

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2024

Miriam Čavojská



# 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

## BAKTERIOCIDNÍ ÚČINEK SUPERPARAMAGNETICKÝCH NANOČÁSTIC S OBSAHEM AG NA VYBRANÉ BAKTERIE.

BACTERIOCIDAL EFFECT OF AG-CONTAINING SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLES ON  
SELECTED BACTERIA.

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Miriam Čavojská

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

BRNO 2024

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1894/2023 Akademický rok: 2023/24  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Miriam Čavojská**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Bakteriocidní účinek superparamagnetických nanočástic s obsahem Ag na vybrané bakterie

### Zadání bakalářské práce:

- Vypracujte literární rešerši na téma superparamagnetické částice s obsahem Ag, jejich charakteristika, metody syntézy a možnosti aplikace.
- Prostudujte problematiku mikrobicidního účinku tohoto typu částic na různé mikroorganismy.
- V rámci experimentální části práce otestujte bakteriocidní účinek připravených nanočástic navybrané mikroorganismy nepatogenního charakteru.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

-----  
Miriam Čavojská  
studentka

-----  
Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.  
vedoucí práce

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

V Brně dne 1.2.2024

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Cieľom tejto práce je dôkaz bakteriocídneho účinku superparamagnetických nanočastíc s obsahom Ag na vybrané baktérie nepatogénneho typu. Teoretická časť sa zameriava na charakteristiku superparamagnetizmu, no hlavnou časťou práce je charakterizácia nanočastíc s obsahom striebra, ich metódy syntézy a využitie v praxi. Ďalej sú v nej uvedené aj základné špecifiká pre vybrané baktérie.

Experimentálna časť sa zameriava najmä na kultivácie bakteriálnych kultúr spoločne s nanočasticami, čím sa dokazoval antibakteriálny efekt nanočastíc. Za použitia vhodnej DNA bola tiež stanovená biokompatibilita nanočastíc pomocou real-time PCR.

## **ABSTRACT**

The aim of this work is to demonstrate the bacteriocidal effect of Ag-containing superparamagnetic nanoparticles on selected non-pathogenic bacteria. The theoretical part is focused on the characterization of superparamagnetism, but the main part of the work is the characterization of silver-containing nanoparticles, methods of their synthesis and their practical application. Furthermore, basic specificities for selected bacteria are presented.

The experimental part is mainly focused on the cultivation of bacterial cultures together with nanoparticles, thus demonstrating the antibacterial effect of nanoparticles. The biocompatibility of the nanoparticles was also determined by real-time PCR using the corresponding DNA.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Superparamagnetické nanočastice s obsahom Ag, bakteriocídny účinok

## **KEY WORDS**

Superparamagnetic nanoparticles containing Ag, bactericidal effect

ČAVOJSKÁ, Miriam. *Bakteriocidní účinek superparamagnetických nanočástic s obsahem Ag na vybrané bakterie* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-05-18]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/153316>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Štěpánka Trachtová.

## PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

## POĎAKOVANIE

Rada by som poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce Ing. Štěpánke Trachtovej, Ph.D. za odborné a cenné rady, ochotu a trpezlivosť pri spracovaní tejto práce. Tiež ďakujem Ing. Anastasiie B. Shatan z Českej akadémie vied za poskytnutie nanočástic a všetkých ich potrebných dát. Zvláštne poďakovanie patrí mojej rodine a priateľom za podporu behom celého štúdia.

# Obsah

ÚVOD .....	8
TEORETICKÁ ČASŤ .....	9
1. Superparamagnetizmus .....	9
1.1. Morfológia a charakterizácia magnetického jadra .....	10
1.2. Superparamagnetické častice .....	10
1.3. Superparamagnetické nanočastice oxidu železa .....	11
1.3.1. Superparamagnetické nanočastice oxidu železa .....	11
1.3.2. Ultramalé superparamagnetické oxidy železa.....	12
1.4. Metódy syntézy .....	13
2. Antibakteriálne látky.....	13
2.1. Antibakteriálny efekt Ag.....	14
2.1.1. Mechanizmus .....	15
3. Baktérie .....	15
3.1. Escherichia coli .....	18
3.2. Rod Bacillus.....	19
3.2.1. Bacillus cereus .....	19
3.2.2. Bacillus subtilis.....	21
3.3. Serratia marcescens.....	22
3.4. Kocuria rosea .....	23
3.5. Micrococcus luteus .....	24
3.6. Rod Staphylococcus.....	25
3.6.1. Staphylococcus epidermis.....	26
EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	27
4. Materiál .....	27
4.1. Chemikálie .....	27
4.2. Pomôcky a prístroj .....	27
4.3. Použité superparamagnetické častice.....	28
4.4. Použité mikroorganizmy .....	28
4.5. Materiály potrebné na kultiváciu bakteriálnych kultúr .....	29
4.6. Roztoky potrebné na mikroskopické pozorovanie.....	29
5. Metódy .....	29
5.1. Krížový rozter .....	29

5.2.	Gramovo farbenie .....	30
5.3.	Kultivácia na masopeptonovom bujóne .....	30
5.4.	Aplikácia nanočastíc na vybrané bakteriálne kultúry .....	31
5.5.	Meranie optickej hustoty .....	31
5.6.	Kultivácia a aplikácia zriedených častíc .....	31
5.7.	Denzitometria .....	32
5.8.	Kultivácia na LB médiu a riedenie .....	32
5.9.	Kultivácia s odoberaním alikvótov .....	32
5.10.	Koinkubácia nanočastíc v LB médiu .....	32
5.11.	Sledovanie biokompatibility častíc pomocou PCR v reálnom čase .....	33
VÝSLEDKY A DISKUSIA .....		35
6.	Príprava testovaných bakteriálnych kultúr .....	35
6.1.	Kultivácie bakteriálnych kultúr .....	35
6.2.	Mikroskopické vyšetrenie .....	35
7.	Overenie mikrobiologickej čistoty testovaných nanočastíc .....	37
7.1.	Vylúčenie prípadnej kontaminácie nanočastíc .....	37
7.2.	Vylúčenie prípadnej kontaminácie zriedených nanočastíc .....	38
7.3.	Úprava pôvodných častíc .....	39
8.	Testovanie antimikrobiálnej aktivity nanočastíc .....	40
8.1.	Bujónová dilučná metóda .....	40
8.1.1.	Nezriedené častice .....	40
8.1.2.	Zriedené častice .....	40
8.2.	Difúzna platňová metóda .....	41
8.2.1.	Antimikrobiálna aktivita nezriedených nanočastíc .....	41
8.2.2.	Kultivácia so zriedenými časticami .....	44
8.2.3.	Kultivácia na LA agare .....	45
8.3.	Stanovenie baktericídneho účinku pomocou odoberania alikvótov .....	47
8.4.	Testovanie antimikrobiálnej aktivity nanočastíc pri koinkubácii modelových mikroorganizmov .....	51
9.	Overenie biokompatibility nanočastíc .....	53
ZÁVER .....		58
LITERATÚRA .....		59
ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....		62

# ÚVOD

Superparamagnetické častice, ktoré sú zložené z potiahnutého jadra a oxidov železa sú špecifické magnetické častice, ktoré majú charakteristické vlastnosti aj pri nižších teplotách ako je Néelova teplota. Za prítomnosti vonkajšieho magnetického poľa sa vyznačujú vysokými hodnotami magnetických momentov. Ak obsahujú dané častice magnetit, tak ich povrch môže detekovať strieborné alebo zlaté obaly, ktoré sa vyznačujú napr. biokompatibilitou.

Samotný superparamagnetizmus je veľmi charakteristický typ magnetizmu, kde veľkosť nanočastíc sa pohybuje zväčša v nanometroch. Častice môžu mať využitie vo viacerých oblastiach či už je to dezinfekcia prostriedkov alebo prípadné využitie pri liečbe rezistivity niektorých patogénnych baktérií. Práve vďaka tomuto javu sa študuje bakteriocídny účinok týchto nanočastíc.

Tento účinok je spojený so zlúčeninami, ktoré sa prejavujú vyhubením baktérií. Jednou z týchto zlúčenín môžu byť práve nanočastice s obsahom Ag, ktoré už v rade spotrebiteľských produktov pôsobia ako antimikrobiálne látky. Ak dôjde k uvoľneniu iónov striebra z nanočastíc, tak bakteriocídny účinok použitých nanočastíc zosilnie. Častice majú funkciu interagovať s bakteriálnou membránou a prenikať do vnútra bunky, kde vyvolaním oxidačného stresu dokážu vyvolať štrukturálne poškodenia bunky. Práve spomínaný oxidačný stres v konečnom dôsledku spomaľuje množenie buniek. Za bežných podmienok je proliferácia buniek pomerne rýchla.

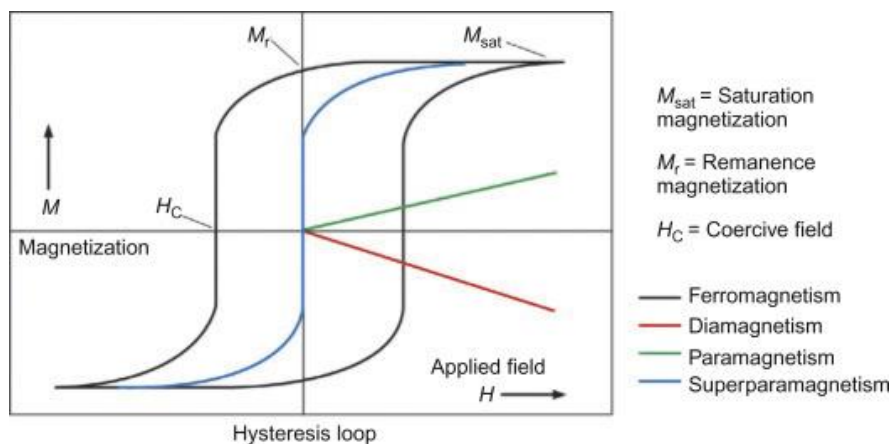
Teoretická časť je venovaná najmä superparamagnetickým časticiam a vybraným baktériám, s ktorými sa po celú dobu pracovalo. V praktickej časti boli uskutočnené kultivácie bakteriálnych kultúr s nanočasticami, ktoré boli syntetizované v rámci spolupráce na Ústave makromolekulárnej chémie Akadémie vied ČR tímom Ing. Daniela Horáka, Ph.D. v rôznych objemoch a koncentráciách. Okrem iného došlo aj k stanoveniu biokompatibility daných nanočastíc pomocou qPCR. Väčšina týchto meraní bola uskutočnená pomocou *Escherichia coli*, keďže sa jedná o baktériu bežne vyskytujúcu sa v ľudskej mikroflóre.



# TEORETICKÁ ČASŤ

## 1. SUPERPARAMAGNETIZMUS

Superparamagnetizmus je charakteristický typ magnetizmu, v ktorom sa vyskytujú feromagnetické či ferimagnetické nanočastice. Ich veľkosť sa pohybuje od pár nanometrov až po desiatky nanometrov, v závislosti od vybraného materiálu. Zväčša každý feromagnetický alebo ferimagnetický materiál sa vyznačuje prechodom do paramagnetického stavu nad jeho Curieovu teplotu, no superparamagnetizmus sa od daného štandardného prechodu odlišuje vďaka existencii materiálu aj pod Curieovou teplotou. Pre lepšie pochopenie a porovnanie vlastností bol aj priložený obrázok 1.1 [1].



Obrázok 1.1 Porovnanie vývoja magnetizácie [2]

Okrem toho sa jedná o jednodomé častice to znamená, že pri ich priblížení môže byť celkový magnetický moment nanočastice považovaný za jeden magnetický moment zložený z jednotlivých magnetických momentov atómov, ktoré tvoria dané nanočastice.

Veľmi častým javom v správaní nanočastíc v magnetickom poli je usporiadanie magnetizácie v jednom preferovanom smere. Pri dostatočne malých rozmeroch daných nanočastíc môže byť tento smer náhodne pozmenený pôsobiacou magnetizáciou pod vplyvom teploty. Čas, pri ktorom dôjde ku dvom preklopeniam sa nazýva Néelov relaxačný čas. Néelova relaxačná doba častice je daná vzťahom [1].

$$\tau = \tau_0 \epsilon^{(K.V)/(k_B.T)} \quad [-] \quad (1.1) \quad [1]$$

kde

K [J.m <sup>-3</sup> ]	-	Koeficient anizotropie
V [m <sup>-3</sup> ]	-	Objem
$\tau_0$ [m <sup>3</sup> mol <sup>1</sup> s <sup>-1</sup> ]	-	Preexponenciálny faktor
$k_B$ [J.K <sup>-1</sup> ]	-	Boltzmanova konštanta
T [K]	-	Termodynamická teplota
$\tau$ [s]	-	Néelova relaxačná doba

Pri absencii vonkajšieho magnetického poľa sa priemerná hodnota magnetizácie javí ako nulová, pokiaľ čas použitý na toto meranie má dlhšie trvanie ako je Néelov relaxačný čas. V tomto prípade sa jedná o nanočastice v superparamagnetickom stave [3], [4].

### **1.1. Morfológia a charakterizácia magnetického jadra**

Všeobecne sa distribúcia a morfológická charakteristika veľkosti vzoriek nanočastíc pozoruje pomocou techniky transmisnej elektrónovej mikroskopie - TEM. Táto technika sa vyznačuje schopnosťou rozlíšiť usporiadanie atómov a tiež dokáže charakterizovať deformáciu mriežky v tenkej vrstve. V najmenších časticiach možno rozoznať:

- kationovú poruchu
- neusporiadanú povrchovú vrstvu
- krátkodosahový poriadok vo vnútri celého objemu.

Ultramalé superparamagnetické oxidy železa (USPIO) sa vyznačujú tým, že obsahujú obmedzený počet kubických bunkových jednotiek. Ich systém je preto považovaný za menej usporiadaný, nie je úplne kryštalický a ani amorfný. Charakterizovať ich jadro je pomerne náročné, preto sa využívajú rôzne kombinácie analytických techník.

Jednou z najdôležitejších techník pre charakterizáciu štruktúry je röntgenová difrakcia, pri ktorej sa používajú rôzne druhy zdrojov žiarenia. Okrem röntgenovej difrakcie sa tiež využíva:

- tepelná analýza či
- infračervená spektroskopia
- a ďalšie.

Väčšina vyššie spomínaných techník vyžaduje sušenie vzoriek avšak vo farmaceutickom priemysle je potrebné nanočastice dispergovať v kvapaline. Pri sušení môže dôjsť k poruche fyzikálno-chemických vlastností USPIO, čo sa prejaví na agregácii častíc.

Kvôli týmto ťažkostiam sa na určenie skutočnej povahy nanočastíc používajú viaceré techniky na raz a výsledky z nich sa následne porovnávajú. Napríklad získaný stredný priemer častíc z elektrónovej mikroskopie je porovnaný s priemerom z röntgenovej difrakcie a magnetickou veľkosťou [5].

### **1.2. Superparamagnetické častice**

Superparamagnetické častice sú definované ako magnetické častice, ktoré sa vyznačujú dvomi charakteristickými vlastnosťami:

- každá magnetická častica obsahuje jednu Weiss doménu

To vedie k výrazne väčšiemu magnetickému momentu častice v porovnaní s magnetickým momentom jediného magnetického iónu. Veľkosť magnetického momentu jednej častice je konštantná, pokiaľ spiny elektrónov sú vzájomne zrovnané v jednej magnetickej doméne.

- nulová zvyšková magnetizácia

Táto vlastnosť vyjadruje, rovnovážny stav vzorky pri každom opakovanom meraní. Magnetický moment jednej častice sa pri nulovom magnetickom poli presunie z pôvodného smeru na opačný. Vo výsledku je teda magnetický moment priemerovaný na nulu. Tento proces

bude prebiehať jedine vtedy, ak hodnota relaxačného času je malá v porovnaní s časom kedy bolo uskutočnené meranie [6].

Ak vzorka obsahuje superparamagnetické častice a je vystavená magnetickému poľu, magnetizácia sa zvýši až na hodnotu nasýtenia.

Pôvodne sa jednalo o feromagnetické látky, ktoré vďaka svojej veľkosti stratili permanentný magnetizmus. Charakterizujú sa vysokými magnetickými momentami za prítomnosti statického vonkajšieho magnetického poľa [5].

### **1.3. Superparamagnetické nanočastice oxidu železa**

Superparamagnetické nanočastice oxidu železa alebo superparamagnetické oxidy železa sa značia označením SPIO. Pre tieto častice sa používa niekoľko akronymov a ich skratky môžu reprezentovať rôzne variácie:

- Superparamagnetické oxidy železa (SPIO)
- Ultramalé superparamagnetické oxidy železa (USPIO) [4].

#### **1.3.1. Superparamagnetické nanočastice oxidu železa**

Superparamagnetické nanočastice oxidu železa - SPIO pozostávajú z jadra oxidu železa a to buď z magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) či maghemitu ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Na ochranu a stabilizáciu jadra sa najčastejšie používa dextrans [7]. Ak sa jedná o častice magnetitu tak môžu byť potiahnuté homogénnymi zlatými alebo striebornými obalmi. Sú ideálnymi obalmi v oblasti biomedicíny vďaka:

- nízkej reaktivite
- vysokej chemickej stabilite
- biokompatibilite.

Ag častice dodávajú SPIO plazmotické vlastnosti [2]. V prítomnosti statického vonkajšieho magnetického poľa majú superparamagnetické nanočastice vysokú hodnotu magnetického momentu. Superparamagnetické nanočastice oxidu železa sú:

- nízko toxické
- jednoducho biologicky odbúrateľné
- ľahko a efektívne odstránené z tela vďaka metabolizmu železa [8].

Tiež sa vyznačujú pomerne malou veľkosťou a veľkým povrchom. Ak sa jedná o častice, ktoré svoj povrch nemajú potiahnutý obalmi, tak je väčšia pravdepodobnosť, že u nich dôjde k agregácii. Majú vysokú nešpecifickú adsorpciu proteínov a buniek. Aby sa predišlo týmto problémom, uskutočňujú sa rôzne povrchové úpravy pomocou zavedenia povlaku alebo zapuzdrenia. Na zapuzdrenie sa používajú polyméry, ako sú:

- poly(vinylalkohol)
- poly(etylénglykol)
- oxid kremičitý.

$\text{SiO}_2$  sa v danej problematike vyznačuje svojou necytotoxicitou, vysokou chemickou stabilitou a jednoduchou syntézou [9].

Magnetická povaha týchto častíc umožňuje ich fungovanie nielen ako kontrastných činidiel pri zobrazovaní magnetickej rezonancie, ale tiež umožňuje navádzanie na cieľové

terapeutické miesto vďaka vonkajším magnetickým poľiam. Možno ich využiť pri zahrievaní v oblastiach nádoru. Pri lokalizovanej hypertermii sú schopné spustiť uvoľnenie vyžadovaného liečiva, a tak zvýšenou teplotou spôsobiť bunkovú smrť tzv. apoptózu [8]. Ich špecifikom je vychytávanie mononukleárných fagocytov v systémoch. Najčastejšie sa využívajú pri nádoroch pečene a metastázach, kedy sú aplikované intravenózne. Hydrodynamická veľkosť týchto častíc sa pohybuje okolo 50 nm [5].

Častice obsahujúce Ag môžu mať potencionálne využitie v oblasti dezinfekcie rôznych hygienických priestorov napr. dezinfekcia odpadových vôd. Využitie je možné nájsť aj pri liečbe patogénnych baktérii vykazujúcich rezistenciu voči niektorým antibiotikám. Jedná sa najmä o baktérie, ktoré sa stávajú hlavnou hrozbou pre zdravie jedinca pri nepriamom prenose cez zdravotnícke pomôcky a rôzne kontaminované povrchy [9].

### 1.3.2. Ultramalé superparamagnetické oxidy železa

Ultramalé superparamagnetické oxidy železa - USPIO sú častice, ktorých veľkosť je menšia než 50 nm v rámci hydrodynamického povlaku. Najčastejšie sa jedná o častice, ktoré sú maghemitové alebo magnetitové. V súčasnej dobe majú veľké využitie v magnetickej rezonancii, kde sa využívajú ako kontrastné činidlá. Ak sa nanočastice dispergujú vo vodnom médiu, tak elektrická dvojvrstva obklopuje častice nesúce povrchový náboj. V tomto prípade má vlastnosti podobné kondenzátoru s elektrickým potenciálom, kde hodnota klesá so vzdialenosťou od povrchu. USPIO pozostávajú z:

- jadra
- oxidu železa

Tieto dve časti vytvárajú kryštáli zväčša menšie ako 10 nm. O ich osude rozhodujú povlaky, ktorými sú pokryté jadrá nanočastíc a tie hrajú veľmi dôležitú úlohu v stabilite v „*in vitro*“, či „*in vivo*“. Vďaka vhodne zvoleným polymérom môžu systémy obsahovať rôzne fyzikálno-chemické vlastnosti, ako sú:

- hustota
- konečná veľkosť
- povrchový náboj
- a ďalšie.

Ich povlak a mala konečná veľkosť spôsobuje vyhnutie sa príjmu makrofágmi. Táto vlastnosť im umožňuje dlhšie prúdenie v krvnom obehú človeka po intravenóznom podaní. Práve preto sa často využívajú na zobrazovanie krvného obehú, pričom sa využije ich efektivita na relaxačný čas. USPIO umožňujú detekciu rôznych diagnóz:

- roztrúsená skleróza
- proliferácia mozgového nádoru
- mŕtvica
- metastázy v lymfatických uzlinách
- mnoho ďalších.

Okrem vyššie vymenovaných diagnóz majú dané častice „*ex vivo*“ označenie kmeňových buniek, ktoré je možné pozorovať „*in vivo*“ pomocou nukleárnej magnetickej rezonancie (MRI). Vzhľadom na široké klinické indikácie sa v blízkej budúcnosti od daných systémov očakáva maximálna možná aplikácia. Avšak problémom, ktorý môže nastať počas práce s

USPIO je analytické rozlíšenie, pretože častice majú natoľko malé rozmery, že niektoré komerčne dostupné prístroje ich nedokážu zaznamenať [5].

