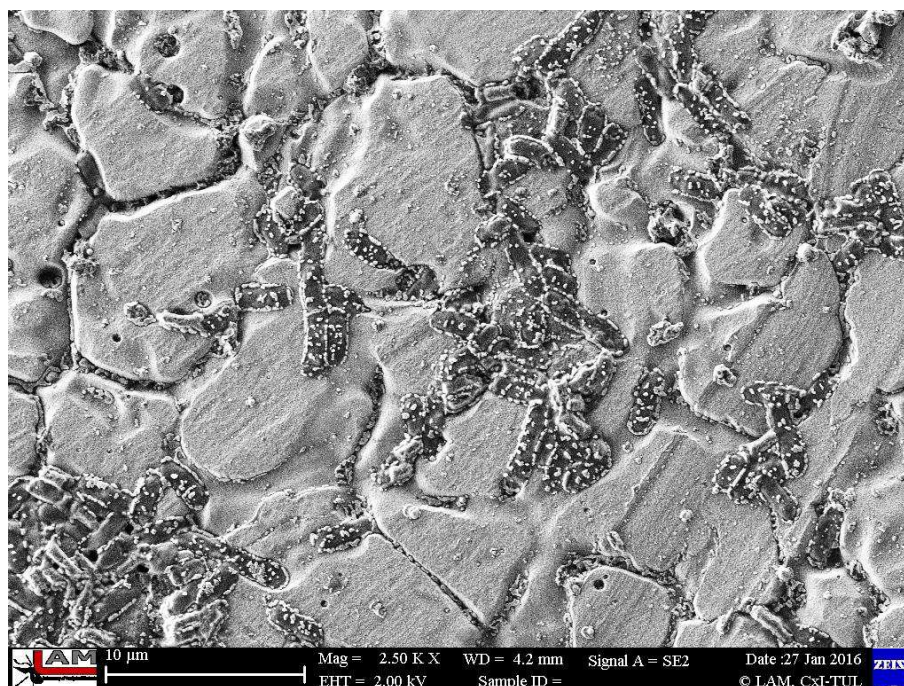
V případě kdy byl vzorek ponechán v kontaktu s bakteriální populací pouze 1 hodinu, byly na povrch přichyceny pouze jednotlivé bakterie. Jejich velikost se pohybovala mezi 2,5 - 3,5 μm (obrázek 14).



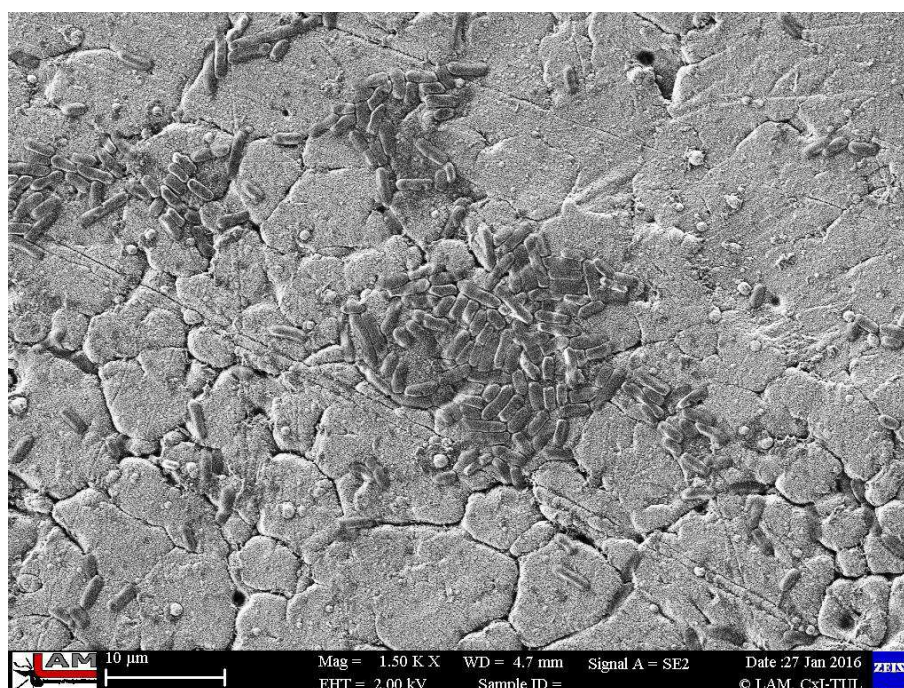
Obrázek 9: Struktura povrchu TiCN tenké vrstvy vzorku S-01 (snímek pořízený pomocí SEM).



