

Univerzita Karlova v Praze

Pedagogická fakulta

Katedra biologie a environmentálních studií

Antibakteriální účinky dezinfekčních přípravků

Bakalářská práce

Autor: Ivana Vítková

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Pavlasová, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lenky Pavlasové, Ph.D. s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství.

Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s uložením své bakalářské práce v databázi Theses.

V Praze dne

.....

Ivana Vítková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své rodině a svým přátelům za podporu během studia na Pedf UK. Též bych ráda poděkovala pedagogům a dalším zaměstnancům KBES za velmi milou atmosféru na katedře a vstřícný přístup ke studentům a samozřejmě bych ráda poděkovala RNDr. Lence Pavlasové Ph.D. za vedení mé bakalářské práce a za velkou ochotu a pomoc při provádění pokusu.

Anotace

Tato práce se zabývá antibakteriálním účinkem běžně dostupných dezinfekcí používaných k hojení ran a dezinfekci lidského těla.

Teoretická část je zaměřena na popis mikrobiálních organismů, dále popisuje druhy antibakteriálních látek se zaměřením na chemoterapeutika a způsob interakce chemoterapeutik a mikrobů. Nakonec jsou nastíněny metody zkoumání vlivu chemoterapeutik na bakterie.

V praktické části je proveden test citlivosti bakterií pomocí modifikované diskové difúzní metody na vybrané druhy dezinfekcí modifikovanou diskovou difúzní metodou. Je zde uveden postup celého pokusu a následné vyhodnocení.

Klíčová slova

disková difúzní metoda, antibakteriální účinnost, antimikrobiální účinnost, dezinfekce

Annotation

Antibacterial Effects of Desinfectants

This bachelor's work is about antibacterial effect of commercially available disinfectant used for wound healing and disinfection of the human body.

The theoretical part focuses on the description of microbial organisms, next describe further kinds of antibacterials substances mainly chemotherapeutics and way to interact between chemoterapeutics and microbes and methods of studying this interaction.

In the practical part of this work is executed test sensitivity by disc-diffusion method of bacterial colonies on selected types of disinfectant. There is shown the whole process of test and subsequently evaluated.

Keywords

disc-diffusion method, antibacterial activity, antimicrobial activity, disinfection

Obsah

Úvod.....	8
1. Mikroorganismy kolem nás	9
2. Bakterie	11
2.1. Tvary bakteriálních buněk	11
2.2. Stavba bakteriální buňky	11
2.3. Růst a množení bakterií	16
2.4. Životní cyklus individuální bakterie	17
2.5. Výživa bakterií	18
2.6. Bakteriální osídlení lidského těla	19
2.7. Pěstování bakterií in vitro	20
2.8. Kultivační média	21
2.9. Kultivace bakterií	22
2.10. Vzhled mikrobiálních kolonií a bližší určení druhu mikroorganismu	23
2.11. Přežívání a usmrcování mikrobů	23
3. Antibakteriální látky	25
3.1. Přehled antibiotik.....	26
3.1.1. β -laktamy.....	26
3.1.2. Tetracykliny	27
3.1.3. Aminoglykosidy	28
3.1.4. Makrolidy	29
3.1.5. Linkosamidy.....	30
3.1.6. Amfenikoly	31
3.1.7. Polypeptidová antibiotika.....	31
3.1.8. Glykopeptidová antibiotika.....	32
3.1.9. Ansamycinová antibiotika.....	32
3.1.10. Sulfonamidy a pyrimidiny.....	33
3.1.11. Nitroimidazoly a nitrofurany.....	34
3.1.12. Chinolony	34

3.2.	Přehled antiseptických látek	34
3.1.13.	Antibakteriální účinek halogenů	34
3.1.13.1.	Antibakteriální účinek jódu	34
3.1.13.2.	Antibakteriální účinek chlóru	35
3.1.14.	Genciánová violet'	36
3.1.15.	Antibakteriální účinek oxidujících látek	36
3.1.15.1.	Peroxid vodíku.....	37
3.1.16.	Antibakteriální účinek alkoholů a fenolů	37
4.	Metody stanovení citlivosti bakterií na antibiotika.....	38
4.1.	Bakteriální rezistence na antibiotika	38
5.	Praktická část	40
5.1.	Vlastní průběh pokusu	40
5.1.1.	Naočkování pevných agarových médií.....	41
5.1.2.	Přeočkování napěstovaných kolonií (izolace čisté kultury)	46
5.1.3.	Testování bakterií na jednotlivé antibakteriální látky.....	52
6.	Diskuze	<u>5758</u>
7.	Závěr	<u>5859</u>
8.	Seznam použité literatury	<u>5960</u>

Úvod

Na celé zeměkouli žije nepřehledné množství organismů. Některé dosahují gigantických rozměrů, jiné jsme naopak možno vidět pouze pod mikroskopem. Mikroorganismy žijí opravdu všude – na naší pokožce, na povrchu stolu, kliky... Zkrátka opravdu všude. Pokud ale nemáme mikroskop, lze jejich přítomnost dokázat jiným způsobem? Samozřejmě ano, jedná-li se o bakterie, plísňe nebo kvasinky. Jejich přítomnost lze velmi snadno prokázat, v případě, že jim poskytneme prostředí jim vyhovující. Začnou se v něm rychle množit až do makroskopických kolonií.

Bohužel ne všechny mikroorganismy jsou člověku prospěšné, ba naopak řada z nich způsobuje vážná onemocnění. Je tedy potřeba se proti nim bránit. K zabránění jejich růstu a množení byla vynalezena antibiotika a řada dezinfekčních přípravků. Lze tento účinek demonstrovat žákům na střední škole? Cílem této práce je právě ověření účinnosti diskové difúzní metody ve školních podmínkách. Test byl proveden řadou nejběžnějších dezinfekčních přípravků na vybraném bakteriálním druhu. Jelikož je test proveden v rámci školní laboratoře, došlo tak ke snadnému ověření, zda lze tet provádět i v laboratořích na středních školách. Každý žák si sám může vyzkoušet metodu ke stanovení antibakteriálního účinku přípravku.

Práce se nejprve zabývá mikroorganismy, kde je podrobněji popsána charakteristika bakterií, následně jsou rozebírány antimikrobiální látky a v konečné části práce je uveden podrobný popis pokusu, který byl proveden při testu na dezinfekční přípravky. Popis postupu je možné využít jako návod pro další testování bakterií na antibakteriální látky.

Cílem bakalářské práce je otestování vybraných antibakteriálních přípravků pomocí diskové difúzní metody ve školních podmínkách a ověření účinnosti této metody za uvedených podmínek.

1. Mikroorganismy kolem nás

Celá planeta je osídlena nekonečným množstvím mikroorganismů. Tvoří velmi složitý ekosystém, kde jsou uplatněny všechny druhy vztahů, od mutualistického až po parazitický. Podobný vztah mají mikroorganismy i k člověku. Některé jsou pro nás prospěšné a jiné nám naopak škodí. Mikroby je osídleno naše tělo, předměty, venkovní prostředí a neustále s nimi přicházíme do kontaktu. Tato práce je zaměřena především na bakterie. Bakteriím je proto v této práci věnována podrobná samostatná kapitola (viz kap. č. 2).

Kromě bakterií patří mezi mikroorganismy také kvasinky. I ty jsou součástí našeho těla a často se vyskytují na pokožce. Jsou to jednobuněčné organismy, které se řadí mezi vřeckovýtrusné houby. Na rozdíl od bakterií patří kvasinky mezi eukaryota. Svůj název získaly díky schopnosti kvasit (Šilhánková, 1995). Buňky kvasinek se stejně jako bakterie vyskytují téměř všude. Jejich dalším společným znakem je rychlý růst. Kvasinka je schopna se rozmnožit během minut až hodin. Kvasinková buňka je obklopena silnou buněčnou stěnou, pod kterou je cytoplazmatická membrána. Uvnitř buňky nalezneme veškeré buněčné struktury jako je jádro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, vakuoly a Golgiho komplex. Mimo jiné jsou v cytoplazmě také zásobní látky, mezi které patří manany a glykogen. Buňka může nabývat rozmanitých tvarů od kulovitých, protáhlých, oválných až po elipsovité. Kvasinky se většinou rozmnožují pučením. Během pučení se mateřské jádro mitoticky rozdělí na dvě a po dosažení pučící části kvasinky velikosti mateřské buňky jádro přejde do buňky dceřiné. Když se dceřiná buňka odškrtní, zůstává na mateřské buňce jizva. Dalším typem rozmnožování může být přehrádkované dělení. Kvasinková buňka začne růst do délky, mezitím se jádro mitoticky rozdělí, každé jádro doputuje na opačný pól buňky, uprostřed buňky se vytvoří příčná přepážka a dojde k rozdělení buňky. Kvasinkové buňky jsou schopné se rozmnožovat i pohlavně. Během životního cyklu jsou schopné vytvářet pohlavně odlišné spory, které spolu mohou konjugovat a vytvářet tak zygotu. V životním cyklu kvasinek tak dochází jak k pohlavnímu, tak i k nepohlavnímu rozmnožování (Šipický a Šubík, 1992).

Dalšími mikroorganismy jsou plísňe. Plísňe jsou houbové organismy spadající do skupin hub vřekovýtrusných, stopkovýtrusných a hub nedokonalých. Podobně jako ostatní mikroorganismy jsou spory plísni téměř všudypřítomné. Ke svému růstu samozřejmě potřebují optimální podmínky jako je dostatek živin a vlhkosti. Skládají se ze stélky, která je tvořena vlákny – hyfy. Právě dle stavby stélky (mycelia) a dle způsobu rozmnožování rozdělujeme plísňe do výše uvedených skupin. Houby vřekovýtrusné mají mnohobuněčné přehrádkované mycelium, rozmnožují se pouze nepohlavně – exosporami a askosporami tvořenými v asku. Houby stopkovýtrusné mají jednobuněčné – nepřehrádkované mycelium, rozmnožují se nepohlavně endosporami a pohlavně zygosporami. U hub nedokonalých je též přehrádkované mycelium, ale co se týče rozmnožování, byla zde zachována pouze pohlavní fáze pomocí exospor. Některé druhy plísni tvoří tvrdý polokulovitý útvar – sklerocium. Jednotlivé buňky mohou obsahovat jedno nebo více jader. Buněčná stěna je tvořena z polysacharidů jako jsou chitin, glukán a manány. Časté jsou i látky podobné ligninu a celulóze (Šilhánková, 1995).

2. Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné organismy vyskytující se po celé planetě. Doposud bylo popsáno přibližně 5500 druhů. Tyto organismy se řadí do říše prokaryot, která je charakteristická jednoduchou stavbou buňky, velmi malou velikostí (řádově v mikrometrech) a genomem tvořeným jedinou zpravidla cyklickou (někdy lineární) molekulou DNA volně vloženou v cytosolu. Velikost takovýchto buněk se pohybuje v rozmezí 0,3 až 25 μm . Některé rody bakterií se vyznačují speciální schopností – tvorbou spor. Tato stádia dávají buňce schopnost přežít extrémní podmínky. Velikost bakteriální buňky je několikanásobně menší než buňky eukaryotní (Julák, 2006).

2.1. Tvary bakteriálních buněk

Buňky jsou rozmanitých tvarů. Tvoří například kuličky (tzv. koky), které mohou zůstat spojené v dvojice (diplokoky), řetízky (streptokoky) nebo shluky (stafylokoky) nebo tvoří tyčinky, které mohou být zahnuté (vibria), vláknité (mycelia) nebo stočené (spirály) (Julák, 2006).

2.2. Stavba bakteriální buňky

Bakteriální buňka se skládá z genomu tvořeného jedinou cyklickou molekulou DNA (viz výše), cytosolu ohraničeného cytoplazmatickou membránou a buněčné stěny. Buňky někdy mohou obsahovat bičík a fimbrie (viz obr. č. 1).

Nukleoid

Nukleoid zaujímá asi 15 % objemu buňky. V elektronovém mikroskopu se jeví jako světlejší část buňky. Tato oblast je díky menšímu obsahu hmoty oproti okolnímu prostředí lépe propustná pro elektrony, a tak je vyzářeno větší množství světla (Julák, 2006). Nukleoid je tvořen molekulou DNA, která je zároveň jediným bakteriálním chromosomem. Na rozdíl od eukaryotních buněk je molekula volně vložena v cytosolu. DNA molekula je v buňce několikrát stočena a po jejím rozvinutí by měřila zhruba 1

mm. DNA se skládá z dvoušroubovice komplementárních řetězců nukleotidů. Například u bakterie *E. coli* obsahuje jeden řetězec 4×10^6 nukleotidů (Kaprálek, 1999). Místo histonů jsou na molekule DNA navázány 4 druhy proteinů histonům podobným. Jejich funkcí je regulace replikace DNA a syntéza a transkripce mRNA. Molekula DNA je prostorově držena molekulou RNA. Nukleoid obsahuje asi 3 500 genů. Zbytek genetické informace je obsažen v dalších částech buňky, které jsou zmíněny níže (Kaprálek, 1983). Bakteriální genom je o 3 řády menší než genom lidský (Votava, 2010a).

