



**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

**PRODUKCE MAGNETICKÝCH ČÁSTIC  
MIKROORGANISMY**

PRODUCTION OF MAGNETIC PARTICLES BY MICROORGANISMS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Eva Chvalkovská

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

BRNO 2017

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1141/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Eva Chvalkovská**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název bakalářské práce:

Produkce magnetických částic mikroorganismy

### Zadání bakalářské práce:

Vypracování literárního přehledu na téma biosyntéza magnetických nano- a mikročástic pomocí mikroorganismů. Sledování produkce nanočástic stříbra u vybraných mikrobiálních kmenů rodu *Lactobacillus* v přítomnosti různé koncentrace  $\text{AgNO}_3$  v prostředí.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

-----  
Eva Chvalkovská  
student(ka)

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

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

V Brně dne 31.1.2017

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

## ABSTRAKT

Předkládaná práce se zabývá magnetickými nanočásticemi, které jsou produkovány bakteriemi. Jedná se o dva typy bakterií. Jeden typ jsou bakterie žijící v industriálním prostředí, které produkují magnetické nanočástice pomocí tzv. magnetozomů. Magnetozomy jsou útvary obsahující nanokrystaly a jsou obklopeny lipidovou vrstvou. V bakterii se skládají do řetízků a slouží bakterii jako kompas. V této práci se zabývám možnostmi kultivace těchto bakterií, získání magnetozomů a jejich následným zpracováním. Druhým typem jsou bakterie žijící v lidském těle, a které začnou produkovat magnetické nanočástice až po přidání spouštěče, jako například dusičnanu stříbrného. Patří se například *Bacillus* sp, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* ssp. *casei* a *Lactobacillus fermentum*.

V experimentální části bakalářské práce byla testována produkce stříbrných nanočástic po přidání dusičnanu stříbrného v koncentracích 0,1; 1; 2; 4 mM. Bakterie, u nichž byla prokázána produkce stříbrných nanočástic jsou *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> a *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7089 a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>.

## ABSTRAKT

This thesis focuses on the magnetic nanoparticles produced by bacteria. These are two types of bacteria. First of them we can find in an industrial environment that produce magnetic nanoparticles using magnetosomes. Magnetosomes are units containing nanocrystals and are surrounded by a lipid layer. They are made up of chains and work as a compass. In this thesis I deal with possibilities of cultivation of these bacteria, acquisition of magnetosomes and subsequent processing. The second type is bacteria living in the human body, they start to produce magnetic nanoparticles after the addition of trigger, such as silver nitrate. Bacteria which can produce silver or ferrous nanoparticles are *Bacillus* sp, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* ssp. *casei* and *Lactobacillus fermentum*.

Experimental part of bachelor thesis focused on the production of silver nitrate in concentration of 0,1; 1; 2; 4 mM. The bacteria that have been shown to produce silver nanoparticles are *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> and *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7089 and *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Magnetické bakterie, magnetozomy, kultivace, umělá magnetická bakterie, využití

**KEYWORDS:** Magnetic bacteria, magnetosomes, cultivation, artificial magnetic bacteria, utilization

CHVALKOVSKÁ, E. *Produkce magnetických částic mikroorganismy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 61 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za odborné vedení, dále bych také ráda poděkovala Bc. Barboře Tomanové a Bc. Denise Romanovské za cenné rady a ochotu. Velký dík patří také mojí rodině a přátelům za neustálou podporu.

# Obsah

|       |                                                                                             |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | ÚVOD                                                                                        | 7  |
| 2     | TEORETICKÁ ČÁST                                                                             | 8  |
| 2.1   | Magnetické bakterie v přírodě                                                               | 8  |
| 2.1.1 | Biologie magnetických bakterií                                                              | 8  |
| 2.1.2 | Magnetozomy                                                                                 | 9  |
| 2.2   | Produkce stříbrných nanočástic pomocí chemických, fyzikálních a biologických metod          | 12 |
| 2.3   | Uměle vytvořené bakterie                                                                    | 13 |
| 2.3.1 | Produkce stříbrných částic bakteriemi                                                       | 13 |
| 2.3.2 | Bacillus sp.                                                                                | 13 |
| 2.3.3 | Escherichia coli                                                                            | 15 |
| 2.4   | Produkce nanočástic lactobacily                                                             | 17 |
| 2.4.1 | Optimalizace metody pro syntézu stříbrných nanočástic pomocí Lactobacillus casei ssp. casei | 17 |
| 2.4.2 | Produkce želených nanočástic pomocí Lactobacillus fermentum                                 | 18 |
| 2.5   | Využití stříbrných nanočástic                                                               | 19 |
| 2.5.1 | Antibakteriální efekt                                                                       | 19 |
| 2.5.2 | Antivirové účinky                                                                           | 19 |
| 2.5.3 | Čištění vody a povrchů                                                                      | 20 |
| 2.5.4 | Jiné aplikace                                                                               | 20 |
| 3     | CÍL PRÁCE                                                                                   | 21 |
| 4     | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST                                                                         | 22 |
| 4.1   | Materiál                                                                                    | 22 |
| 4.1.1 | Použité bakteriální kmeny                                                                   | 22 |
| 4.1.2 | Bakteriální DNA                                                                             | 22 |
| 4.1.3 | Chemikálie                                                                                  | 22 |
| 4.1.4 | Kultivační média                                                                            | 22 |
| 4.1.5 | Roztoky                                                                                     | 23 |
| 4.2   | Pomůcky a přístroje                                                                         | 24 |
| 4.3   | Metody                                                                                      | 25 |
| 4.3.1 | Ožiování a uchovávání bakteriálních kultur                                                  | 25 |
| 4.3.2 | Příprava hrubých lyzátů buněk                                                               | 25 |
| 4.3.3 | Izolace DNA pomocí magnetických mikročástic.                                                | 25 |
| 4.3.4 | Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA                         | 26 |

|          |                                                                           |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.5    | Polymerázová řetězová reakce                                              | 26        |
| 4.3.6    | Elektroforéza                                                             | 29        |
| 4.3.7    | Médium pro produkci stříbra                                               | 29        |
| 4.3.8    | MRS médium                                                                | 29        |
| 4.3.9    | Nepřímé stanovení počtu buněk kultivační metodou                          | 29        |
| 4.3.10   | Stanovení růstových křivek bakteriálních kultur rodu <i>Lactobacillus</i> | 30        |
| 4.3.11   | Produkce nanočástic stříbra                                               | 30        |
| <b>5</b> | <b>VÝSLEDKY</b>                                                           | <b>31</b> |
| 5.1      | Kultivace bakterií a kontrola čistoty                                     | 31        |
| 5.2      | Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA         | 31        |
| 5.3      | Polymerázová řetězová reakce                                              | 32        |
| 5.3.1    | Důkaz přítomnosti bakteriální DNA                                         | 32        |
| 5.3.2    | PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>                                          | 37        |
| 5.3.3    | PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i>      | 38        |
| 5.3.4    | PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>                    | 39        |
| 5.4      | Kultivace v médiu s přidaným dusičnanem stříbrným                         | 40        |
| 5.4.1    | Růstové křivky bakteriálních kmenů <i>Lactobacillus</i>                   | 40        |
| 5.4.2    | Stanovení počtu buněk v pozdní exponenciální fázi                         | 46        |
| 5.4.3    | Produkce nanočástic stříbra                                               | 47        |
| <b>6</b> | <b>DISKUSE</b>                                                            | <b>52</b> |
| 6.1      | Kultivace bakterií                                                        | 52        |
| 6.2      | Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA         | 52        |
| 6.3      | Kvantitativní PCR                                                         | 52        |
| 6.3.1    | Důkaz přítomnosti bakteriální DNA                                         | 52        |
| 6.3.2    | PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>                    | 53        |
| 6.4      | Konvenční PCR                                                             | 53        |
| 6.4.1    | PCR specifická pro rod <i>Lactobacillus</i>                               | 53        |
| 6.4.2    | PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> .    | 53        |
| 6.5      | Kultivace v médiu s přidaným dusičnanem stříbrným                         | 53        |
| 6.5.1    | Růstová křivka                                                            | 53        |
| 6.5.2    | Produkce stříbrných nanočástic                                            | 54        |
| <b>7</b> | <b>ZÁVĚR</b>                                                              | <b>55</b> |
| <b>9</b> | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ</b>                                            | <b>56</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>                                           | <b>58</b> |