### 1.4. Metódy syntézy

K syntéze dochádza postupnou úpravou použitých častíc ako sú:

- $\text{Fe}_3\text{O}_4$
- $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-SH}$
- $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-Ag}$

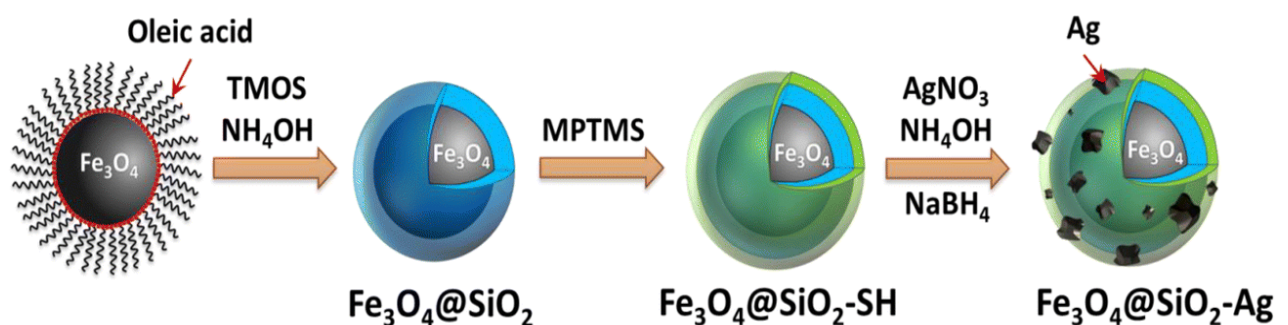
V prvom spomínanom prípade sa častice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  získali tepelným rozkladom  $\text{Fe(III)}$  oleátu. Oleát sa rozpustí pôsobením zmesou organických látok a následne je možné túto zmes predhrievať prúdom dusíka. Na oddelenie častíc magnetom je nutné k roztoku pridať ethanol, čím sa odstránia zvyšky rozpúšťadiel a kyselina olejová. Proces sa ukončí dispergovaním  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  v hexáne, čo spôsobí možnosť uskladnenia.

V prípade  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-SH}$  je možné použiť techniku reverznej mikroemulzie voda v oleji. Kedy sa k disperzií vytvorenej v prvom prípade pridajú potrebné látky a zmes sa sonikuje pri laboratórnej teplote niekoľko minút až hodín. Pri syntéze  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-SH}$  je postup rovnaký avšak pridanou látkou je MPTMS a dĺžka miešania je kratšia.

Pri príprave  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-Ag}$  sa využíva zhotovený koloid  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-SH}$ . Za stáleho miešania sa ku koloidu pridáva po kvapkách:

- $\text{AgNO}_3$
- $\text{NH}_3$
- a po tvorbe komplexu SBH.

Týmto pridaním sa získajú výsledné častice  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-Ag}$  (Obrázok 1.2). Na odstránenie povrchovo aktívnych látok a prípadnému uskladneniu je nutné roztok opakovane premyť ethanolom [9].



Obrázok 1.2 Schématická príprava nanočastíc [9]

## 2. ANTIBAKTERIÁLNE LÁTKY

Antibakteriálne látky sú dôležitou súčasťou vo viacerých oblastiach napr. balenie potravín, dezinfekcie alebo medicína. Antibakteriálna aktivita je spájaná so zlúčeninami, ktoré zabíjajú baktérie a patria do skupiny baktericídnych, alebo spomaľujú ich rast bez toho aby boli toxické

pre okolité tkanivo a tieto nazývame bakteriostatické. Veľká časť antibakteriálnych látok je v súčasnej dobe modifikovaná ako prírodná zlúčenina napr.:

- cefalosporíny
- karbapenémy

Antibakteriálne látky hrajú veľkú úlohu pri boji proti rôznym infekčným chorobám. Avšak pri ich častom používaní dochádza často k rezistencii baktérii voči antibakteriálnym liečivám, čo je založené na evolučných procesoch. Kmene alebo druhy odolné voči tejto vlastnosti sú označované ako superbaktérie a prispievajú ku vzniku chorôb, ktoré boli dlhé roky pod kontrolou.

Jedným z mnohých príkladov sú bakteriálne kmene spôsobujúce tuberkulózu, ktoré sa vyznačujú rezistenciou na antibakteriálnu liečbu. Ďalšou veľkou nevýhodou týchto látok sú škodlivé vedľajšie účinky. Toxicita je spôsobená vysokými dávkami antibiotík. Táto problematika vydala impulz pre vývoj alternatívnych stratégií na liečbu ochorení. Došlo tak k rozvoju nanočastíc v nosičoch na podávanie antibiotík. Poskytujú výhodnejšie vlastnosti ako je vysoký pomer plochy povrchu k objemu, čo vedie k objavu nových vlastností nanočastíc ako sú ich :

- chemické vlastnosti
- elektrické vlastnosti
- magnetické vlastnosti
- a ďalšie [10].

## **2.1. Antibakteriálny efekt Ag**

Nanočastice striebra, ktoré sa často označujú aj ako AgNP sú považované za nanomateriály, ktoré majú najčastejšie použitie v spotrebiteľských produktoch, kde slúžia ako antimikrobiálne látky. Toto je spôsobené vďaka uvoľňovaniu AgNP alebo samotných iónov do životného prostredia. Existujú rôzne formy striebra ako sú:

- soli
- kovy
- nanočastice

Tieto formy sa často aplikujú na lekárske produkty, vďaka čomu zabraňujú infekciám alebo chronickým vredom, ktoré sú spôsobené mikroorganizmami. Ióny striebra majú schopnosť reagovať s proteínmi, kde dochádza ku tvorbe väzby so sulfhydrylovou skupinou. Tvorba tejto väzby je príčinou, ktorá vedie k zníženiu či úplnej strate aktivity enzýmov a ku následnej sterilizácii.

AgNP proti baktériám pôsobia podobným spôsobom ako samotné ióny striebra, no považujú sa za toxickejšie vďaka veľkému povrchu, ktorý zabezpečuje lepší kontakt s bunkami. Okrem toho pri uvoľnení iónov striebra z nanočastíc, dochádza k zosilneniu baktericídneho účinku AgNP. Od začiatkov pozorovania antimikrobiálnej aktivity sa táto aktivita pripisuje prítomnosti Ag<sup>0</sup>. Pomocou niekoľkých metód ako sú:

- transmisná elektrónová mikroskopia (TEM)
- proteomická analýza
- rastrovací elektrónová mikroskopia (SEM)

bolo zistené, že nanočastice sú schopné interagovať s bakteriálnou membránou. Častice prenikajú do vnútra bunky a tak sú schopné spôsobiť štrukturálne poškodenie, narušenie funkcie bunky a bunkovej smrti. Zapríčiňujú to vyvolaním oxidačného stresu. Týmto stresom sa začnú tvoriť reaktívne formy kyslíka, ktoré poškodzujú proteíny aj nukleové kyseliny a v konečnom výsledku spomaľujú bunkovú proliferáciu [11].

### 2.1.1. Mechanizmus

Antibakteriálny systém pozostávajúci zo striebra, obsahuje mechanizmus zložený z dvoch rôznych krokov. Avšak oba majú dopad na účinnosť. Prvým spôsobom je, ako sa bude systém chovať v záujmovom prostredí, v ktorom môže dochádzať k fyzikálnym alebo chemickým zmenám. Za zmeny sa považuje:

- agregácia
- rozpúšťanie
- adsorpcia alebo desorpcia iónov
- mnoho ďalších.

Spomínané zmeny môžu mať vplyv dostupnosť kovu ale aj na antibakteriálny účinok.

Druhý krok zahŕňa ako interaguje striebro s bakteriálnou bunkou. Tento spôsob závisí aj na prvom kroku, pretože povaha interakcie striebro-článok závisí od typu druhov striebra, ktoré sa v roztoku nachádzajú [12].

## 3. BAKTÉRIE

Baktérie sú jednobunkové mikroorganizmy, ktoré nemajú jadrovú membránu. Bakteriálne bunky sú veľmi malé a ich veľkosť sa pohybuje od 0,1-10  $\mu\text{m}$ . Ich pomer povrchu je voči objemu veľmi vysoký. Delia sa binárnym štepením a sú metabolicky aktívne. Samoreplikáciu bunky spôsobujú exergonické a endergonické reakcie, ktoré sú katalyzované v bakteriálnej bunke rôznymi integrovanými enzýmovými systémami. Tempo, ktorým sa baktérie rozmnožujú je pomerne rýchle a rozdielne druhy týchto organizmov môžu využívať rôzne substráty uhl'ovodíkov na daný proces.

Na výrobu energie v baktériách sa využívajú oxidačné a disimilačné reakcie substrátu. Ich primárnym zdrojom chemickej energie je ATP ako u väčšiny buniek rastlín či živočíchov. Tiež pre svoju funkciu vyžadujú vitamíny B-komplexu, ktoré pôsobia ako funkčné enzýmy pre množstvo oxidačno-redukčných reakcií. Z hľadiska lekárskeho prostredia sú častou príčinou rôznych druhov ochorení.

Na prvý pohľad sa môže zdať, že sa jedná o pomerne jednoduché organizmy, no v skutočnosti sa tieto bunky považujú za vysoko prispôsobivé a sofistikované. Väčšina z baktérií sa považuje za parazitov, avšak existujú aj organizmy voľne žijúce. Jedná sa o prokaryota, ktoré majú nukleoid a nemajú membránovo viazané cytoplazmatické organely. Množstvo funkcií týchto chýbajúcich membránových organel zastupuje u prokaryot plazmatická membrána.

Z metabolického alebo nutričného hľadiska je možné mikroorganizmy rozdeliť do troch skupín (Tabuľka 3.1):

- heterotrofy (alebo chemoorganotrofy)
- autotrofy (alebo chemolithotrofy)

- fototrofy

Tabuľka 3.1 Metabolické a nutričné rozdelenie baktérií [13]

	Zdroj uhlíku	Zdroj dusíku	Zdroj energie
<b>Heterotrofy (chemoorganotrofy)</b>	organické zlúčeniny	organické/anorganické zlúčeniny	Oxidácia organických zložiek
<b>Autotrofy (chemolithotrofy)</b>	CO <sub>2</sub>	anorganické zlúčeniny	Oxidácia anorganických zložiek
<b>Fototrofy</b>	CO <sub>2</sub>	anorganické zlúčeniny	slnečné žiarenie

Na niektorých bakteriálnych druhoch možno rozlíšiť dva typy povrchových doplnkov. Prvým z nich sú bičíky, ktoré zapríčiňujú pohyb a obsahujú ich grampozitívne (G+) aj gramnegatívne (G-) baktérie. Druhým doplnkom sú pili, známe ako fimbrie, ktoré sa vyskytujú význačne na gramnegatívnych baktériách. Existujú však aj baktérie, ktoré obsahujú oba spomínané doplnky. Dané mikroorganizmy sa tiež vyznačujú charakteristickými tvarmi ako sú:

- tyčinky
- špirály
- koky.

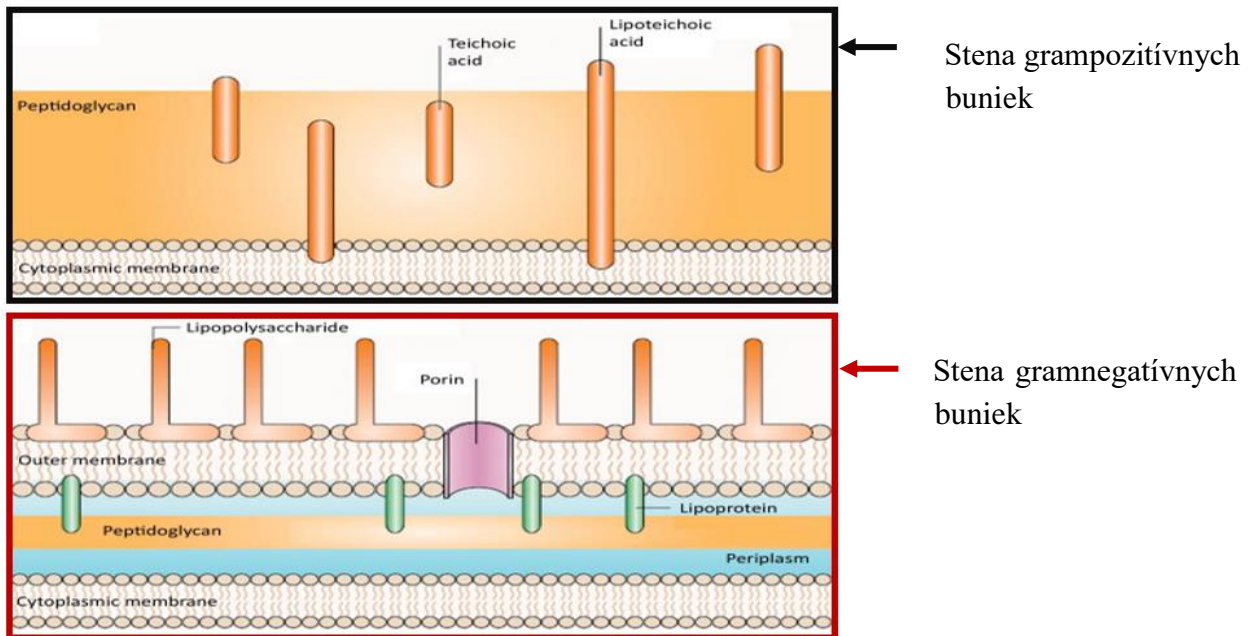
Mikroorganizmy majú výnimočnú schopnosť sa prispôbiť prostrediu, v ktorom sa nachádzajú. Identifikujú sa tak aby ich bolo možné rozlíšiť medzi kmeňmi a na zoskupenie organizmov podľa kritérií mikrobiológov. V závislosti od ochorenia aké daný bakteriálny druh produkuje sa môže líšiť v kmeni alebo podskupine. Rozdielny organizmus, ktorý obsahuje charakteristické znaky nazýva bakteriálny druh. Druhy boli často definované kritériami ako:

- patogenita
- schopnosť produkovať plyn pri fermentácii
- rozsah hostiteľa.

Na identifikovanie povrchových vrstiev bakteriálnych buniek sa v praxi používajú rôzne techniky ako napr. svetelná mikroskopia, biochemická charakterizácia jednotlivých zložiek alebo izolácia [13].

Podstatnou súčasťou baktérií je bunková stena (Obrázok 3.1), ktorá tvorí u baktérií rovnomernú štruktúru a je navrhnutá tak, aby poskytla tvar, pevnosť a tuhosť. Taktiež chráni bunku pred mechanickým poškodením a osmotickým prasknutím. Štruktúra bunkovej steny má dôležitú úlohu pri citlivosti a tolerancii baktérií. Podľa štruktúry a funkcií sa delia na:





Obrázok 3.1 Štruktúra bakteriálnej bunky [8]

- Grampozitívne

U grampozitívnych buniek je stena bunky hrubá asi 15-100 nm. Obal bunkovej steny je makromolekulárna, exoskeletálna organela. Stena sa podieľa na interakciách G+ patogénov s prostredím a to najmä s tkanivami infikovaného hostiteľa. Bunková stena pozostáva okrem cytoplazmatickej membrány aj z peptidoglykán, ktorý je základným polymérom týchto organizmov. Peptidoglykán zodpovedá za osmotickú stabilitu a tiež vďaka nemu bunka udržiava svoj tvar. Skladá sa z dvoch kyselín, ktoré sú zodpovedné za vznik trojrozmernej siete. Steny obsahujú rôzne typy polysacharidov, ktoré možno rozdeliť do 3 odlišných skupín podľa štruktúrnych charakteristík:

- kyseliny teichoové
- kyseliny teichurónové
- neutrálne alebo kyslé polysacharidy.

Práve teichoové kyseliny sú charakteristickou vlastnosťou pre grampozitívnu bunkovú stenu a tvoria približne polovicu hmoty bunkovej steny. Tiež pokrývajú baktérie tenkou vrstvou glykánov a tie sú následne vystavené prostrediu [10], [14].

- Gramnegatívne

Gramnegatívne bunkové steny sú oproti G+ zložitejšie po štruktúrnej aj chemickej stránke. Stena obsahuje dve časti. Prvá je tenká vrstva peptidoglykán a druhá je vonkajšia membrána, ktorá pokrýva povrchovú membránu. Vrstva, ktorú nájdeme najviac na povrchu sa nazýva lipidovo-proteínová dvojvrstva. Táto vrstva obsahuje:

- proteíny
- fosfolipidy
- lipopolysacharidy.

Priestor medzi vonkajšou membránou a plazmatickou membránou je vyplnený periplazmou, ktorá obsahuje väzbové proteíny pre cukry, vitamíny či detoxikačné enzýmy a odpovedá

gélovej matici. Periplazma v skutočnosti nie je súčasťou protoplastu ani okolitého prostredia, ale je to jedna z častí bunkovej steny. Vonkajšia membrána u gramnegatívnych baktérií odoláva hydrofóbnym látkam a tiež musí byť porézna pre určité látky. Avšak porézita nesmie prekročiť hranicu, kedy by mohlo dôjsť k poškodeniu periplazmatickej zložky a tak by mohlo byť ohrozené živobytie bunky.

Zložka charakterizujúca G- baktérie je lipopolysacharid, ktorý zvyšuje negatívny náboj na bunkových membránach a tiež je nevyhnutný pre životaschopnosť baktérií. Steny u gramnegatívnych buniek sú dostatočne pevné na to aby odolávali vysokým teplotám, či rôznym Ph a tiež ich elasticita zabezpečuje rozpínanie na normálnych povrchoch. Tieto vlastnosti tak chránia obsahy buniek [10], [15].

### 3.1. Escherichia coli

Jedná sa o gramnegatívne, krátke tyčinky. To že sa jedná práve o gramnegatívnu baktériu je preukázané spoločným znakom, čo je prítomnosť alebo neprítomnosť tepelne stabilných somatických antigénov [13]. Jej klasifikácia je zaznamenaná v tabuľke 3.2.

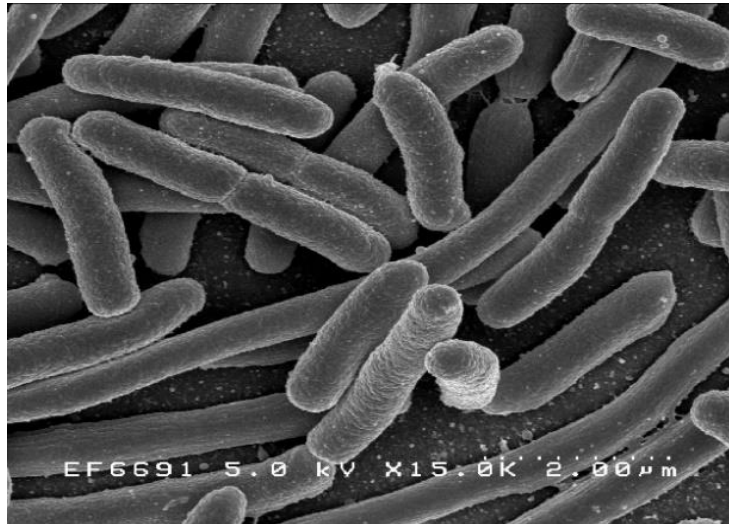
Tabuľka 3.2 Klasifikácia *Escherichia coli* [16]

Kmeň	Trieda	Čeľaď	Rod
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>

Evokuje univerzálny a rozmanitý enterobakteriálny druh. Podľa prítomnosti, či neprítomnosti rozličných oblastí DNA sa delia na:

- nepatogénne
- komenzálne
- črevne patogénne
- extraintestinálne patogénne kmene [17].

*Escherichia coli* (Obrázok 3.2) je baktéria nachádzajúca sa vo flóre ľudského čreva. Pokiaľ nezíska faktory, ktoré kódujú virulencie zostáva tak nezmenená ako benígny komenzál, no ak nadobudne plazmidovú DNA, ktorá kóduje enterotoxíny či invázne faktory dochádza k zmene a stáva sa virulentnou. Existuje viacero druhov enterotoxínov. Niektoré z nich majú cytotoxický charakter, čím poškodzujú slizničné bunky. Iné vyvolávajú sekréciu vody a majú tak charakter cytotonický [13].



Obrázok 3.2 *Escherichia coli* [18]

Niektoré kmene sa adaptovali na prostredie a vyvinuli si tak schopnosť, kedy dokážu spôsobiť ochorenie nielen gastrointestinálneho systému, ale aj močového či centrálne nervového systému. Tieto mikroorganizmy sú považované za najčastejšie príčinu hnačkových ochorení prejavujúcich sa najmä u maloletých. *E coli* je obvykle neškodne obmedzená na črevný lúmen, no ak sa jedná o slabší organizmus hostiteľa či počas života došlo k oslabeniu gastrointestinálnej bariéry, tak poruchu alebo prípadnú infekciu môže spôsobiť aj bežný nepatogénny kmeň daného mikroorganizmu.

Ak sa jedná o patogénny kmeň *E coli*, môžu vznikať rôzne infekcie na povrchu slizníc. Taktiež sa môžu šíriť po celom tele a spôsobiť rôzne syndrómy infekcie ako sú napr.:

- meningitída
- črevné ochorenia
- infekcie močových ciest.

Dané kmene prislúchali k prvým patogénom, na ktoré boli použité molekulárne diagnostické metódy. Tieto metódy sa používajú dodnes vďaka ich spoľahlivosti na odlišenie diarheagénnych kmeňov od nepatogénnych členov. Jednou z možností ako nadobudnúť *E coli* je z klinických vzoriek či média za aeróbnych podmienok. Zväčša je daný druh identifikovaný pomocou biochemických reakcií, kde je možné využiť kultivačné skúmavky alebo testovacie prúžky. Na rôzne klinické ciele sa *E coli* po vizuálnej identifikácii vyberá z agarovej platne [18].

## 3.2. Rod *Bacillus*

Jedná sa o grampozitívne anaeróbne alebo fakultatívne anaeróbne baktérie, ktoré sa vyznačujú tyčinkovitým tvarom. Baktérie často vytvárajú endospóry. Rôzne druhy *Bacillus* sa používajú vo viacerých medicínskych, farmaceutických a priemyselných procesoch, kde sa využívajú ich fyziologické charakteristiky a schopnosť produkovať enzýmy, agresíny a iné metabolity [13].