Cytosol

Genom je obklopen cytosolem, což je vodný roztok obsahující rozpustné složky ohraničený cytoplazmatickou membránou. V cytosolu jsou volně rozptýleny plazmidy, ribozomy a zásobní látky. Na rozdíl od eukaryotických buněk neobsahuje cytosol žádné organely (Votava, 2010a). Cytosol obsahuje více než 50% všech proteinů. Většina z nich má enzymatickou funkci. Tyto enzymy katalyzují především glykolýzu, pentózový cyklus, glyoxalátový cyklus, Krebsův cyklus a další metabolické pochody. Je to prostor, kde dochází k pohybu hmoty díky tekutému až gelovitému prostředí. Cytosol též obsahuje molekuly mRNA a tRNA, meziprodukty metabolismu a biologicky účinné ionty (Kaprálek, 1983).

Plazmidy

Plazmidy jsou krátké úseky DNA, které jsou volně vloženy v cytosolu. Počet kopií plazmidu v buňce může být 1 až více než 100. Iniclace replikace plazmidu je regulována autonomně a nezávisle na iniciaci replikace chromozomu. Celá replikace trvá řádově desetiny generační doby. Buňka může plazmid ztratit. Ztráta je však vždy trvalá. Některé plazmidy mají schopnost konjugace - přecházení do jiné bakteriální buňky. V případě, že plazmid není schopný konjugace, může být předáván transdukci. Tento přenos probíhá pomocí bakteriofága, který napadne bakteriální buňku a místo bakteriální DNA zabalí do své hlavičky DNA plazmidu. Fág následně infikuje jinou buňku, a tak plazmid přeneše. Jeden plazmid obsahuje řádově jednotky, maximálně desítky genů.

Díky plazmidům může bakteriální buňka získat několik výhodných genů, které jí pomáhají v přežití. Například mohou způsobovat patogenitu buňky, rozšiřovat schopnost využití organických látek nebo způsobovat rezistence na antibiotika nebo těžké kovy. Dále díky nim může produkovat toxiny nebo koliciny (Kaprálek, 1983).

Ribozomy

Bakteriální ribozom je složen ze dvou podjednotek stejně jako ribozom eukaryotických buněk. Struktura ribozomu je kulovitého tvaru díky slabým vazebným interakcím mezi jednotlivými bázemi. Oproti buňkám eukaryotním se ribozomy liší svou velikostí. Velká podjednotka má velikost 50 S a malá podjednotka 30 S. Podjednotky se mohou volně rozpojovat. Stejně jako u eukaryotických buněk mají funkci překlada mRNA do proteinů potřebných pro život buňky (Kaprálek, 1999). Pro zahájení překlada je nutná volná podjednotka 30 S. Po navázání molekul mRNA, GTP, tRNA nesoucí formylovaný methionin a dvou bílkovinných iniciačních faktorů se může navázat podjednotka 50 S a je zahájen překlad. Klidová buňka obsahuje několik set ribozomů, množící se buňka jich může obsahovat více. Ribozomy jsou tvořeny ze 2/3 molekulou rRNA a 1/3 bílkovinami.

Ribozomy jsou uloženy volně v cytosolu. Vysoká koncentrace je v oblasti jádra, kde dochází k překlada již přepsané mRNA, a po obvodu buňky, kde jsou navázané na cytoplazmatickou membránu (Kaprálek, 1983).

Cytoplazmatická membrána

Buňku ohraničuje cytoplazmatická membrána. Je to jediná membrána vyskytující se v bakteriální buňce. Tato membrána je tvořena dvojvrstvou fosfolipidů, ve které jsou zakomponovány bílkoviny. Bílkoviny jsou po obou stranách membrány poutány hydrofobními nebo elektrostatickými silami. Membránové bílkoviny činí 10 - 20 % obsahu všech bakteriálních bílkovin.

Hlavní funkcí cytoplazmatické membrány je izolace cytosolu od okolí. Umožňuje selektivní propouštění molekul z buňky i do buňky, je zde lokalizována řada enzymatických reakcí a transformace energie. Celková tloušťka membrány je kolem 8

nm (Votava, 2010a). Většinou je membrána hladká a napjatá, u některých druhů bakterií se však mohou vytvářet vchlípeniny.

Chemické složení membrány též souvisí s bakteriálním druhem. Obměna membránových proteinů a fosfolipidů v rostoucích bakteriích je oproti eukaryotním buňkám velmi malá. Řada metabolických reakcí je vázána právě na tuto strukturu díky hydrofobnímu prostředí. Dochází zde k posledním fázím tvorby složek buněčné stěny – peptidoglykanu, teichoových kyselin, lipopolysacharidů a pouzdrových polysacharidů. Na membránu je napojena replikačním počátkem DNA (Kaprálek, 1983).

Buněčná stěna

Buněčná stěna je jediná pevná část vyskytující se v bakteriální buňce. Obklopuje celou bakteriální buňku. Její hlavní funkcí je ochrana buňky, tvoří takzvaný vnější skelet. Z chemického hlediska je tvořena peptidoglykanem (lineárním polymerem tvořeným ze dvou aminocukrů – N-acetylglukosaminu a kyseliny N-acetylmuramové pospojovaným peptidovými a glycinovými můstky, který svou sítí vláken obklopuje celou buňku) (Votava, 2010a). Na každou karboxylovou skupinu N-acetylmuramové kyseliny je navázán řetězec 4 aminokyselin. Buněčná stěna odlišná u gramnegativních a grampozitivních bakterií.

U gramnegativních bakterií je průřez stěnou tenčí a má složitější výstavbu. Stěna je z vnější strany pokryta membránou. Je tvořena dvojvrstvou lipidů a bílkovin. V této vrstvě jsou zabudovány molekuly lipopolysacharidů. Vyskytují se zde receptory fágů, molekuly porinu, který tvoří v membráně nespecifické kanálky sloužící k průniku živin do periplazmového prostoru. Tato membrána je k peptidoglykanu poutána molekulami lipoproteinu (Pavlasová, 2009).

Grampozitivní bakterie mají průřez stěny dvakrát širší. Je tvořena mohutnou vrstvou peptidoglykanu, který je protkán teichoovými kyselinami. Tyto kyseliny vážou kationty Mg^{2+} a Ca^{2+} , nepostradatelné pro integritu stěny i membrány. Stěna grampozitivních bakterií neobsahuje lipidy ani bílkoviny (Kaprálek, 1999).

Bakteriální obaly

Buněčnou stěnu může ještě obklopovat další vrstva. Tato vrstva se může značně lišit. Pokud je vrstva obklopující stěnu jasně zřetelná, jedná se o pouzdro. V případě, že vrstva splývá s buněčnou stěnou, jedná se o slizovou vrstvu. Posledním typem je glykokalyx, který obklopuje bakterii tenkou sítí s vyčnívajícími vlákny. Vyčnívající vlákna umožňují specifickou i nespecifickou adhezi (Pavlasová, 2009).

Fimbrie

Na některých bakteriích mohou být zřetelné fimbrie, což jsou pevná rovná vlákna vyčnívající po obvodu buňky dlouhá několik mikrometrů. Často se jich zde nachází velké množství. Vlákna jsou dutá, složená z proteinových podjednotek. U řady bakterií mají velkou úlohu při adhezi k povrchu. Vyskytují se pouze u gramnegativních bakterií (Kaprálek, 1983).

Bičik

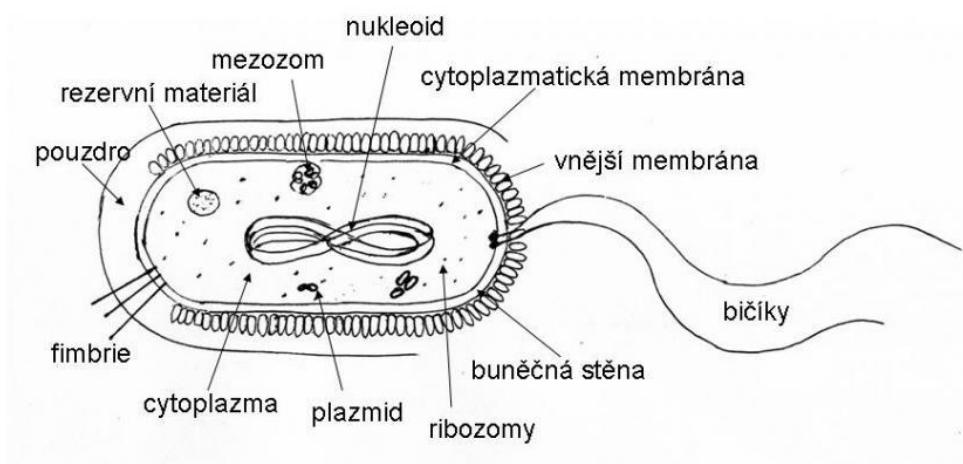
Kromě fimbrií může z bakterie vyčnívat jeden nebo více bičíků. Hlavní funkcí bičíku je pohyb, ke kterému dochází díky jeho rotaci. Stavební jednotkou bičíku je flagelin, jenž je uspořádaný do šroubovice. Právě tato stavba napomáhá pohybu. Při pohybu může bakterie měnit rychlost i směr rotace. Typický bakteriální pohyb je střídavě pohybující se vpřed a střídavě rotující na místě. Pohyb buňka uskutečňuje především kvůli vyhledávání živin.

Zdrojem energie pro pohyb bičíku je protonový gradient na cytoplazmatické membráně. Bičik je velmi křehký a snadno se láme. Pokud se bičik odlomí, opět rychle doroste (během 10 – 20 minut).

Spory

Jak je již výše zmíněno, bakterie jsou schopné přežít velmi extrémní podmínky. Jsou to vlastně nejodolnější organismy na naší planetě. Některé rody bakterií mají schopnost tvořit spory, stádia s téměř nulovým metabolismem. Jsou to jediné organismy na planetě

mající tuto schopnost. Tvorba spory je spuštěna specifickým impulsem, díky kterému dojde k řetězci reakcí včetně zapínání a na druhou stranu i vypínání určitých genů. Spora se tvoří vždy uvnitř buňky a buňka tak má zcela jinou morfologii. Nově je syntetizována kyselina dipikolinová, bílkoviny sporového pláště, peptidoglykan kortexu a další. Tvorba jedné spory trvá kolem deseti hodin. Bakteriální buňka se samozřejmě může opět přeměnit ze spory na buňku vegetativní.



Obrázek 1. Schéma bakteriální buňky¹

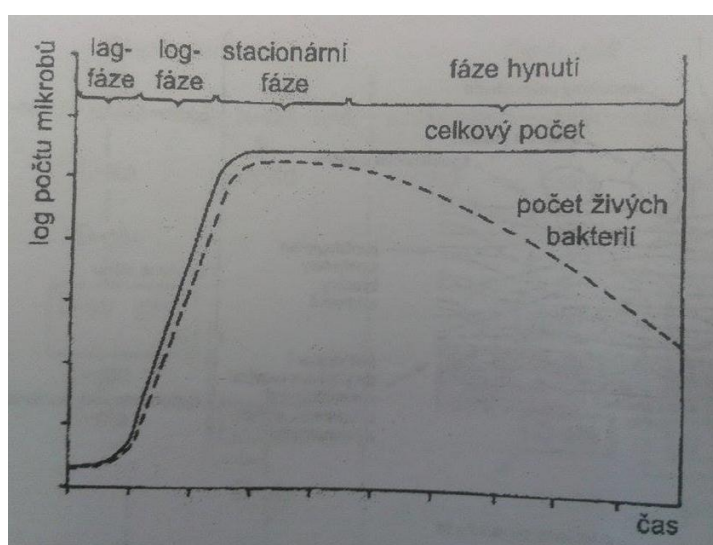
2.3. Růst a množení bakterií

Pokud se vyskytuje bakteriální buňka v prostředí, kde se pro ni vyskytují vhodné chemické i fyzikální podmínky, rozmnoží se. Začne přijímat zvýšené množství živin, zdvojovat komponenty svého těla a zvětší svoji hmotnost i objem. Po dosažení určité velikosti, která je geneticky kódovaná, se příčně rozdělí. Přesné rozdělení buňky je podrobněji rozebráno v kapitole Životní cyklus individuální bakterie. Buňky někdy mohou zůstat úzce spojeny, tímto způsobem vznikají právě shluky buněk (diplokoky,

¹ http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=130&typ=html

streptokoky, stafylokoky apod.), nebo se od sebe oddělí zcela. Stávají se i případy, kdy se buňky nedělí vůbec a rostou jen do délky (tyčinky) (Kaprálek, 1999).

Generační doba začíná vznikem bakterií a končí jejich smrtí či rozdělením buněk (Kaprálek, 1999). Často se stává, že se chromozom začne replikovat ještě předtím, než je původní replikace dokončena. Pro příklad generační doba *E. coli* při 37°C je 20 minut a při 20°C je 1 hodina (Votava, 2010a). Doba zdvojení představuje celkový čas zdvojnásobení počtu buněk v kolonii (Kaprálek, 1999). Někdy je buněčný růst inhibován zplodinami jejich vlastního metabolismu (Votava, 2010a).



Graf 1 Růstová křivka bakteriální populace²

2.4. Životní cyklus individuální bakterie

Životní cyklus bakterie se dělí na fázi C, která začíná okamžikem zahájení replikace bakteriální DNA a končí dokončením replikace, a na fázi D, která začíná dokončením replikace a končí rozdělením buňky na dvě dceřiné (Pavlasová, 2009).

Autoreprodukce bakterie samotné začíná replikací DNA. Replikaci dělíme na tři fáze.

² Zdroj: Greenwood a kol.: Lékařská mikrobiologie 1999

První fáze je iniciace replikace. Replikace začíná vždy na specifickém místě na DNA zvaném origin. Díky enzymům helikázy se vlákno DNA začne rozplétat, během rozplétání se v molekule tvoří napětí, které rozvolňují enzymy topoisomerázy a následně DNA-polymeráza syntetizuje druhé vlákno k molekule od konce 5' ke konci 3', které je k mateřskému vláknu spojeno enzymem lygázou (Kocur, 1981) (Votava, 2010a).