# 1 ÚVOD

Nanotechnologie je nově vznikající obor, který má budoucnost v mnoha odvětvích vědy. V poslední době se objektem zkoumání tohoto oboru staly i tzv. magnetické bakterie. Magnetické bakterie jsou bakterie schopné produkovat tzv. magnetické nanočástice. Magnetické nanočástice jsou kovové částice s vlastnostmi magnetu, které jsou mnohem účinnější než magneticky-závislé nanočástice. Toto chování je způsobeno zvyšujícími se magnetickými vlastnostmi a silným magnetickým reakcím. Použitím magnetických nanočástic lze například snížit dobu pro léčbu hypertermií a to díky magnetickým interakcím, které mohou zvýšit svůj tepelný výkon. Získání kontroly nad shromážděnými nanočásticemi by tím pádem znamenalo milník, o který vědci usilují. Objev magnetických bakterií, vyskytujících se v industriálním prostředí, pomohl vědcům objasnit produkci těchto nanočástic, a to díky biogenetickým magnetitům produkováným právě těmito magnetickými bakteriemi. Jedná se o magnetické bakterie spadající do skupiny prokaryot, které mají tendenci k biomineralizaci intracelulárních magnetických nanokrystalů. Tyto nanokrystaly jsou obklopeny lipidovou vrstvou, souhrnně se tento systém nazývá magnetozom. Každá lipidová vrstva se skládá z proteinů, jejichž složení závisí na druhu bakterie. Proteiny mají jak ochrannou, tak i kontrolní funkci v oblasti růstu, syntézy a organizaci magnetozomů mezi buňkami. Tato kontrola má pak další vliv v oblasti kultivace dané bakterie a následné vlastnosti jako například obsah kyslíku, kompozice dané bakterie apod. Magnetozomy tvoří řetízky, které v buňce fungují jako kompas. Díky tomuto kompasu se umí bakterie orientovat ve vodném prostředí podle magnetického pole Země.

Příklady druhů produkujících magnetické nanočástice spadají do rodu *Magnetospirillum*, který patří do třídy *Alphaproteobacteria* a byl izolován z čisté vody.

Kromě těchto bakterií žijících volně v přírodě se vědci snaží o vytvoření tzv. umělých bakterií. Jedná se o běžně známé bakterie, které se stanou po aplikaci určitých částic (hlavně stříbrných a zlatých) a určitého záření nebo magnetů schopné samostatně produkovat tyto nanočástice. Je to levnější a mnohem rychlejší než umělá syntéza těchto nanočástic. K produkci magnetických nanočástic jsou využívány běžně dostupné bakterie a můžeme je použít jako katalyzátory v chemických reakcích, jako optické receptory a také jako přenašeče léčiv při léčbě například rakoviny. Pro svou práci jsem si pro produkci nanočástic zvolila rod *Lactobacillus*.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Magnetické bakterie v přírodě

Magnetické bakterie vyskytující se v přírodě spadají do již v úvodu zmíněného rodu *Magnetospirillum*. Spadají sem například *Magnetospirillum magneticum*, *Magnetospirillum magnetotacticum*. Bakterie izolované ze slané vody (mořské) jsou například *Magnetococcus marinus* MC-1, *Magnetofaba australis* (IT-1), vibriodní kmen *Magnetovibrio blakemorei* MV-1, spirila *Magnetospirillum athiophila* (MMS-1) a *Magnetospira* sp. QH-2. Všechny tyto bakterie také spadají do třídy *Alphaproteobacteria*. Jednotlivé druhy syntetizují krystaly specifického složení, buď  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nebo  $\text{Fe}_3\text{S}_4$ . Některé druhy jsou schopny syntetizovat oba dva minerály. [1]

#### 2.1.1 Biologie magnetických bakterií

##### 2.1.1.1 Výskyt

Magnetické bakterie se nachází hlavně ve vodném prostředí. Většinou je můžeme najít v nebo pod přechodem mezi kyslíkatou a bezkyslíkatou zónou, v rozvrstvené koloně nebo sedimentu. Tyto bakterie se dokonce nachází i v hlubokém moři, v čisté vodě, nebo smíšených sedimentech při okolní teplotě. Pokud se zaměříme na rozmanitost a bohatost těchto bakterií, tak nejvíce jich najdeme ve slané vodě, zde má na výskyt těchto bakterií dále vliv teplota a koncentrace dusíku a síry. [1]

##### 2.1.1.2 Metabolismus

Z hlediska metabolismu je většina těchto bakteriálních druhů schopna vázat atmosférický dusík a železo pro syntézu magnetozomů z okolního prostředí. Magnetické bakterie jsou schopny vázat 100x více železa než jiné nemagnetické heterotrofní bakterie. Dále hrají důležitou roli v metabolických cyklech, a to nejen v syntéze magnetozomů, ale také v syntéze uhlíku, dusíku a síry skrz chemoautotrofní syntézu. [1]

Nejlépe prozkoumaná bakterie je bakterie *Magnetovibrio baltica*, která žije v mořské vodě. Tato bakterie vykazuje nejširší metabolickou rozmanitost. Bakterie je chemoautotrofní, roste s použitím thiosulfátu nebo sulfidu a jako elektronového dárce a zdroj uhlíku využívají oxid uhličitý. Autotrofie probíhá prostřednictvím cyklu Calvin-Benson-Bassham. Roste také chemoorganoheterotrofně za použití různých organických kyselin, aminokyselin, peptonu, kvasnicového extraktu a tryptonu jako zdroje elektronů a uhlíku. Bakterie je schopna růstu za mikroaerofilních a anaerobních podmínek, využívá k tomu kyslík, dusičnany nebo oxid dusný jako koncové elektronové akceptory. *Magnetovibrio baltica* je jediný známý magnetotaktický kmen, který je schopen růstu jak s oxidem dusným, tak s dusičnanem jako s akceptory elektronů a také s fixováním dusíku. Z toho vyplývá, že tento druh hraje významnou roli v cyklu dusíku v mořském prostředí. [1]

##### 2.1.1.3 Izolace a kultivace

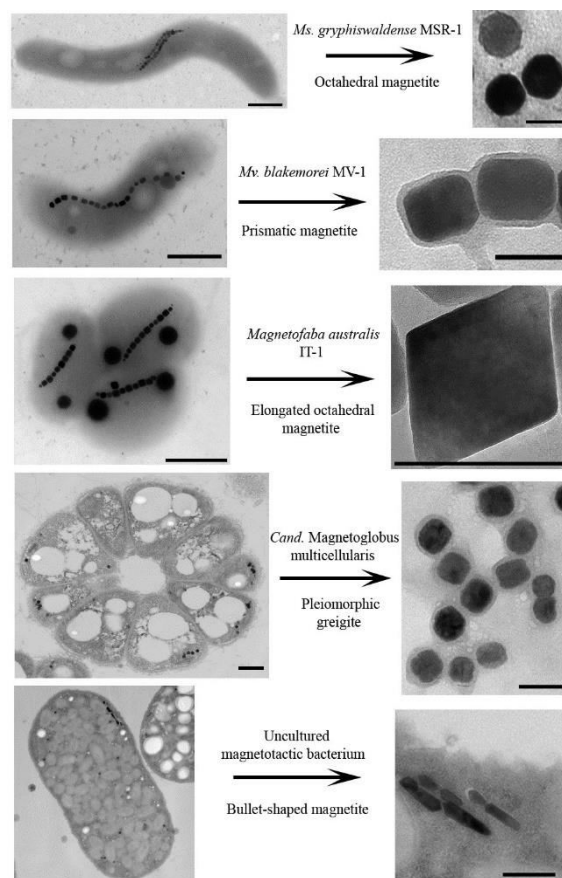
Vzhledem k odpovědi magnetických bakterií na magnetické pole je jednoduché tyto bakterie separovat od nemagnetických bakterií. Výzkum těchto bakterií se provádí pomocí transmisní elektronové mikroskopie, fluorescence. [1]

Zajímavostí je, že většina magnetických bakterií, jejichž vzorky byly odebrány na severní polokouli, se pohybovala paralelně k magnetickému poli Země, zatímco bakterie pocházející z jižní polokoule se pohybovaly antiparalelně. Tohoto jevu je využito k odběru vzorků bakterií z vodného prostředí. Typ a množství magnetických bakterií, žijících v přirozeném prostředí, záleží na přítomnosti kyslíku a jiných elektronových donorech, jako jsou například redukující sírové sloučeniny. [1]