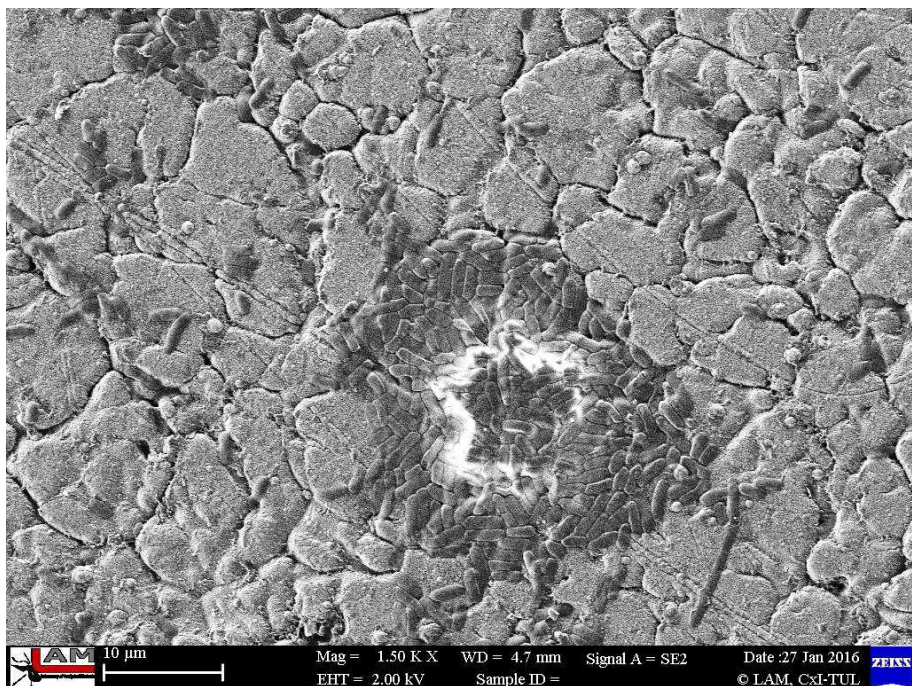
Obrázek 10: Vzniklé kolonie bakterie *Escherichia coli* po 24 hodinách kontaktu bakteriální suspenze s povrchem vzorku S-01 (snímek pořízený pomocí SEM).