Další fází je elongace (vlastní replikace). Replikace probíhá obousměrně a končí na místě zvaném terminus. Na rozdíl od růstu individuálních bakterií je rychlost replikace v podstatě konstantní. Například rychlost replikace genomu *E. coli* je 41 minut.

Konečnou fází replikace je terminace. Nově vzniklé bakteriální chromozomy jsou připoutány svými počátky k cytoplazmatické membráně a k buněčné stěně. K samotnému oddělení dceřiné buňky od mateřské dochází intenzivním růstem buněčného obalu (cytoplazmatické membrány a buněčné stěny) mezi oběma místy přichycení obou chromozomů. Vytvoření příčné přepážky je podmíněno dokončením replikace a prostorovým přesunem replik k oběma pólům buňky (Votava, 2010a).

2.5. Výživa bakterií

Bakterie pro svůj růst a rozmnožování potřebují dostatečné množství energie. Způsob získání energie záleží na jejich metabolismu.

Mohou ji získávat z viditelného záření vlnové délky kolem 800 nm, kdy bakteriální fotosystém zachytí světelné kvantum (fototrofní bakterie) a přemění ho na energii chemických vazeb. Nebo ji mohou získávat oxidací redukovaných látek (chemotrofní bakterie) opět obdobným způsobem. Většina bakterií má metabolismus chemotrofního charakteru.

Chemotrofní bakterie získávají energii oxidací organických nebo anorganických látek. V případě využívání organických látek je označujeme jako chemoorganotrofní, v případě využívání anorganických látek jako chemolitotrofní (Kaprálek, 1999).

Bakteriální buňka ke svému životu potřebuje především dostatečný přísun uhlíku. Autotrofní bakterie nacházejí jeho zdroj v atmosféře v molekulách oxidu uhličitého, zatímco heterotrofní bakterie mohou čerpat uhlík ze solí organických sloučenin, sacharidů, lipidů, aminokyselin, peptonů a bílkovin.

Dále ke svému životu bakterie potřebují dostatečný zdroj dusíku pro tvorbu nukleových kyselin a dalších sloučenin obsahujících dusík. Některé bakterie mohou čerpat atmosférický dusík, většina však nachází zdroj ve formě amoniakálních solí a amoniaku díky snadnému průniku do buňky. Dalšími zdroji dusíku mohou být dusičnany, aminokyseliny, peptony a bílkoviny. Někdy mohou využívat též jako zdroj dusíku močovinu.

Nedílnou součástí výživy tvoří minerální látky potřebné pro některé stavební složky buňky nebo pro katalýzu určitých reakcí. Mezi hlavní potřebné minerální látky patří síra a fosfor (Kocur, 1981).

2.6. Bakteriální osídlení lidského těla

V prenatálním období je tělo člověka zcela bez mikrobiálních organismů. Po narození začnou tělo postupně osidlovat mikroby. Na pokožce se vytvoří tzv. biofilm, který pokryje celé tělo. Biofilm se skládá především z řad aerobních bakterií, jako jsou stafylokoky, mikrokoky, sarciny a další. V kožních záhybech je flóra bohatší díky vlhčímu prostředí a většímu množství živin (Julák, 2006). Bakteriální rozklad těchto živin způsobuje zápach, který je velmi dobře znám (Kocur, 1981). Co se týče vrstev pokožky, největší množství bakterií osídluje vlasové folikuly (Julák, 2006).

Další velmi pestře osídlenou částí těla je ústní dutina. Zde se nachází až 10^{11} bakterií na 1 gram tkáně (Julák, 2006). Na povrchu se nacházejí zejména aerobní streptokoky, neisserie, korynbakteria, pod povrchem naopak anaerobní aktinomycety, nesporulující gram pozitivní a gram negativní koky a tyčinky. Jsou zde i bakterie *Streptococcus mutans* a *Streptococcus sobrinus*, které způsobují tvorbu zubního kazu.

Od hltanu směrem k dýchacím cestám začíná bakterií postupně ubývat. Dolní cesty dýchací už jsou za normálních okolností zcela sterilní stejně jako krevní řečiště. V

případě, že se do krve bakterie dostanou, jsou co nejrychleji eliminovány imunitním systémem.

Další částí lidského těla bohatou na bakterie je zažívací trakt. Zde se nachází řada symbiotických bakterií, které pomáhají trávit řadu důležitých látek. V žaludku, kvůli kyselému pH, jsou schopny přežít pouze stafylokoky a laktobacily, které mají schopnost okolní prostředí neutralizovat. Největší množství bakterií se nachází v tlustém střevě. Majoritně je zde zastoupeno 30 - 40 druhů, minoritně 400 - 500. V 1 gramu tkáně se zde nachází 10^{10} bakterií, tedy o něco méně než v ústní dutině (Julák, 2006). U novorozenců je tlusté střevo osídlováno nejprve laktobacily, enterokoky a *Escherichia coli*, poté bakteroidy a dalšími anaeroby. Rychlost osídlení úzce souvisí se způsobem výživy. Některé střevní bakterie jsou potenciálními patogeny. Střevo je ale uzpůsobeno tak, že je proti produkovaným toxinům imunní.

Do mikrobiologicky zajímavých oblastí též patří ženský trakt. V průběhu života se v něm mikrobiologické osídlení mění. Za celý život se zde vystřídají laktobacily, řady anaerobních bakterií, korynebakterií, stafylokoků a streptokoků.

Jak je vidět, lidský organismus obývá opravdu velké množství bakterií. Pokud bychom všechny bakterie zvážili, vážily by 1 - 1,5 kg (Julák, 2006).

2.7. Pěstování bakterií in vitro

Bakterie jsou velkým předmětem výzkumu. Abychom mohli bakterie dobře zkoumat, je nezbytné je uměle vypěstovat. K tomu se využívají kultivační půdy, které musí obsahovat živiny potřebné pro výživu bakterií. Každý druh potřebuje ke svému růstu optimální fyzikální podmínky, takže kromě živin je důležité přizpůsobit teplotu, složení atmosféry a další fyzikální faktory. Například pro pěstování lékařsky významných bakterií se kultivační média vkládají do termostatů, kde je nastavena teplota 37° C (Votava, 2010a). Podmínkou kultivačního média je jeho sterilita (Votava, 2010b).

2.8. Kultivační média

Kultivační média můžeme podle složení rozdělit do dvou základních skupin – přirozené a syntetické. Pro půdy přirozené je základním médiem živný bujon, který není chemicky definován. Naproti tomu u syntetických médií přesně známe chemické složení (Votava, 2010a).

Kultivační média mohou mít též různou konzistenci. Buďto jsou pevná díky ztužení pomocí agaru nebo tekutá, kdy hlavní složku tvoří peptonová voda (Votava, 2010a).

Tekuté půdy se skladují v silnostěnných zkumavkách. Výhoda těchto médií je snadný přísun živin pro pěstované bakterie. Naopak nevýhodou těchto médií je špatná orientace v napěstovaných bakteriích. Růst se zpravidla projeví zakalením zkumavky, málokdy sedimentem nebo blankou. (Votava, 2010a)

Jak je již výše uvedeno, tuhé půdy jsou ztužovány agarem. Agar obsahuje směs polysacharidů, agarosy a agaropektinu extrahovaných z rudých mořských řas. Při přípravě agarové půdy se agar nejdříve rozpustí při teplotě 85° C, kdy dojde zároveň ke sterilizaci, a následně se roztok přelije do Petriho misky, kde agar ztuhne. Občas se využívají i zkumavky, kde se agar ponechá v šikmé poloze. Velkou výhodou agarových půd je možnost pěstování jednotlivých bakteriálních kolonií. Vypěstované kolonie vidíme na médiu pouhým okem, kdy se od sebe mohou lišit barvou, tvarem, konzistencí, velikostí a dalšími vlastnostmi. Zároveň od sebe můžeme kolonie izolovat rozočkováním na další kultivační média (Votava, 2010a).

Dále můžeme kultivační média rozdělit podle složení na základní, obohacené, selektivní, diagnostické, k anaerobní kultivaci, k antibiotickým zkouškám, ke stanovení účinných látek, k uchování kultur a transparentní.

Základní půdy obsahují pouze základní složky. Tekutá média obsahují živný bujon a peptonovou vodu, pevná média obsahují živný agar připravený rozvařením 1,5 procentního suchého agaru v živném bujonu. Živný bujon je vlastně masový extrakt s přidavkem bílkovinných štěpů, tzv. peptonu. Tento typ agaru slouží k namnožení nenáročných druhů bakterií. Peptonová voda je složena z 1,5% peptonu, vody a 0,5% kuchyňské soli. Mezi základní typy půd patří masopeptonový agar (Votava, 2010b).

Obohacené agary obsahují další živné složky. Používají se pro náročnější bakterie. Základy tohoto bujónu se připravují z kvalitnějších extraktů – mozkosrdcové infuze a obohacují se bílkovinnými koncentráty. Dále obsahují vitamíny, případně další speciální peptony. Jedním z běžných obohacujících látek těchto agarů je krev (Votava, 2010a).

Na selektivních půdách můžeme vypěstovat pouze určité druhy bakterií. Tyto půdy vždy obsahují nějaký inhibitor, který umožní růst pouze některých druhů bakterií (Votava, 2010a).

Pro zjištění citlivosti bakterií na antibiotika se používají speciální typy půd. Nejběžnější typ takovéto půdy se nazývá Müller-Hintonové. Na rozdíl od základních typů půd zde nemůžeme použít pepton, protože by bránil difuzi antibiotika. Hlavní živnou složku zde tedy tvoří škrob. Škrob zároveň chrání bakterie proti vlastním toxickým metabolitům a umožňuje růst velmi malého inokula (Votava, 2010b).

Při přípravě půd je velmi důležité dbát na sterilitu a kalibraci přístrojů. Komerčně dodávané Petriho misky a další plasty jsou sterilizované už od výrobce. Ke sterilizaci se používá kyselina peroctová nebo plazmatický výboj ve vakuu (Votava, 2010b).

2.9. Kultivace bakterií

Připravenou Petriho misku s živnou půdou lze naočkovat bakteriemi. Vždy se musí očkovat přísně asepticky, aby nedošlo k přenosu nežádoucích mikrobů. K naočkování bakterií je vhodné použít navlhčené vatové tyčinky. Půdy se dobře očkují navlhčenou vatovou tyčinkou kontaminovanou požadovanými mikroby. Povrch agarů se lehkým klikatým tahem potře mikroby z vatové tyčinky. Při očkování půd je třeba zabránit nadbytečné kontaminaci, proto se vždy víčko Petriho misky pouze nadzvedne a přidržuje těsně nad miskou. Po naočkování se miska musí ihned uzavřít a uskladnit dle požadovaných podmínek pěstovaného mikroba. Růst méně náročných mikrobů trvá při laboratorní teplotě zpravidla několik dní, maximálně týden (Votava, 2010b).

Po nárůstu kolonie bakterií na Petriho misce je možné izolovat jednotlivé druhy. Opět je třeba dbát na přísnou sterilitu prostředí a pomůcek. Při izolaci bakteriální

kolonie se opět nadzvedne víčko Petriho misky napěstovaných bakterií, vyžíhanou a vychladlou mikrobiologickou kličkou se setře jeden druh bakteriální kolonie a přeneše lehkým klikatým tahem na čistou Petriho misku. Je nutné mikrobiologickou kličku opět vyžíhat v plameni a zbavit ji tak bakterií. Nově naočkované mikroby je se musí skladovat v optimálních podmínkách pro jejich růst několik dní, maximálně týden (Votava, 2010b).

2.10. Vzhled mikrobiálních kolonií a bližší určení druhu mikroorganismu

Napěstované mikrobiální kolonie na agarových půdách jsou jasně zřetelné a lze je přibližně charakterizovat. Na jednotlivých koloniích můžeme definovat morfologické znaky jako je velikost, tvar kolonie, okraje, povrch a barva. Pro bližší identifikaci mikroba často napovídá druh kultivačního média, na kterém je bakterie vypěstovaná. Některé půdy jsou přímo určené k identifikaci mikrobů. Mohou obsahovat indikátory, které mění barvu na základě změny podmínek v okolí. K další identifikaci mikrobů slouží samozřejmě podmínky, ve kterých jsou mikroby napěstovány, a řada biochemických testů (Kootallur a kol., 2011).

2.11. Přežívání a usmrcování mikrobů

Některé mikroby jsou pro nás užitečné, ale proti některým musíme sami sebe a naše okolí chránit. Jelikož každý organismus potřebuje pro svůj růst optimální podmínky, můžeme tyto podmínky přizpůsobit tak, aby bylo v růstu a v množení mikroorganismů zabráněno. Zabránit rozšíření mikroorganismů lze řadou způsobů. Buďto můžeme přerušit šíření mikroorganismu pomocí dezinfekčních přípravků – chemicky nebo růst mikroba zcela eliminovat, takovému způsobu pak říkáme sterilizace. Dezinfekční látky mohou mikroby ničit mnoha způsoby, jako je například porušení tvorby bílkovin nebo narušení buněčné stěny. Při sterilizaci dochází k úplnému usmrcení všech organismů. Takového výsledku můžeme dosáhnout například vysokou teplotou – 160 – 180° C, přímým vyžíháním v plameni nebo UV zářením. Pokud začne na mikroby působit dezinfekční látka nebo se vyskytnou v nevhodných podmínkách, postupně se přestanou

množit a naopak začnou odumírat. Odumírání probíhá dle logaritmické křivky. Počet usmrcených buněk závisí na intenzitě působícího činitele a na expoziční době. Čím intenzivnější je činitel, tím více buněk je usmrceno.