Po odebrání vzorku můžeme díky reakci na magnetické pole Země separovat jak bakterie ze severní, tak jižní polokoule. K separaci se používá tzv. Pasteurova pipeta, kdy na úzký konec pipety dáme bavlněnou zátku a poté se celá pipeta naplní vodou. Následně je širokým otvorem pipety přidán sediment, nebo voda obsahující sediment, s magnetickými bakteriemi. K oběma koncům pipety je přiložen magnet a po době určené pro pohyb těchto magnetických bakterií je odstraněna bavlněná zátka a dané bakterie jsou odebrány na kulturu nebo fixovány pro různé analýzy. Pro kultivaci těchto bakterií se většinou využívá kultivační médium, které obsahuje více kyslíku než jiné živiny. [1]

### 2.1.2 Magnetozomy

Magnetozomy jsou tvořeny několika sloučeninami, a to oxidem železitým, oxidem železnato-železitým, sulfidem železitým, nebo sulfidem železnato-železitým. Nejčastěji se jedná buď o magnetit (oxid železnato-železitý) nebo o tzv. greigit (sulfid železnato-železitý), ale obvykle mají bakterie magnetozomy syntetizované z obou těchto látek. Složení magnetozomů záleží na druhu dané bakterie nebo na přítomnosti či nepřítomnosti kyslíku v prostředí, ve kterém se nachází. Co se týče výše zmíněné přítomnosti kyslíku v prostředí, bakterie, které mají magnetozomy složené hlavně z magnetitu, se nachází na rozhraní mezi kyslíkatým a bezkyslíkatým prostředím, zato bakterie, jejichž magnetozomy jsou složené z greigitu, se vyskytují více v bezkyslíkatém prostředí, kde se nachází sulfid. Pokud se tedy podíváme na syntézu těchto magnetozomů, jedná se o velmi složitý a velmi kontrolovaný proces. Výsledkem jsou částice, jejichž velikost spadá do oblasti nano-, se značnou mírou krystalické dokonalosti, permanentní magnetizací a samozřejmě biokompatibilní lipidovou dvojvrstvou. Pokud toto všechno obsahují magnetozomy, můžeme je použít v biotechnologiích, medicíně apod. Velikost těchto magnetických částic se pohybuje kolem 35–120 nm a při běžné teplotě vykazují permanentní magnetický moment. Právě díky tomuto momentu jsou schopny orientovat se pomocí magnetického pole Země. Magnetozomy jsou složeny, jak už bylo také řečeno, ze sloučenin  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a  $\text{Fe}_3\text{S}_4$ . Obě dvě tyto sloučeniny mají stejné morfologické uskupení oktaedru nebo prismy. (Obrázek 1). Magnetozomy se v buňce pohybují v podobě řetízků v blízkosti cytoplazmatické membrány, kde v mnoha případech působí jako její opora. Množství a variace těchto řetízků závisí na druhu a také na prostředí, ve kterém se bakterie vyskytuje. [1]



Obrázek 1: Tvary magnetozomů v různých bakteriích [1]

Při tvorbě magnetozomů hraje důležitou roli magnetozomová membrána. V prvním kroku dojde díky přeskupení rozdílných proteinů, přítomných v magnetozomové membráně, ke změnám v jejím proteinovém složení. Další kroky probíhají většinou průběžně s prvním krokem, dochází k absorpci železa z okolí buňky, vzniku krystalů, zrání krystalů a tvoření řetězků. Železo se sráží ve vzniklých měchýřcích, které následně tvoří magnetické krystaly. Většina takto vzniklých krystalů se odpojí od membrány a stanou se z nich opravdové měchýřky. Celá biosyntéza je kontrolovaný proces, který vyžaduje přítomnost 28 proteinů, které jsou kódované tzv. *mam* a *mms* geny. Například v *Magnetospirillum gryphiswaldense* jsou tyto geny organizované čtyřmi operony: *mamAB*, *mamGFDC*, *mamXY* a *mms6*. Chceme-li se zaměřit na gen vyskytující se ve všech druzích bakterií, pak musíme svou pozornost obrátit ke genu, který se nazývá *mamABEIKMOPQ*. Tento gen se vyskytuje jak v kultivovaných, tak i nekultivovaných, magnetit/greigite produkujících bakteriích. Proteiny produkované tímto genem nejsou natolik prostudované, ale vykazují podobnost s jinými, již popsány proteiny. Například protein *mamK* vypadá jako aktin, tvoří filameny podél buňky, protein *mamJ* seřazuje magnetozomy na tyto filameny. Následné uspořádání do řetězců a fixace na filameny se děje za pomoci magnetického pole Země. Velikost a tvar těchto magnetozomů je kontrolované proteinem, který je kódován *mamCD* operonem. [1]

Studie, které zkoumaly specifické funkce magnetozomových proteinů umožnily použití syntetických peptidů, které napodobují funkci těchto proteinů v chemické syntéze magnetických krystalů s některými požadovanými vlastnostmi magnetomních krystalů. Výsledkem byly magnetické krystaly, které v některých případech měly charakteristické vlastnosti magnetomních krystalů. Výzkum těchto krystalů ještě není dokončen, pořád je zde spousta nezodpovězených otázek. Pokud by

se podařilo dotáhnout výzkum až do konce, mohly by se takto syntetizované nanočástice využít například k léčbě rakoviny pomocí hypertermie. Při této léčbě dochází ke generování tepla během reakce, v níž se oxidací a působením střídavého magnetického pole z magnetitových magnetozomů stává méně magnetický minerální maghemit. [1]

### 2.1.2.1 Produkce magnetických bakterií a magnetozomů

Mnoho experimentů se snaží o produkci magnetozomů ve větším množství, a to s využitím bakterií rodu *Magnetospirillum*. Studie ukazují, že tento rod produkuje kubické magnetické krystaly v průměru okolo 40–45 nm. Každá buňka má okolo 60 magnetozomů organizovaných v jednoduchých řetězcích, ačkoli přesný počet magnetozomů závisí na prostředí, ve kterém se buňka nachází. Bakterie tohoto druhu jsou chemoorganoheterofní a používají organické kyseliny jako zdroj uhlíku a elektronů, ačkoli autotrofní reakce jsou u mnoha kmenů založené na oxidaci redukovaných sloučenin síry. Pro růst magnetosomů je potřeba mikroaerobní nebo aerobní prostředí, kdy bakterie využívá kyslík a dusík jako akceptory elektronů. I přestože u kyslíku si touto funkcí nejsme jistí, je velká pravděpodobnost, že poskytuje optimální redoxní podmínky pro syntézu a růst magnetozomů. Bohužel ne všechny bakterie požadují jen takto nenáročné podmínky. Bakterie *Magnetovibrio blakemorei* využívá širší škálu metabolických substrátů, díky kterým může růst a pomocí širšího spektra akceptorů elektronů vyrábět magnetozomy. Tato bakterie je přizpůsobitelná velkokapacitní kultivaci ve velkém měřítku.

Bakterie rodu *Magnetospirillum* jsou kultivovány v tzv. bioreaktorech, kde mají potřebný přísun kyslíku, jako hlavního elektronového akceptora, sukcinátu a laktátu, jakožto zdroje uhlíku, a dusičnan nebo amoniaku jako zdroje dusíku. Ovšem optimalizace syntézy, zejména s ohledem na přísun kyslíku, dusíku a dalších prvků podstatných pro výživu bakterie, která zajistí maximální počet získaných magnetozomů, je stále předmětem výzkumu. V jednom z takových experimentů byly tři různé bakterie, konkrétně *Magnetospirillum magneticum*, *Magnetospirillum magnetotacticum* a *Magnetospirillum gryphiswaldense* vloženy do bioreaktoru o objemu 5 litrů, přičemž byla za stejných podmínek sledována produkce magnetizomů. Růstové médium obsahovalo laktát a citrát železnatý jako zdroj železa. Bakterie *Magnetospirillum gryphiswaldense* se ukázala jako nejrychleji rostoucí bakterie s největší tolerancí vůči kyslíku, ačkoli absorpce železa byla se zvyšující se koncentrací kyslíku snížena na polovinu. Co se týče výtěžku, tak poslední zmíněná bakterie *M. gryphiswaldense* dosáhla produkce 6,3 mg magnetitu na litr média za den. *Magnetospirillum magneticum* a *Magnetospirillum magnetotacticum* byly schopny syntetizovat 3,3 a 2,0 mg magnetitu na litr média za den. [1]