### 3.2.1. *Bacillus cereus*

Existuje ako spórotvorná a vegetatívna bunka. Spóry sú odolné voči extrémnym podmienkam ako je:

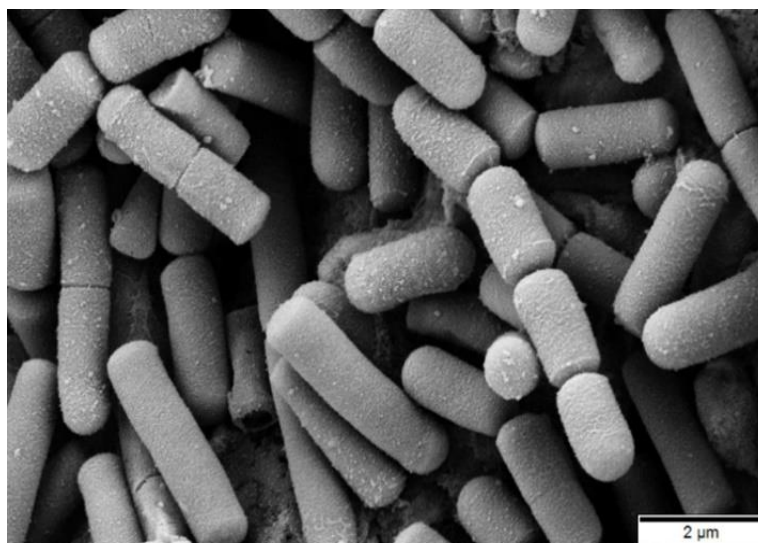
- chlad
- vysychanie
- žiarenie
- dezinfekčné prostriedky.

Klasifikácia *Bacillus cereus* je zhrnutá v tabuľke 3.3.

Tabuľka 3.3 Klasifikácia *Bacillus cereus* [19]

Kmeň	Trieda	Čeľad'	Rod
<i>Bacillota</i>	<i>Bacili</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>

Bežne sa vyskytuje pôde, potravinách či morských hubách. Ak sa poskytnú baktérii aeróbne podmienky, tak dochádza ku vzniku matne sivých a nepriehľadných kolónií s drsným okrajom (Obrázok 3.3).



Obrázok 3.3 *Bacillus cereus* [19]

Často je *Bacillus cereus* spájaný s otravou jedla, čo sa prejavuje dvomi rôznymi syndrómami:

- emetický syndróm ( nevoľnosť a vracanie)
- hnačkový syndróm.

Tieto príznaky otravy jedlom sú spôsobené toxínmi produkovanými v potravinách počas množenia. Medzi vylučovanými toxínmi sú štyri hemolyzíny, tri fosfolipázy, tri enterotoxíny a toxín spôsobujúci vracanie. Pôvodca, ktorý zodpovedá za nevoľnosť je emetický toxín, ktorý sa syntetizuje v kontaminovaných potravinách ako napr.:

- mlieko, ryža, cestoviny.

Ak dochádza k produkcii letálneho toxínu, u jedincov sa často vyskytuje vyššie spomínaný hnačkový syndróm.

Okrem zažívacích problémov spôsobuje aj množstvo systémových a lokálnych infekcií, čo sa prejaví najčastejšie u oslabených jedincov. Do tejto skupiny patria novorodenci, pacienti

s chirurgickými ranami alebo zavedenými katétami. Infekcie môžu spôsobiť poškodenie centrálného nervového systému, pneumóniu a aj rôzne druhy kožných infekcií. Častým javom *Bacillus cereus* je rezistivita na antibiotiká obsahujúce penicilín, cefalosporín a mnohých ďalších látok vďaka produkcii  $\beta$ -laktamázy.

Na odhalenie cytoplazmatickej membrány, ktorá obklopuje bunkový obsah danej baktérie vegetatívnej bunky sa využíva transmisná elektrónová mikroskopia [13], [20].

### 3.2.2. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* je silne bičíkovaná baktéria, čo jej dodáva schopnosť rýchlejšieho pohybu v kvapalinách. Rovnako ako u *Bacillus cereus*, vytvorené spiace endospóry sú veľmi odolné voči okolitým podmienkam. Tiež bola definovaná klasifikácia zhrnutá v tabuľke 3.4.

Tabuľka 3.4 Klasifikácia *Bacillus subtilis* [21]

Kmeň	Trieda	Čeľaď	Rod
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacili</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>

Jedná sa o nepatogénnu baktériu, ktorá sa bežne vyskytuje v pôde. Práve preto sa spóry jednoducho dostanú do vzduchu a rozptýlia sa vetrom. Vďaka tomuto sú schopné prekonávať veľké vzdialenosti. Danú baktériu je možné izolovať z rizosféry rôznych druhov rastlín. Tvar tyčinky je uchovávaný po celý čas vegetatívneho rastu a sporulácie.

Vyznačuje sa povrchovým rojením a schopnosťou tvoriť biofilmy. V rámci biofilmov sú bunky vložené do matric, ktoré sú zložené z extracelulárnych polymérnych látok. Mikroby spojené s biofilmom často preukazujú rôzne fyziologické či metabolické rozdiely ako je znížená citlivosť na antimikrobiálne látky. Tieto vlastnosti sú charakteristické pre divoké kmene.

Jedná sa o rozmanitý bakteriálny druh, ktorý sa vyznačuje schopnosťou rásť vo viacerých prostrediach vrátane gastrointestinálneho traktu ľudí aj zvierat. Počas všetkých fáz rastu musia byť dodržané dve základné podmienky a to:

- priestorová kontrola tvaru bunky
- časová kontrola tvaru bunky.

Bunkový cyklus pre mikroorganizmus je určený bunkovou morfológiou. Sporulácia začína asymetrickým delením, ktorým dochádza ku vzniku materskej bunky a menšej perspóry. V skutočnosti sa daná baktéria vníma ako probiotikum, keďže po požití má priaznivé účinky na organizmus. Je to pravdepodobne spôsobené tým, že udržiava a obnovuje zdravé bakteriálne bunky v tele. *Bacillus subtilis* sa okrem pôdy nachádza aj v niektorých fermentovaných potravinových produktoch, ako napríklad sójové bôby. Používa sa aj na priemyselnú produkciu rekombinovaných proteínov vďaka svojej nepatogénosti, známemu genómu a vonkajšej membrány bez obsahu lipopolysacharidov.

Podľa objavených génov, ktoré kódujú respiračnú nitrátreduktázu, by mal byť mikroorganizmus schopný rásť aj anaeróbne, kde sa ako akceptor elektrónov namiesto kyslíka použije dusičnan. Vďaka tomuto faktoru je možný jeho vegetatívny život v anaeróbnom gastrointestinálnom trakte zvierat [22].

### 3.3. *Serratia marcescens*

*Serratia marcescens* sa považuje za gramnegatívny bacil produkujúci DNAázu, ktorý možno klasifikovať medzi *Enterobacteriaceae*. Samotná jej klasifikácia je spomenutá v tabuľke 3.5. Jej tvar je tyčinkovitý. Baktéria je fakultatívne anaeróbna čo znamená, že dochádza k jej rastu v prítomnosti a aj v neprítomnosti kyslíka. Pri anaeróbných podmienkach je schopná redukovať dusičnany.

Tabuľka 3.5 Klasifikácia *Serratia marcescens* [23]

Kmeň	Trieda	Rod
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Serratia</i>

Jedná sa o saprofytickú baktériu, ktorá sa bežne vyskytuje v potravinách. Najčastejšie sú to rôzne škrobové produkty, ktoré jej poskytujú dostatočne vhodné podmienky a prostredie pre rast. Okrem toho sa môže vyskytovať v pôde, vzduchu či v rastlinách.

Vyznačuje sa schopnosťou rastu v extrémnych podmienkach vrátane antiseptík či dezinfekčných prostriedkov. Charakteristickou vlastnosťou tejto baktérie je produkcia červeného pigmentu nazývaného prodigiozín (Obrázok 3.4). Tento pigment zohráva dôležitú úlohu pri dýchaní ale tiež sa vyznačuje aj antibiotickými vlastnosťami. Produkciu ovplyvňuje viacero faktorov ako je teplota, aminokyseliny či aniónové detergenty [24].



Obrázok 3.4 Pigment prodigiozínu u *Serratia marcescens* [23]

Pri oneskorenom raste buniek, ku ktorému dochádza pri nepriaznivých okolitých podmienkach slúži biosyntéza prodigiozínu ako ochranný mechanizmus. V začiatkoch sa jednalo o pomerne neškodný, nepatogénny vodný mikroorganizmus. Veľmi často sa používal ako biologický marker vďaka svojim červeným kolóniám. V dnešnej dobe sa však považuje za patogén a etiologické činidlo pri viacerých druhoch infekcií ako napríklad infekcie dýchacích ciest, močových ciest či meningitíde.

*Serratia marcescens* sa považuje tiež medzi jednou s príčin spôsobujúcich endokarditídu. Na spomínané infekcie sú náchylnejší hospitalizovaní pacienti na jednotke intenzívnej starostlivosti, drogovu závislí ľudia a pacienti liečení širokospektrálnymi antibiotikami.

Liečba týchto infekcií môže byť z hľadiska rekonvalescencie zložitejšia z dôvodu rezistencie na antibiotiká obsahujúce cefalosporíny alebo ampilcín. Od ostatných gramnegatívnych baktérií sa odlišuje svojou schopnosťou vykonávať hydrolyzu kazeínu. Tiež je pre ňu charakteristické vylučovanie extracelulárnej chitinázy, nukleázy, lipázy a väčšieho množstva rôznych proteáz. Pri kolonizácii povrchov dochádza tiež k produkcii povrchovo aktívnej látky. V súlade od prostredia v ktorom sa baktéria nachádza vytvára odlišné formy bičikátých buniek. Tento fakt závisí od zvolenia rastového média, a to či je teda použité tekuté alebo pevné médium. Avšak bunky, ktoré neobsahujú bičík majú taktiež schopnosť sa premiestňovať cez povrch média, no obsah agaru musí byť pomerne nízky [24].

### 3.4. *Kocuria rosea*

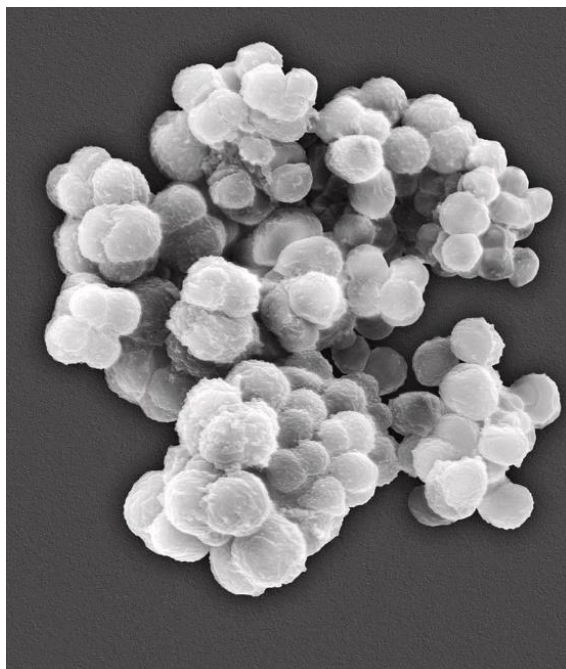
Druhy *Kocuria* možno odlišiť od *Actinomycetales* (Tabuľka 3.6) najmä na základe obsahu galaktozamínu a glukozamínu ako hlavných cukrov v bunkovej stene, peptidoglykáne atď.

Tabuľka 3.6 Klasifikácia *Kocuria rosea* [25]

Rad	Čeľad'	Rod
<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria</i>

*Kocuria rosea* (Obrázok 3.5) je baktéria, ktorá má grampozitívny charakter a bežne ju možno nájsť v ľudskej kožnej mikroflóre. Tiež sa nachádza v životnom prostredí v pôde, vode a aj vzduchu. Jedná sa o aeróbnny mikroorganizmus nevytvárajúci spóry. Vyznačuje sa pozitívnou produkciou katalázy a negatívnou produkciou koagulázy. Na živnom médiu sa najčastejšie objavuje ako jemne ružová až červená kruhová kolónia. *Kocuria rosea* rastie pri teplote 25-37°C v pároch poprípade zhlukoch alebo tetradach [25].





Obrázok 3.5 *Kocuria rosea* [26]

Táto baktéria je charakterizovaná ako oportúnny patogén z čoho vyplýva možná infekcia spojená so zdravotníckymi pomôckami. Najčastejšie sú to katétre zavedené v pacientoch. Môže spôsobiť infekciu močových ciest, endokarditídu a peritonitídu.

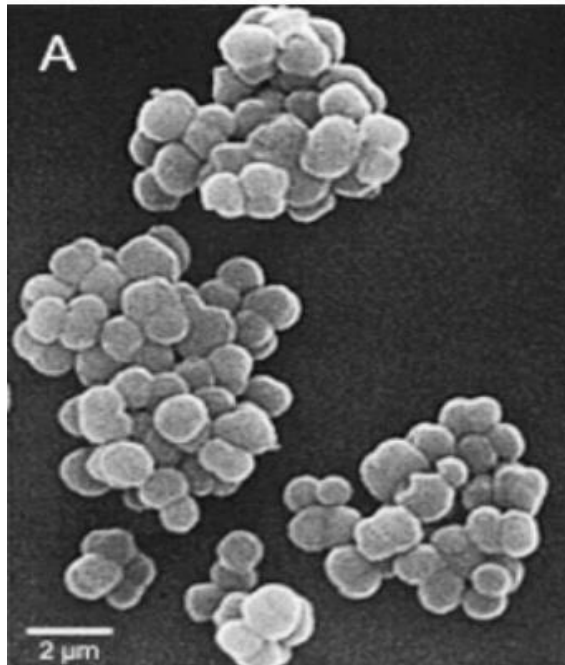
Na dané ochorenia sú náchylnejší pacienti podstupujúci peritoneálnu dialýzu a imunokompetentní pacienti. Tieto infekcie daným organizmom sú v bežnom živote pomerne zriedkavé.

Bunky, ktoré sa neskôr používajú na identifikáciu sú najčastejšie izolované z krvi alebo povrchov inertných lekárskeho implantátov. Samotná identifikácia prebieha pomocou fenotypových testov. Hlavným kritériom je citlivosť na bacitracín a lyzozým. Jej ďalším charakteristickým znakom je aj odolnosť voči nitrofurantoín/furazolidón. Okrem toho bola zistená rezistencia na kanamycín, ampicilín, erytromycín a mnoho ďalších látok, ktoré sa nachádzajú v antibiotikách [25].

### 3.5. *Micrococcus luteus*

Jedna sa grampozitívnu baktériu, ktorá sa vyznačuje svojím guľatým tvarom. Je to druh katalázového a oxidázového mikroorganizmu. Vyskytujú sa vo forme tetrad, sú nepohyblivé a nevytvárajú spóry. *Micrococcus* (Obrázok 3.6) sa považuje za baktériu, ktorá plne vyžaduje aeróbne podmienky.





Obrázok 3.6 *Micrococcus luteus* [27]

Klasifikácia pre *Micrococcus* je spomenutá v tabuľke 3.7.

Tabuľka 3.7 Klasifikácia *Micrococcus luteus* [28]

Kmeň	Trieda	Čeľaď
<i>Actinomycetota</i>	<i>Actinomycetia</i>	<i>Micrococcaceae</i>

Membrány sú veľmi bohaté na enzýmy využívajúce prenylpyrofosfát, ktorý funguje ako donor pri prenylačných reakciách. Bežne ju je možné nájsť v prostredí ako je pôda či rôzne vodné zdroje.

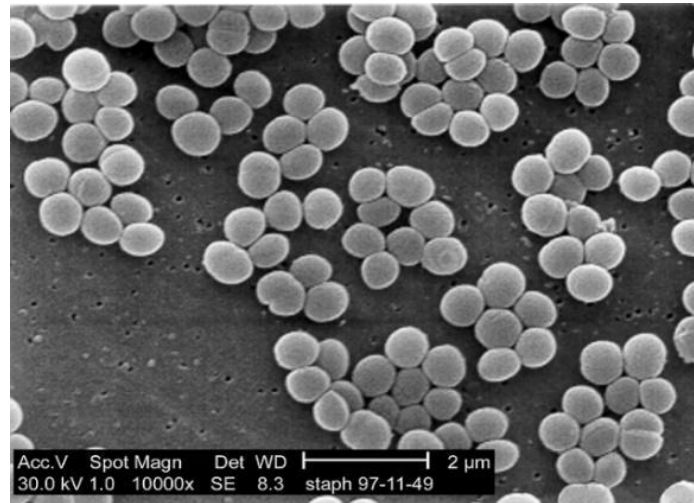
V týchto miestach dokáže prekonávať extrémne podmienky. Vo vode bežne vytvára žlté nerozpustné pigmenty. Taktiež ho vieme nájsť v normálnej flóre ľudskej kože a sliznice orofaryngu. Klinicky sa považuje za potenciálny oportúnny patogén, ktorý môže spôsobiť pečeneňový a mozgov absces, natívnu endokarditídu chlopne, bakteriémiu a septickú artritídu. Tieto ochorenia sa zvyčajne prejavujú u pacientov s oslabenou imunitou, invazívnymi operáciami a zavedenými katétami.

Niektoré kmene *Micrococcus luteus* majú pomerne široké spektrum antimikrobiálnej rezistencie. Účinné antibiotiká, ktoré zaberajú voči tomuto mikroorganizmu sú s obsahom cefalosporínov a chinolónov. Avšak menej už reaguje na erytromycín [29], [27].

### 3.6. Rod *Staphylococcus*

Jedná sa o grampozitívne koky z rodu *Staphylococcus* (Obrázok 3.7). Ich priemer je okolo 0,5 - 1  $\mu\text{m}$ . Vedia vyvolať viacero foriem infekcií. Môžu rásť v zhlukoch, pároch a občasne ich môžeme nájsť aj v krátkych reťaziach. Stafylokoky sa štiepia v dvoch rovinách, čo je dôvodom vznikajúcich zhlukov. Zvyčajne sa *Staphylococcus* delí do dvoch skupín podľa schopnosti

zrážanie krvnej plazmy (koagulázová reakcia). Ak je koaguláza pozitívna jedná sa o druh *Staphylococcus aureus* či *Staphylococcus intermedius*. Iné stafylokoky sú koaguláza negatívne. Často sú hemolytické a dokážu tolerovať sol. Na ich identifikáciu je potrebné biotypová analýza [13].



Obrázok 3.7 *Staphylococcus* [30]

### 3.6.1. *Staphylococcus epidermis*

Tento mikroorganizmus sa javí ako jeden z členov koaguláza-negatívnych stafylokokov. Na rozdiel od *Staphylococcus aureus* teda nie je schopný produkovať koagulázu. Patrí medzi hlavných predstaviteľov bakteriálnej flóry kože či ľudskej sliznice. Jedná sa o oportunný patogén a je častou príčinou nozokomiálnych infekcií. Možno sem zaradiť infekcie krvného obehu, kardiovaskulárne infekcie, infekcie oka, ucha, nosa a hrdla.

Častými pacientami týchto ochorení sú ľudia s oslabenou imunitou, predčasne narodené deti, prípadne osoby závislé na omamných látkach. Telo je najčastejšie infikované cez zavedenie intravaskulárneho katétra, prípadne implantovaných zariadení. Neprodukuje veľké množstvo toxínov, ktoré poškodzujú tkanivá [31].

# EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

## 4. MATERIÁL

### 4.1. Chemikálie

- (3-merkaptopropyl)trimethoxysilan so striebornými nanoklastrami –  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-Ag}$ , 4 mg/ml (Česká akadémia vied, Praha, ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Ethanol, 96% (Penta, Chrudim, ČR)
- Fenol (Sigma, St. Louis, USA)
- Fuchsin (Sigma, St. Louis, USA)
- Imerzný olej (Lachema, Brno, ČR)
- Jód (Sigma, St. Louis, USA)
- Jodid draselný (Sigma, St. Louis, USA)
- Kryštalová violet' (Sigma, St. Louis, USA)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery pre doménu *Baktéria* – Feub a Reub (Generi Biotech, Hradec králové)
- qPCR 2x SYTO 9 Master mix (Top-Bio, Praha, ČR)

### 4.2. Pomôcky a prístroj

- Agarové platne
- Autokláv (Microjet, Essex, Spojené kráľovstvo)
- Denzitometer (Biosan, Lotyšsko)
- Eppendorfove skúmavky (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Laboratórna váha (Ohaus, Švajčiarsko)
- Laboratórne sklo
- Magnetický separátor Dynal (Invitrogen, Oslo, Nórsko)
- Mikropipeta automatická (HTL Lab, Poľsko)
- Mikroskop
- Minicentrifuga MINI Spin 13 400 min (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Očkovací box
- Papinov hrniec
- Petriho misky
- Pipeta
- Plastové sterilné skúmavky
- Plastové špičky pre mikroskopické pipety
- Plynový kahan (Schuett-biotec, Nemecko)
- Podložné sklíčka
- Rotor-Gene 6000 (CORBET RESEARCH, Rakúsko)
- Spektrofotometer UV/VIS (IMPLEN, Mníchov, Nemecko)
- Štandardné laboratórne vybavenie (rukavice, buničina, stojany na skúmavky...)
- Termostat

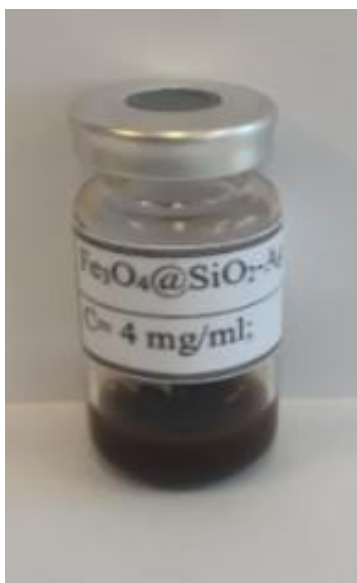
- Trepáčka (Heidolph, Nemecko)
- UV box pracovný UVC/T-AR
- Vortex (Ohaus, Švajčiarsko)

### 4.3. Použité superparamagnetické častice

Použité superparamagnetické nanočastice s obsahom Ag boli pripravené Ing. Anastasiia B. Shatan na Ústave makromolekulárnej chémie Českej akadémie vied. Základné vlastnosti spomínaných monodisperzných častíc sú zhrnuté v tabuľke 4.1. Taktiež je priložená aj fotografia pripravených nanočastíc (Obrázok 4.1).