3. Antibakteriální látky

Antibakteriálními látkami nazýváme takové látky, které mají bakteriostatický nebo baktericidní účinek na bakterie. Řada z nich je mikrobiálního původu a nazývají se tak antibiotika. Mezi organismy produkující antibakteriální látky patří především plísně. Nejčastěji jsou to produkty půdních mikroorganismů. Antibiotika byla objevena za dob 2. světové války. Díky objevení penicilinu Alexandrem Flemingem došlo následně k velkému rozvoji řady antibiotik. V současné době je na trhu přes 150 druhů antibiotik. Aby bylo antibiotikum vhodné pro léčbu bakteriálních onemocnění, nesmí poškozovat eukaryotní buňku. Zároveň musí mít antibiotikum takovou účinnost, aby jej bylo možné používat v nízkých koncentracích (mg/l). Mnoho antibiotik je v dnešní době připravováno synteticky. Základní dělení antibiotik spočívá v rozdělení dle chemické struktury. Antibiotika lze též dělit dle spektra účinku, cílového mikrobiálního druhu a farmakologického účinku. Klasifikace antibiotik dle chemické struktury je uvedena níže.

Ostatní antibakteriální látky, které nejsou živého původu, nazýváme chemoterapeutika. Chemoterapeutika se vyrábí synteticky. Antibakteriální látky využívané v lékařství musí dosahovat takové míry toxicity, aby zabíjely nežádoucí mikroby, ale zároveň aby nepoškozovaly živou tkáň. Často se tohoto účinku dosahuje optimální mírou koncentrace. Některé antibakteriální látky růst bakterií pouze zastavují, mají takzvaný bakteriostatický účinek, zatímco některé bakterie přímo zabíjejí – látky baktericidní. Řada těchto látek má schopnost poškozovat cytoplazmatickou membránu, inhibovat růst bakteriální stěny, inhibovat proteosyntézu nebo tvorbu nukleových kyselin. Látky, které hrubým zásahem ničí živou hmotu, nazýváme dezinfekce. Jsou využívány především k usmrcení mikroorganismů na předmětech. Látky k usmrcení mikroorganismů na živé tkáni nazýváme antiseptika. Antiseptika na rozdíl od antibiotik působí většinou nespecificky na většinu mikrobů. Jejich účinek se dostavuje během minut až hodin (Votava, 2010a). Oproti klasickým dezinfekčním látkám jsou méně koncentrované a navíc jsou šetrné k pokožce. Antiseptika dle chemického složení dělíme do několika skupin – alkoholová antiseptika, antiseptika obsahující halové

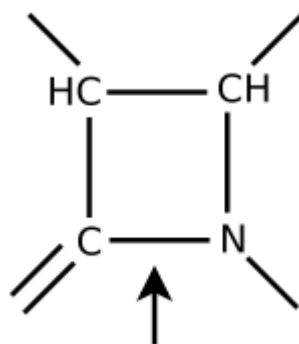
prvky, fenolová antiseptika, antiseptika obsahující oxidující látky, mýdlové roztoky kresolů a detergencia (Hynie, 2003). Přehled základních desinfekčních prostředků je uveden v následujícím textu.

3.1. Přehled antibiotik

3.1.1. β -laktamy

Tato velká skupina antibiotik zahrnuje peniciliny a cefalosporiny. Jejich společným strukturním znakem je β -laktamový kruh. Podle typu molekuly, která je na tento kruh navázána, se β -laktamy od sebe liší. V případě penicilinů je na β -laktamový kruh napojena pětiuhlíkatá cyklická sloučenina obsahující atom síry. Peniciliny mají velmi vysokou účinnost a zároveň velmi nízkou toxicitu k eukaryotním buňkám. Získávají se z kultury *Penicillium chrysogenum*. Cefalosporiny jsou strukturně podobné penicilinům, rozdíl je v tom, že místo pěti uhlíkatého kruhu je na β -laktamový řetězec napojen šesti uhlíkatý kruh. Jejich způsob poškození bakterií spočívá v inhibici tvorby bakteriální stěny. Vážou se na enzymy účastnící se tvorby peptidových a glycinových můstků spojujících řetězce střídajících se molekul N-acetylglukosaminu a kyseliny N-acetylmuramové. Důsledkem celého procesu je inhibice růstu bakteriální stěny a rozpad bakteriální buňky. Tyto látky se rychle vylučují močí, proto je jejich podání poměrně časté (každých 6 – 8 hodin). Neúčinkují na mykobakterie, vzhledem k tomu, že mají pro β -laktamy nepropustnou stěnu, dále na mykoplazmata, která nemají bakteriální stěnu vůbec, a na intracelulární bakterie, k nimž je špatný přístup.

Bakterie vůči β -laktamům mohou podléhat rezistenci. Nejčastěji tvoří enzym β -laktamáza, který štěpí β -laktamový kruh a antibiotikum tak ztrácí své účinky. Dále jsou schopné blokovat průnik β -laktamů skrze póry zevní membrány nebo syntetizovat modifikované enzymy, které jsou schopné tvorby bakteriální stěny, nebo přijetím genu kódujícího enzym, který má k β -laktamům velmi nízkou afinitu (Votava, 2010a).



Obrázek 2 - β -laktamový kruh³

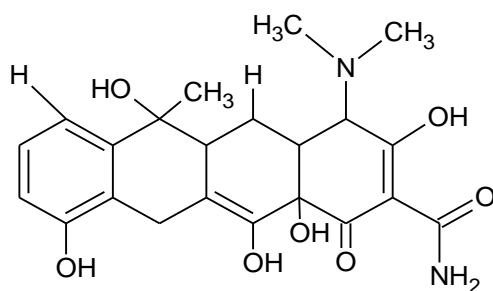
3.1.2. Tetracykliny

Další skupinu antibiotik představují tetracykliny. Molekuly tetracyklinů vždy obsahují čtyři šestičlenné kondenzované cykly. Všechny tetracykliny inhibují tvorbu proteinů tím, že brání vazbě komplexu tRNA na příslušné místo ribozomu. Eukaryotní buňky k této vazbě však nejsou citlivé, proto se tyto látky dají využívat v léčbě bakteriálních onemocnění. Tetracykliny mají široké spektrum účinnosti. Působí na mykoplazmata, chlamydie, rickettsie, spirochety, aktinomycety a některé prvoky.

V dnešní době je však většina bakterií na tetracykliny rezistentní. Cytoplazmatická membrána bakterií se uzpůsobila tak, aby byla pro tetracykliny nepropustná, ribozomy mohou být chráněny proti tetracyklinům nebo jsou tetracykliny z buňky ihned vyloučeny. Geny způsobující rezistenci jsou předávány transpozony.

U tetracyklinů jsou časté vedlejší účinky, které postihují gastrointestinální trakt. Přímo účinkují na sliznici a způsobují přemnožení mikroorganismů střevní mikroflóry. Tento typ antibiotika způsobuje žloutnutí zubů a nepříznivě ovlivňuje tvorbu kostí, proto se nesmí podávat těhotným ženám a dětem do 8 let (Votava, 2010a).

³ Zdroj: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:%CE%92-laktamov%C3%BD_kruh.png



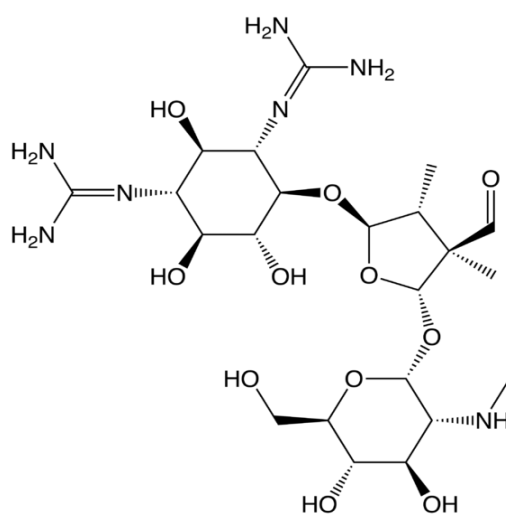
Obrázek 3 Molekula tetracyklinu

3.1.3. Aminoglykosidy

Již z názvu antibiotika vyplývá, že se jedná o cukerné látky. Molekula aminoglykosidů se skládá většinou z trisacharidu a aminocukrů.

Aminoglykosidy opět inhibují proteosyntézu. Brání vzniku iniciačních komplexů, které vedou k tvorbě proteinů. Působí hlavně na aerobní gramnegativní bakterie, dále na stafylokoky a některé mykobakterie. Často se používají společně s β -laktamy. Jelikož se tato antibiotika nevstřebávají ze střeva, musí se podávat parenterálně. Aminoglykosidy se vylučují pouze močí a při vyšších dávkách mohou poškozovat ledviny, proto nejsou vhodné pro pacienty s poruchami ledvin. Mimo jiné jsou i neurotoxické a mohou způsobovat poškození sluchu vedoucí až ke hluchotě.

I na aminoglykosidy mohou být bakterie rezistentní. Tato rezistence může být přirozená, kdy má antibiotikum špatný přístup do buňky, nebo získaná spočívající ve tvorbě enzymů, které inaktivují účinek aminoglykosidu. Geny tvořící tyto enzymy se mohou přenášet pomocí plazmidů, transpozomů nebo integronů (Votava, 2010a).



Obrázek 4 Streptomycin - příklad aminoglykosidu⁴

3.1.4. Makrolidy

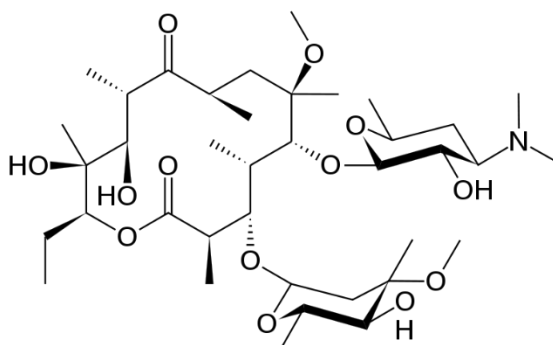
Makrolidy jsou makrocyclické laktony. Molekula se skládá z 14 – 16 členného kruhu, na který jsou napojeny většinou dva cukry.

Jejich antibiotický účinek spočívá v inhibici proteosyntézy. Vážou se na rRNA a po vzniku peptidické vazby brání uvolnění tRNA.

Makrolidy I. generace – *Erythromycin* působí na obdobné bakterie jako penicilin. Působí hlavně na grampozitivní bakterie, gramnegativní koky a gramnegativní spirochety. Podání je většinou perorální. Vylučuje se žlučí. Vedlejší účinky postihují trávicí soustavu, často se dostavuje zvracení. Toto antibiotikum není dobré kombinovat s jinými léky. V případě kombinace s β -laktamy dochází k inaktivaci antibiotika, protože vzájemně působí antagonisticky.

K rezistenci dochází tím způsobem, že rRNA zablokuje vazbu místa makrolidu navázáním methylové skupiny. Tuto vazbu způsobuje enzym methyláza. Gen, který ho kóduje, je přenášen plazmidy nebo transpozomy. Mezi makrolidy patří jedno z nejméně toxických antibiotik – *Spiramycin* (Votava, 2010a).

⁴ Zdroj: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Streptomycin.png>



Obrázek 5 Clarithromycin - příklad makrolidu⁵

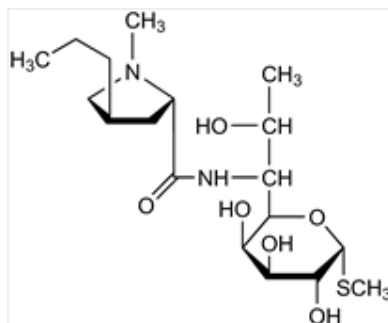
3.1.5. Linkosamidy

Tato antibiotika získala název od produkčního kmene *Streptomyces lincolnensis*. Z chemického hlediska jsou odvozeny od aminokyseliny prolinu substituovaného amidy a aminocukrem thiolinkosaminem.

Linkosamidy působí bakteriostaticky, váží se na ribozomy – brání vzniku peptidické vazby v proteinech. V savčích buňkách se na ribozomy vázat nedovedou.

Působí na grampozitivní bakterie včetně penicilinrezistentních stafylokoků. Mají velmi nízkou toxicitu. Nežádoucí účinky se objevují v místě aplikace. Antibiotikum velmi dobře proniká do kostní tkáně.

Rezistence je opět možná methylací specifického místa v molekule rRNA stejně jako u erythromycinu (Votava, 2010a).



Obrázek 6 Linkomycin - příklad linkosamidu⁶

⁵ Zdroj: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Makrolidy>

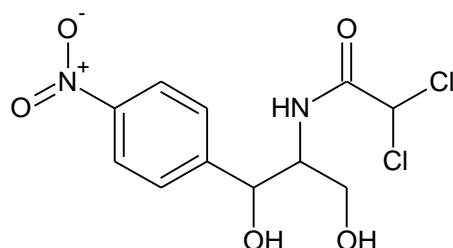
3.1.6. Amfenikoly

Z této skupiny antibiotik je jediným typem *chloramfenykol*. Molekula obsahuje dva atomy chlóru a nitrobenzenové jádro.