### 2.1.2.2 Získávání magnetozomů a jejich úprava

Důvod pro kultivaci těchto bakterií je jediný, a to získání magnetozomů. Pokud tedy bakterie vyprodukuje magnetické nanočástice, je potřeba je pro další použití separovat a očistit. Toto očištění je významné hlavně z důvodu následného použití v biotechnologiích. V praxi se k této separaci buněk od magnetozomů používají různé procedury. Narušení vazby buněk na magnetozomy může být dosaženo pomocí ultrazvuku nebo vysokotlakým homogenizérem. Největším problémem je, že lipidová vrstva je kolem magnetozomů velice pevně navázána a je těžké ji odstranit. Odstranění se proto provádí pomocí různých detergentů, jako je například dodecyl síran sodný. Abychom získali opravdu čistý materiál vhodný pro další použití je potřeba rozsáhlé promytí magnetozomových nebo magnetozomálních krytalů. K promytí dochází v důsledku buněčných úlomků včetně elektrostaticky nabitých buněčných proteinů, které po promytí detergentem zůstaly na magnetozomech. Pokud by nedošlo k závěrečnému promytí, mohly by tyto úlomky interferovat s výkonem magnetozomů

v konkrétních aplikacích. Výhoda velkokapacitní kultivace magnetických bakterií a masová produkce magnetozomů vedly k vývoji dalšího magnetozomního očištění. Po narušení vazeb buněk na magnetozomy dochází pomocí různých kolon k postupné separaci. Poslední kolona obsahuje silné magnetické pole, které separuje samotné magnetozomy, ty zůstanou v koloně a jsou znovu očištěny. Jsou vyjmuty pomocí silného magnetického pole a je na ně aplikován pufr. Posléze je ještě povrch očištěn od zbytků buněk a DNA pomocí ultrazvuku, močoviny a proteinázy K. Vzhledem k vysokým požadavkům na toxicitu je poslední krok procesu očištění velmi podstatný pro jejich následnou aplikaci *in vivo*. [1]

Magnetozomy mají široké využití v biomedicině. Můžeme je využít například v imunoanalýze, separaci buněk, léčbě hypertermie, transportu léčiv, jaderné magnetické rezonanci a ve spoustě dalších odvětví biomedicíny. Všechny tyto aplikace vyžadují přítomnost částic, které budou mít trvalou magnetizaci, stejnou velikost (menší než 100  $\mu\text{m}$ ), stálou morfologii a nesmí být toxické. [1]

## **2.2 Produkce stříbrných nanočástic pomocí chemických, fyzikálních a biologických metod**

Produkce nanočástic byla, je a bude v okruhu zájmu řady vědců. Díky velikosti, velkému povrchu a množstvem využití se čím dál tím více vědců snaží najít možnosti, jak je produkovat. Nanočástice je možné v současnosti syntetizovat mnoha způsoby, ať už chemickými nebo fyzikálními. V dnešní době se ale jako zajímavá jeví možnost produkce nanočástic pomocí mikroorganismů [2].

Většina chemických reakcí je prováděna za laboratorní teploty, přičemž jako redukční činidla jsou používány polyoly, tetraboritan sodný, hydrazin, citrát sodný a N,N-dimethylformamid. Aby nedocházelo k agregaci stříbrných nanočástic, přidávají se do roztoku dodecylsulfát sodný, polyvinylpyrrolidon a citronan sodný. Úspěšné experimenty produkce stříbrných nanočástic byly provedeny za použití povrchově aktivního citronanu sodného jako iniciátora redukční reakce a redukčním činidlem formaldehydsulfoxylátem sodným v kombinaci s dusičnanem stříbrným. Jedná se o velmi čistou metodu výroby stříbrného nanoprášku o velikosti částic menších než 50 nm, a to ve velkém množství. Další chemickou metodou je metoda založená na redukci stříbrných iontů pomocí dextrózy, hydrazinu jako redukčního činidla a Tollensova činidla s redukčním činidlem m-hydroxybenzaldehydem. Tato metoda je prováděna za zvýšené teploty. [3]

Mezi nejpoužívanější fyzikální metody patří metoda využívající cílenou kondenzaci par, pomocí zahřívání a následného prudkého ochlazení. [3]

Mezi biologické metody je řazena již zmíněná produkce pomocí bakterií, ale také pomocí hub nebo rostlin. [3] Tato metoda je velmi využívána, protože bakterie, houby i rostliny dokáží produkovat stříbrné nanočástice pomocí enzymů a ostatních látek přítomných v organismu. Dalším důvodem je ekologičnost této metody a nízké náklady. Mezi houby, které se podílejí na produkci stříbrných nanočástic patří například *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus* nebo *Trichoderma viride*. [3,4] Houba *Fusarium oxysporum* je schopna redukovat, pomocí enzymu nitrátreduktáza, stříbrné ionty ve vodném roztoku. Výsledkem je extrémně stálý stříbrný hydrosol. Vzniklé nanočástice jsou stabilizovány v roztoku proteinů sekretovaných houbou. Velikost nanočástic se pohybuje v rozmezí 5 až 15 nm. Další zkoumanou houbou byla vláknitá houba *Aspergillus fumigatus*. Byla zkoumána také extracelulární biosyntéza nanočástic stříbra. Průběh syntézy byl poměrně rychlý, během několika minut došlo ke kontaktu stříbrných iontů s buněčným filtrátem a k syntéze nanočástic. Mechanismus redukce stříbrných iontů u vláknitých hub zatím není jasný, pravděpodobně zde dochází k redukci pomocí enzymu reduktázy. [3] Houba *Trichoderma viride*, se zase ukázala jako důležitá složka pro

extracelulární tvorbu stříbrných nanočástic. Velikost stříbrných nanočástic se pohybuje v rozmezí 5-40 nm. [4]

### 2.3 Uměle vytvořené bakterie

Jedná se o bakterie, které se začnou produkovat nanočástice kovu (tedy začnou se chovat jako magnetické bakterie) až po aplikaci částic následného záření nebo magnetu [5], nebo jen po aplikaci například dusičnanu stříbrného. Pro produkci se využívá schopnost bakterie adaptovat se na nové prostředí a tím i využití jednotlivých metabolických drah na produkci nanočástic kovu. [2] Pro produkci se využívají bakterie, které jsou blízké lidskému tělu, jako *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* ssp. *casei* nebo *Lactobacillus fermentum*.

#### 2.3.1 Produkce stříbrných částic bakteriemi

První syntéza stříbra byla provedena v roce 2000 pomocí bakterie *Bacillus licheniformis*. Bakterie byla přidána do vodného roztoku obsahující stříbrné nanočástice. [3] Studie zabývající se produkcí stříbrných nanočástic bakteriemi se snažily o syntézu stříbrných nanočástic jak extracelulárně, tak intracelulárně. Vzhledem k jednoduššímu a také levnějšímu provedení se do popředí dostává především extracelulární biosyntéza stříbrných nanočástic.

Způsobem, jak získat stříbrné nanočástice, je dále srážení v důsledku metabolické aktivity bakterie. Mezi bakterie, které mají potenciál tímto způsobem nanočástice produkovat jsou řazeny *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas proteolytica*, *Pseudomonas meridiana*, *Arthrobakter kerguelensis*, *Bacillus indicus* a mnoho dalších. Tyto bakterie byly nalezeny ve slaných vodách průmyslových zón. Ovšem největší potenciál k produkci stříbrných nanočástic měl z této skupiny *Bacillus* sp., který se ukázal být schopen produkovat stříbro jak extracelulárně, tak intracelulárně. [6] Dalším adeptem na produkci stříbrných nanočástic je bakterie, která je blízká našemu tělu a střevní mikroflóře, a to *Escherichia coli*. Tato bakterie je schopna stříbrné nanočástice produkovat jen extracelulárně, ale vzhledem k tomu, že je bližší našemu tělu, je lepším adeptem pro transport léčiv než jiné. [7]

#### 2.3.2 *Bacillus* sp.

*Bacillus* sp. je rod vyskytující se v půdě, rostlinách a vodě. Produkce stříbrných nanočástic u tohoto rodu probíhá v přítomnosti 1 mM AgNO<sub>3</sub>. Nanočástice jsou produkovány extracelulárně při pokojové teplotě. [6]