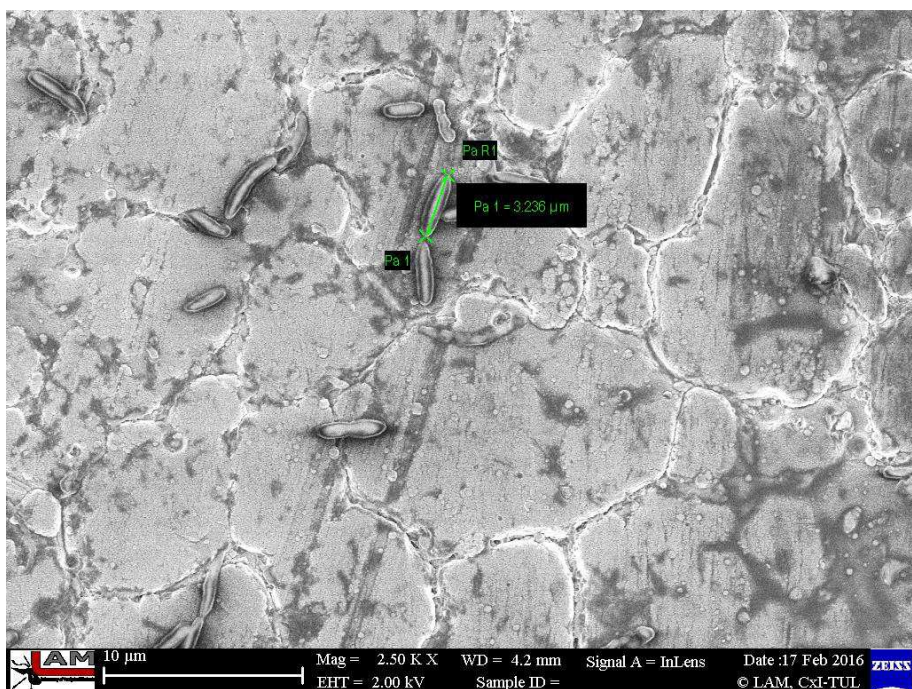
Obrázek 11: Zkrystalizovaný fyziologický roztok na povrchu bakterií (snímek vzorku S-01 pořízený pomocí SEM).



Obrázek 12: Vznikající kolonie bakterií (snímek vzorku S-08 pořízený pomocí SEM).



Obrázek 13: Vzorek, nabíjející se v místech s příliš tlustou vrstvou bakteriálního biofilmu (snímek vzorku S-08 pořízený pomocí SEM).



Obrázek 14: Jednotlivé bakterie *Escherichia coli* po 1 hodině kontaktu bakteriální suspenze s povrchem vzorku S-04 (snímek pořízený pomocí SEM).

4. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vyhodnocení závislosti mezi parametry depozice tenké vrstvy, fyzikálně-chemickými vlastnostmi a biokompatibilními vlastnostmi povrchu tenkých vrstev TiCN. U sedmi vzorků nanesených na chirurgické oceli AISI 316 byla na základě naměřených dat diskutována jejich vhodnost pro potenciální využití v biomedicínských aplikacích.

Biologická interakce byla vyhodnocena na základě tří druhů kultivačních testů. Při zanedbání výsledků u vzorku S-02 (odůvodnění viz. diskuze str. 39) vypovídají všechny tři testy o největší kolonizaci bakteriální populací v případě vzorku S-05, dále pak u vzorků S-04, S-07 a S-08. Takto hovoří výsledky jak po jednohodinovém, tak i dvacetičtyřhodinovém kontaktu bakteriální suspenze s povrchem.

Nejvýraznější vliv na tvorbu biofilmu z hlediska fyzikálně-chemických parametrů měla hydrofobicita povrchu. Čím více byl vzorek hydrofobní, tím více bakterií se na jeho povrchu přichytilo, a to s korelačním koeficientem až 0,95. Plošná drsnost povrchu měla na tvorbu biofilmu rovněž pozitivní vliv, ale nižší (s korelačním koeficientem 0,46 – 0,60). Jako třetí významný faktor ovlivňující adhezi bakterií se uvádí chemické složení povrchu. Nicméně v případě našich vzorků s TiCN vrstvami měl obsah jednotlivých prvků na povrchu minimální vliv na tvorbu biofilmu. Pouze obsah uhlíku vykazoval po 24 hodinách slabý pozitivní efekt.

Dílčím cílem této bakalářské práce bylo odhalení závislosti mezi vlastnostmi majícími pozitivní vliv na biologickou interakci a parametry při nanášení vrstvy. Dle provedených korelací neměl žádný z parametrů depozice výrazný vliv na výslednou hydrofobicitu povrchu. Na plošnou drsnost povrchu měl výrazný vliv proud použitý při depozici. U vzorků deponovaných při vyšším proudu, byla drsnost nejnižší. Chemické složení bylo nejvíce ovlivněno poměrem plynů při depozici.