Mechanismus účinku opět spočívá v zabránění vzniku peptidické vazby. Přímou blokuje působení peptidyltransferázy. Na bakteriální proteiny účinkuje selektivně.

Co se týče spektra účinku, působí na aerobní i anaerobní grampozitivní i gramnegativní bakterie, mykoplasmata, rickettsie a chlamydie. Dobře proniká do tkání a do mozkomíšního moku a zasahuje též intracelulárně. Jejich toxicita je relativně vysoká, a proto je chloramfenikol méně často používaným antibiotikem. Používá se pouze u závažných infekcí jako je hemofilová seps, meningitidy, břišního tyfu a nitrooční infekce.

I u těchto antibiotik je známá rezistence. Existují geny, které modifikují acetyltransferázu a chloramfenikol inaktivují. Gen je možné přenášet pomocí plazmidu (Votava, 2010a).



Obrázek 7 Molekula chloramfenykolů

3.1.7. Polypeptidová antibiotika

Z názvu vyplývá přítomnost polypeptidová struktura. Tato antibiotika jsou tvořena rozvětvenými cyklickými polypeptidy. Nejpoužívanější jsou polymyxiny, které produkuje rod *Bacillus polymyxa*.

⁶ Zdroj: <https://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/2009/CLK0946C001.png>

Antibiotický účinek je způsoben rozrušováním fosfolipidové vrstvy cytoplazmatické membrány bakteriální buňky.

Působí pouze na gramnegativní bakterie. Často se používá k léčbě močových infekcí. Při vyšších dávkách mohou být nefrotoxické. Podání je většinou injekční. Používá se i k lokálním výplachům (Votava, 2010a).

3.1.8. Glykopeptidová antibiotika

Glykopeptidy jsou bílkovinné sloučeniny s navázanou cukernou složkou. Glykopeptidy zasahují do syntézy bakteriální stěny. Zabraňují zesíťování se peptidoglykanu tím, že se navážou na D-alanyl-D-alanin. Tato antibiotika působí baktericidně. Podání je parenterální. Nejvíce používaný glykopeptid je *vankomycin* izolovaný ze *Streptomyces orientalis*. Působí pouze na některé grampozitivní bakterie a spirochety. Do ostatních bakterií se tak velká molekula nedostane. Výhodou vankomycinu je, že působí na některé často k ostatním antibiotikům rezistentní kmeny.

Vankomycin vykazuje značnou míru toxicity. Působí na uši, ledviny a centrální nervovou soustavu.

I u těchto antibiotik je známa rezistence. Je způsobená syntézou D-laktátu místo D-alaninu, na který se vankomycin může vázat (Votava, 2010a).

3.1.9. Ansamycinová antibiotika

Ansamycinová antibiotika jsou složena z aromatických kruhů. Selektivně se vážou na RNA-polymerázu a blokují tak syntézu mRNA. Tímto mechanismem působí baktericidně.

Působí na stafylokoky, většinu enterokoků, kromě bakterií působí i na některé viry a prvoky. Podání je orální, dobře proniká do tkání a vylučuje se žlučí. Využívají se při léčbě kontaminovaných umělohmotných implantátů. Rychle vzniká rezistence, a proto je nutná kombinace s jinými antibiotiky.

Přirozená rezistence je dána nedostatečným průnikem do buňky. Získaná rezistence vzniká modifikací enzymu RNA-polymerázy, který není schopný antibiotikum navázat (Votava, 2010a).

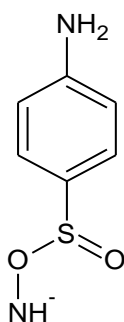
3.1.10. Sulfonamidy a pyrimidiny

Struktura molekul těchto antibiotik se skládá z pyrimidinových bází nebo z benzenového jádra, na které se váží aminoskupiny společně s atomem síry. Antibakteriální účinek spočívá v kompetitivní inhibici vazebného místa enzymu, který katalyzuje reakci, která vede k syntéze kyseliny tetrahydrofolové. Přítomnost kyseliny je nutná k syntéze purinových a pyrimidinových bází a tudíž i k syntéze nukleových kyselin. Vazbou antibiotika je však tato syntéza znemožněna.

Působí na streptokoky, stafylokoky, klostridia a nokardie. U gramnegativních bakterií působí na legionely a chlamydie. Účinek je bakteriostatický.

Vedlejší účinky jsou časté, ale mají mírný průběh. Rezistence vzniká syntézou nového enzymu, který molekulu antibiotika neváže. Gen se přenáší pomocí plazmidu.

V dnešní době se samotné sulfonamidy nepodávají. Mohou se používat k lokální léčbě v dermatovenerologii, oftalmologii a otorinolaryngologii (Votava, 2010a).



Obrázek 8 Základní struktura molekuly sulfonamidů

3.1.11. Nitroimidazoly a nitrofurany

Jedná se o antibiotika obsahující nitrosloučeniny s cyklickými kruhy. Po vstupu do buňky jsou redukovány na metabolity, které poškozují DNA. Jsou účinné pouze na anaerobní bakterie, které jsou schopné antibiotikum redukovat. Působí baktericidně.

Působí na anaerobní bakterie. Společně v kombinaci s dalšími antibiotiky se používají na léčbu infekcí břicha a měkkých tkání, dále k profylaxi infekcí ran při chirurgických výkonech a léčbě onemocnění způsobených některými prvoky.

Vedlejší účinky mohou být neuropatické (Votava, 2010a).

3.1.12. Chinolony

Tato antibiotika jsou vyráběna synteticky. Molekuly chinolonů obsahují aromatická jádra s navázaným karboxylem.

Působí na DNA-gyrasu, která odpovídá za štěpení a opětné spojování řetězce DNA při replikaci DNA. Účinek je baktericidní. Působí hlavně na enterobakterie.

Používají se při léčbě močových infekcí (Votava, 2010a).

3.2. Přehled antiseptických látek

3.1.13. Antibakteriální účinek halogenů

Halogeny patří mezi dobrá antiseptika především díky svým dobrým oxidačním schopnostem. Při oxidaci bílkovin v buňce patogenu dochází k jejich denaturaci a následně k usmrcení patogenu (Zhi-Bin a kol., 2015).

3.1.13.1. Antibakteriální účinek jódu

Nejvyšší antibakteriální účinky jsou u jódu prokázány při poměru 1:20 000 (jod + voda) (Hynie, 2003). Při uvedené koncentraci dokáže bakterie usmrtit do 1 minuty a

spory do 15 minut. Díky své relativně malé tkáňové toxicitě se jód používá jako běžné antiseptikum v mnoha dezinfekcích. Nalezneme ho například v Betadině ve formě komplexu polyvinylpyrrolidonu s jodem pod triviálním názvem *polyvidon-jod*, stejně tak v antiseptiku jménem Jodisol. Antibakteriální účinek povidon-jodu je nesporně prokázán. Účinek byl například studován při sterilizaci transplantovaných orgánů (Zhao a kol., 2015) V této formě je vhodný i pro léčbu hnisavých zánětů kůže, bércových vředů a dalších kožních onemocnění (Pohl-Markl a Neumann, 1988). Mezi další známá antiseptika patří jodová tinktura, kde se jód nachází ve formě lihového roztoku. V roztoku je 6,5 % volného jódu a 2,5 % jodidu draselného (Hynie, 2003). Jedná se o širokospektrální antiseptikum, které oxiduje aktivní geny pro tvorbu bílkovin v cytosolu patogenu. Dochází zde k denuraci bílkovin a tím je patogen úspěšně zničen (Zhi-Bin, Jin-Tian, Tun, Xu a Qing-Guo, 2015).

3.1.13.2. Antibakteriální účinek chlóru

Chlór slouží jako vhodná dezinfekce na očištění předmětů. Jakožto antiseptikum jej používáme zásadně z organických sloučenin, které chlór uvolňují pomalu, aby nedošlo k podráždění pokožky. Vhodné sloučeniny jsou například chloraminy. Antibakteriální účinek lze zvýšit přidáním kvartérní amoniové soli (Rahma a kol., 2015) Antibakteriální účinek je nejlepší při koncentraci 0,5 – 1 %, pro dezinfekci kůže je nejvhodnější koncentrace 0,1 – 0,3 %. Roztoky chloraminů se používají k výplachům ve stomatologii a k ošetření ran (Hynie, 2003).

Chlór nalezneme například v dezinfekci jménem Phyteneo neocide spray. Je zde ve formě octenidin dichloridu, který má velmi nízkou tkáňovou toxicitu. Je vhodnou dezinfekcí i pro novorozené děti a zároveň má dobré baktericidní účinky (Dettenkofer a kol., 2010).

Další používanou dezinfekcí je Eosin dezinfekční sprej. Hlavní antibakteriální látkou je zde methylchloroisothiazolinon. Při testech citlivosti na pokožku však bylo zjištěno, že je mírně dráždivý (Jensen a kol., 2006).

Naopak benzalkonium chlorid je k pokožce šetrný a zároveň má dobré antiseptické účinky proti velké řadě bakterií (Popelka a kol., 2015).

3.1.14. Genciánová violet'

Genciánová violet' je velmi významná látka pro své užitečné vlastnosti. Z chemického hlediska se jedná o organickou sloučeninu skládající se ze tří cyklických šestiuhlíkatých řetězců obsahujících aminoskupinu, dva atomy dusíku a atom chloru. Syntéza genciánové violeti byla objevena francouzským chemikem Charlesem Lauthem v roce 1861. Roku 1884 Hans Gram zjistil, že určité druhy bakterií jsou schopné na sebe tuto violet' ireverzibilně navázat. Díky této vlastnosti byly bakterie rozděleny na grampozitivní a gramnegativní. O několik let později se genciánová violet' začala používat jako antiseptikum. Toto irokospektrální antiseptikum působí především na grampozitivní bakterie, méně pak na gramnegativní. Violet' je schopna proniknout buněčnou stěnou grampozitivních bakterií a kovalentně se tak navázat na buněčné proteiny. Mechanismus účinku je bohužel neznámý. První polovinu 20. století byla hojně využívána na různé druhy infekčních i kožních onemocnění či zranění. Další výhodou je její šetrnost k pokožce. Po objevu antibiotik se dostala na ústup. V dnešní době je genciánová violet' stále hojně využívána díky svým antibakteriálním, antimykotickým, anthelmintickým, antiangiogenním a protirakovinným vlastnostem, které se stále zkoumají (Maley a Arbiser, 2013).

3.1.15. Antibakteriální účinek oxidujících látek

Antibakteriální účinek oxidujících látek je podobný jako u halogenidů, jelikož všechny tyto sloučeniny mají vysoké oxidační schopnosti. Odštěpený atomární kyslík narušuje molekulární vazby a tím pravděpodobně inaktivuje enzymy (Votava, 2010a). Oxidační činidla jsou velmi univerzální antibakteriální látkou. Působí na bakterie, spory i na neobalené viry (Votava, 2010a).

3.1.15.1. Peroxid vodíku

Mezi silná oxidační činidla řadíme peroxid vodíku, který působením tkáňových kataláz uvolňuje kyslík. Během uvolňování kyslíku vzniká hojná pěna, která napomáhá vyčistit povrch rány. Peroxid vodíku ničí především anaerobní bakterie (Brudzynski, 2006; Hynie, 2003). V přítomnosti organických látek se snadno rozkládá na vodu a molekulární kyslík. Tento typ dezinfekce je šetrný k životnímu prostředí, ale nemá až tak velké dezinfekční účinky, protože molekulární kyslík pouze dokáže pomocí bublinek vyplavit nečistoty z rány (Votava, 2010a).

3.1.16. Antibakteriální účinek alkoholů a fenolů

Řada alkoholů dokáže denaturovat bakteriální bílkoviny, jejímž důsledkem je usmrcení mikroorganismů. V případě použití etanolu dosáhneme nejvyššího účinku při 70% koncentraci. Pokud je ethanol koncentrovaný, mikroby spíše konzervuje (Votava, 2010a). Umí působit pouze na bakterie, na spory nikoli. Dalšími vhodnými antiseptickými alkoholy jsou izopropylalkohol, ethylenglykol a noxytiolin. Nyxotiolin působí pomalým uvolňováním formaldehydu a využívá se především k výplachům příštětí, močového měchýře a k ošetření spálenin (Hynie, 2003). Nejčastěji používaným alkoholem mezi dezinfekcemi je ethanol. Používá se do řady dezinfekcí jako je Ajatin, Jodisol, Septonex nebo Tantum verde.