##### 2.3.2.1 Izolace

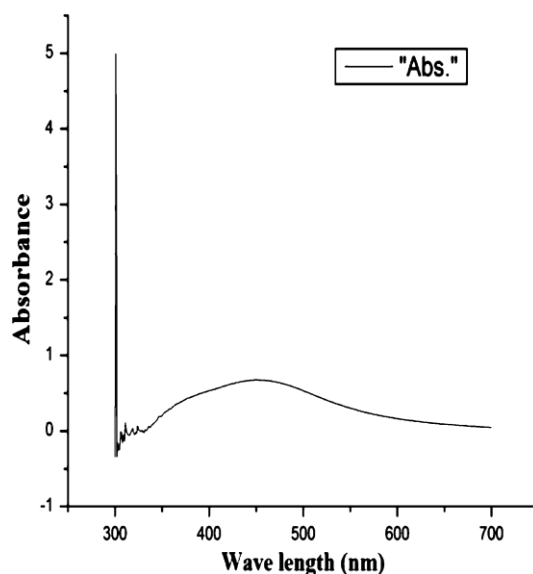
Vzorky, které obsahovaly tuto bakterii, byly posbírány v průmyslových zónách. Vzorek byl rozpuštěn v 0,8% NaCl a následně aplikován na médium. Poté byl vzorek naočkován na agar, který obsahoval 1 mM roztoku dusičnanu stříbrného. Následně byl vzorek inkubován při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Pro studii produkce nanočástic stříbra byl použit supernatant vzniklý smícháním bakterie se sterilní kulturou a následnou centrifugací. Produkce nanočástic probíhala jak intracelulárně, tak extracelulárně. [6]

##### 2.3.2.2 Výsledky

Během experimentu bylo studováno 11 bakterií. Všechny bakterie, které byly použity pro tento experiment, byly schopné po aplikaci dusičnanu stříbrného produkovat stříbrné nanočástice. Po odebrání vzorků DNA bylo zjištěno, že většina těchto bakterií patří do skupiny *Bacillus* sp. Byla sledována také změna barvy bakterií, které byly kultivovány na biomase a v supernatantu, po aplikaci dusičnanu stříbrného. Po 24 hodinách, kdy byly oba vzorky inkubovány za přítomnosti světla, se barva změnila ze světle žluté barvy na hnědou barvu a udržela si ji po dobu 72 hodin. Změna barvy je

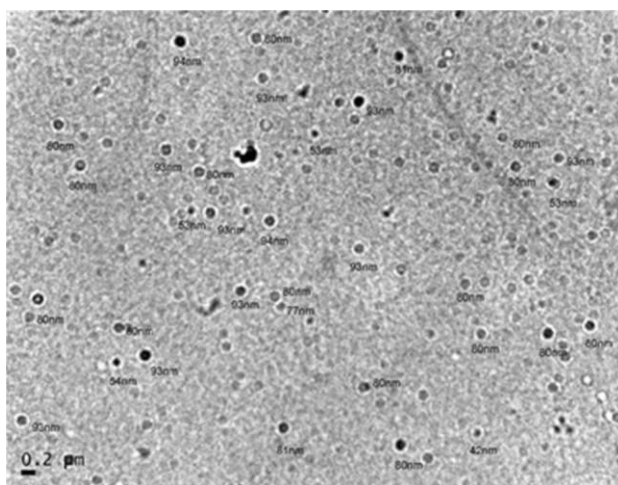
způsobena vytvářením stříbrných nanočástic v systému. I přes to, že byla změna barvy pozorována jak u vzorků obsahující biomasu, tak u vzorků obsahující supernatant, výzkum pokračoval jen s extracelulárními vzorky, a to z důvodu výhodnosti této metody. [6]

Vzorky byly po změně barvy podrobeny UV spektrofotometrii. Co se týče kmenu CS 11, který byl po celou dobu zkoumán a do kterého patří i *Bacillus* sp., tak jeho absorpce se pohybovala kolem 450 nm, což potvrdilo přítomnost stříbrných nanočástic. (Obrázek 2).



Obrázek 2: Graf popisující závislost absorpce na vlnové délce [6]

Následně byly vzorky podrobeny analýze pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM), přičemž bylo zjištěno, že velikost nanočástice se pohybuje kolem 42-94 nm a že mají sférický tvar. (Obrázek 3) [6]



Obrázek 3: Výsledek TEM analýzy stříbrných nanočástic produkovaných *Bacillus* sp. CS 11. Na obrázku jsou zobrazené stříbrné nanočástice v rozmezí velikostí 42-94 nm [6]

### 2.3.3 *Escherichia coli*

V jiném experimentu byla za účelem bioprodukce stříbrných nanočástic zvolena tělu blízká bakterie, a to *Escherichia coli*. Ta byla pro tento výzkum získána z výzkumného centra pro mikrobiální tkáně Chandigarh v Indii. Tyto bakterie se poté dále uchovávaly v agarovém výživovém médiu při teplotě 27 °C. [7]

#### 2.3.3.1 Produkce biomasy

Pro tvorbu biomasy byla *Escherichia coli* uchovávána ve dvou výživových tekutých médiích, jeden z nich byl Nutrient broth medium (NB) a druhý Lysogeny broth medium (LB). Baňky, které obsahovaly tyto média, byly uchovány na míchačce při teplotě 27 °C, otáčky byly nastaveny na 220 rpm. Tato biomasa byla kultivována po dobu 24 hodin a poté centrifugována při 12 000 rpm po dobu 10 minut. [7]

Po proběhnutém experimentu bylo vyhodnoceno, které médium nejvíc vyhovuje produkci nanočástic. Co se týče množství vzniklých nanočástic, tak více vyhovovalo LB médium. Ovšem i zde byla pozorována změna barvy po celou dobu experimentu, a to ze žluté barvy do hnědé v důsledku tvorby stříbrných nanočástic redukcí stříbrna z  $\text{Ag}^+$  na  $\text{Ag}^0$  (zde byla barva nejintenzivnější) (Obrázek 4 a Obrázek 5). [7]

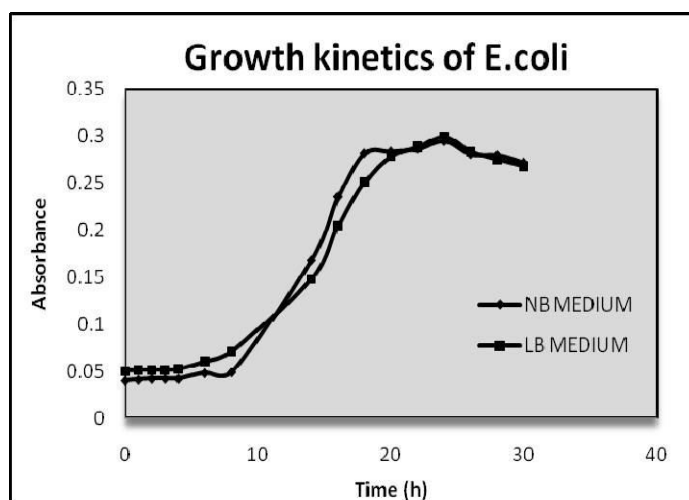


Obrázek 4: Vzorky na NB médiu [7]



Obrázek 5: Vzorky na LB médiu [7]

Musíme ale také vzít v potaz, že změna barvy nemusí vždy nastat ve stejném časovém úseku jako v tomto experimentu. Záleží také na tom, jaké médium si na růst bakterií zvolíme a po jakou dobu je necháme růst a reagovat. Produkce nanočástic v obou médiích byla také zkoumána pomocí absorbance. Kde bylo množství produkce biomasy stejné (Obrázek 6). [7]



Obrázek 6: Graf popisující absorbanci na čase pro NB medium a LB medium [7]

### 2.3.3.2 Přítomnost stříbrných nanočástic

Přítomnost stříbrných nanočástic byla zjišťována v různých časových intervalech při vlnové délce 1 nm pomocí UV-spektrofotometru. Jejich velikost byla analyzována pomocí laserové difraktrometrie. I zde, při prozáření daných vzorků UV světlem, ukázaly tyto vzorky absorpci elektromagnetických vln ve viditelném pásmu. Stejně jako u *Bacillus* sp. je to způsobeno excitací elektronů na povrchu těchto nanočástic, které při této excitaci vyzáří dané světlo. Tento jev se nazývá povrchová plazmová rezonance. [7]

### 2.3.3.3 Charakterizace stříbrných nanočástic

To, že nanočástice vznikly, je patrné už díky barvě, jak už bylo zmíněno v odstavci výše. To, jak tyto nanočástice vznikají v těchto bakteriích, jak dochází k jejich syntéze, jak dochází k redukci

stříbra, ještě není jasné. Jisté je to, že při mikrobiálním růstu dochází k největší produkci stříbrných nanočástic ve stacionární fázi, v níž mají největší aktivitu enzymy, které se právě podílejí na srážení stříbra a vzniku stříbrných nanočástic. Další charakterizace byla, stejně jako v předchozím pokusu s *Bacillus* sp., provedena na UV-spektrofotometru, a to při vlnovém rozpětí od 370 do 410 nm. Vibrace elektronů ve stříbrných nanočásticích byla zjištěna už při 370 nm, samotná excitace proběhla při 390 nm. [7]