Vzorky, které byly vyhodnoceny jako nejvhodnější pro kolonizaci bakteriální populací, byly podrobeny dalšímu zkoumání. Tloušťka vrstvy i adheze vrstvy k substrátu měla u takových vzorků dobré výsledky. Vzorek S-05, však vykazoval znatelně nižší chemickou stálost oproti ostatním vzorkům. Po šedesáti dnech bylo u tohoto vzorku detekováno vysoké množství vylouhovaného chromu a niklu, což řadí vzorek S-05 mezi nevhodné pro biomedicínské aplikace.

Po provedených testech a následném vyhodnocení biologických, fyzikálních i chemických vlastností lze za nejvhodnější povrchy pro biomedicínské aplikace označit

vzorky S-04, S-07 a S-08. Jedná se však pouze o první krok v pozorování biologické interakce těchto TiCN tenkých vrstev.

V plánovaném pokračování této práce bych se ráda zaměřila na dvě oblasti. V první řadě na bližší vyšetření vlivu depozice na hydrofobicitu povrchu, která vykazuje u TiCN tenkých vrstev největší vliv na tvorbu biofilmu. Dále bych ráda provedla stejné vyhodnocení u dalších tenkých vrstev a dalších typů bakteriálních populací, které mohou být využívány v biomedicínských aplikacích a porovnála výsledky s již otestovanými vrstvami TiCN. Také by bylo vhodné vytvořit či ověřit další biologické metody hodnocení těchto vrstev (například fluorescenční hodnocení adherovaných bakterií na povrchu, hodnocení metabolické aktivity bakterií v přítomnosti vrstev apod.). Dalším směrem výzkumu pro TiCN tenké vrstvy je modifikace povrchu například atmosférickou plazmou, která by měla vyvolat změny na povrchu vzorků a ovlivnit tak adhezi bakteriálních populací. Jako poslední krok bych ráda vyzkoušela testy s tkáňovými buňkami (svalové či kostní), které by mohli být posledním krokem před reálným nasazením daných vrstev v biomedicině.

Seznam použité literatury

ACTON, Ashton, 2012. *Advances in Steel Research and Application: 2012 Edition*. B.m.: ScholarlyEditions. ISBN 9781464992100.

BARABASZOVÁ, Karla Čech, 2012. *Vybrané instrumentální metody analýzy materiálů a nanomateriálů*. B.m.: Akademické nakladatelství CERM. ISBN 9788072048106.

BEECH, Iwona B., C. W. Sunny CHEUNG, D. Barrie JOHNSON a James R. SMITH, 1996. Comparative studies of bacterial biofilms on steel surfaces using atomic force microscopy and environmental scanning electron microscopy. *Biofouling* [online]. 1. 9., roč. 10, č. 1-3, s. 65–77 [vid. 2016-březen-10]. ISSN 0892-7014. Dostupné z: doi:10.1080/08927019609386271

BIOTEK, 2008. *Monitoring the Growth of E. coli With Light Scattering Using the Synergy™ 4 Multi-Mode Microplate Reader with Hybrid Technology* [online] [vid. 2016-březen-10]. Dostupné z: http://www.bioteck.com/resources/docs/E_coli_app_note_final_format-2.pdf

BLAŽEK, Tomáš, 2015. *Studium vlastností tenkých vrstev a jejich aplikace v medicíně*. 2015. B.m.: Liberec: Technická univerzita Liberec, Fakulta strojní.

BURSOVÁ, Šárka, 2014. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita. ISBN 978-80-7305-675-9.

CÉNEK, Lukáš, 2014. *Stanovení vlastností původních a eb-modifikovaných nástříků deponovaných tech-nologiemi tepelného nanášení pomocí vrypové zkoušky a testování nano-indentací*. 20. leden 2014. B.m.: Vysoké Učení Technické v Brně.