Tabuľka 4.1 Vlastnosti použitých nanočastíc

<b>Označenie</b>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> -Ag
<b>Magnetické nanočastice</b>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
<b>Koncentrácia [mg/ml]</b>	4
<b>Povrch</b>	tetramethyl orthosilikát; (3-merkaptopropyl)trimethoxysilan so striebornými nanoklastrami
<b>Priemer [nm]</b>	21
<b>Saturačná magnetizácia [A.m<sup>2</sup>/kg]</b>	26



Obrázok 4.1 Použité superparamagnetické častice s obsahom Ag

### 4.4. Použité mikroorganizmy

Pre dôkaz antibakteriálneho účinku superparamagnetických nanočastíc s obsahom striebra boli použité tieto vybrané bakteriálne kultúry. Použité kultúry sa čerpali z Českej zbierky

mikroorganizmov (Czech Collection of Microorganism, CCM) so sídlom na Masarykovej univerzite v Brne.

- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Bacillus subtilis* CCM 1999
- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Kocuria rosea* CCM 570
- *Micrococcus luteus* CCM 210
- *Serratia marcescens* CCM 303
- *Staphylococcus epidermis* CCM 2124

#### **4.5. Materiály potrebné na kultiváciu bakteriálnych kultúr**

Na kultiváciu vybraných mikroorganizmov bol použitý masopeptonový agar (MPA) a masopeptonový bujón (MPB). Pri MPA a MPB sa jedná o univerzálne média, vďaka čomu boli použité na pomnoženie mikróbov. V prípade MPB je zloženie rovnaké okrem agaru, ktorý je tu vynechaný.

Ďalším univerzálnym kultivačným médiom je Luria bujón (LB), ktorý sa využíva najmä pri kultivácii čeľade *Enterobacteriaceae*. Hlavným predstaviteľom tejto čeľade je *E coli*, ktorá sa v tejto práci využívala ako vzorový mikroorganizmus - MO. Po pridaní agaru vzniká Luria agar (LA).

#### **4.6. Roztoky potrebné na mikroskopické pozorovanie**

- Destilovaná voda
- Ethanol 96 %
- Imerzný olej
- Karbolfuchsin  
Zloženie: 90 ml destilovaná voda, 10 ml ethanol 96%, 5 ml fenol, 1g fuchsin
- Kryštalová violet'  
Zloženie: 80 ml destilovaná voda, 20 ml ethanol 96%, 0,5 g kryštalová violet'
- Lugolov roztok  
Zloženie: 300 ml destilovaná voda, 1 g jódu, 2 g jodidu draselného

### **5. METÓDY**

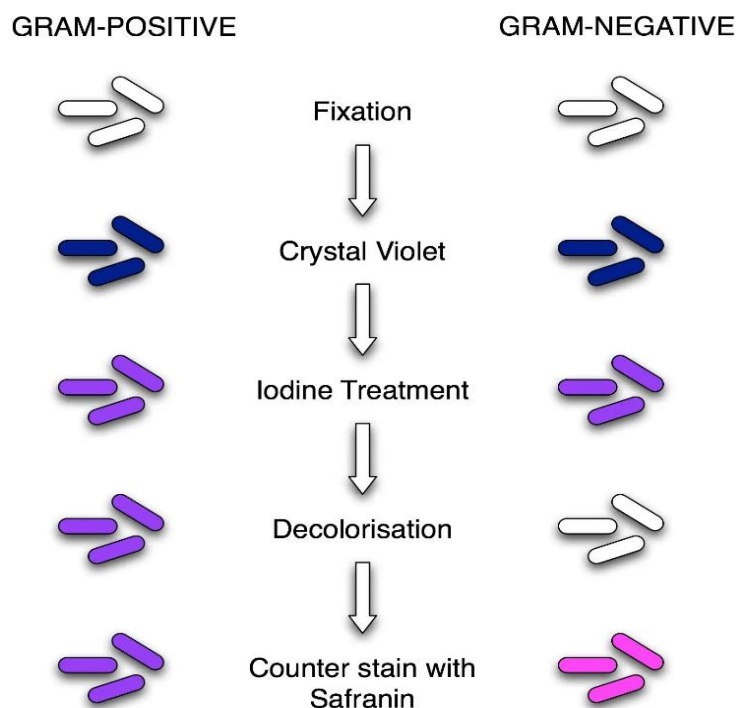
Postup podľa ktorého sa v experimentálnej časti postupovalo vychádza zo skript a zo znalostí z laboratórnych cvičení.

#### **5.1. Krížový rozter**

- Na pripravené agarové platne bol aplikovaný krížový rozter bakteriálnej kultúry
- S agarovými platňami sa pracovalo v sterilných podmienkach a hneď po vykonanej práci boli uzavreté a prelepené parafilmom
- Následne boli umiestnené do termostatu
- Inkubácia prebiehala pri teplote 37 °C po dobu 48 hodín

## 5.2. Gramovo farbenie

- Podložné sklíčko bolo vybrané pomocou pipety z ethanolu, podržané nad plameňom kahana a umiestnené na podložku
- Na sklíčko bola nanosená kvapka sterilnej vody, do ktorej bolo prenesené malé množstvo bakteriálnej kultúry
- Suspenzia bola rozotrená po podložnom sklíčku a takto pripravený preparát bol nechán voľne schnúť
- Po zaschnutí bolo sklíčko fixované nad plameňom
- Na preparát bola aplikovaná kryštálová violet po dobu 30 s a následne bola opláchnutá vodou (Obrázok 5.1)
- Postup bol opakovaný s Lugolovým roztokom
- Odfarbenie preparátu bolo uskutočňované pomocou ethanolu do úplného vymytia farbiva (približne 20-30 s)
- Nasledovalo opláchnutie vodou a dofarbenie karbolfuchsinom po dobu 1 minúty
- Posledným krokom bolo premytie vodou a usušenie voľne na vzduchu
- Preparát bol pozorovaný imerzným objektívom



Obrázok 5.1 Postup Gramovho farbenia so farebnými zmenami [32]

## 5.3. Kultivácia na masopeptonovom bujóne

- Bolo pripravené tekuté živné médium podľa doporučenia výrobcu
- Po úplnom vychladení média došlo k odberu kultúry z Petriho misky pomocou sterilnej kľučky
- Odobraná kultúra bola ponorená do bujónu a mierne vytrasená
- V prípade *Escherichia coli* došlo k očkovaní pomocou očkovacej ihly

- Ihlou bol kopírovaný vpich a následne došlo k ponoreniu a vytraseniu kultúry do média
- Takto zaočkované skúmavky boli vložené do termostatu
- Kultivácia prebiehala pri 37 °C po dobu 48 hodín

#### **5.4. Aplikácia nanočastíc na vybrané bakteriálne kultúry**

- Na agarové platne bolo napipetované 0,1 ml bakteriálnej kultúry
- Sterilnou hokejkou bol daný objem rozotretý po povrchu agarovej platne
- Následne bol pridaný určitý objem nanočastíc pomocou automatických mikropipet
- Množstvo aplikovaných častíc bolo rôzne
- Petriho misky boli voľne ponechané pokiaľ nedošlo ku vstrebaniu častíc
- Nasledovala kultivácia mikroorganizmov v termostate pri teplote 37 °C po dobu 72 hodín

#### **5.5. Meranie optickej hustoty**

- Bolo pripravených 18 sterilných eppendorfiiek
- Do 7 z nich bolo napipetovaných 1,5 ml čistej kultúry
- Do ďalších 7 bolo napipetovaných 1,5 ml kultúry a následne sa pridalo 100 µl superparamagnetických častíc
- Kultúra bola preliata do kyvety a umiestnená do spektrofotometra, čím bola zistená OD
- V prípade kultúry a častíc došlo pred meraním ku odseparovaniu nanočastíc pomocou magnetického separátoru a zvyšok roztoku bol odpipetovaný do kyvety
- Meranie prebiehalo pri vlnovej dĺžke 600 nm a ako blank bolo použité MPA médium
- Ostatné eppendorfky boli umiestnené do termostatu pri teplote 37 °C
- Optická hustota bola meraná po 24 hodinách po dobu 3 dní

#### **5.6. Kultivácia a aplikácia zriedených častíc**

- Boli pripravené dve sterilné Erlenmeyerové banky
- Do prvej Erlenmeyerovej banky bolo napipetovaných 10 ml tekutého živného média a 1 ml kultúry *E coli*
- Do druhej banky sa napipetovalo 9 ml média, 1 ml kultúry a nakoniec 1 ml nanočastíc
- Obe banky boli umiestnené na trepačku po dobu 24 hodín pri teplote 37 °C, kde došlo ku kultivácii
- Nasledovala aplikácia na agarové platne
- Aplikovalo 100 µl kultúry z prvej banky a 100 µl zmesi z druhej banky
- U oboch prípadoch došlo k zaočkovaniu pomocou rozteru
- Na agarové platne sa tiež napipetovalo 100 µl a po roztere sa pridalo 10 µl zriedených nanočastíc
- Petriho misky boli umiestnené do termostatu
- Kultivácia prebiehala pri teplote 37 °C po dobu 48 hodín

## 5.7. Denzitometria

- Do sterilnej sklenenej skúmavky bolo napipetované potrebné množstvo kultúry alebo zmesi kultúry a nanočastíc
- Skúmavka bola umiestnená do denzitometra
- V prípade vysokej hodnoty došlo ku zriedeniu pomocou destilovanej vody

## 5.8. Kultivácia na LB médiu a riedenie

- Čistá kultúra v LB médiu bola vyriedená v pomere 9:1
- Dostali sme tak riedenia od  $10^0$  –  $10^{-5}$
- V týchto skúmavkách bola zmeraná hustota pomocou denzitometru
- Na LB agarové misky bolo napipetovaných 100  $\mu$ l kultúry od každého riedenia
- Následne došlo k rozteru
- Na ďalšie 2 misky bolo nanesených 10  $\mu$ l častíc, ktoré boli opätovne premyté sterilnou vodou
- Tieto častice boli kvapnuté iba do jednej polovice agarovej misky
- Vždy sa uskutočňovali dve paralelne merania
- Na jednu miskú bolo aplikovaných 100  $\mu$ l premytých nanočastíc a aj v tomto prípade došlo k rozteru
- Misky boli umiestnené do termostatu pri teplote 37 °C po dobu 48 hodín

## 5.9. Kultivácia s odoberaním alikvótov

- 1 ml *E coli* bol zaočkovaný do 10 ml LB média a médium bolo ponechané cez noc na trepačke pri teplote 37 °C
- Nasledujúci deň bola kultúra zriedená v 2 ml LB média na  $1 \cdot 10^7$  CFU/ml
- Častice o pôvodnej koncentrácii 4 mg/ml boli zriedené na koncentrácie 12,5; 25 a 50  $\mu$ g/ml
- Na malé Petriho misky bola rozpipetovaná zriedená kultúra, do ktorej sa aplikovalo 40  $\mu$ l zriedených nanočastíc v požadovaných koncentráciách
- Tieto misky boli opäť umiestnené na trepačku pri teplote 37 °C
- Z misiek došlo k odobratiu alikvótov v čase 0; 30; 60 a 90 minút
- Odoberalo sa vždy 1,5 ml kultúry a nasledovalo jej zriedenie na  $10^{-4}$
- Na LA platne sa aplikovalo 100  $\mu$ l zriedenej aj nezriedenej kultúry a pomocou rozteru došlo k zaočkovaniu
- Vždy boli realizované dve paralelne merania, vďaka čomu došlo k zamedzeniu chyby
- Petriho misky boli umiestnené do termostatu pri teplote 37 °C po dobu 24 hodín

## 5.10. Koinkubácia nanočastíc v LB médiu

- 1 ml *E coli* bol zaočkovaný do 10 ml LB média
- V prípade práce so *Staphylococcus epidermis* došlo pomocou vpichu k preočkovaniu do skúmavky obsahujúcej LB médium
- Skúmavka bola umiestnená do termostatu kde došlo ku kultivácii pri teplote 37 °C po dobu 24 hodín



- Všetky spomínané kultúry boli zriedené v 2 ml LB média na  $1 \cdot 10^5$  CFU/ml
- Ku kultúre sa pridalo 40  $\mu$ l nanočastíc zriedených na koncentráciu 500  $\mu$ g/ml
- Kultúry v Petriho miskách boli umiestnené opäť na trepačku pri teplote 37 °C po dobu 24 hodín
- Po 24 hodinách sa odpipetovalo 1,5 ml kultúry a došlo ku zriedeniu na  $10^{-4}$
- Na LA platne sa aplikovalo 100  $\mu$ l zriedenej kultúry na  $10^{-4}$ ; nezriedenej kultúry a kultúry zriedenej  $1 \cdot 10^5$  CFU/ml bez obsahu častíc
- Pomocou rozteru došlo k zaočkovaní a LA platne boli umiestnené do termostatu pri teplote 37 °C po dobu 24 hodín

### 5.11. Sledovanie biokompatibility častíc pomocou PCR v reálnom čase

- PCR bola uskutočnená pomocou komerčného qPCR 2x SYTO-9 Master Mixu, ktorý je určený pre náročnejšiu analýzu vzoriek pomocou metódy qPCR pomocou interkalačného farbiva SYTO-9.
- Boli použité primery špecifické pre doménu *Baktéria*, ich charakterizácia je uvedená v tabuľke 5.1. Informácie o primeroch pochádzajú z odborných článkov [33].

Tabuľka 5.1 Použité primery pre qPCR [33]

	Primer	Sekvencia primerov (5'-3')	Veľkosť špecifického produktu
Doména <i>Baktéria</i>	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

- PCR bola optimalizovaná tak, aby bola citlivá, špecifická, rýchla a úsporná
- Použitá teplota hybridizácie bola 55 °C a počet cyklov bol 30, čo viedlo k zníženiu amplifikácie nešpecifických produktov PCR.
- Master mix bol pripravený pomocou PCR komponentov (Tabuľka 5.2) bez obsahu DNA a jeho obsah bol rozpipetovaný do 6 eppendorfiiek po 159,5  $\mu$ l

Tabuľka 5.2 Zloženie master mixu

Krok	Zložka	Objem [ $\mu$ l]
1	SYTO-9 Master Mix	850
2	F_eub	68
3	R_eub	68

- Do týchto eppendorfiiek sa pridalo 11  $\mu$ l DNA odpovedajúcich koncentrácií v rozsahu od 100 ng/ $\mu$ l do 1 pg/ $\mu$ l
- Do stripu sa napipetoval potrebný objem vody a nosiča uvedený v tabuľke 5.3. Objem nosiča odpovedal množstvu nanočastíc

Tabuľka 5.3 Objemy pridávané do stripu pre qPCR

Strip	Objem	
	Voda [ $\mu$ l]	Nosič [ $\mu$ l]
1 - 12	9,5	0,0
13 - 24	9,0	0,5
25 - 36	8,5	1,0
37 - 48	7,0	2,5
49 - 60	4,5	5,0

- Posledným krokom bolo pridanie DNA spolu s master mixom do stripu o objeme 15,5  $\mu$ l
- Boli pripravené dve negatívne kontroly, ktoré slúžili na indikáciu prípadnej kontaminácie
- V Rotor-Gene 6000 bol nastavený vhodný program uvedený v tabuľke 5.4.

Tabuľka 5.4 Nastavenie vhodného programu pre meranie

Cyklus	Doména <i>Baktéria</i>
Predĺžená denaturácia DNA	95 °C/5'
Denaturácia DNA	95 °C/15"
Elongácia primerov	55 °C/30"
Syntéza nových reťazcov	72 °C/15"
Predĺžená syntéza	72 °C/5'
Počet celkových cyklov	35

# VÝSLEDKY A DISKUSIA

## 6. PRÍPRAVA TESTOVANÝCH BAKTERIÁLNYCH KULTÚR

Boli vybraté vhodné bakteriálne kultúry pre danú prácu. Jednalo sa o baktérie nepatogénneho typu. Ako modelový organizmus bola zvolená *Escherichia coli* CCM 3954, keďže sa jedná o pomerne bežne vyskytujúcu sa baktériu. Na testovanie samotných kultúr bolo použitých viacero kultivačných médií.

### 6.1. Kultivácie bakteriálnych kultúr

Baktérie boli v prvom kroku zaočkované na Petriho misky s agarom pomocou krížového rozteru. Vďaka tomuto kroku mohlo dôjsť ku kultivácii v tekutom živnom médiu (MPB). Do tekutého média boli zaočkované všetky vyššie MO z bodu 4.4. Postupovalo sa podľa kapitoly 5.3. Na obrázku 6.1 sú zobrazené narastené kultúry v tekutom MPB médiu bez obsahu nanočastíc, čo je viditeľné vďaka vzniknutým sedimentom na dne skúmaviek. S takto zaočkovanými kultúrami sa pracovalo v ďalších experimentoch, či už sa jednalo o meranie optickej hustoty (OD) alebo meranie hustoty podľa McFarlanda. V prípade McFarlanda musela byť v niektorých prípadoch kultúra zriedená aby bolo vôbec možné túto hustotu určiť.

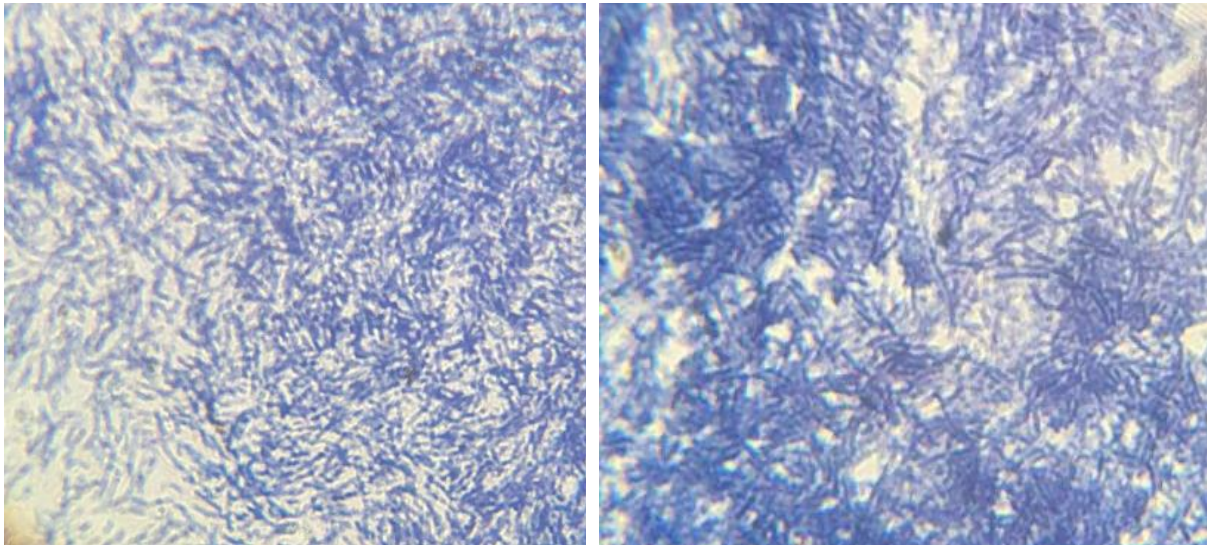


Obrázok 6.1 Bakteriálne kultúry po kultivácii v tekutom živnom médiu. Bakteriálne kultúry z ľava doprava *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* CCM 1999, *Kocuria rosea* CCM 570, *Serratia marcescens* CCM 303, *Micrococcus luteus* CCM 210 a *Escherichia coli* CCM 3954

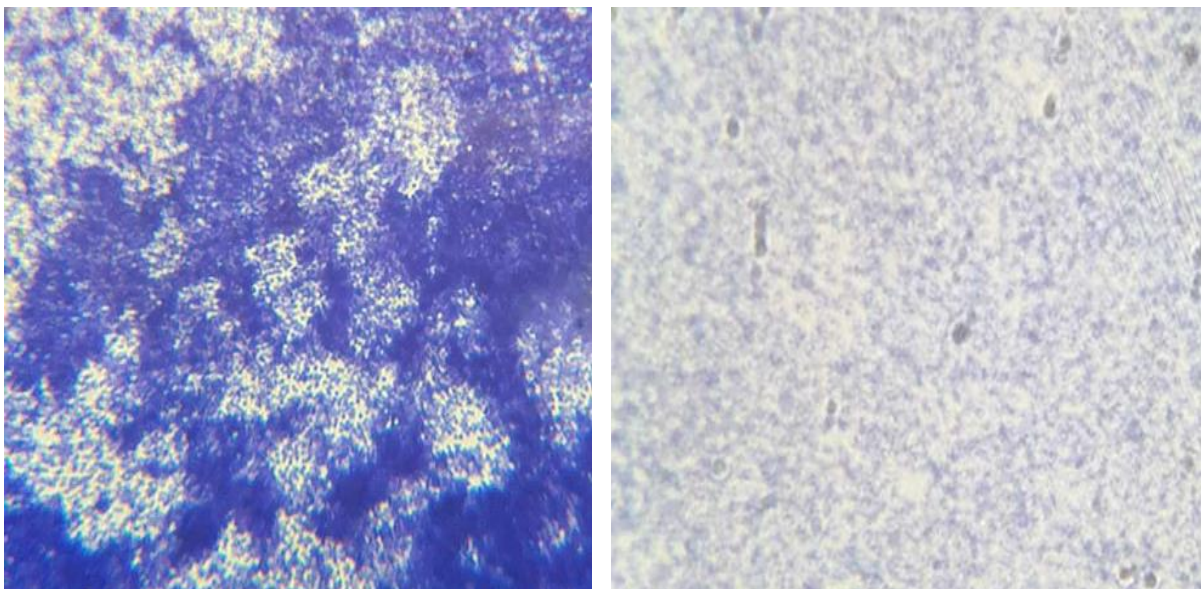
### 6.2. Mikroskopické vyšetrenie

Mikroskopicky bola overená čistota ďalej používaných testovaných modelových bakteriálnych kultúr, a to vrátane prevedenia Gramovho farbenia. Na vykonanie Gramovho farbenia predchádzal krížový rozter a kultivácia vybraných bakteriálnych kultúr na MPA po dobu 48 hodín bez obsahu nanočastíc. Očkovali sa tak na agarové platne čisté kultúry, čím bolo možné overiť ich kvalitu. Postup podľa ktorého sa konalo toto farbenie je zahrnuté v kapitole 5.2. Vďaka tejto metóde bolo možné určiť či sa jedná o grampozitívne alebo gramnegatívne baktérie, keďže v prípade gramnegatívnych baktérií došlo k odfarbeniu preparátu. Tiež bolo

možné rozlíšiť tvar. Uvedené vlastnosti bakteriálnych kultúr sú uvedené v tabuľke 6.1. Tieto vlastnosti bolo možné určiť vďaka pozorovaniu pod mikroskopom, čomu odpovedá obrázok 6.2, 6.3 a 6.4.