4. Metody stanovení citlivosti bakterií na antibiotika

Velmi častou činností mikrobiologických laboratoří je právě testování citlivosti bakterií na danou antibakteriální látku. Nejčastější metodou testování je tzv. disková difúzní metoda. Provádí se na pevných agarových médiích s naočkovanými bakteriemi. Aby byl test co nejpřesnější, musí být bakterie na agar naočkovány rovnoměrně. Toho docílíme vytvořením suspenze bakterií ve fyziologickém roztoku a rovnoměrným politím agarové plotny. Koncentrace bakterií by měla být 10^6 buněk na 1 ml roztoku. K rovnoměrnému pokrytí agaru roztokem si můžeme pomoci mikrobiologickou hokejkou, kterou můžeme tekutinu po agaru rozetřít. Přebytečnou tekutinu musíme z agaru vždy odsát. Pro testování antibiotik se používají papírové disky nasycené antibiotikem. Kladou se na agarovou půdu rovnoměrně do kruhu, kdy na jednu agarovou půdu může být položeno maximálně 6 antibiotických disků. Díky nasátí vody na disk z agaru se začne antibiotikum z disku uvolňovat a difundovat do okolí. Antibiotikum tak začne přímo účinkovat na bakterie a začne jejich růst inhibovat. Na médiu jsou poté zřetelné kruhové zóny zábrany růstu kolem disků, tzv. inhibiční zóny, a dle jejich velikosti je patrné, jak dalece je bakterie na určité antibiotikum citlivá (Votava, 2010b). Velikost inhibiční zóny také závisí na difuzi antibiotika, která záleží na molekulové hmotnosti a elektrickém náboji antibiotika, koncentraci, viskozitě a kvalitě agaru. Pokud mikroba odstraníme z prostředí, kde je jeho růst potlačen, inhibiční účinek částečně stále pokračuje. Tento jev se nazývá postantibiotický účinek. Může trvat různě dlouho od 120 minut až do 5 hodin. Doba závisí na mikrobiálním druhu. U gramnegativních bakterií s výjimkou karbapenů se tento jev nevyskytuje (Bednář, 1996). V případě testování jiných antibakteriálních látek je možné vytvořit do agaru otvory, kam je následně možné antibakteriální látku nakapat. Pokud je bakterie na danou látku citlivá, opět se kolem otvoru začne tvořit inhibiční zóna. Celý test většinou netrvá déle než 48 hodin (Votava, 2010a).

4.1. Bakteriální rezistence na antibiotika

Často se stává, že je určitá bakteriální kolonie vůči antibiotiku rezistentní (odolná). Tato rezistence může být buďto vrozená nebo získaná. Rezistence vůči antibiotiku je geneticky kódovaná. Gen kódující rezistenci může být obsažen v cyklické molekule DNA nebo v plazmidu. Pokud bakterie rezistenci získá, dojde k tomu díky mutaci. Mutace může způsobit změnu místa vstupu látky do buňky. Látka může být ihned zablokována a do buňky se vůbec nedostane nebo do buňky vnikne, ale následně je opět vyloučena nebo může být enzymaticky inaktivována. Rezistence na dané antibiotikum se mezi bakteriemi snadno šíří díky výměnám plazmidů mezi jednotlivými bakteriemi. Často se též stává, že *in vitro* je bakterie na dané antibiotikum citlivá a reaguje, ale *in vivo* je rezistentní. Takovouto rezistenci pak nazýváme perzistence (Votava, 2010a).

5. Praktická část

Cílem praktické části je ověření možnosti využití modifikované diskové difúzní metody k demonstraci antibakteriálního účinku běžně dostupných dezinfekcí a jejich vzájemné porovnání. Každá dezinfekce obsahuje antibakteriální látky, které se od sebe liší ve způsobu mechanismu účinku a v míře účinnosti. Většina dezinfekcí ničí mechanismus tvorby bílkovin a celou bakterii tak usmrtí.

Bakteriální kolonie byly napěstovány na agarových půdách. Společně s bakteriemi na agarovém médiu vyrostla řada plísní a kvasinek. Vybrané mikrobiální druhy byly izolovány na nové agarové půdy a poté testovány na určené druhy dezinfekcí. Dle velikosti inhibičních zón blokujících růst bakterií na pevném agarovém médiu byla porovnána účinnost jednotlivých druhů dezinfekcí. Všechny fáze kultivace byly fotografovány a jsou přiloženy v příloze.

Jelikož je pokus koncipován tak, aby jej šlo provést i v běžném školním prostředí, jsou zde nepatrně porušeny aseptické podmínky. Po celou dobu pokusu byla dodržována opatření k zabránění kontaminaci, ale nebylo dosaženo takových aseptických podmínek jako v mikrobiologické laboratoři. Jelikož zde jde pouze o porovnání dezinfekcí a nejsou zde přímo měřeny inhibiční zóny pro vědecké účely, možná drobná kontaminace pokus zásadně neovlivnila.

5.1. Vlastní průběh pokusu

Celý pokus byl rozdělen na tři části. Nejprve byla nutná kultivace mikroorganismů. Mikroorganismy byly získány z nejbližšího okolí a naneseny na agarové půdy, kde se díky vhodným podmínkám rozmnožily. Následně byly izolovány čisté kolonie na nové agarové půdy. Po nárůstu čistých kolonií došlo k testování citlivosti kolonie na antibakteriální látky modifikovanou diskovou difúzní metodou. K testu byla vybrána jediná bakteriální kolonie. Dle velikosti inhibičních zón kolem dezinfekce byly zpracovány výsledky.

5.1.1. Naočkování pevných agarových médií

Pevná agarová média byla již předem připravena, a tudíž celý pokus začal naočkováním bakterií. V první fázi bylo naočkováno šest pevných agarových médií, kdy každá polovina Petriho misky byla kontaminována mikroorganismy ze dvou různých míst, přičemž každé dvě Petriho misky byly nakontaminovány stejným způsobem. Všechny Petriho misky byly označeny číslem 1, které značilo první sérii, a za lomítkem příslušným číslem 1 – 6 pro označení konkrétní misky ze série. Každá miska byla navíc rozdělena na dvě části – A a B. Mikroorganismy byly pěstovány na běžném masopeptonovém agaru. Nárůst bakterií díky vyšší teplotě v laboratoři trval 2 dny. Poté byly půdy uschovány do lednice.

Pomůcky:

Petriho misky s masopeptonovým agarem, vatové tyčinky, H₂O, lihový fix

Postup:

Postupně byla každá polovina misky kontaminována z různých míst. V případě kontaminací částí těla byl na agar udělán otisk (prsty a kloub zápěstí) nebo přímo vložen vzorek (část vlasu). Pokud byla kontaminace prováděna stěrem z určitého povrchu, probíhala kontaminace následujícím způsobem: Vatová tyčinka byla ponořena do destilované vody, poté s ní byl potřen povrch požadovaného předmětu a následně potřena část agaru (stěry z kliky, madla lednice a stolu). Takto kontaminované plotny se uzavřely víčkem, otočily dnem vzhůru a byly vloženy do krabice. Díky vyšší teplotě v laboratoři bakteriální kolonie společně s kvasinkami a plísněmi narostly již během dvou dnů. Vzhledem k tomu, že plánovaná izolace čistých kultur probíhala o dalších pět dnů

později, byly plotny uloženy do lednice. Přehled zdrojů mikroorganismů použitých ke kontaminaci je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1 Zdroje mikroorganismů

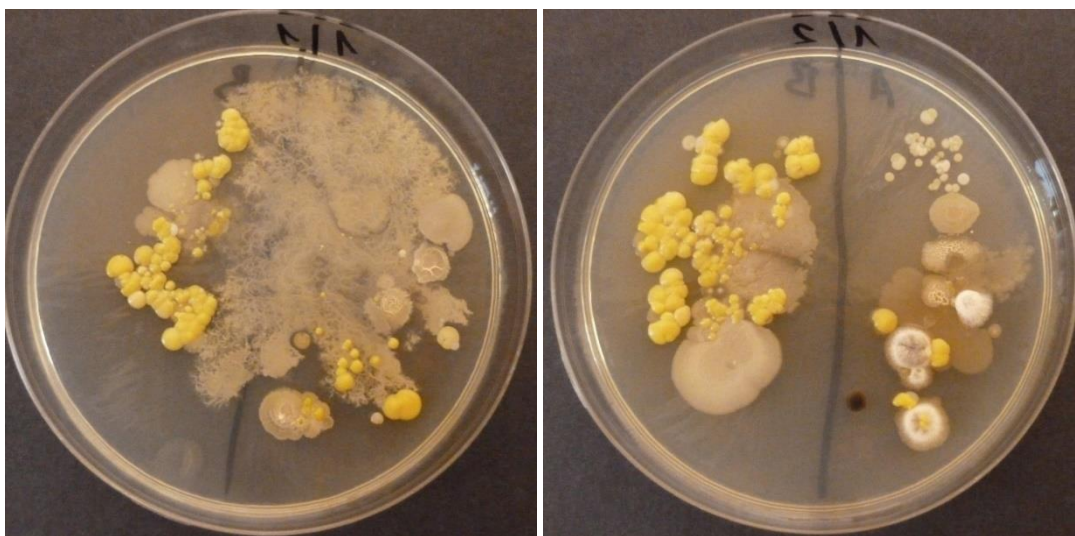
Petriho miska č.	Část A	Část B	Č. mikrobiální kolonie
1/1	otisk prstu	otisk kloubů zápěstí	I
1/2	otisk prstu	otisk kloubů zápěstí	I
1/3	Vlas	stěr z kliky u dveří	II
1/4	Vlas	stěr z kliky u dveří	II
1/5	Stůl	stěr z madla ledničky	III
1/6	Stůl	stěr z madla ledničky	III

Výsledky:

Na pevných agarových půdách vyrostla řada mikroorganismů. Přehled narostlých mikrobiálních kolonií je uveden v tabulce 2. Fotografie jednotlivých kolonií jsou přiloženy pod tabulkou (obr. 9 - 14).

Tabulka 2 Vykultivované mikrobiální kolonie

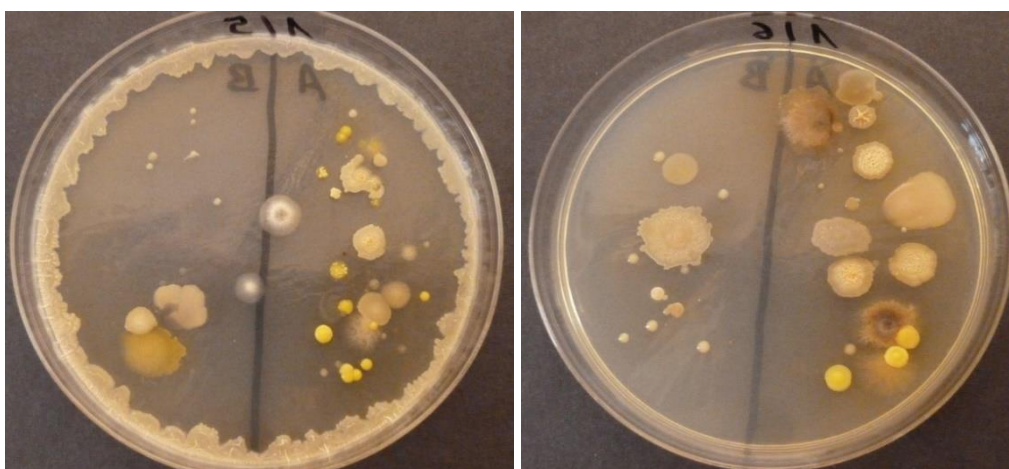
Petriho miska č.	Část A	Část B	Obr. č.
1/1	<ul style="list-style-type: none"> • šedé kvasinky • žluté bakterie • šedobílá bakterie 	<ul style="list-style-type: none"> • šedé kvasinky • žluté bakterie • šedobílé bakterie 	9
1/2	<ul style="list-style-type: none"> • šedé kvasinky • žluté bakterie • šedobílé bakterie • plíseň 	<ul style="list-style-type: none"> • bílé kvasinky • šedobílé kvasinka • žluté bakterie 	10
1/3	<ul style="list-style-type: none"> • krémové bakterie • žluté bakterie 	<ul style="list-style-type: none"> • okrové bakterie • pleťové bakterie 	11
1/4	<ul style="list-style-type: none"> • krémové bakterie • žluté bakterie 	<ul style="list-style-type: none"> • pleťové bakterie • plíseň 	12
1/5	<ul style="list-style-type: none"> • žluté bakterie • bílé bakterie • pleťové bakterie • bílé kvasinky 	<ul style="list-style-type: none"> • pleťové bakterie • žluté kvasinky 	13
1/6	<ul style="list-style-type: none"> • žluté bakterie • bílé kvasinky • pleťové kvasinky • pleťové bakterie • okrové kvasinky 	<ul style="list-style-type: none"> • pleťové bakterie • okrové bakterie • šedobílé kvasinky 	14



Obrázek 9 a 10. - Mikrobiální kolonie I



Obrázek 11 a 12 - Mikrobiální kolonie II



Obrázek 13 a 14 - Mikrobiální kolonie III

Závěr:

Na agarových půdách vyrostla směs různých mikroorganismů. Nejrozsáhlejší skupina mikroorganismů vyrostla na stěru z prstu. Co se týká bakteriálních kolonií, nejlépe se rozrostly žluté kolonie, pravděpodobně díky neoptimálním podmínkám pro pěstování a vysokému obsahu kontaminace při provádění stěru. Společně s bakteriemi vyrostly na médiu i kvasinky. Kvasinky se vyskytly na stěru z ruky a povrchu kliky a madla ledničky, kam mohly být přeneseny právě z ruky. Naopak kolem vlasu kvasinky nikdy nevyrostly. Na stěrech ze stolu a madla ledničky vyrostly netypické bakterie s vystouplými středy, v případě stolu ve tvaru hvězdy a v případě madla ledničky s vystouplým středem. Tyto agarové půdy byly pokryty mikroorganismy relativně málo, díky nízké kontaminaci kliky i madla ledničky.

5.1.2. Přeočkování napěstovaných kolonií (izolace čisté kultury)

Ve druhé fázi byla provedena izolace konkrétních bakteriálních kolonií. Pro izolaci byly vybrány rozrostlejší kolonie většinou s jasně ohraničenými okraji nebo zajímavější druhy bakterií. V případě stěru z prstu, kloubu zápěstí a madla ledničky byly též izolovány kvasinky. Z každého druhu stěru byly vždy izolovány tři druhy kolonií.