## **2.4 Produkce nanočástic *Lactobacily***

*Lactobacily* jsou bakterie, vyskytující se v hojném množství v trávicí soustavě člověka. *Lactobacillus casei* ssp. *casei* je schopen produkovat stříbrné nanočástice po přidání dusičnanu stříbrného a snížení obsahu glukózy. Za produkci stříbrných nanočástic stojí nitrátoreduktáza. [2] *Lactobacillus fermentum* produkuje železné nanočástice po aplikaci maghemitických nanočástic. [5]

### **2.4.1 Optimalizace metody pro syntézu stříbrných nanočástic pomocí *Lactobacillus casei* ssp. *casei***

Studie zabývající se produkcí stříbrných nanočástic bakteriemi rodu *Lactobacillus* si pro optimalizaci této metody vybrala druh *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. Bakterie byly kultivovány v De Mann, Rogosa, Sharp medium (MRS) médiu do exponenciální fáze. Vyroslé kultury byly smíchány s dusičnanem stříbrným, který byl použit jako substrát pro tvorbu nanočástic, v různých koncentracích (0,1; 0,2 a 0,4 mM), dále s 56 mM glukózou, která ve směsi působí jako elektronový donor, s biomasou působící biokatalyzátor, a nakonec byl přidán fosfátový pufr (pH 6,5). Během experimentu byla sledována změna koncentrace směsi během reakce, vliv koncentrace dusičnanu stříbrného na produkci nanočástic, změna zbarvení směsi, efekt biomasy, vliv pH a glukózy jako elektronového donoru. [2]

#### **2.4.1.1 Zbarvení směsi a růstová křivka**

Stejně jako u bakterie *Escherichia coli* i zde došlo ke zbarvení směsi, a to přes žluto-hnědou barvu do tmavě hnědé. Ke změně barvy dochází v důsledku tvorby koloidní suspenze stříbrných nanočástic. Růstová křivka bez přítomnosti dusičnanu stříbrného má krátkou lag fázi a prodlouženou fázi zrychleného růstu, exponenciální fáze tohoto kmenu je krátká a stacionární fáze je prodloužená. Optimální fáze pro odběr bakterií a použití pro experiment je kolem 12 hodin. Pokud přidáme dusičnan stříbrný (i v malém množství), dojde k aktivaci enzymů, které obsahuje tato bakterie a které začnou reagovat na stříbro jako na substrát. Po přidání 0,1 mM dusičnanu stříbrného do kultivačního média proto dojde k prodloužení přípravné fáze asi na 15 hodin, což souvisí s adaptací mikroorganismu na nové prostředí. Růstová křivka byla pozorována pomocí UV/VIS spektrofotometrie při vlnové délce 436 nm, kdy mají stříbrné nanočástice největší absorpci. [2]

#### **2.4.1.2 Enzymy podílející se na produkci nanočástic**

Na produkci nanočástic stříbra se podílí enzym zvaný nitrátoreduktáza. Aktivátorem nitrátoreduktázy je právě dusičnan stříbrný, takže stačí přidání jen malého množství a dojde k transkripci genu, který je zodpovědný za syntézu tohoto enzymu. To, že za produkci stříbrných nanočástic stojí enzymatická reakce, potvrzuje fakt, že zahřátím reakční směsi dojde k inhibici enzymu, a tedy zastavení produkce stříbrných nanočástic. Enzym nitrátoreduktáza je v bakterii zodpovědná za redukci dusičnanu na dusitan. [2]

#### 2.4.1.3 Vliv koncentrace substrátu, pH a TEM analýza

Vliv koncentrace substrátu byl zkoumán s rozdílnými koncentracemi dusičnanu stříbrného (0,1; 1; 2; 4 a 6 mM). Největší produkce stříbrných nanočástic nastala při koncentraci 6 mM. Můžeme také říct, že *Lbc. casei* ssp. *casei* je schopen detoxikovat a redukovat obrovské množství dusičnanu stříbrného na stříbro. Ovšem jsou zde i pochybnosti, že se zvyšujícím se množstvím dusičnanu stříbrného jako substrátu nebude docházet i ke zvýšení toxicity.

Vzhledem k tomu, že se na redukcí stříbrných iontů podílí enzymy, je potřeba během reakce zajistit takové pH, které bude odpovídat pH rozmezí, ve kterém enzym funguje. *Lbc. casei* ssp. *casei* je bakterie, která žije v kyselém prostředí, takže i pH reakční směsi by mělo odpovídat tomuto pH. [4]

Změřením vzniklých nanočástic, po proběhnutí tohoto experimentu, bylo na TEM mikroskopu zjištěno, že vzniklé nanočástice se nacházely jak uvnitř, tak na povrchu, a vně buněk bakterie. Velikost těchto částic se pohybovala v rozmezí 25–100 nm. [2]

#### 2.4.2 Produkce železných nanočástic pomocí *Lactobacillus fermentum*

. Produkce železných nanočástic byla sledována u bakterie, která je velmi blízká naší střevní mikroflóře, a to *Lactobacillus fermentum*. Vědci, kteří se zabývají využitím magnetických bakterií, vědí, jak je těžké jejich aplikace do běžného zdravotnictví. Proto se snaží o nalezení bakterie, strukturálně podobné magnetickým bakteriím, která by byla syntetizována v buňkách buď pomocí *magA* genu, nebo pomocí přenesení buněk na expresi *magA* proteinu. Nakonec se vědci nepokusili o napodobení jejich struktury, ale chování těchto bakterií. K pokusu byla zvolena právě bakterie *Lactobacillus fermentum*. Tato bakterie byla použita jako bioplatforma pro husté uspořádání železných nanočástic na jejím vnějším povrchu, což vedlo ke vzniku tzv. uměle vytvořené magnetické bakterie. Tento stav nastane na základě přiblížení těchto bakterií blíž k sobě a vytvoření vazeb dipól-dipól. Poté přiblížením vnějšího magnetického pole dojde k tomu, že se železné nanočástice začnou spontánně shromažďovat a tím pádem se bakterie začne chovat jako magnetická už při pokojové teplotě. Bohužel nanočástice, které takto vzniknou, mají tendenci k nekontrolovatelným agregacím, a proto jsou v biomedicínských aplikacích nepoužitelné. Použití bakterie jako bioplatformy zajistí, aby tato bakterie neagregovala a zůstala v roztoku. [5]

##### 2.4.2.1 Syntéza železných nanočástic

K tomu, aby se probiotická bakterie chovala jako magnetická, jsou potřeba dva kroky. Napřed podpoříme rozrůstání bakterie, poté aplikujeme holé maghemitické nanočástice. Absorpce těchto nanočástic se uskuteční uvnitř biofilmu. Biofilm je obal složený hlavně z polysacharidů. Zajímavostí je, že po odstranění tohoto biofilmu došlo k úplnému rozpadu shromážděných nanočástic, které byly kolem bakterie. Ovšem byly nalezeny nahodilé agregace ve vnějším prostoru bakterie.

Velkým úspěchem je příprava nanočástic obsahující železo v množství 0,1–25 mg na 1 gram bakterie. Pomocí TEM analýzy a magnetického měření bylo zjištěno, že větší množství železa, tedy 25 mg na 1 gram bakterie má větší akumulaci na bakteriálním filmu. Zajímavostí je, že produkce těchto nanočástic probíhá při běžné pokojové teplotě. Takže běžné maghemitické nanočástice se ze superparamagnetických stanou železo-magnetickými nanočásticemi při 160 K, zatímco u bakterie *Lactobacillus fermentum* je to o 100 K víc. [5]