COSTERTON, J. William, 2007. *The Biofilm Primer*. B.m.: Springer Science & Business Media. ISBN 9783540680222.

DU, Liangwei, Hong JIANG, Xiaohua LIU a Erkang WANG, 2007. Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by Escherichia coli DH5α and its application on direct electrochemistry of hemoglobin. *Electrochemistry Communications* [online]. 5., roč. 9, č. 5, s. 1165–1170 [vid. 2016-březen-10]. ISSN 1388-2481. Dostupné z: doi:10.1016/j.elecom.2007.01.007

FALHAR, Martin, 2016. *Kontaktní úhel - úhel smáčivosti - Optikarium.cz - svět oční optiky a optometrie* [online] [vid. 2016-duben-28]. Dostupné z: <http://www.optikarium.cz/kontaktni-cocky-a-roztoky/kontaktni-uhel-smacivost>

FEDEL, M. a F. DEFLORIAN, 2016. Electrochemical characterization of atomic layer deposited Al₂O₃ coatings on AISI 316L stainless steel. *Electrochimica Acta* [online]. 18. 2. [vid. 2016-březen-18]. ISSN 0013-4686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2016.02.107

FLETCHER, Madilyn, 1977. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 1. 1., roč. 23, č. 1, s. 1–6 [vid. 2016-únor-23]. ISSN 0008-4166. Dostupné z: doi:10.1139/m77-001

FOLTÝN, Michal, 2008. *Povlakované slinuté karbidy*. 2008. B.m.: Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství.

GARRETT, Trevor Roger, Manmohan BHAKOO a Zhibing ZHANG, 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* [online]. 10. 9., roč. 18, č. 9, s. 1049–1056 [vid. 2015-listopad-10]. ISSN 1002-0071. Dostupné z: doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001

GOLDMAN, Emanuel a Lorrence H. GREEN, 2008. *Practical Handbook of Microbiology, Second Edition*. B.m.: CRC Press. ISBN 9781420009330.

HERALD, Paula J. a Edmund A. ZOTTOLA, 1988. Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel Surfaces at Various Temperatures and pH Values. *Journal of Food Science* [online]. 1. 9., roč. 53, č. 5, s. 1549–1562 [vid. 2016-únor-23]. ISSN 1750-3841. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.1988.tb09321.x

HOLMBERG, Kenneth a Allan MATHEWS, 1994. Coatings tribology: a concept, critical aspects and future directions. *Thin Solid Films* [online]. 15. 12., roč. 253, č. 1, s. 173–178 [vid. 2016-březen-27]. ISSN 0040-6090. Dostupné z: doi:10.1016/0040-6090(94)90315-8

HORI, Katsutoshi a Shinya MATSUMOTO, 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 15. 2., roč. 48, č. 3, Invited Review Issue 2010, s. 424–434 [vid. 2015-listopad-15]. ISSN 1369-703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2009.11.014

CHRISTIDIS, G. E, EUROPEAN MINERALOGICAL UNION a MINERALOGICAL SOCIETY (GREAT BRITAIN), 2011. *Advances in the characterization of industrial minerals university textbook* [online]. London: European Mineralogical Union [vid. 2016-únor-27]. ISBN 9780903056359 0903056356. Dostupné z: <http://ebooks.geoscienceworld.org/content/advances-in-the-characterization-of-industrial-minerals>

JACOB, W. a W. MÖLLER, 1993. On the structure of thin hydrocarbon films. *Applied Physics Letters* [online]. 27. 9., roč. 63, č. 13, s. 1771–1773 [vid. 2016-březen-27]. ISSN 0003-6951, 1077-3118. Dostupné z: doi:10.1063/1.110683

JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK, 2014. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. B.m.: Nakladatelství Olomouc. ISBN 9788071823384.