Pomůcky:

6 Petriho misek s masopeptonovým agarem, plastové mikrobiologické kličky, nakultivované plotny, lihový fix

Postup:

Nové Petriho misky s masopeptonovým agarem byly rozděleny lihovým fixem na tři části a označeny příslušnými čísly (série 2, číslo misky 1 – 6, část A, B nebo C). Napěstované kolonie z jednotlivých stěrů byly velmi pestré a z každého druhu stěru vyrostlo vždy několik druhů bakterií, občas společně s kvasinkami a plísněmi. Díky této pestrosti bylo možné z každého druhu stěru izolovat vždy tři druhy mikrobů. Mikroby byly z každého stěru vybírány tak, aby byly dostatečně velké, ucelené a jistým

způsobem zajímavé (viz tab. 3). Morfologie vybraných mikroorganismů k přeočkování je uvedena v tabulce 4. Samotné přeočkování bylo prováděno pomocí mikrobiologické kličky tím způsobem, že nejdříve byla kolonie mikroba setřena koncem kličky z napěstované kultury a poté přenesen na čisté živné médium. Do média byl vpraven klikatým potřením kontaminované kličky po půdě. Během přeočkování je vždy třeba dodržet aseptické podmínky. Při provádění stěru je nutné napěstovanou půdu co nejméně pootevřít, setřít kolonii kličkou a kulturu opět ihned uzavřít. Opět při očkování čisté půdy je nutné misku pootevřít potřít kličku a opět ihned uzavřít. Zabráni se tak co nejmenší kontaminaci z ovzduší. Po naočkování všech půd byly misky uloženy do krabice dnem vzhůru. Mikrobiální kolonie díky teplému letnímu počasí narostly opět velmi rychle – během tří dnů.

Tabulka 3 Zdroje mikroorganismů - přeočkování

Petriho miska	Zdroj mikroorganismů
2/1	otisk prstu
2/2	otisk kloubů zápěstí
2/3	Vlas
2/4	stěr z kliky u dveří
2/5	stěr z plochy stolu
2/6	stěr z madla ledničky

Tabulka 4 Mikroorganismy použité k izolaci – popis morfologie kolonií

Petriho miska č.	Druh mikrobu	Velikost	Barva	Tvar kolonie	Okraje	Povrch
1/1/A	bakterie	střední	žlutá	okrouhlý	rovné	lesklý
1/2/A	bakterie	malá	šedobílá	okrouhlý	rovné	hladký
1/1/A	kvasinka	velká	běžová	okrouhlý	rovné	drsny
1/2/B	bakterie	střední	žlutá	okrouhlý	rovné	lesklý
1/2/B	bakterie	malá	šedobílá	okrouhlý	rovné	hladký
1/2/B	kvasinka	velká	šedobílá	okrouhlý	rovné	drsny
1/4/A	bakterie	velká	krémová	okrouhlý	rovné	hladký
1/3/A	bakterie	střední	žlutá	okrouhlý	rovné	lesklý
1/3/A	bakterie	malá	okrová	okrouhlý	rovné	lesklý
1/3/B	bakterie	malá	okrová	okrouhlý	rovné	lesklý
1/3/B	bakterie	malá	pleťová	okrouhlý	rovné	lesklý
1/4/B	bakterie	malá	pleťová	okrouhlý	rovné	lesklý
1/6/A	bakterie	malá	žlutá	okrouhlý	rovné	lesklý
1/6/A	bakterie	velká	pleťová	okrouhlý	vroubkované	vrstevnatý
1/5/A	bakterie	velká	pleťová	okrouhlý	vroubkované	vrstevnatý
1/6/B	bakterie	malá	pleťová	okrouhlý	rovné	Lesklý
1/6/B	bakterie	malá	okrová	laločnatý	rovné	Lesklý
1/5/B	kvasinka	velká	žlutá	laločnatý	vroubkované	Matný

Výsledky:

Vybrané mikroorganismy se po agaru většinou velmi dobře rozrostly. Přeočkované mikroorganismy, jejich zdroje a míra pokrytí agaru je uvedena v tabulkách 5 – 9. Fotografie jsou uvedeny na obrázcích 15 – 20.

Tabulka 5 Vypěstované kultury z prstu – obr. č. 15

Části Petriho misky 2/1	Vypěstované čisté kultury	Míra pokrytí	Mikroorganismus z Petriho misky č.
A	žlutá kolonie bakterií	Masivní	1/1/A
B	šedobílá kolonie bakterií	relativně masivní	1/2/A
C	běžová kolonie kvasinek	Mírné	1/1/A

Tabulka 6 Vypěstované kultury z kloubu zápěstí – obr. č. 16

Části Petriho misky 2/2	Vypěstované čisté kultury	Míra pokrytí	Mikroorganismus z Petriho misky č.
A	žlutá kolonie bakterií	velmi masivní	1/2/B
B	šedobílá kolonie kvasinek	Mírné	1/2/B
C	šedobílá kolonie bakterií	Masivní	1/2/B

Tabulka 7 Vypěstované kultury z vlasu – obr. č. 17

Části Petriho misky 2/3	Vypěstované čisté kultury	Míra pokrytí	Mikroorganismus z Petriho misky č.
A	krémová kolonie bakterií s oranžovými okraji	relativně masivní	1/4/A
B	žlutá kolonie bakterií	relativně masivní	1/3/A
C	okrová kolonie bakterií	Mírné	1/3/A

Tabulka 8 Vypěstované kultury z kliky – obr. č. 18

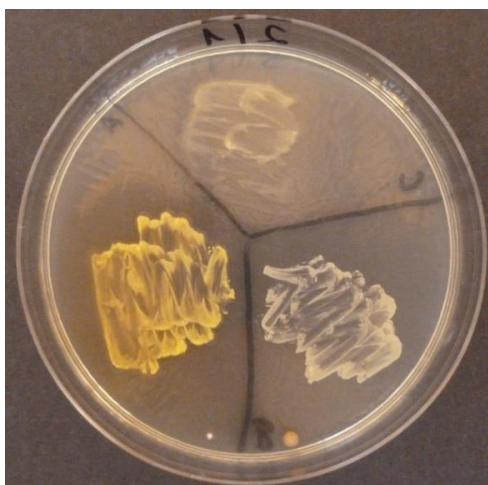
Části Petriho misky 2/4	Vypěstované čisté kultury	Míra pokrytí	Mikroorganismus z Petriho misky č.
A	okrová kolonie bakterií	relativně mírné	1/3/B
B	pleťová kolonie bakterií	Mírné	1/3/B
C	okrová kolonie bakterií	Nepatrné	1/4/B

Tabulka 8 Vypěstované kultury ze stolu – obr. č. 19

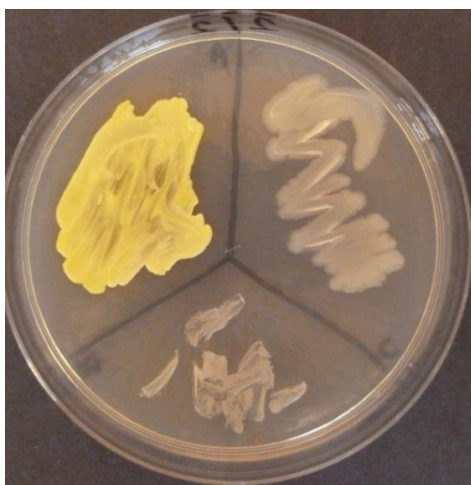
Části Petriho misky 2/5	Vypěstované čisté kultury	Míra pokrytí	Mikroorganismus z Petriho misky č.
A	kolonie žlutých bakterií	Masivní	1/6/A
B	plet'ová kolonie bakterií.	relativně masivní	1/6/A
C	plet'ová kolonie bakterií	Mírné	1/5/A

Tabulka 9 Vypěstované kultury z madla ledničky – obr. č. 20

Části Petriho misky 2/6	Vypěstované čisté kultury	Míra pokrytí	Mikroorganismus z Petriho misky č.
A	drobné kulaté plet'ové kolonie bakterií	Nepatrné	1/6/B
B	okrová kolonie bakterií	Mírné	1/6/B
C	žlutá kolonie kvasinek	Masivní	1/5/B



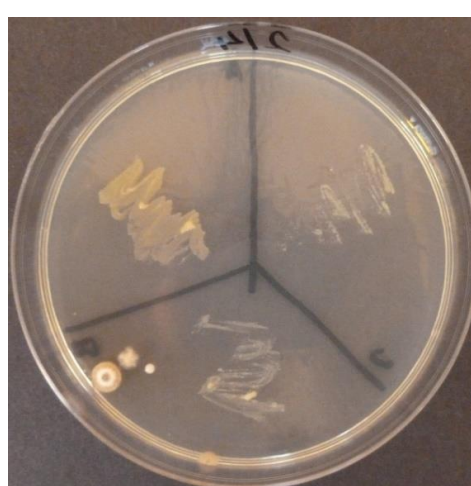
Obrázek 15 - Mikroorganismy z prstu



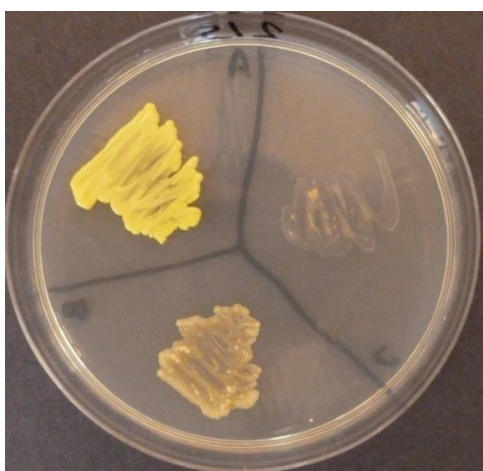
Obrázek 16 – Mikroorganismy z kloubu zápěstí



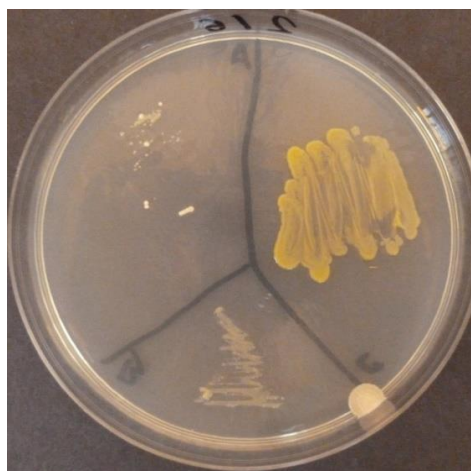
Obrázek 17 – Mikroorganismy z vlasu



Obrázek 18 – Mikroorganismy z kličky



Obrázek 19 – Mikroorganismy ze stolu



Obrázek 20- Mikroorganismy z madla ledničky

Závěr:

Z napěstovaných kultur bakterií se vždy nejlépe rozrostly žluté kolonie, pravděpodobně díky neoptimálnějším podmínkám pro pěstování. Nejméně se rozrostly kolonie setřené ze stolu, z kliky a madla ledničky. Tyto kultury bakterií už i při přeočkování byly velmi malé, díky nízké kontaminaci stěrů, tudíž ani nyní se nemohly tak rychle rozrůst ve velké kolonie.

5.1.3. Testování bakterií na jednotlivé antibakteriální látky

V konečné fázi pokusu byl proveden samotný test citlivosti bakterií na vybrané druhy dezinfekcí. Aby bylo možné porovnat účinek dezinfekce co nejpřesněji, byl k celému pokusu použit pouze jeden druh bakteriální kolonie napěstované na agaru z druhé série – kolonie krémové barvy vykultivované z vlasu. Test byl prováděn modifikovanou diskovou difúzní metodou (Pavlasová, 2014a; Pavlasová, 2014b). Do kontaminovaného kultivačního média byly vykrájeny otvory, do kterých byl nanesen dezinfekční roztok. Dezinfekční roztok difundoval médiem a tvořily se tak různě velké inhibiční zóny růstu. Dle velikosti inhibiční zóny je možné porovnat antibakteriální účinky dezinfekcí.

Pomůcky:

6 Petriho misek s Müller-Hintonovým agarem, plastové zkumavky, nakultivované plotny, lihový fix, plastová brčka, kapátko, hokejka, plastové mikrobiologické kličky

Postup:

Nejprve je nutné celou plotnu rovnoměrně kontaminovat bakterií. Aby došlo ke kontaminaci celé plochy rovnoměrně, musí být nejprve vzorek kolonie rozmíchán ve 1ml vody a poté rozlit po agaru. Jelikož ani tak nedojde k dokonalému rovnoměrnému pokrytí povrchu, je nutné roztok rozetřít do suchých částí agaru hokejkou. Následně se

musí plotna nechat vyschnout, samozřejmě pod víčkem, aby nedošlo k nežádoucí kontaminaci. Když je povrch agaru suchý, je možno do něj začít dělat otvory na vzorky dezinfekcí. Otvory byly tvořeny pomocí brčka, které bylo sterilně zabaleno do papírového obalu. V každé plotně byly vždy 3 otvory kolem dokola. Do otvorů byly pomocí kapátka nakapány vždy dvě kapky příslušné dezinfekce. Po nakapání všech šesti vzorků byla miska uzavřena víčkem a vložena do krabice, tentokrát dnem dolů. Plotny byly uloženy do suchého a temného místa, aby se zajistily podmínky rovnoměrného růstu bakterií a též rovnoměrné difuze antibakteriální látky. Dle účinnosti antibakteriální látky na bakterie se kolem otvorů vytvořily inhibiční zóny.