##### 2.4.2.2 Charakterizace

Po vytvoření umělé magnetické bakterie byly provedeny pokusy a bylo zjištěno, že ač mají nanočástice úplně jinou strukturu, dokážeme napodobit jejich chování. Například bakterie byla označena fluoreskujícím zářením a bylo přiloženo externí magnetické pole. Bakterie, stejně jako běžné

magnetické bakterie v přírodě, začala plavat a směřovat směrem k tomuto magnetickému poli. To dokazuje, že bakterie dokáže přežít aplikaci magnetických nanočástic. Po aplikaci tohoto vnějšího magnetického pole se bakterie stala plně magnetickou. Zajímavé je to, že tato bakterie je schopna reagovat už na slabé magnetické pole (30 mT), zatímco přírodní magnetická bakterie reaguje jen na magnetické pole Země. To je jeden z důvodů, proč by bylo lepší k biomedicínským účelům využívat spíš uměle vytvořené bakterie než ty přírodní. Po aplikaci běžného magnetu můžeme totiž pomocí těchto bakterií transportovat léčiva a „navádět“ tak bakterii na správné místo. A nejen to, vzhledem k tomu, jakou mají lactobacily funkci v našem těle, mohou mít také dobrý vliv na naši imunitu. Pokud bychom je tím pádem použili při léčbě rakoviny pro transport léčiv na postižené místo, tak bychom čistě teoreticky mohli zajistit i rychlejší zotavení organismu. [5] Pro transport léčiv jsou nanočástice zlata konjugovány s molekulami biospecifického rozpoznávání, jako jsou protilátky, molekuly DNA a enzymy. [8]

## **2.5 Využití stříbrných nanočástic**

Stříbrné nanočástice nachází v současné době využití v celé řadě odvětví. Díky jejich antibakteriálnímu účinku se využívají k inhibici bakterií, jako například *E. coli*, dále pro čištění povrchů, nanopasti na viry ve farmakologii nebo také jako nosiče léčiv. [4,9]

### **2.5.1 Antibakteriální efekt**

Stříbro je známé svými antibakteriálními účinky. Mnoho studií se zabývá antibakteriálními účinky na Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie. Z Gram-negativních bakterií je většinou zkoumána bakterie *E. coli* a z Gram-pozitivních bakterií *Staphylococcus aureus*. Z většiny studií vyplývá, že inhibice bakterií je závislá na koncentraci použitých nanočástic. Například studie Sondi a Salopeck-Sondi prokázala, že koncentrace stříbrných nanočástic, která inhibuje růst bakterii *E. coli* se pohybuje v rozmezí 50-60 a 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  pro  $10^5$  CFU a  $10^4$  CFU *E. coli*. Jiná studie popisuje, že nejnížší koncentrace, potřebná na inhibici bakterie *E. coli* je 3,3 nM. Pro *S. aureus* je tato koncentrace desetkrát vyšší, a to 33 nM. [4]

Stříbrné nanočástice se shromažďují uvnitř buněčné membrány, kde následně dochází k poškození až zničení této membrány. K antibakteriální aktivitě stříbrných nanočástic přispívají také povrchové modifikace. Například modifikace pomocí dodecyl sulfátu sodného (SDS). Pokud použijeme tuto modifikaci na stříbrné nanočástice a následně je smícháme s bakterií *S. aureus*, zjistíme, že se potřebná koncentrace na inhibici bakterie je v rozmezí 1,69-13,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Koncentrace je ovšem závislá na použitém kmenu a povrchové modifikaci. Nejnížší dosažená koncentrace, potřebná na inhibici bakterií, byla 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  za použití již zmíněného SDS. [4]

Jelikož mnoho studií prokázalo antibakteriální účinky stříbra, je stříbro dobrým kandidátem pro použití ve farmaceutických a medicínských produktech. Dokázalo by totiž zničit i bakterie rezistentní vůči antibiotikům. [4]

### **2.5.2 Antivirové účinky**

V dnešní době se ve světě objevuje čím dál tím víc nových virových onemocnění, nebo se vrací nemoci, které již byly považovány za vymýcené. Jsou to zejména nemoci způsobené viry jako SARS-Cov, horečka A/H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> a A/H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, HIV virus, Encefalitida a mnoho dalších. Vliv stříbrných nanočástic na viry není až tak prostudovaný jako vliv stříbrných nanočástic na bakterie, přesto jsou některé účinky na viry zaznamenány. [4]

Jednou ze studií bylo zkoumání vlivu stříbrných nanočástic na virus HIV. Výsledkem bylo, že stříbrné nanočástice vykazují anti-HIV aktivitu v časném stádiu virové replikace. Stříbrné nanočástice se váží na *gp120* způsobem, který brání vazbě, fúzi a infekčnosti viru. [4]

Dalším studovaným virem byl virus Hepatitidy B. Tato studie se zabývala antivirovým účinkem stříbrných nanočástic pokrytých PVP (N-vinyl-2-pyrrolidone). Tyto nanočástice vykazují nízkou toxicitu a stačí nízká koncentrace stříbrných částic ke zničení tohoto viru. [4]

Většina studií prokazuje antivirové účinky stříbra. Stříbro se váže na vnější proteiny virových částic a tím inhibuje daný virus a znemožňuje jeho replikaci. Přestože antivirový mechanismus není přesně znám, mohou být stříbrné nanočástice navrženy jako potenciální antivirové látky. [4]

### **2.5.3 Čištění vody a povrchů**

Nedostatek pitné vody je v dnešní době velkým problémem po celém světě, a to zvláště v rozvojových zemích.

Vzhledem k již zmíněným antibakteriálním účinkům stříbrných nanočástic se celá řada studií zabývá jejich využitím na čištění vody. V jedné ze studií dochází k použití bakterií mléčného kvašení pro produkci nanočástic stříbra, které lze následně aplikovat za účelem čištění vody. Použití bakteriálně produkováných nanočástic stříbra souvisí s buněčnou stěnou, která slouží jako mikroskopická nosná matice pro vzniklé nanočástice a tím pádem brání v agregaci. Proto takto vyrobené nanočástice jsou velmi slibné pro použití v desinfekčních prostředcích. [4]

Nanočástice stříbra se dají také použít jako povrchový nátěr, který chrání povrchy před bakteriemi. Tyto nanočástice jsou smíchány s oleji a použity na různé povrchy od dřeva přes sklo až po ocel. Výsledky studií ukazují, že povrchy pokryté barvou nanočástic stříbra mají vynikající antimikrobiální vlastnosti tím, že zabíjejí jak grampozitivní lidské patogeny (*S. aureus*), tak i gramnegativní (*E. coli*). [4]

### **2.5.4 Jiné aplikace**

Stříbrné nanočástice nachází uplatnění v celé řadě oborů. Aplikace je závislá na schopnosti syntetizovat částice s různým chemickým složením, tvarem, velikostí a monodisperzí.

Stříbrné nanočástice se používají například jako spektrální selektivní povlak pro absorpci solární energie, interkalační materiál pro elektrické baterie, optické receptory, polarizační filtry, katalyzátory chemických reakcí a jako již zmíněná antibakteriální činidla. [3] Nanočástice stříbra se také využívají jako tzv. nanopastí na viry ve farmakologii. V medicíně se stříbrné magnetické nanočástice vyskytují v diagnostické metodě magnetická rezonance (MRI), kde působí jako kontrastní látky. Další alternativou je použití magnetických nanočástic jako nosiče léčiv. Aplikace takových léků by probíhala pomocí magnetického pole. Pomocí této metody by bylo možné imobilizovat hormony a enzymy uvnitř nebo vně vhodných nanostruktur a transport do příslušných oblastí organismu. Výhodami této metody je řízené uvolňování léčiv, aplikace pouze na postižená místa a tím i šetrnost k organismu. [9]

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je vypracování literárního přehledu na téma biosyntéza magnetických nano- a mikročástic pomocí mikroorganismů.

Experimentální část je zaměřena na sledování produkce nanočástic stříbra u vybraných mikrobiálních kmenů rodu *Lactobacillus* v přítomnosti různé koncentrace dusičnanu stříbrného v prostředí.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Všechny postupy byly dělány podle návodů uvedených ve skriptech Španová a Rittich [10] a podle článku Silver Nanoparticles production with Probiotic Bacteria [11]

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Použité bakteriální kmeny

Použité bakteriální kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů. (Czech Collection of Microorganisms (CCM)) sídlící na Masarykově universitě v Brně (ČR).

- *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup>
- *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7089
- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1828<sup>T</sup>

#### 4.1.2 Bakteriální DNA

Pro sestavení kalibrační křivky použité pro kvantifikaci bakteriální DNA v PCR v reálném čase byla použita komerční bakteriální DNA *Escherichia coli* (D4889) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

#### 4.1.3 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Serva, Heidelberg, SRN)
- Dusičnan stříbrný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Monohydrát glukózy (Lachema, Brno, ČR)
- Monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lachema, Brno, ČR)
- Lactobacillus MRS broth médium (HIMEDIA, Bombaj, Indie)
- Octan sodný
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Další běžné chemikálie byly z komerční sítě v kvalitě p.a.