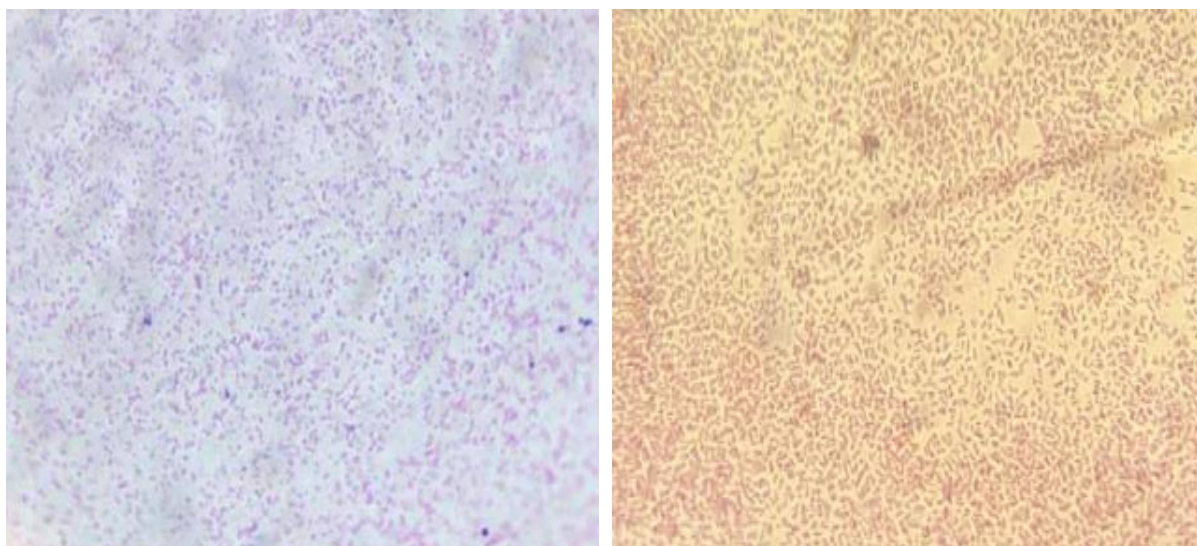


Obrázok 6.2 Gramovo farbenie pre *Bacillus subtilis* CCM 1999 (naľavo), *Bacillus cereus* CCM 2010 (napravo)



Obrázok 6.3 Gramovo farbenie pre *Micrococcus luteus* CCM 210 (naľavo), *Kocuria rosea* CCM 570 (napravo)





Obrázok 6.4 Gramovo farbenie pre *Serratia marcescens* CCM 303 (naľavo), *Escherichia coli* CCM 3954 (napravo)

Tabuľka 6.1 Pozorované vlastnosti baktérií

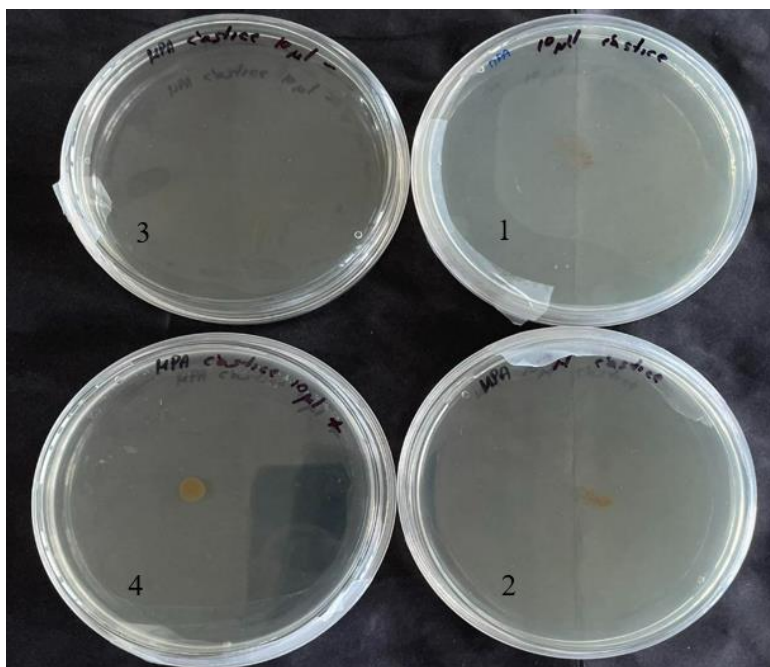
Mikroorganizmus	Rozdelenie baktérii	Tvar buniek
<i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	G+	Tyčinky
<i>Bacillus subtilis</i> CCM 1999	G+	Tyčinky
<i>Kocuria rosea</i> CCM 570	G+	Koky
<i>Micrococcus luteus</i> CCM 210	G+	Koky
<i>Serratia marcescens</i> CCM 303	G-	Tyčinky
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	G-	Tyčinky

## 7. OVERENIE MIKROBIOLOGICKEJ ČISTOTY TESTOVANÝCH NANOČASTÍC

Za účelom vylúčenia falošne pozitívnych výsledkov v dôsledku prípadnej mikrobiálnej kontaminácie samotných nanočastíc, bola kultiváciou na odpovedajúcich médiach táto skutočnosť overená. Súčasne boli častice opakovane premyté sterilnou vodou. Jednak z dôvodu už zmienenej minimalizácie nožnej mikrobiálnej kontaminácie nanočastíc a tiež z dôvodu odstránenia tmavého zafarbenia, ktoré by mohlo mať negatívny vplyv pri spektrofotometrickom meraní.

### 7.1. Vylúčenie prípadnej kontaminácie nanočastíc

Samotné nanočastice s obsahom Ag sa v objeme 10 µl aplikovali na čisté MPA bez obsahu bakteriálnych kultúr za účelom overenia prípadnej mikrobiálnej kontaminácie.

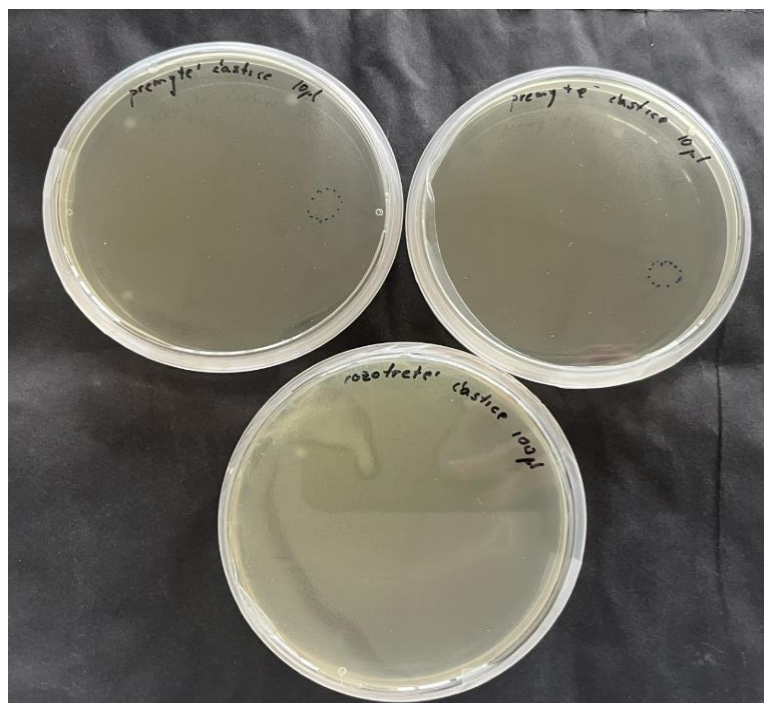


Obrázok 7.1 Aplikácia nanočastíc na čisté MPA

V prvom prípade došlo na agarovej platni k nárastu kolónie v okolí aplikovaných nanočastíc, vďaka čomu sa predpokladala kontaminácia roztoku. Pre kontrolu sa postup zopakoval a výsledkom bola Petriho miska č.2, ktorá naopak nejavila žiadne znaky kontaminácie. Uskutočnil sa tak postup, pri ktorom sa nanočastice aplikovali z 2 rozdielnych eppendorfiiek v rovnakých množstvách na Petriho misky č.3 a č.4. Touto metódou bolo možné vylúčiť kontamináciu jednej prípadne oboch použitých eppendorfiiek. Na obrázku 7.1 je zobrazený výsledok priebehu po kultivácii a opäť neboli zaznamenané žiadne zmeny na agarových platniach, čo je možné vidieť na miskách č.3 a č.4. Preto sa v prípade č.1 predpokladalo, že neboli pri práci dodržané dostatočne sterilné podmienky.

## 7.2. Vylúčenie prípadnej kontaminácie zriedených nanočastíc

Pri aplikácii 10 µl nanočastíc na čistú kultúru došlo k väčšiemu nárastu a sýtejšiemu sfarbeniu. Tento jav je spomenutý v kapitole 8.2.2. Predpokladalo sa, že daný jav môže byť spôsobený kontamináciou zriedených nanočastíc. Z tohto dôvodu sa na LA médium aplikovali tiež opakovane premyté častice, čím bola opätovne skontrolovaná čistota častíc a zamedzilo sa prípadnej práci s kontaminovanými nanočasticami. Na jednu misku sa aplikovalo väčšie množstvo častíc, t.j. 100 µl a očkovovalo sa pomocou krížového rozteru.

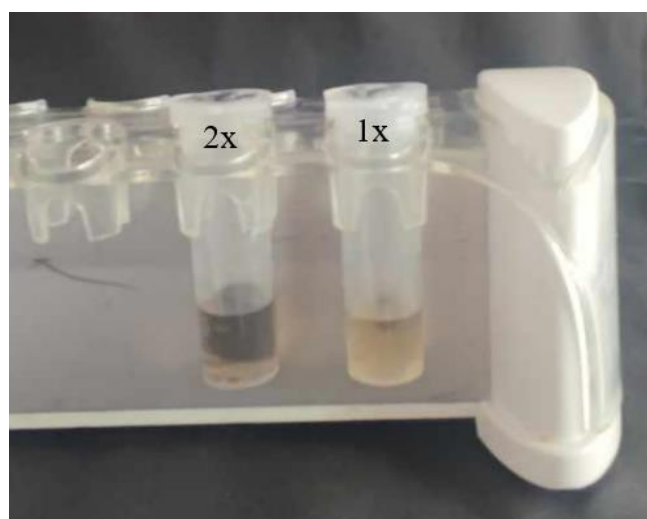


Obrázok 7.2 Aplikované častice na LB médiu

Z obrázku 7.2 vyplýva, že častice nejavia žiadny znak kontaminácie a preto jav spomínaný v kapitole 8.2.2 je vyvrátený znečistením častíc.

### 7.3. Úprava pôvodných častíc

Došlo k úprave častíc ich premytím sterilnou vodou, kedy bol prepipetovaný objem 750  $\mu$ l superparamagnetických nanočastíc s obsahom Ag do sterilnej eppendorfky. Pomocou magnetického separátoru došlo k oddeleniu častíc od roztoku a následne sa roztok odpipetoval do inej čistej eppendorfky. Častice boli dvakrát premyté rovnakým objemom sterilnej vody. Množstvo tejto vody odpovedalo odobratému objemu roztoku. Posledným krokom bolo 10-násobné zriedenie. Týmto spôsobom bolo dosiahnuté zníženie zakalenia roztoku. Na obrázku 7.3 je zaznamenané premytie sterilnou vodou po prvý aj druhýkrát.



Obrázok 7.3 Častice premyté sterilnou vodou

## 8. TESTOVANIE ANTIMIKROBIÁLNEJ AKTIVITY NANOČASTÍC

Pre testovanie antimikrobiálnej aktivity boli použité celkom dve, respektíve štyri metódy. V prvom prípade bol testovaný vplyv prídavku nanočastíc s obsahom Ag do kultúry narastenej v tekutom živnom médiu, teda tzv. bujónovou dilučnou metódou. V ďalšej časti práce bola použitá difúzna platňová metóda, teda za pomoci pevného živného média a to v 2 úpravách. Bolo uskutočnené testovanie antimikrobiálnej aktivity v základnej verzii tejto metódy pomocou kvapnutia roztoku nanočastíc na agarovú platňu zaočkovanú zvolenou bakteriálnou kultúrou. Ďalšie dva spôsoby sa líšili v koncentráciách inokula nanášaného na Petriho misky a následne aj zložením tohto inokula, kedy boli použité zmesné kultúry. Súčasne bolo použitých viacero rôznych kultivačných médií.

### 8.1. Bujónová dilučná metóda

V tomto prípade bol pozorovaný vplyv prídavku nanočastíc na rast vybraného MO na základe merania intenzity zákalu, teda optickej hustoty (optical density, OD) metódou absorbancie.

Pomocou spektrofotometra bola nameraná optická hustota (OD), pri ktorej bol zvolený postup spomínaný v kapitole 5.5. Meranie bolo uskutočnené teda s pôvodnými nezriedenými časticami o koncentrácii 4mg/ml a tiež s 10-násobne zriedenými, ktoré boli pridané ku kultúre. Vďaka výsledkom tejto metódy by bolo možné určiť rastovú krivku a posúdiť tak, či častice s obsahom Ag majú aspoň minimálny dopad na rast baktérií. V tomto experimente sme pracovali len s *E coli* CCM 3954.

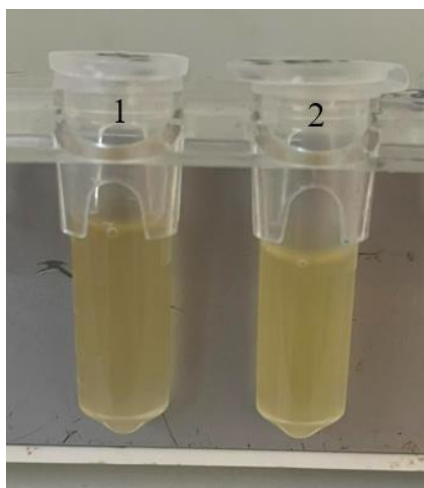
#### 8.1.1. Nezriedené častice

V prípade práce s nezriedenými časticami došlo k meraniu po dobu 3 dní a postupovalo sa podľa postupu, ktorý je spomenutý v kapitole 5.5. Namerané hodnoty pri použití kultúry sa pohybovali zväčša okolo hodnoty 1,0. Problém pri meraní tejto metódy vznikol pri zmiešaní kultúry spoločne s časticami. Pri použití 100 µl častíc spoločne s kultúrou hodnoty OD nebolo možné zmerať po dobu 24 až 72 hodín. V tomto prípade sa predpokladalo, že aj po odseparovaní častíc je kultúra pomerne tmavá a zakalená, čo spôsobilo neschopnosť prechodu lúču cez roztok. Kvôli tejto problematike bol zvolený postup zriedenia a premytia samotných častíc pred vlastnou kultiváciou s vybranými MO.

#### 8.1.2. Zriedené častice

V tomto prípade sa ku kultúre aplikovali častice pripravené podľa kapitoly 7.3. Na experiment tu bola opäť použitá kultúra *E coli*. Meranie prebiehalo po dobu 2 dní. OD zmesi kultúry a častíc opäť nebola zaznamenaná, avšak kultúra sa na prvý pohľad javila ako menej zakalená (Obrázok 8.1).





Obrázok 8.1 Porovnanie kultúry + častíc (1) a čistej kultúry (2)

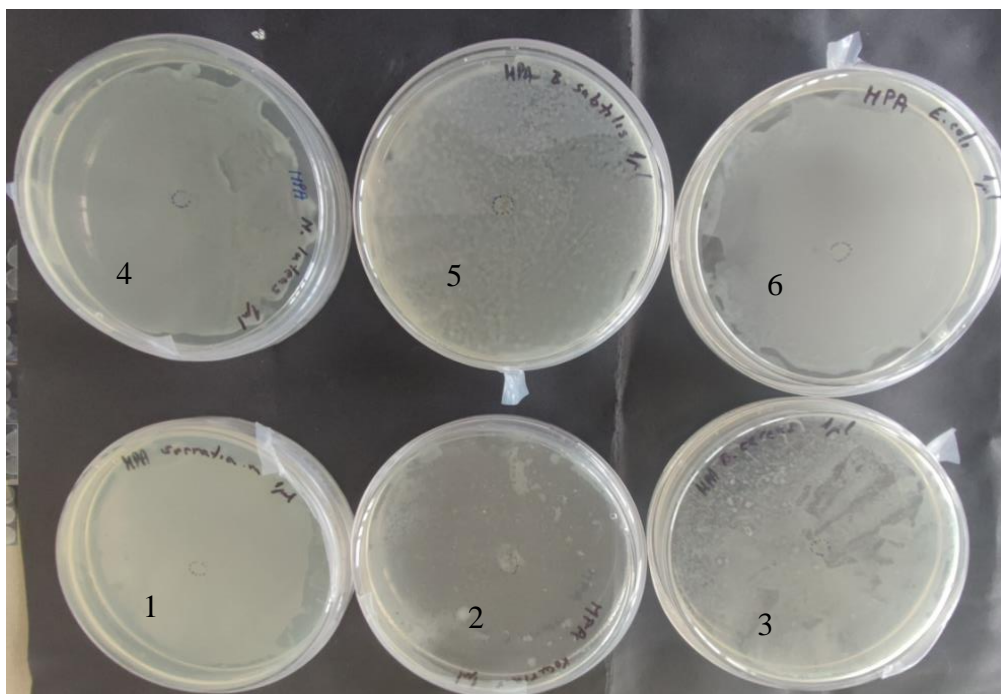
Po posúdení výsledkov a neschopnosti merania OD zriedených aj nezriedených častíc v zmesi kultúry a častíc sa táto metóda vylúčila z možnosti určenia rastovej krivky. Jednou z možných príčin môže byť pomerne vysoká koncentrácia nanočastíc, či prítomnosť striebra. OD sa už pre tento dôvod v nasledujúcich postupoch nemerala.

## 8.2. Difúzna platňová metóda

Na predom pripravené agarové platne boli aplikované kultúry a po ich dostatočnom zaschnutí sa pridali nanočastice s obsahom Ag. Použité boli všetky rozkultivované bakteriálne kultúry v MPB. Používali sa rôzne množstvá nanočastíc, ktoré sú bližšie charakterizované v kapitole 4.3. o objeme 1  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$  a 15  $\mu\text{l}$ . Po nanosení a kultivácii bolo možné určiť či dané častice vykazujú antibakteriálny efekt. Petriho misky boli označené na fotografiách od 1-6. Ku každému číslu bola priradená baktéria. Číslom 1 sú označené misky pre *Serratia marcescens* CCM 303, č.2 *Kocuria rosea* CCM 570, č.3 *Bacillus cereus* CCM 2010, č.4 *Micrococcus luteus* CCM 210, č.5 *Bacillus subtilis* CCM 1999 a č.6 *Escherichia coli* CCM 3954.

### 8.2.1. Antimikrobiálna aktivita nezriedených nanočastíc

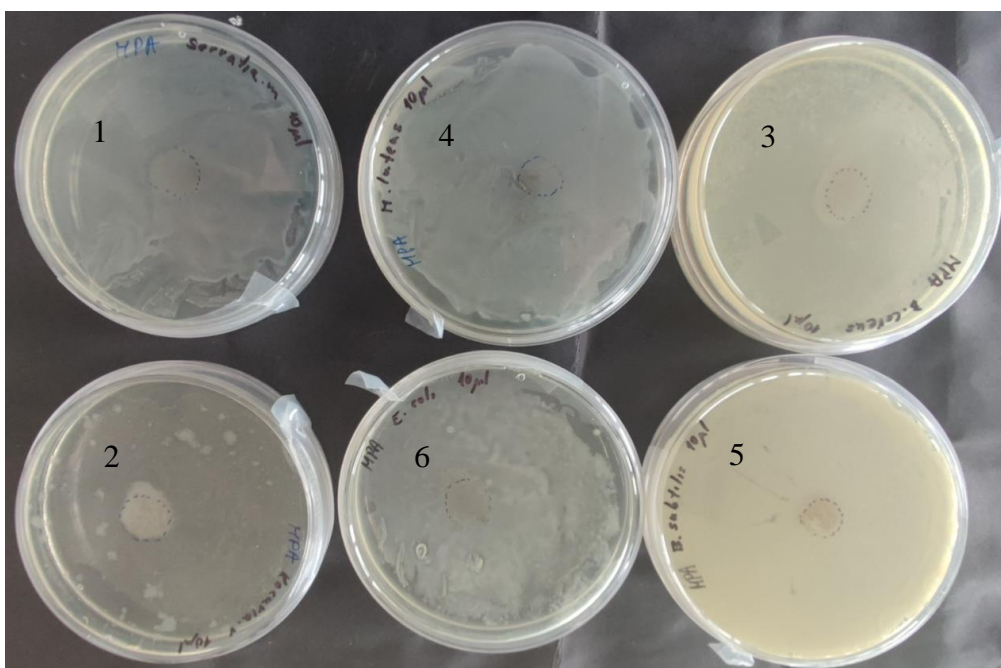
Na Petriho misky s kultivačným médiom a zaočkovanými vybranými MO bol aplikovaný 1  $\mu\text{l}$  nezriedených nanočastíc a to vždy v dvoch opakovaníach. Cieľom bolo určiť či je rast mikroorganizmov v prítomnosti testovaného objemu častíc ovplyvnený alebo nie (Obrázok 8.2).