KENNETH, Todar, 2012a. Todar's Online Textbook of Bacteriology. In: *The Growth of Bacterial Populations* [online]. [vid. 2016-únor-24]. Dostupné z: http://textbookofbacteriology.net/nutgro_4.html

KENNETH, Todar, 2012b. Todar's Online Textbook of Bacteriology. In: *The Growth of Bacterial Populations* [online]. [vid. 2016-říjen-03]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/growth.html>

KNOWLES, W.R., 1995. *Environmental scanning electron microscope* [online]. B.m.: Google Patents. Dostupné z: <http://www.google.com/patents/US5412211>

KOMORNICZAK, Michal, 2011. Wikiskripta. In: *Množení bakterií in vitro* [online]. [vid. 2016-únor-23]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Bacterial_growth_cs.svg

KRAJČOVIČOVÁ, Markéta, 2009. *Bakalářská práce: Studium distribuce prvků v zubech a kostech s využitím laserové spektroskopie (LIBS + LA-ICP-MS)*. Brno: Masarykova Univerzita.

KRÁSNÝ, Ivo, 2010. *Měření kontaktních úhlů smáčení a určování povrchové energie plastů*. 19. květen 2010. B.m.: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

LIU, Yuping, Hongzhi TANG, Zhanglin LIN a Ping XU, 2015. Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnology Advances* [online]. 15. 11., roč. 33, č. 7, Industrial Biotechnology: Tools and Applications, s. 1484–1492 [vid. 2016-únor-23]. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2015.06.001

MARRIE, T. a J. COSTERTON, 1984. Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *Journal of Clinical Microbiology*. 5., roč. 19, č. 5, s. 687–693. ISSN 0095-1137.

MARSHALL, Kevin C, 1994. Microbial adhesion in biotechnological processes. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 6., roč. 5, č. 3, s. 296–301 [vid. 2015-listopad-15]. ISSN 0958-1669. Dostupné z: doi:10.1016/0958-1669(94)90032-9

MCFARLAND, Joseph, 1907. The nephelometer: aN instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association* [online]. 5. 10., roč. XLIX, č. 14, s. 1176–1178 [vid. 2016-březen-10]. ISSN 0002-9955. Dostupné z: doi:10.1001/jama.1907.25320140022001f

MEDICINENET, 2014. Blood pH. *MedicineNet.com* [online] [vid. 2016-březen-18]. Dostupné z: <http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=10001>

MITURA, Katarzyna, 2005. Interactions between carbon coatings and tissue. *Surface & Coatings Technology*. 13. 11., roč. 201-(2006), č. 2117–2123.

MUSIL, Jindřich, 2000. Hard and superhard nanocomposite coatings. *Surface and Coatings Technology* [online]. 3., roč. 125, č. 1–3, s. 322–330 [vid. 2016-březen-27]. ISSN 0257-8972. Dostupné z: doi:10.1016/S0257-8972(99)00586-1

OHRING, Milton, 2001. *Materials Science of Thin Films*. B.m.: Academic Press. ISBN 9780080491783.

OLSON, Eric R., 1993. Influence of pH on bacterial gene expression. *Molecular Microbiology* [online]. 1. 4., roč. 8, č. 1, s. 5–14 [vid. 2016-únor-23]. ISSN 1365-2958. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01198.x

PALMER, Jon, Steve FLINT a John BROOKS, 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 6. 7., roč. 34, č. 9, s. 577–588 [vid. 2016-duben-28]. ISSN 1367-5435, 1476-5535. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-007-0234-4

PEARSON EDUCATION, 2008. Direct Measurement of Microbial Growth. *Microbial Growth* [online] [vid. 2016-říjen-03]. Dostupné z: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap06/Microbial%20Growth%20ss5.htm>

PRATT, Leslie A a Roberto KOLTER, 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 1. 12., roč. 2, č. 6, s. 598–603 [vid. 2015-listopad-21]. ISSN 1369-5274. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-5274(99)00028-4