Výsledky:

Bakteriální kolonie na dezinfekce reagovala velmi dobře. Kolem otvorů se tvořily inhibiční zóny různých velikostí, v závislosti na tom, jak moc byla bakterie na antibakteriální látku citlivá. Podrobné výsledky jsou zpracovány v tabulkách 10 – 13. Tabulky jsou doplněné fotografickou dokumentací na obrázcích 21 – 24.

Tabulka 10 Test antibakteriálních látek miska 3/1 – obr. č. 21

Otvory P. misky 3/1	Antibakteriální přípravek	Velikost inhibiční zóny
A	Voda (1)	0 cm (kontrolní otvor)
B	Braunol (2)	cca 0,5 cm
C	Tantum Verde (3)	0 cm

Tabulka 11 Test antibakteriálních látek miska 3/2 – obr. č. 22

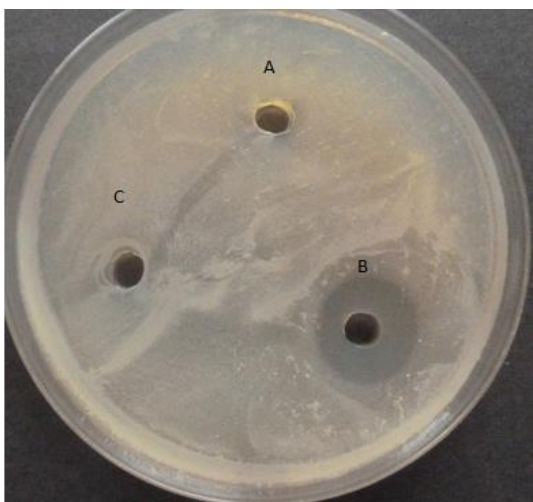
Otvory P. misky 3/2	Antibakteriální přípravek	Velikost inhibiční zóny
A	Phyteneo Neocide spray (4)	cca 3,5 cm
B	Genciánová violet' (5)	cca 2,5 cm
C	Ajatin akut spray (6)	cca 3,5 cm

Tabulka 12 Test antibakteriálních látek miska 3/3 – obr. č. 23

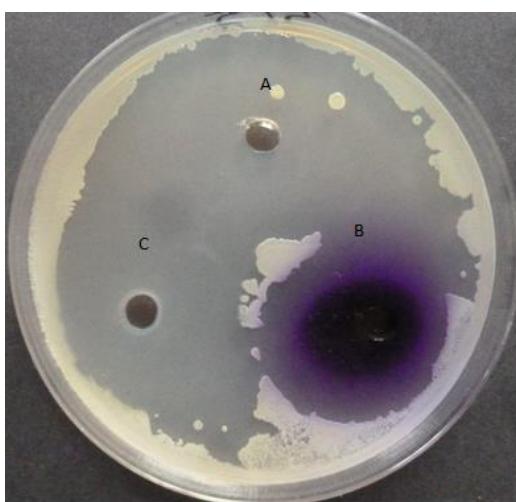
Otvory P. misky 3/3	Antibakteriální přípravek	Velikost inhibiční zóny
A	peroxid vodíku (7)	cca 3,5 cm
B	Eosin dezinfekční a hojivý spray (8)	cca 1 cm
C	ethanol (9)	0 cm

Tabulka 13 Test antibakteriálních látek miska 3/4 – obr. č. 24

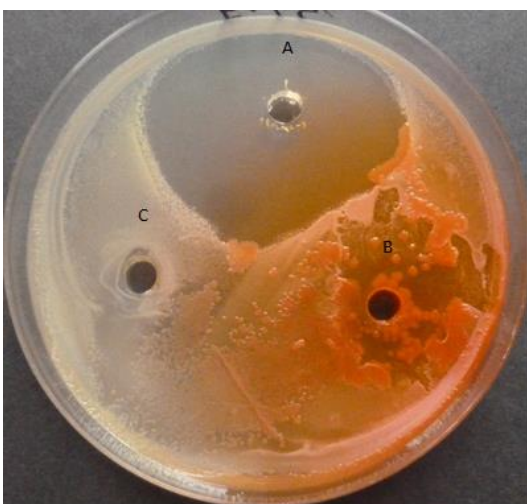
Otvory P. misky 3/4	Antibakteriální přípravek	Velikost inhibiční zóny
A	Cutasept F (10)	cca 1 cm
B	Septonex (11)	cca 2,5 cm
C	Jodisol (12)	cca 0,5 cm



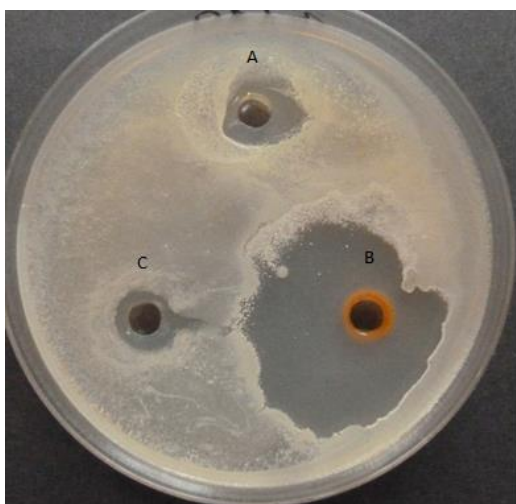
Obrázek 21 - Test antibakteriálních látek 1 - 3



Obrázek 22- Test antibakteriálních látek 4 - 6



Obrázek 23 Test antibakteriálních látek 7 - 9



Obrázek 24 - Test antibakteriálních látek 10 - 12

Závěr:

Bakterie vypěstovaná z vlasu měla nejvyšší citlivost k přípravku Ajatin akut spray, Phyteneo Neocide spray a peroxidu vodíku. Tato řada dezinfekcí patří k běžným typům dezinfekcí na ošetření pokožky. Jejich vysoká antibakteriální účinnost byla díky tomuto pokusu potvrzena.

Další velmi účinnou dezinfekcí je Genciánová violet' a Septonex. Inhibiční zóna růstu se kolem otvoru vytvořila relativně široká. Obě dezinfekce jsou opět vhodné na ošetření pokožky.

Vypěstovaná bakterie byla též relativně citlivá na tuto řadu dezinfekcí – Eosine dezinfekční a hojivý spray a Cutasept F. Inhibiční zóna měřila zhruba 1 cm.

Nejméně citlivá byla bakterie na Braunol a Jodisol. Inhibiční pás neměřil více než 0,5 cm.

Voda, ethanol a Tantum Verde růst bakterie nijak neovlivnil. Čistá voda sama o sobě nemá žádné antibakteriální účinky, proto byla použita jako slepý pokus. Jak je již výše uvedeno, ethanol má nejvyšší antibakteriální účinky při 70% koncentraci. Na pokus byl ale použit 98% ethanol, antibakteriální účinek neprojevil. Jelikož je Tantum Verde druh dezinfekce působící na bakterie v ústní dutině na bakteriální druh z vlasu neúčinkoval. Pro zjištění účinku by bylo nutné pokus zopakovat i s jinými bakteriálními druhy.

6. Diskuze

Práce je zaměřena na ověření účinnosti diskové difúzní metody ve školních podmínkách.

V teoretické části práce jsou nejprve všeobecně popsány běžné druhy mikrobů, následuje podrobná kapitola o bakteriích. Nachází se zde popis bakteriální buňky, její fyziologie a životního cyklu. V dalším úseku práce jsou rozebírány antibakteriální látky. Nejprve je popisován mechanismus účinku a následně jsou antibakteriální látky charakterizovány v kapitolách antibiotika a antiseptika. Nechybí zde popis diskové difúzní metody, kterou byla prováděna praktická část této práce. Dále je zde zmínka o antibakteriální rezistenci a jejím vzniku.

V praktické části práce byl proveden test citlivosti bakterií na vybrané dezinfekční látky pomocí modifikované diskové difúzní metody. Dezinfekce byly vybrány tak, aby byly běžně dostupné a zpravidla součástí vybavení lékárníček. Pro test byly vybrány bakterie z vlasu, jelikož kolonie byla dostatečně velká a bylo možné tak bakterie použít pro celý test a to v dostatečné koncentraci. Test se prokázal jako úspěšný, jelikož u řady dezinfekcí se vytvořily relativně široké inhibiční zóny. Naopak u látek, které za daných podmínek nemají antibakteriální účinky, se test opět potvrdil a u těchto látek se inhibiční zóny nevytvořily. Podrobné výsledky velikosti inhibičních zón jednotlivých dezinfekčních látek jsou zpracovány do tabulek. Kultivace bakterií včetně testu na dezinfekční látky jsou vždy podloženy fotodokumentací.

Provedená série pokusů ukázala, že je možné tuto metodu provádět ve školních podmínkách a využít ji pro účely vzdělávání žáků na SŠ.

7. Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem prokázala všudypřítomnost mikrobiálních kolonií a úspěšně otestovala vybrané druhy dezinfekcí pomocí modifikované diskové difúzní metody a ověřila tak jejich účinek. I když přesně nebyly dodrženy aseptické podmínky, i tak lze test považovat za úspěšný. Při přeočkování vyrostly čisté kolonie bakterií, které bylo možné použít v testu na dezinfekce. Na bakteriální kolonii z vlasu byl následně proveden celý test citlivosti, který prokázal antibakteriální účinek některých běžných dezinfekcí používaných na rány.

Vzhledem k tomu, že celý test proběhl úspěšně na půdě fakultní laboratoře, je též možné uplatnit ho i ve výuce v rámci biologického praktika na střední škole. Studenti tak budou mít možnost sami si ověřit účinnost antibakteriálních přípravků. Navíc si během pokusu sami dokážou všudypřítomnost mikrobiálních látek a uvidí jejich makroskopické kolonie.

8. Seznam použité literatury

HYNIE, S. *Speciální farmakologie. Díl VII/B, Protiinfekční léčiva*. Praha: Karolinum, 2003. 208 s. ISBN 80-246-0657-7.

BRUDZYNSKI, K. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian Journal of Microbiology*. 2006, **52**(12): 1228-1237. ISSN 0008-4166.

DETTENKOFER, M., C. WILSON, A. GRATWOHL, C. SCHMOOR, a kol. Skin disinfection with octenidine dihydrochloride for central venous catheter site care: a double-blind, randomized, controlled trial. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010, **16**(6): 600-606. ISSN 1198-743X.

HYNIE, S. *Speciální farmakologie. Díl VII/B, Protiinfekční léčiva*. Praha: Karolinum, 2003. 208 s. ISBN 80-246-0657-7.

JENSEN, J.-M., V. HARDE a J. BRASCH. Airborne contact dermatitis to methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone in a boy. *Contact Dermatitis*. 2006, **55**(5): ISSN 0105-1873.

JULÁK, J. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1270-4.

KAPRÁLEK, F. *Fyziologie bakterií II*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1983.

KAPRÁLEK, F. *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-811-5.

KOCUR, M. *Obecná bakteriologie*. edited by T.M. KAREL HOŘÁK, STANISLAV ROSYPAL. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1981.

KOOTALLUR, B. N., C. P. THANGAVELU a M. MANI. Bacterial identification in the diagnostic laboratory: How much is enough? *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2011, **29**(4): 336-340. ISSN 0255-0857.

MALEY, A. M. a J. L. ARBISER. Gentian Violet: a 19th century drug re-emerges in the 21st century. *Experimental Dermatology*. 2013, **22**(12): 775-780. ISSN 0906-6705.

MAREK BEDNÁŘ, V. F., JIŘÍ SCHINDLER, ANDREJ SOUČEK, JIŘÍ VÁVRA
Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.

PAVLASOVÁ, L. *Mikrobiologie pro učitele přírodopisu a biologie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta, 2009. ISBN 978-80-7290-406-8.

POHL-MARKL, H. a R. NEUMANN. Polyvinylpyrrolidone iodine--its significance in dermatology. *Zeitschrift fur Hautkrankheiten*. 1988, **63**(12): 1009-1015. ISSN

POPELKA, A., I. NOVAK, M. LEHOCKY, F. BILEK, a kol. Antibacterial treatment of LDPE with halogen derivatives via cold plasma. *Express Polymer Letters*. 2015, **9**(5): 402-411. ISSN 1788-618X.

RAHMA, H., S. ASGHARI, S. LOGSETTY, X. C. GU, a kol. Preparation of Hollow N-Chloramine-Functionalized Hemispherical Silica Particles with Enhanced Efficacy against Bacteria in the Presence of Organic Load: Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity. *Acs Applied Materials & Interfaces*. 2015, **7**(21): 11536-11546. ISSN 1944-8244.

ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Praha: VICTORIA PUBLISHING, a. s. , 1995. ISBN 80-85605-71-6.

ŠIPICKÝ, M. a J. ŠUBÍK *Genetika kvasinek*. Bratislava: VEDA, 1992. ISBN 80-224-0396-2.

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie*. Brno: Neptun, 2010a. ISBN 978-80-86850-04-7.

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010b. ISBN 978-80-86850-04-7.

ZHAO, Y. T., J. YAN, Y. XIA, F. M. ZHANG, a kol. Enhanced Osteogenesis of Polyvinylpyrrolidone-Iodine as a Sterilizing Agent for Preservation of Allografts. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. 2015, **5**(6): 465-471. ISSN 2157-9083.

ZHI-BIN, L., H. JIN-TIAN, L. TUN, Z. XU, a kol. Treatment of Folliculitis on the Expanded Postauricular Skin Flap by Topical Iodine Tincture. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*. 2015, **3**(8): 486. ISSN