Obrázok 8.2 Petriho misky po kultivácii MO s obsahom 1 µl nanočastíc Ag

Na základe dosiahnutých výsledkov prezentovaných na obrázku 8.2 bolo posúdené, že k inhibícii rastu nedošlo, a teda antibakteriálny efekt testovaných nanočastíc za daných podmienok nebol preukázaný.

Iba v prípade bakteriálnej kultúry kmeňa *Kocuria rosea* CCM 570 došlo pri aplikácii o objeme 10 µl pri druhom opakovaní antimikrobiálneho testu k nárastu kolónií práve v mieste aplikovaných nanočastíc (Obrázok 8.3). Preto bolo meranie zopakované pri rovnakých podmienkach.



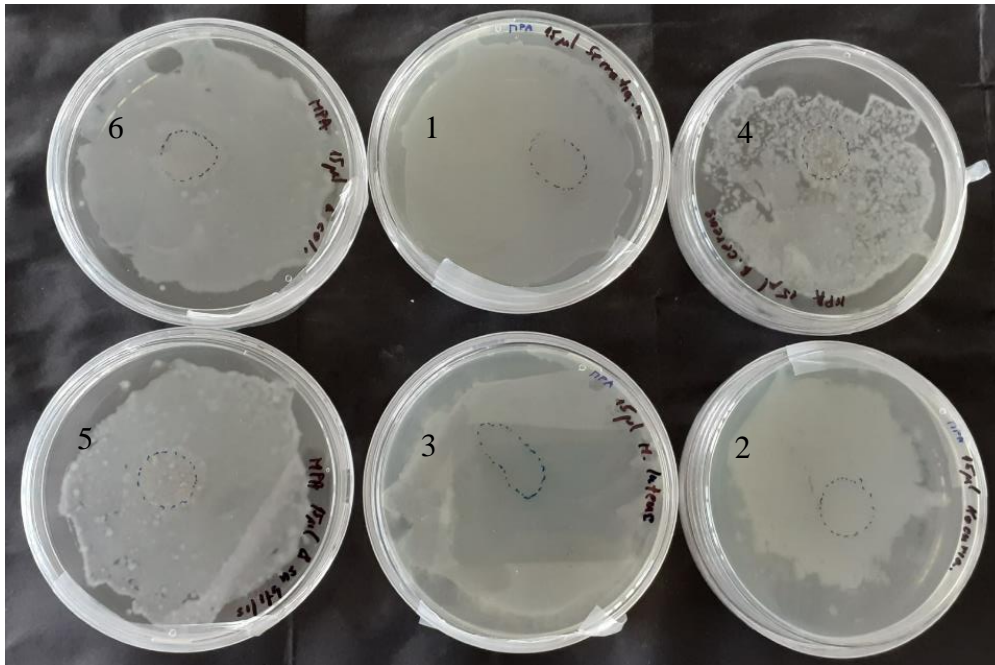
Obrázok 8.3 Petriho misky zaočkované vybranými MO po aplikácii 10 µl nanočastíc s obsahom Ag

Po niekoľkonásobnom zopakovaní aplikácie nanočastíc a postupu spomínanému v bode 5.4 bolo posúdené, že k antibakteriálnemu efektu nedochádza ani pri objeme 10  $\mu$ l (Obrázok 8.4). K javu, ktorý sa objavil pri *Kocuria rosea* pravdepodobne došlo v dôsledku nedostatočného rozotrenia kultúry na agarových platniach.



Obrázok 8.4 Opakované stanovenie – Petriho misky zaočkované vybranými MO po aplikácii 10  $\mu$ l nanočastíc s obsahom Ag

Najvyšší použitý objem nezriedených testovaných nanočastíc aplikovaných na agarové platne činil 15  $\mu$ l o koncentrácii 4 mg/ml . Vyššie objemy sa nevolili z dôvodu pokrytia veľkej plochy na Petriho miskách. Toto množstvo bolo aplikované jedenkrát na všetky vybrané bakteriálne kultúry. Postupovalo sa podľa kapitoly 5.4. Z obrázku 8.5 možno usúdiť, že nebol pozorovaný inhibičný vplyv nanášaných nanočastíc na vybrané mikrobiálne kultúry ani v tomto prípade.



Obrázok 8.5 Petriho misky po aplikácii a kultivácii 15 µl nanočastíc s obsahom

### 8.2.2. Kultivácia so zriedenými časticami

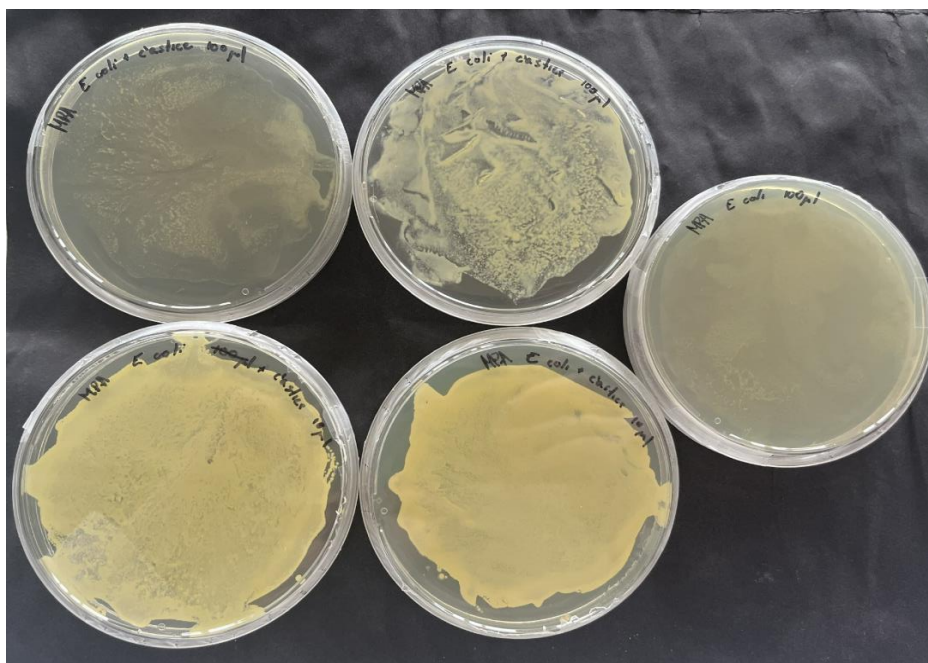
Na MPA médium sa aplikovala kultúra podľa postupu uvedeného v kapitole 5.6. Bola tiež zmeraná hustota pomocou denzitometra, čím bolo možné zistiť množstvo buniek, ktoré obsahuje médium spoločne s kultúrou a aj s obsahom nanočastíc. Pri meraní hustoty sa postupovalo podľa kapitoly 5.7. Z výsledku možno posúdiť, že počet buniek v Erlenmeyerovej nádobe obsahujúcej kultúru spoločne s časticami je nižší, z dôvodu iného pomeru média, kultúry a častíc. Výsledky sú uvedené nižšie v tabuľke 8.1.

Tabuľka 8.1 Namerané hustoty a počet buniek

	Kultúra	Kultúra + častice
Hustota McFarland	6	2,6
Počet buniek	8,40E+09	7,80E+08

Na agarových platniach obsahujúcich kultúru, ktorá sa kultivovala spoločne s časticami možno vidieť jemný povlak. Pri použití čistej kultúry a následnej aplikácii 10 µl zriedených častíc možno pozorovať väčší nárast, ktorý sa prejavil aj sýtejším sfarbením. Ako kontrola bola aplikovaná samotná čistá kultúra *E coli* CCM 3459. Z výsledkov možno posúdiť, že k inhibícii nedošlo ani v jednom prípade, a tak antibakteriálny efekt nebol dokázaný. Agarové platne po kultivácii sú zobrazené na obrázku 8.6.





Obrázok 8.6 Agarové platne zaočkované kultúrou *Escherichia coli* CCM 3459 po kultivácii. Horné misky zodpovedajú kultivácii kultúry spoločne s časticami. V prípade dolných misiek sa zriedené častice prikvapli až po aplikácii kultúry na agarovú platňu

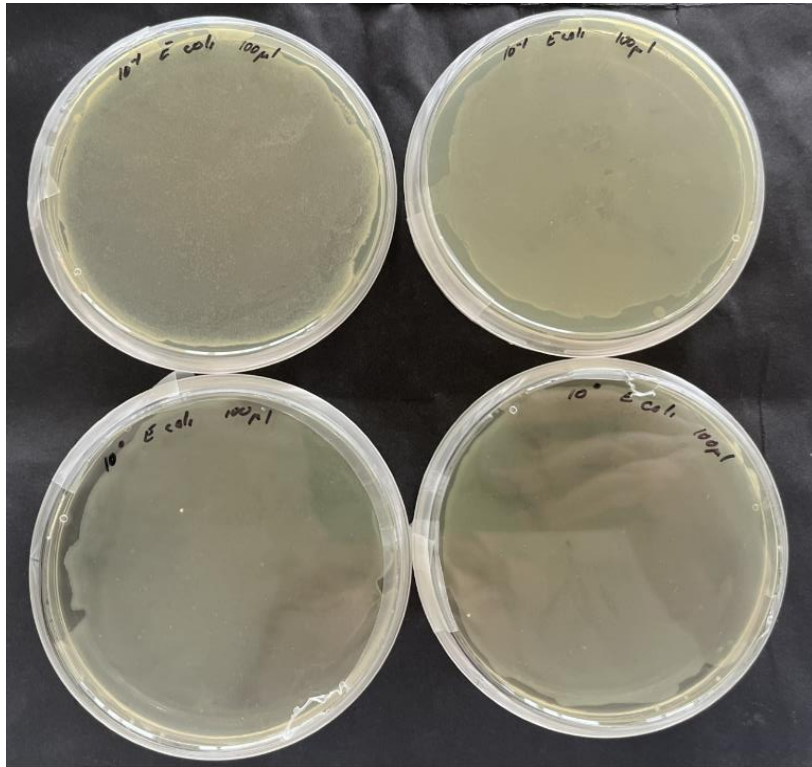
### 8.2.3. Kultivácia na LA agare

Po vzniku pomerne slabého povlaku pri použití zriedených častíc kultivovaných spoločne s kultúrou v kapitole 8.2.2, bolo zvolené LA médium. Pracovalo sa s kultúrou *E coli* CCM 3459, ktorá bola zaočkovaná v tekutom LB médiu a následne sa postupovalo podľa kapitoly 5.8. Bola tiež zmeraná hustota pomocou denzitometru, podľa postupu spomenutého v kapitole 5.7. Výsledky merania hustoty a počtu buniek kultúry *E coli* CCM 3459 sú uvedené v tabuľke 8.2.

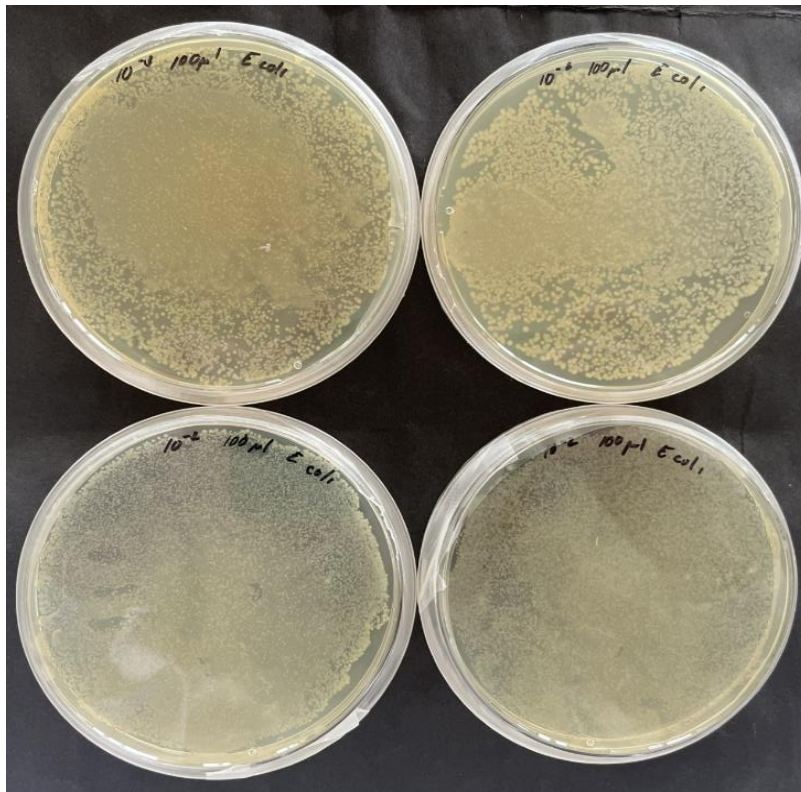
Tabuľka 8.2 Namerané hustoty a počty buniek kultúry *E coli* CCM 3459

	Riedenie					
	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Hustota McFarland	5,3	0,7	0,4	0,3	0,3	0,2
Počet buniek	1,59E+09	2,10E+08	1,20E+08	9,00E+07	9,00E+07	6,00E+07

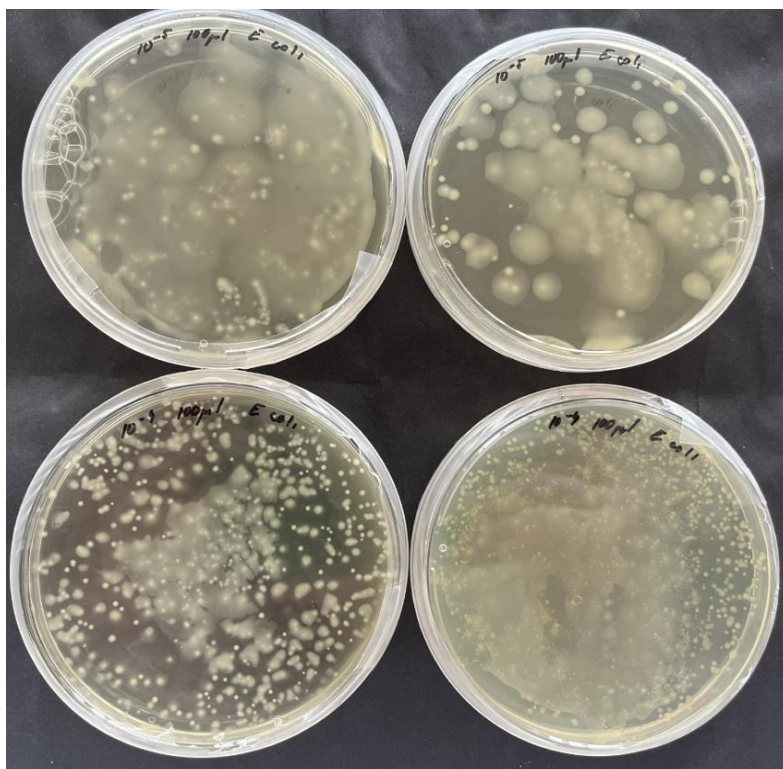
Podľa klesajúcej hustoty a teda aj klesajúceho počtu buniek bolo možné posúdiť, že došlo k správne zriedeniu, čo by sa malo prejavíť aj pri kultivácii jednotlivých riedení. Jednotlivé riedenia zaočkované na LA sú zobrazené na obrázku 8.7, 8.8 a 8.9. Z fotografie bolo usúdené, že kultúra je vhodne zriedená a teda na LA médiu je zreteľne vidieť klesajúce množstvo buniek v jednotlivých riedeniach. Vďaka tomuto faktoru sa LA médium javí ako vhodné na ďalšie očkovania a je na ňom možné pozorovať väčšie zmeny.



Obrázok 8.7 Petriho misky zaočkované kultúrou *E. coli* CCM 3459 riedenia 10<sup>0</sup> (spodné misky) a 10<sup>-1</sup> (vrchné misky) na LA médiu



Obrázok 8.8 Petriho misky zaočkované kultúrou *E. coli* CCM 3459 riedenia 10<sup>-2</sup> (spodné misky) a 10<sup>-3</sup> (vrchné misky) na LA médiu



Obrázok 8.9 Petriho misky zaočkované kultúrou *E coli* CCM 3459 riedenia  $10^{-4}$  (spodné misky) a  $10^{-5}$  (vrchné misky) na LA médiu

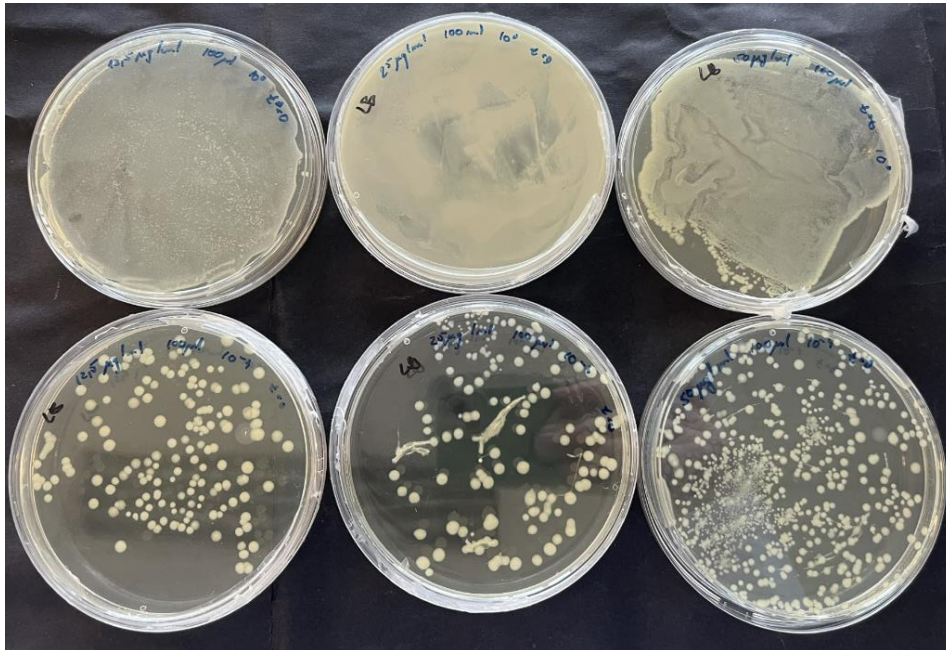
### 8.3. Stanovenie baktericídneho účinku pomocou odoberania alikvótov

Za účelom overenia antimikrobiálneho účinku nanočastíc bol okrem vyššie uvedených technik použitá aj metóda prevzatá z práce Anastasiia B. Shatan [9]. V tejto metóde bol zvolený postup spomenutý v kapitole 5.9. Oproti pôvodnému textu boli uskutočnené drobné úpravy. Jednou z spomínaných úprav je, že v našom prípade došlo k vynechaniu resuspendácie kultúry v PBS. V pôvodnom článku [9] tiež pracujú s baktériami *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*, avšak z dôvodu patogenity druhu *Staphylococcus aureus* u nás nebolo možné uskutočniť tento experiment s týmto MO.

Vďaka postupnému odoberaniu alikvótov z Petriho misiek v závislosti na čase bolo možné stanoviť baktericídny účinok, ktorý by sa prejavil znížením počtu kolónií na tuhých LA platniach. Zvyšujúcou sa koncentráciou nanočastíc s obsahom Ag v kultúrach by teda množstvo buniek malo klesať. Petriho misky boli zoradené podľa stúpajúcich koncentrácií.

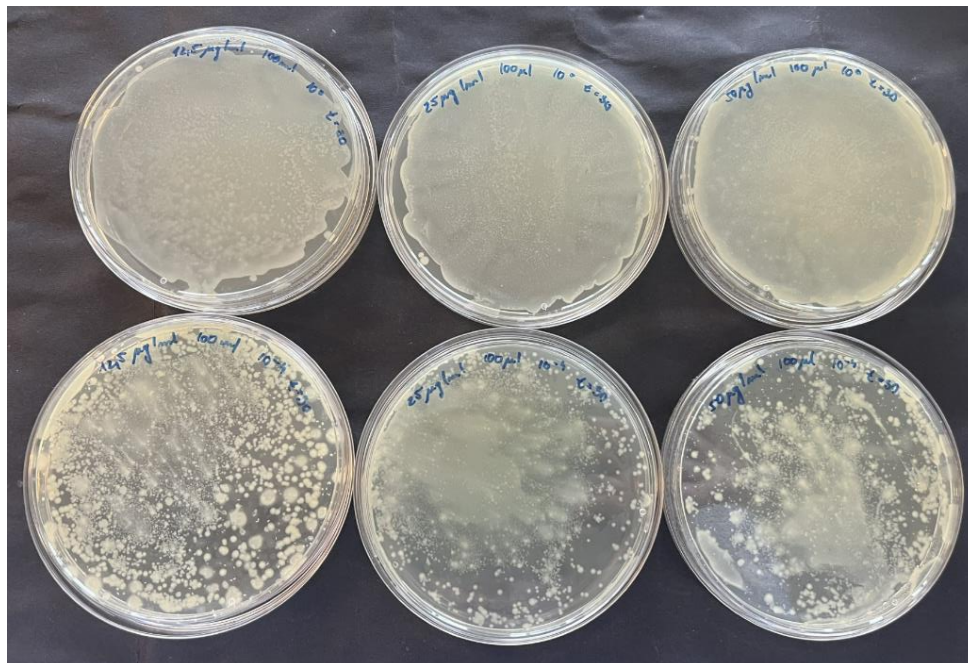
V prvom prípade kedy došlo k odberu hneď po aplikácii nanočastíc do Petriho misiek a ich premiešaní možno vidieť, že pri použití koncentrácie 50  $\mu\text{g/ml}$  je nárast kolónie väčší. Pri prvých dvoch koncentráciách (12,5  $\mu\text{g/ml}$  a 25  $\mu\text{g/ml}$ ) možno pozorovať rast pomerne malého počtu kolónií. Tento jav je spôsobený zriedením kultúry a tiež nedošlo ku kultivácii na trepačke ako v nasledujúcich prípadoch. Z obrázku 8.10 bolo usúdené, že nedošlo k žiadnej inhibícii rastu.