PRIGENT-COMBARET, Claire, Gérard PRENSIER, Thanh Thuy LE THI, Olivier VIDAL, Philippe LEJEUNE a Corinne DOREL, 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental Microbiology* [online]. 1. 8., roč. 2, č. 4, s. 450–464 [vid. 2016-únor-24]. ISSN 1462-2920. Dostupné z: doi:10.1046/j.1462-2920.2000.00128.x

ROMEO, Tony, ed., 2008. *Bacterial Biofilms* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Current Topics in Microbiology and Immunology [vid. 2015-listopad-21]. ISBN 978-3-540-75417-6, 978-3-540-75418-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-75418-3>

ROSYPAL, Stanislav, 2003. *Nový přehled biologie*. B.m.: Scientia. ISBN 9788071832683.

SEDDIKI, O., C. HARNAGEA, L. LEVESQUE, D. MANTOVANI a F. ROSEI, 2014. Evidence of antibacterial activity on titanium surfaces through nanotextures. *Applied Surface Science* [online]. 30. 7., roč. 308, s. 275–284 [vid. 2014-prosinec-10]. ISSN 0169-4332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2014.04.155

SEDLÁČEK, Ivo, 2007. *Taxonomie prokaryot* [online]. B.m.: Masarykova univerzita [vid. 2016-březen-15]. ISBN 9788021042070. Dostupné z: <http://www.muni.cz/research/publications/753332>

SOSNOVÁ, Martina, 2006. *Korelace výsledků vrypové a tribologické zkoušky v aplikaci na kluzných vrstvách, Disertační práce*. 2006. B.m.: Západočeská univerzita v Plzni.

SUTTON, Scott, 2006. Measurement of Cell Concentration in Suspension by Optical Density. *The Microbiology Network* [online] [vid. 2016-březen-10]. Dostupné z: <http://www.microbiol.org/resources/monographswhite-papers/measurement-of-cell-concentration-in-suspension-by-optical-density/>

ŠŇUPÁREK, Petr, 2016. *Drsnost povrchu* [online]. 2016. B.m.: VŠB-TU Ostrava, Fakulta elektrotechniky a informatiky Katedra elektrických strojů a přístrojů – KAT 453. [vid. 2016-duben-28]. Dostupné z: http://fei1.vsb.cz/kat410/studium/studijni_materialy/td/01-textyVSB/005_Drsnost%20povrchu.pdf

TAYLOR, R. L., J. VERRAN, G. C. LEES a A. J. P. WARD, 1998. The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 1., roč. 9, č. 1, s. 17–22 [vid. 2016-únor-24]. ISSN 0957-4530, 1573-4838. Dostupné z: doi:10.1023/A:1008874326324

TRÖGL, Josef, 2008. *Návody pro cvičení z mikrobiologie*. 2008. B.m.: Studijní text Fakulty životního prostředí UJEP.

TŮMOVÁ, Štěpánka, Petr LOUDA a Zbigniew ROZEK, 2007. *Uhlíkové vrstvy a jejich aplikace v medicíně. Jemná mechanika a optika*. 3. ISBN 0447-6441.

VODÁREK, Vlastimil, 2012. *Metody studia struktury*. první. B.m.: VŠB - Technická univerzita Ostrava. ISBN ISBN 978-80-248-2559-5.

VOTAVA, Miroslav, 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. B.m.: Neptun. ISBN 9788086850009.

WATT, Ian M., 1997. *The Principles and Practice of Electron Microscopy*. B.m.: Cambridge University Press. ISBN 9780521435918.

YAO, Nan a Zhong Lin WANG, 2006. *Handbook of Microscopy for Nanotechnology*. B.m.: Springer Science & Business Media. ISBN 9781402080067.

ZÁBRANSKÝ, Lukáš, 2010. *Mechanické vlastnosti tenkých vrstev připravených metodou reaktivního magnetronového naprašování*. 2010. B.m.: MASARYKOVA UNIVERZITA Přírodovědecká fakulta.