Obrázok 8.10 Petriho misky zaočkované kultúrou *E coli* CCM 3459 po kultivácii suspenzie v čase  $t=0$ . Horné misky odpovedajú riedeniu  $10^0$  so stúpajúcou koncentráciou nanočastíc od 12,5 do 50  $\mu\text{g/ml}$  z ľava do prava a spodné misky odpovedajú riedeniu  $10^{-4}$  so stúpajúcou koncentráciou nanočastíc od 12,5 do 50  $\mu\text{g/ml}$  z ľava do prava

V druhom prípade, kedy sa alikvót odobral po 30 minútach inkubácie na trepačke pri teplote  $37\text{ }^\circ\text{C}$  bol sledovaný už pomerne veľký nárast kolónií na LA platniach pri zriedení  $10^{-4}$ . Pri koncentrácii 12,5  $\mu\text{g/ml}$  nanočastíc nebol pozorovaný žiaden baktericídny účinok. Avšak pri aplikácii nanočastíc s vyššími koncentraciami došlo k značne menšiemu nárastu v porovnaní s koncentráciou 12,5  $\mu\text{g/ml}$ . Tieto výsledky sú znázornené na obrázku 8.11.

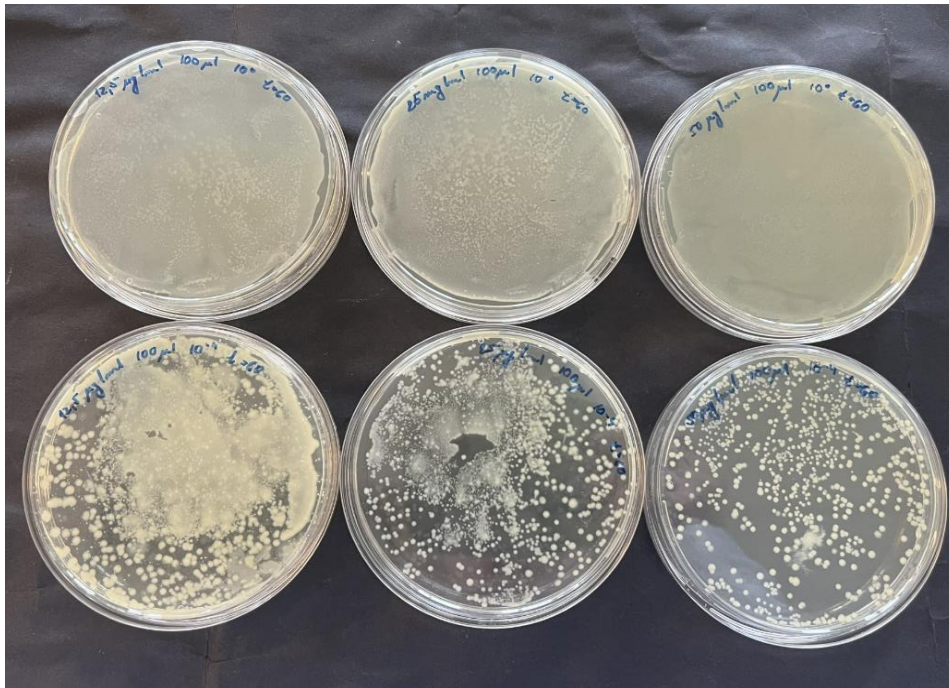


Obrázok 8.11 Petriho misky po kultivácii suspenzie buniek *E coli* CCM 3459 v čase  $t=30$ . Horné misky odpovedajú riedeniu  $10^0$  so stúpajúcou koncentráciou nanočastíc od 12,5 do 50  $\mu\text{g/ml}$  z ľava do prava

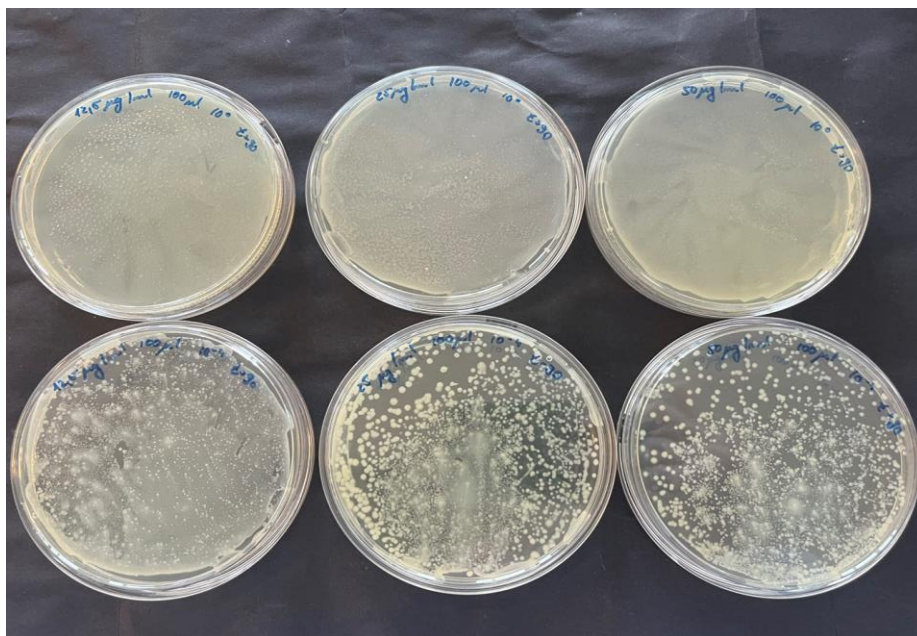


a spodné misky odpovedajú riedeniu  $10^{-4}$  so stúpajúcou koncentráciou nanočastíc od 12,5 do 50  $\mu\text{g/ml}$  z ľava do prava

Pri odbere kultúry po 60 a 90 minútach bolo možné pozorovať stále veľký nárast kolónií pri koncentrácii 12,5  $\mu\text{g/ml}$  nanočastíc, čo je spôsobené rýchlou kultiváciou kultúry pri teplote 37 °C. Pri aplikácii nanočastíc s vyššími koncentráciami bolo zaznamenané znižovanie počtu kolónií pri odbere alikvótu v 60 minúte a aj pri odbere kultúry v 90 minúte (Obrázok 8.12 a 8.13). Preto bolo posúdené, že práve v koncentráciách 25  $\mu\text{g/ml}$  a 50  $\mu\text{g/ml}$  by sa mohlo jednať o dôkaz baktericídneho účinku, no len v prípade ak je kultúra zriedená na  $10^{-4}$ . Ak sa jednalo o pôvodnú nezriedenú kultúru tak tá ani v jednom z našich prípadoch nejavila žiaden náznak inhibície rastu.



Obrázok 8.12 Petriho misky po kultivácii suspenzie buniek *E. coli* CCM 3459 v čase  $t=60$ . Horné misky odpovedajú riedeniu  $10^0$  so stúpajúcou koncentráciou nanočastíc od 12,5 do 50  $\mu\text{g/ml}$  z ľava do prava a spodné misky odpovedajú riedeniu  $10^{-4}$  so stúpajúcou koncentráciou nanočastíc od 12,5 do 50  $\mu\text{g/ml}$  z ľava do prava

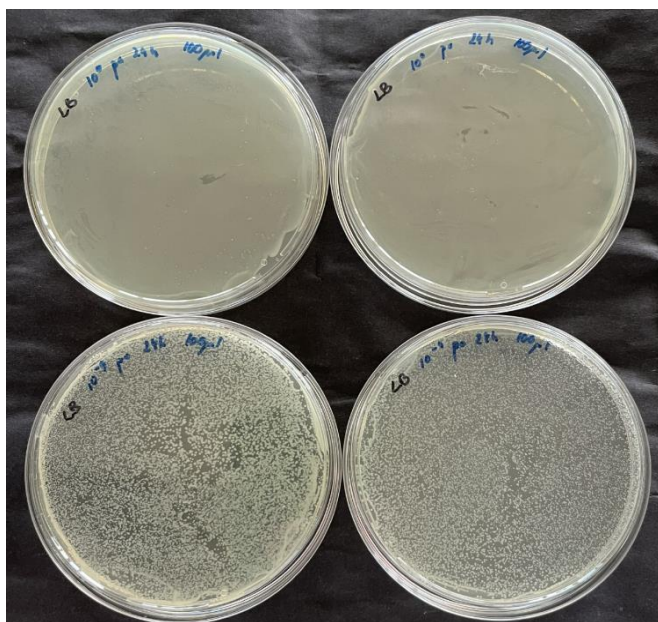


Obrázok 8.13 Petriho misky po kultivácii suspenzie buniek *E coli* CCM 3459 v čase  $t=90$ . Horné misky odpovedajú riedeniu  $10^0$  so stúpajúcou koncentráciou nanočastíc od 12,5 do 50  $\mu\text{g/ml}$  z ľava do prava a spodné misky odpovedajú riedeniu  $10^{-4}$  so stúpajúcou koncentráciou nanočastíc od 12,5 do 50  $\mu\text{g/ml}$  z ľava do prava

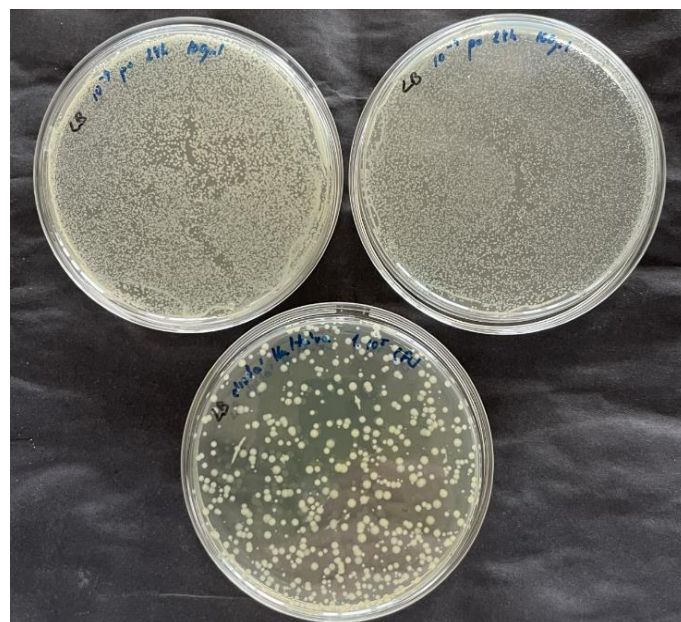
Podobne ako v publikovanom článku Ing. Anastasiia B. Shatan [9] aj my sme pomocou Petriho misiek zaočkovaných kultúrou *E coli* CCM 3459 dokázali zaznamenať postupné zmeny rastu pri rôznych koncentráciách nanočastíc s obsahom Ag v závislosti odberu alikvótov. Vďaka tomu bolo možné pozorovať lepšiu zmenu rastu kolónií kmeňa *E coli* CCM 3459 a teda ich životaschopnosť. Za najvhodnejší príklad bola zvolená najvyššia koncentrácia nanočastíc, ktorá činila 50  $\mu\text{g/ml}$ . Z obrázku 8.14 je viditeľné, že v prítomnosti nanočastíc o koncentrácii 50  $\mu\text{g/ml}$  nedošlo k žiadnemu výraznejšiemu poklesu počtu bakteriálnych buniek v závislosti na čase. Podobný jav bol pozorovaný aj pri použití nižších koncentrácií nanočastíc. Z predošlých fotografií uvedených vyššie je však zrejmé, že pri použití 50  $\mu\text{g/ml}$  nanočastíc sa rast baktérií v 60 a 90 minúte znížil. Práve preto bolo posúdené, že inhibíciu rastu baktérií ovplyvňuje riedenie a teda množstvo buniek, ktoré kultúra obsahuje ako aj koncentrácia nanočastíc s obsahom striebra. Pre ďalšie testovanie bola teda zvolená vyššia koncentrácia nanočastíc a iné riedenie kultúry, ktoré je bližšie spomínané v kapitole 8.4.





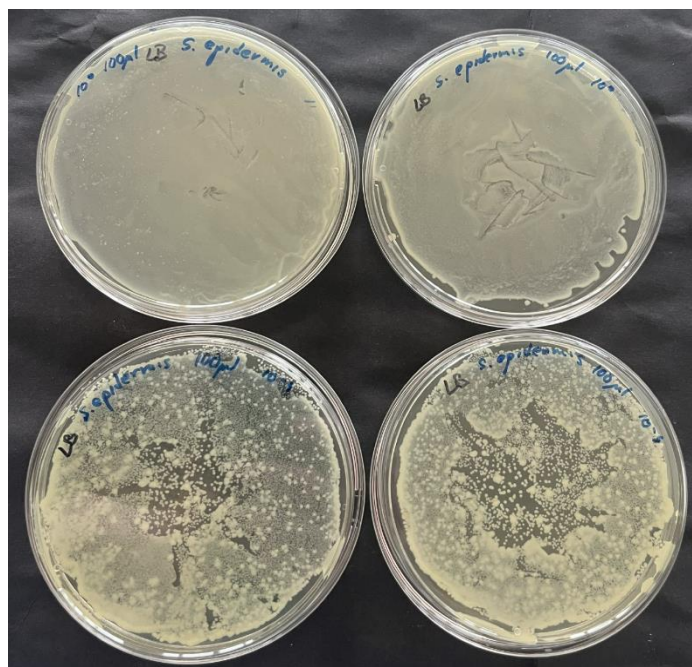


Obrázok 8.15 Petriho misky zaočkované kultúrou *E coli* CCM 3459 riedenia  $10^0$  (horné misky) a  $10^{-4}$  (spodné misky) na LA



Obrázok 8.16 Porovnanie pôvodnej zriedenej kultúry *E coli* CCM 3459, CFU  $1.10^5$  (spodná miska) a kultúry *E coli* CCM 3459 o riedení  $10^{-4}$  (horné misky)

V prípade aplikácii *Staphylococcus epidermis* CCM 2124 bol zaznamenaný rovnaký výsledok ako u *E coli* CCM 3459 (Obrázok 8.17). Po 24 hodinách kultivácie spoločne s časticami o koncentrácii  $500 \mu\text{g/ml}$  nedošlo k narušeniu životaschopnosti buniek, a teda baktericídny účinok nebol dokázaný ani v tomto prípade. Pri použití kultúry o počiatkovej koncentrácii buniek, tj. riedenie  $10^0$  sa na agarových platniach prejavil nárast povlaku po celom obsahu LA platne. Pri riedení  $10^{-4}$  bol zaznamenaný nárast veľkého množstva malých kolónií. Výsledok so stafylokokom sa v porovnaní s článkom [9] líši, čo môže byť spôsobené jednak použitím inej bakteriálnej kultúry, kedy jej reakcia na častice mohla byť diametrálne odlišná alebo je to dôsledok testovaných nanočastíc s obsahom Ag.

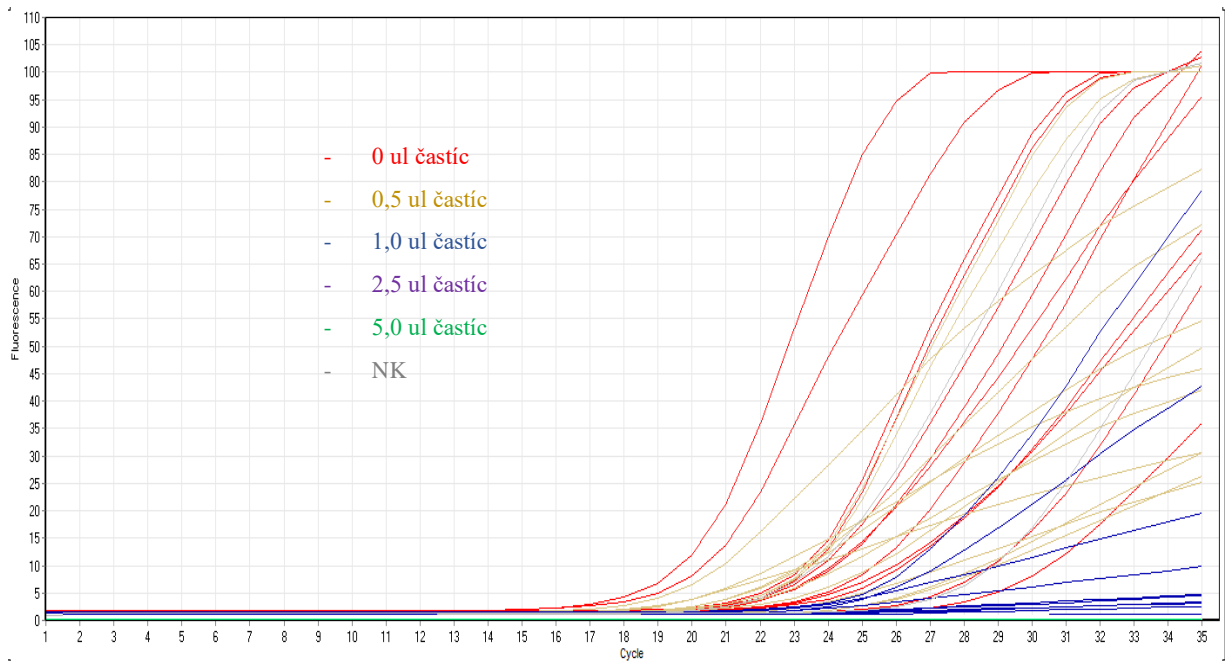


Obrázok 8.17 Petriho misky zaočkované kultúrou *Staphylococcus epidermidis* CCM 2124 riedenia  $10^0$  (horné misky) a  $10^{-4}$  (spodné misky) na LA médiu v prítomnosti nanočastíc s obsahom Ag o koncentrácii 500  $\mu\text{g/ml}$

## 9. OVERENIE BIOKOMPATIBILITY NANOČASTÍC

Biokompatibilita nanočastíc s obsahom striebra bola stanovená pomocou metódy polymerázovej reťazovej reakcie v reálnom čase (qPCR), teda na základe vplyvu prítomnosti nanočastíc v PCR zmesi na amplifikáciu DNA o známej počiatočnej koncentrácii [34]. Cieľom zvoleného postupu bolo určiť, či sa superparamagnetické častice, s ktorými sa pracovalo po celý čas bakalárskej práce javia ako biokompatibilné.

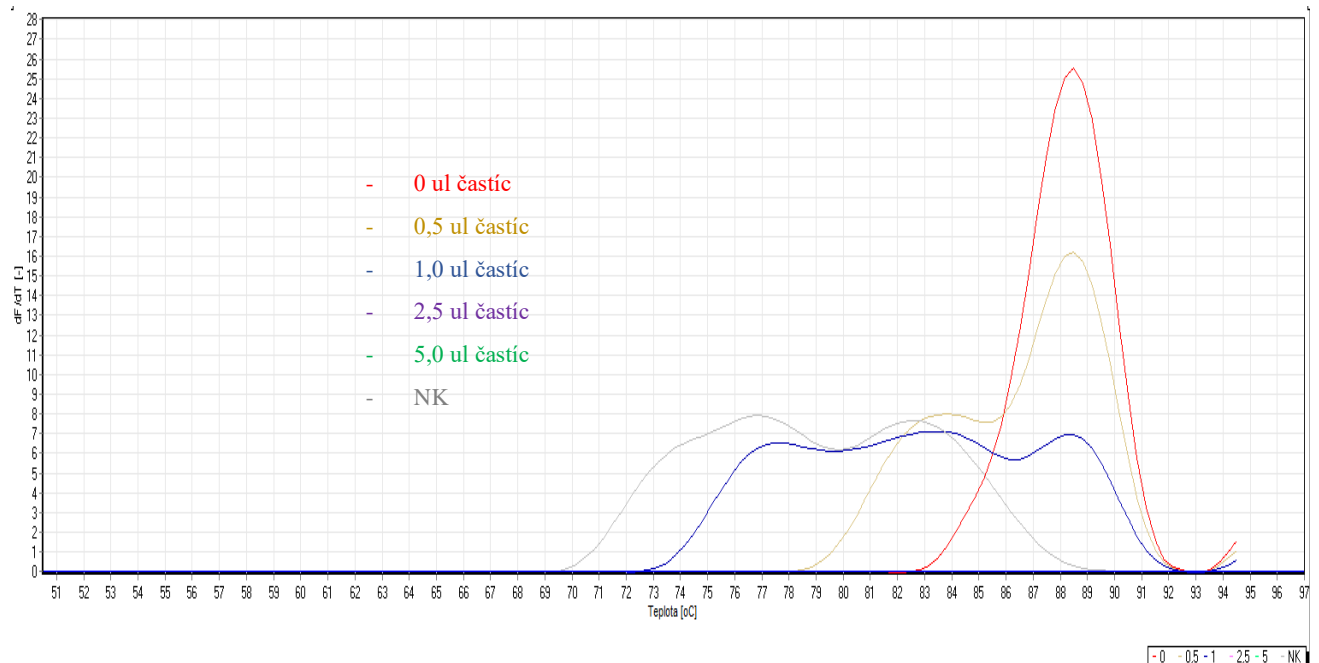
Pri tejto metóde bol zvolený postup z kapitoly 5.11, kedy sa pracovalo s primery špecifickými pre doménu *Baktéria*. Pri meraní boli zhotovené aj negatívne kontroly, vďaka čomu bolo možné vylúčiť prípadnú kontamináciu jednotlivých komponentov PCR. Naopak sada vzorkov obsahujúcich bakteriálnu DNA bez prítomnosti nanočastíc slúžila ako kalibračná krivka, teda ako východzí štandard pre porovnanie vplyvu prítomnosti nanočastíc na amplifikáciu rovnakej DNA. Nosičom boli v našom prípade pôvodné nanočastice o koncentrácii 4 mg/ml. Bakteriálna DNA, ktorá sa pridávala k pripravenému master mixu sa pohybovala v rozmedzí koncentrácií 100 ng/ $\mu\text{l}$  až 10 pg/ $\mu\text{l}$  (desiatkové riedenie).



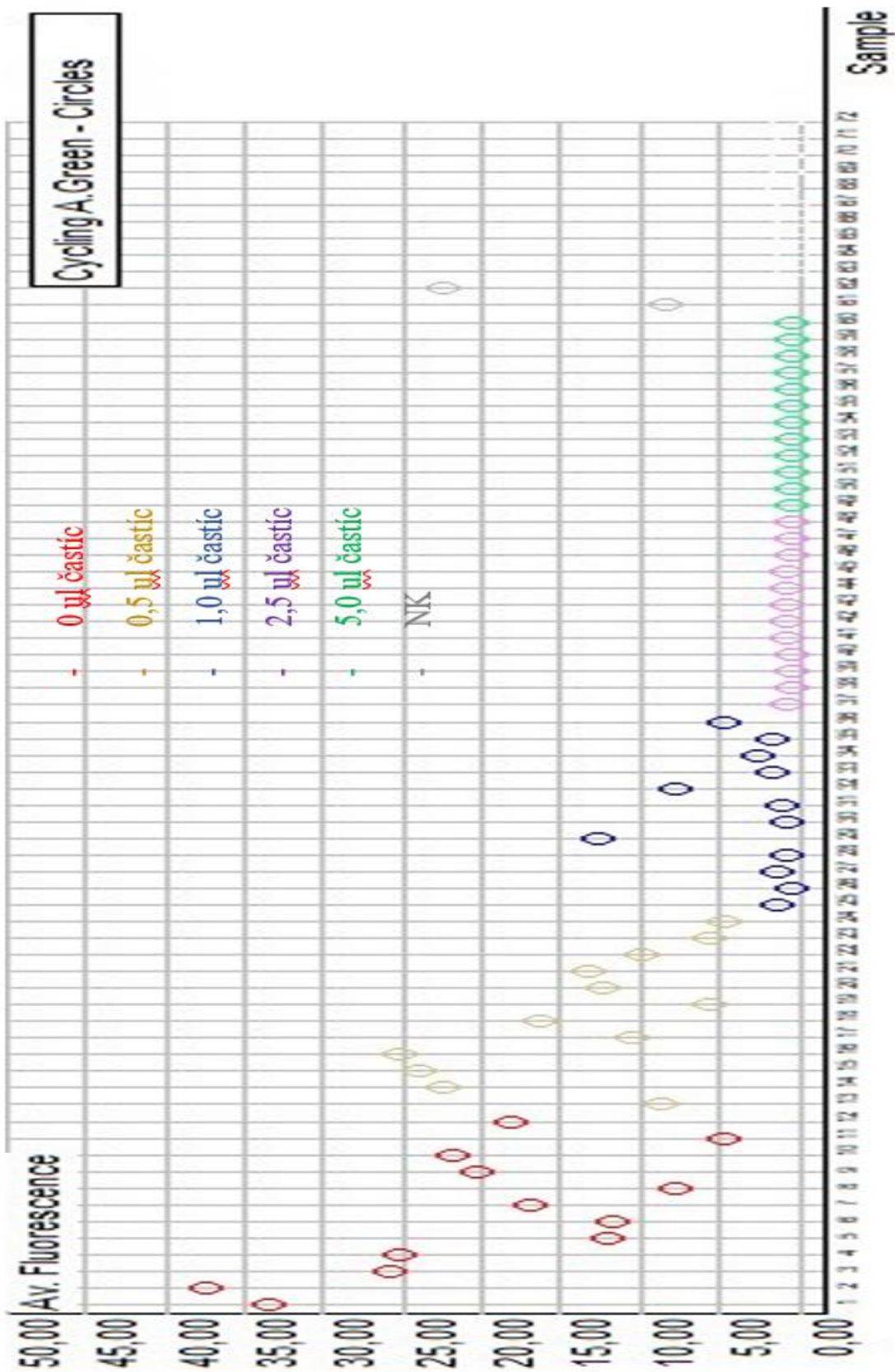
Obrázok 9.1 Kvantifikácia PCR domény Baktéria

Na obrázku 9.1 sú znázornené amplifikačné krivky produktu PCR v prítomnosti testovaného množstva nanočastíc o koncentrácii 4 mg/ml v PCR zmesi. Negatívnou kontrolou bolo potvrdené, že komponenty použité v tomto meraní nejavia známky kontaminácie. Súčasne je preukázané, že testované nanočastice ovplyvňujú fluorescenciu zhášania v závislosti od použitého objemu a tým koncentráciu v PCR zmesi. Pri aplikácii už len 0,5  $\mu$ l nosiča o počiatkovej koncentrácii 4 mg/ml fluorescencia výrazne klesá.

Výsledky amplifikačných kriviek, teda závislosti hodnoty fluorescencie na cyklu PCR potvrdzujú aj výsledky analýzy kriviek topenia, teda produktov PCR znázornených na obrázku 9.2 a zobrazenie porovnania hodnoty fluorescencie v rámci jednotlivých vzorkov vidieť na obrázku 9.3.



Obrázok 9.2 Analýza kriviek topenia produktov PCR špecifických pre doménu Baktéria



Obrázok 9.3 Závislosť fluorescence na vzorke



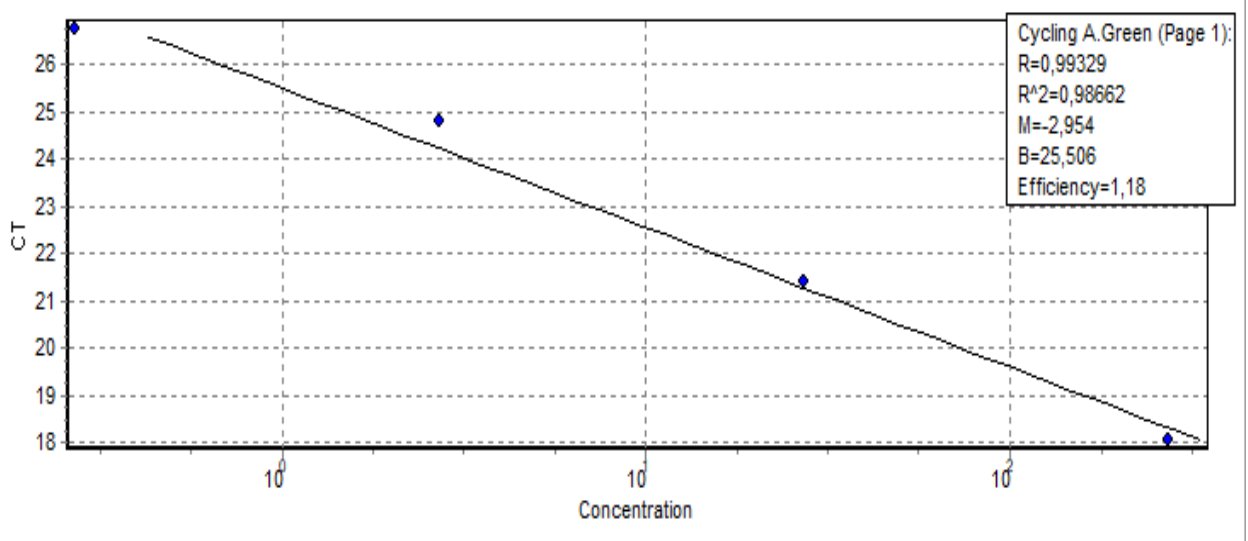
Obrázok 9.3 vypovedá o tom, že pri objeme 2,5  $\mu\text{l}$  a 5  $\mu\text{l}$  nosiča je fluorescencia nižšia ako u negatívnych kontrol a teda sa javí prakticky ako nulová. Tento jav môže mať viacero dôvodov, no jeden z nich môže byť práve obsah Ag v nanočasticiach, aj keď nemožno vylúčiť ani vplyv iných látok, ktoré môžu byť z testovaných častíc uvoľňované. Výsledky graficky zaznamenané na vyššie uvedených krivkách potvrdzujú aj hodnoty charakterizujúce kalibračnú krivku qPCR. Tabulované hodnoty kalibračnej krivky vhodné pre vyhodnotenie kvantifikácie v rámci qPCR, ktoré ju charakterizujú v ideálnom prípade sú podľa údajov z literatúry  $R^2 \leq 0,985$ ,  $M = -3,9$  až  $-3,0$ , Eficiency 80 – 110% (Tabuľka 9.1) [35]. V rámci nášho merania qPCR hodnoty charakterizujúce kalibračnú krivku odpovedajú iba v prípade 0 objemu nanočastíc v PCR zmesi (Obrázok 9.4). Už v prítomnosti 0,5  $\mu\text{l}$  nanočastíc o východzej koncentrácii 4mg/ml sú hodnoty charakterizujúce kalibračnú krivku, teda účinnosť amplifikácie, mimo požadovaný rozsah hodnôt. Na lepšie posúdenie výsledkov bola zhotovená aj tabuľka 9.2, kde pri objemoch 2,5  $\mu\text{l}$  a 5,0  $\mu\text{l}$  neboli namerané žiadne hodnoty v dôsledku veľkej inhibície rastu, a teda hodnoty siahali pod medzu detekcie.

Tabuľka 9.1 Tabulované hodnoty kalibračnej krivky v qPCR [35]

	$R^2$	M	Ef
Optimálne hodnoty	$\leq 0,985$	-3,9 až -3,0	80 - 110%

Tabuľka 9.2 Namerané hodnoty

	$R^2$	M	Ef
0,0 $\mu\text{l}$	0,98662	-2,954	118%
0,5 $\mu\text{l}$	0,91918	-1,011	876%
1,0 $\mu\text{l}$	0,8428	-3,214	105%
2,5 $\mu\text{l}$	-	-	-
5,0 $\mu\text{l}$	-	-	-



Obrázok 9.4 Kalibračná krivka pri aplikácii 0  $\mu\text{l}$  nosiča



Na záver teda môžeme povedať, že prítomnosť nanočastíc aj v nízkej koncentrácii v PCR zmesi silne ovplyvňuje amplifikáciu prítomnej DNA. Testované nanočastice teda nemožno považovať za biokompatibilné a to aj cez to, že na základe prezentovaných výsledkov nemožno presne určiť dôvod tejto inhibície DNA amplifikácie, teda presnejšie či je jej dôvodom práve prítomnosť Ag v testovaných nanočasticiach, alebo je dôvodom prítomnosť inej látky.

## ZÁVER

V experimentálnej časti bol skúmaný bakteriocídny účinok superparamagnetických nanočastíc s obsahom Ag na vybrané baktérie. Bakteriocídny účinok zmienených nanočastíc bol študovaný za použitia baktérie *E coli*, ako najčastejšie používaného modelového mikroorganizmu, avšak ku kultiváciám došlo aj pri iných bakteriálnych kultúrach ako boli *Serratia marcescens*, *Kocuria rosea*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus epidermis*. Týmto sa otestovalo, či nemajú častice rozdielny dopad na gramnegatívne a grampozitívne baktérie v dôsledku rozdielneho zloženia ich bunkovej steny. Na konci práce bolo pomocou DNA domény *Baktéria* uskutočnené qPCR, vďaka čomu bolo možné určiť, či sa nanočastice javia ako biokompatibilné.

Pri aplikácii nanočastíc o pôvodnej koncentrácii ku kultúram v rôznych objemoch nebola sledovaná žiadna inhibícia rastu, či ovplyvnenie životaschopnosti buniek. V prípade kedy došlo k premytiu nanočastíc a následne ich zriedeniu sa požadovaný účinok tiež nedostavil, a teda ani takto upravené častice nejavili známky bakteriocídneho účinku.

Pri práci s časticami, ktoré mali výrazne upravené koncentrácie (napr. 12,5 µg/ml prípade až 50 µg/ml) a kultúrami, ktoré boli niekoľkonásobne zriedené na požadované CFU bol výsledok mierne iný. Bolo možné pozorovať, že inhibíciu rastu ovplyvňuje množstvo buniek, ktoré bakteriálna kultúra, konkrétne sa jednalo o *Escherichia coli* CCM 3459, obsahuje ako aj koncentrácia nanočastíc s obsahom striebra. Pri použití koncentrácie 500 µg/ml nanočastíc sa použil okrem *E coli* CCM 3459 aj *Staphylococcus epidermis* CCM 2124, pri ktorých sa opätovne inhibičný jav nedostavil.

V prípade qPCR bolo určené, že častice sa nejavia ako biokompatibilné v dôsledku viditeľného zhášania fluorescence s narastajúcim objemom použitého nosiča. Je však otázkou či je tento efekt dôsledkom prítomnosti práve Ag alebo dôsledkom iných zlúčenín, ktoré môžu byť súčasťou roztoku testovaných nanočastíc.

Môžeme povedať, že konečným výsledkom predloženej práce je, že častice o pôvodnej koncentrácii nevykazujú bakteriocídny účinok. Avšak v prípade zníženia ich koncentrácie v kombinácii s nižšou koncentráciou buniek testovaných MO bol detekovaný slabý bakteriocídny efekt. Možno teda pre ďalšiu prácu odporučiť tento smer práce.

## LITERATÚRA

- [1] GOSSUIN, Yves; GILLIS, Pierre; HOCQ, Aline; VUONG, Quoc a ROCH, Alain. Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. *online. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2009, roč. 1, č. 3, s. 299-310. ISSN 1939-5116. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/wnan.36>. [cit. 2023-04-01].
- [2] CHIN, Suk; IYER, K. a RASTON, Colin. Facile and Green Approach To Fabricate Gold and Silver Coated Superparamagnetic Nanoparticles. *online*. 2009, roč. 9, č. 6, s. 2685-2689. ISSN 1528-7483. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/cg8013199>. [cit. 2023-10-14].
- [3] BENZ, Manuel. Superparamagnetism: theory and applications.: *Discussion of Two Papers on Magnetic Nanoparticles. online. s. 1-27*. [cit. 2023-03-16].
- [4] MARGHUSSIAN, Vahak. Magnetic Properties of Nano-Glass Ceramics. *online*. In: . Elsevier, 2015, s. 181-223. ISBN 9780323353861. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35386-1.00004-9>. [cit. 2023-03-16].
- [5] DI MARCO, Mariagrazia; SADUN, Claudia; PORT, Marc; GUILBERT, Irene; COUVREUR, Patrick et al. Physicochemical characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) for biomedical application as MRI contrast agents. *online. International Journal of Nanomedicine*. 2007, roč. 2, č. 4, s. 609-622. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S2.4.609>. [cit. 2023-03-22].
- [6] *online*. GOSSUIN, Yves; ROCH, Alain a GILLIS, Pierre. Wiley Interdisciplinary Reviews: *Nanomedicine and Nanobiotechnology: Magnetic resonance relaxation induced by superparamagnetic particles used as contrast agents in magnetic resonance imaging: a theoretical review*. 2017, roč. 9, č. 6. [cit. 2023-03-20].
- [7] REEDIJK, Jan a POEPELMEIER, Kenneth. Comprehensive Inorganic Chemistry III. *online*. In: . s. 407-459. ISBN 978-0-12-823153-1. [cit. 2023-10-07].
- [8] Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery. *online*. In: ASIRI, Abdullah a MOHAMMAD, Ali. 2018, s. 861-903. ISBN 978-0-12-813741-3. [cit. 2023-10-07].
- [9] SHATAN, Anastasiia; VENCLÍKOVÁ, Kristýna; ZASOŇSKA, Beata; PATSULA, Vitalii; POP-GEORGIEVSKI, Ognen et al. Antibacterial Silver-Conjugated Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis and Bactericidal Effect. *online. Pharmaceutical Research*. 2019, roč. 36, č. 10. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2680-x>. [cit. 2023-10-19].
- [10] HAJIPOUR, Mohammad; FROMM, Katharina; AKBAR ASHKARRAN, Ali; JIMENEZ DE ABERASTURI, Dorleta; LARRAMENDI, Idoia et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *online. Trends in Biotechnology*. 2012, roč. 30, č. 10, s. 499-511. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>. [cit. 2023-03-31].
- [11] YAN, Xueting; HE, Bin; LIU, Lihong; QU, Guangbo; SHI, Jianbo et al. Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*: proteomics approach.

- online. *Metallicomics*. 2018, roč. 10, č. 4, s. 557-564. ISSN 1756-5901. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C7MT00328E>. [cit. 2023-10-10].
- [12] LE OUAY, Benjamin a STELLACCI, Francesco. Antibacterial activity of *silver nanoparticles: A surface science insight*. online. *Nano Today*. 2015, roč. 10, č. 3, s. 339-354. ISSN 17480132. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.002>. [cit. 2023-10-10].
- [13] BARON, Samuel (ed.). *Medical Microbiology*. online. 4th edition. 1996. ISBN 0-9631172-1-1. [cit. 2023-03-24].
- [14] SCHNEEWIND, Olaf a NAVARRE, William. *Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope*. online. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/membr.63.1.174-229.1999>. [cit. 2023-10-06].
- [15] BEVERIDGE, Terry J. Structures of gram-negative cell walls and their *derived membrane vesicles*.: *Journal of bacteriology*. online. In: . Dostupné z: 181.16: 4725-4733. [cit. 2023-10-06].
- [16] Klasifikácia *Escherichia coli*. online. In: *Wikipedia: the free encyclopedia. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001*. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](https://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli). [cit. 2024-05-09].
- [17] DOBRINDT, Ulrich. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. online. In: *International Journal of Medical Microbiology*. 2005, s. 357-371. ISSN 14384221. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.009>. [cit. 2023-03-26].
- [18] NATARO, James a KAPER, James. Diarrheagenic *Escherichia coli*. online. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998, roč. 11, č. 1, s. 142-201. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>. [cit. 2023-03-26].
- [19] *Bacillus cereus*. online. In: *Wikipedia*. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus\\_cereus](https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_cereus). [cit. 2023-11-04].
- [20] BOTTONE, Edward J. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. online. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010, roč. 23, č. 2, s. 382-398. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>. [cit. 2023-11-01].
- [21] Klasifikácia *Bacillus subtilis*. online. In: *Wikipedia: the free encyclopedia. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001*. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Bacillus\\_subtilis](https://cs.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis). [cit. 2024-05-09].
- [22] EARL, Ashlee; LOSICK, Richard a KOLTER, Roberto. *Ecology and genomics of Bacillus subtilis*. online. *Trends in Microbiology*. 2008, roč. 16, č. 6, s. 269-275. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>. [cit. 2023-11-01].
- [23] *Serratia marcescens*. online. In: . Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Serratia\\_marcescens.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Serratia_marcescens.jpg). [cit. 2024-02-22].
- [24] HEJAZI, A. a FALKINER, F. *Serratia marcescens*. online. *Journal of Medical Microbiology*. 1997, roč. 46, č. 11, s. 903-912. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/00222615-46-11-903>. [cit. 2023-11-06].

- [25] SAVINI, Vincenzo; CATAVITELLO, Chiara; MASCIARELLI, Gioviana; ASTOLFI, Daniela; BALBINOT, Andrea et al. Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. online. *Journal of Medical Microbiology*. 2010, roč. 59, č. 12, s. 1395-1402. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.021709-0>. [cit. 2023-11-10].
- [26] *Kocuria rosea*. online. In: Sciencephotogallery. 2018. Dostupné z: <https://sciencephotogallery.com/featured/3-kocuria-rosea-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html>. [cit. 2023-11-15].
- [27] GREENBLATT, C.L.; BAUM, J.; KLEIN, B.Y.; NACHSHON, S.; KOLTUNOV, V. et al. *Micrococcus luteus* - Survival in Amber. online. *Microbial Ecology*. 2004, roč. 48, č. 1, s. 120-127. ISSN 0095-3628. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2016-5>. [cit. 2023-11-15].
- [28] Klasifikácia *Micrococcus luteus*. online. In: Wikipedia: the free encyclopedia. *San Francisco (CA)*: Wikimedia Foundation, 2001. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Micrococcus\\_luteus](https://en.wikipedia.org/wiki/Micrococcus_luteus). [cit. 2024-05-09].
- [29] ZHU, MINGHUI; ZHU, QIANG; YANG, ZHEN a LIANG, ZHIXIN. *Clinical Characteristics of Patients with Micrococcus luteus Bloodstream Infection in a Chinese Tertiary-Care Hospital*. online. *Polish Journal of Microbiology*. 2021, roč. 70, č. 3, s. 321-326. ISSN 2544-4646. Dostupné z: <https://doi.org/10.33073/pjm-2021-030>. [cit. 2023-11-15].
- [30] *Staphylococcus*. online. In: Wikipedia. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus>. [cit. 2023-04-01].
- [31] VUONG, Cuong a OTTO, Michael. *Staphylococcus epidermidis* infections. online. *Microbes and Infection*. 2002, roč. 4, č. 4, s. 481-489. ISSN 12864579. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01563-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01563-0). [cit. 2024-05-09].
- [32] Microbe Online. online. In: TANKESHWAR, Acharya. *Microbe Online*. 14.2.2024. [cit. 2024-02-23].
- [33] HAARMAN, Monique a KNOL, Jan. *Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula*. online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, roč. 72, č. 4, s. 2359-2365. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>. [cit. 2024-05-16].
- [34] TRACHTOVA, Stepanka; SPANOVA, Alena; RITTICH, Bohuslav a HORAK, Daniel. *Study on the encapsulation of magnetic cores using real time- polymerase reaction*. online. In: . [cit. 2024-05-17].
- [35] HORAK, Daniel; HLÍDKOVA, Helena; TRACHTOVÁ, Štěpánka; ŠLOUF, Miroslav; RITTICH, Bohuslav et al. USE OF POLY(ETHYLENE GLYCOL)-COATED MONODISPERSE MAGNETIC POLY(2- HYDROXYETHYL METHACRYLATE) AND POLY(GLYCIDYL METHACRYLATE) MICROSPHERES FOR DNA ISOLATION. online. In: . [cit. 2024-05-19].

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AgNP – nanočastice striebra

CCM – Česká zbierka mikroorganizmov (Czech Collection of Microorganisms)

CFU – jednotka tvoriaca kolónie (Colony Forming Units)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

E coli – *Escherichia coli*

G- – gramnegatívne baktérie

G+ – grampozitívne baktérie

LA – Luria agar

LB – Luria bujón

MO – mikroorganizmus

MPA – masopeptonový agar

MPB – masopeptonový bujón

MRI – nukleárna magnetická rezonancia

OD – optická hustota

PBS – Fosfátom pufrovaný fyziologický roztok (Phosphate-buffered saline )

PCR – polymerázová reťazová reakcia

SEM – rastrovacia elektrónová mikroskopia

SPIO – superparamagnetické nanočastice oxidu železa

TEM – transmisná elektrónová mikroskopia

USPIO – ultramalé superparamagnetické oxidy železa