#### 4.1.4 Kultivační média

##### • MRS médium

De Mann, Rogosa, Sharp medium (MRS médium) bylo připraveno podle návodu výrobce uvedeného na obalu. Následně bylo médium vysterilizováno v autoklávu při 121°C po dobu 5 min.

##### • MRS agar

MRS agar byl připraven podle návodu výrobce uvedeného na obalu. Následně byla půda vysterilizována při teplotě 121°C po dobu 5 min.

#### **4.1.5 Roztoky**

##### **4.1.5.1 Roztoky pro lyzi bakteriálních buněk**

- **0,5 M EDTA (pH 8,0)**

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody za stálého míchání na magnetické míchačce. Pomocí NaOH bylo upraveno pH na hodnotu 8,0. Roztok byl doplněn do objemu 1 l destilovanou vodou, rozdělen do alikvotních podílů a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C

- **1 M Tris-HCl (pH 7,8)**

12,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 7,8. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do objemu 100 ml a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C.

- **Lyzační roztok A**

Bylo smícháno 10 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněn destilovanou vodou do objemu 100 ml.

- **Lyzační roztok B**

K připravenému lyzačnímu roztoku A byl přidán lysozym na výslednou koncentraci 3,0 mg/ml.

- **20% SDS**

20 g SDS bylo rozpuštěno v 80 ml sterilní destilované vody při teplotě 68 °C. Roztok byl doplněn do 100 ml destilovanou vodou. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

- **Proteináza K (1 mg/ml)**

10 mg proteinázy K bylo rozpuštěno v 10 ml sterilní destilované vody. Roztok byl rozdělen do alikvotů a uchováván při teplotě –20 °C.

##### **4.1.5.2 Komponenty pro PCR**

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- 10×PCR Blue Buffer (obsahuje 750 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25 °C), 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1% Tween 20, 25 mM MgCl<sub>2</sub>) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Směs dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/μl) (Top-Bio, Praha, ČR)

##### **4.1.5.3 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu**

- **0,5×TBE pufr**

V 600 ml destilované vody bylo rozpuštěno 54 g Tris-báze 27,5 g kyseliny borité. Následně bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněno destilovanou vodou do 1000 ml. Před použitím byl TBE pufr 10× zředěn na výslednou koncentraci.

- **Barvicí lázeň**

100 μl roztoku ethidiumbromidu (5 mg/ml) bylo zředěno 500 ml destilované vody.

- **DNA standart**

100 bp žebříček (obsahuje fragmenty DNA o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 9000, 1000, 1 200, 1 500 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)

- **Nanášecí pufr Yeloow load**

(6×koncentrovaný, obsahuje barvivo orange G) (Top-Bio, Praha, ČR)

#### **4.1.5.4 Roztoky pro skrining produkce nanočástic stříbra**

- **1 M dusičnan stříbrný**

Ve 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 16,99 g krystalického dusičnanu stříbrného. Roztok byl sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C. Uchováván byl při laboratorní teplotě.

- **1 mM glukóza**

Ve 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 19,82 g monohydrátu glukózy. Roztok byl sterilizován v autoklávu 20 minut při teplotě 121 °C. Uchováván byl při laboratorní teplotě.

- **0,2 M hydrogenfosforečnan sodný**

V 250 ml destilované vody bylo rozpuštěno 6,9 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného. Roztok byl sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C. Uchováván byl při laboratorní teplotě.

- **0,2 M dihydrogenfosforečnan sodný**

V 250 ml destilované vody bylo rozpuštěno 6,9 g dihydrátu hydrogenfosforečnanu sodného. Roztok byl sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C. Uchováván byl při laboratorní teplotě.

- **Fosfátový pufr**

Se 125 ml sterilní vody bylo smícháno 76,25 ml zásobního roztoku 0,2 M hydrogenfosforečnanu sodného a 48,75 ml zásobního roztoku 0,2 M dihydrogenfosforečnanu sodného. Takto připravený pufr byl uchováván při laboratorní teplotě.

#### **4.2 Pomůcky a přístroje**

- Běžné laboratorní sklo, umělohmotné a kovové pomůcky apod.
- BIOWAVE CO8000 CELL DENSITY METER Seriál No 994 (WPA, Cambridge, UK)
- Centrifuga FVL-2400N Combi-Spin/Vortex (bioSan, Riga, Litva)
- Centrifuga MINI Spin 13 400 min<sup>-1</sup> (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuga Hettich EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Německo)
- Exikátor (KIF LAB)
- Hybridizační pec Micro Hybridization Incubator 2000 (Sci Gene, Sunnyvale, USA)
- Ilumina Eco Real\_Time PCR systém (Ilumina, USA)
- Inkubační box UVC/T-AR, DNA/RNA UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (OHAUS, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Finnpiette F2 různých objemů (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- NanoPhotometer (Implen, München, Německo)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermocycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Austrálie)
- Termocycler Minicycler™ (BIO-RA Lab., USA)
- Transiluminátor TVR 2121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (labnet International, Woodbridge, USA)

## 4.3 Metody

### 4.3.1 Ožívování a uchovávání bakteriálních kultur

Tekuté MRS médium bylo napipetováno do čtyř skleněných zkumavek po 10 ml. Do tří jednotlivých zkumavek byla naočkována příslušná kultura *Lactobacillus*, poslední zkumavka sloužila jako slepý vzorek. Kultury byly kultivovány po dobu 96 hodin při teplotě 37°C.

Po této době byly kultury po 100 µl přeočkovány do 10 ml MRS média. Přeočkované kultury byly kultivovány po dobu 22 hodin při teplotě 37°C. Narostlé kultury byly skladovány v chladničce při teplotě 4°C.

### 4.3.2 Příprava hrubých lyzátů buněk

- Do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky byl napipetován 1 ml přeočkových kultur. Suspenze byla centrifugována po dobu 3 minut při 13 400 ot/min.
- Supernatant byl slit a byl rozsuspendován v 1 ml lyzačního roztoku A. Následně byla suspenze centrifugována po dobu 3 min při 13 400 ot/min.
- K sedimentu bylo přidáno 500 µl roztoku B a byl rozsuspendován. Následně byly vzorky inkubovány po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě.
- K suspenzím bylo přidáno po 12,5 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K. Roztoky byly promíchány a inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 55°C.

### 4.3.3 Izolace DNA pomocí magnetických mikročástic.

- Do 6 Eppendorfových zkumavek byly napipetovány komponenty podle Tabulky 1, použité magnetické nosiče jsou uvedeny v Tabulce 2
- Po smíchání komponent byla směs inkubována 15 min při laboratorní teplotě.
- Směs byla umístěna do magnetického separátoru a magnetické částice byly separovány po dobu 15 min při laboratorní teplotě.
- Po uplynutí této doby byl odebrán supernatant.
- Z magnetického separátoru byl vyjmut magnetický pás a do zkumavek bylo napipetováno 500 µl 70% ethanolu.
- Vzorek byl promíchán, byl vložen magnetický pás a po 2 minutách byl ethanol odpipetován.
- Eppendorfovy zkumavky byly vyjmuty ze separátoru a vloženy do exsikátoru.
- DNA adsorbovaná na magnetických částicích byla eluována při laboratorní teplotě do 50 µl TE pufru.
- Po 24 hodinách byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát byl odebrán do čistých Eppendorfových zkumavek.

Tabulka 1: Složení směsi pro separaci DNA

| Krok   | Složka                     | Podíl (hm) |
|--------|----------------------------|------------|
| 1      | Voda                       | 100        |
| 2      | NaCl                       | 200        |
| 3      | DNA                        | 50         |
| 4      | PEG 6000 (40%)             | 100        |
| 5      | Magnetický nosič (2 mg/ml) | 50         |
| Celkem |                            | 500        |

Tabulka 2: Použité magnetické částice

| Částice    | Fe (%hm.) | Průměr částice | Koncentrace (mg/ml) | PDI  | -COOH (mM/g) | -NH <sub>2</sub> (mM/g) | Polymer        |
|------------|-----------|----------------|---------------------|------|--------------|-------------------------|----------------|
| Fkol 77ox  | 10,02     | 2,23 μm        | 2,00                | 1,81 | 0,764        | -                       | P(HEMA-co-GMA) |
| F79/L3-PLL | 69,8      | 6,20 nm        | 0,10                | 1,37 | -            | 69,8                    | -              |

*Fe (%) je hmotnostní obsah železa v magnetické částici, PDI je index polydispersity (poměr hmotnosti a počtu nosičů průměrné velikosti), P(HEMA-co-GMA) je poly(hydroxyethylmethakrylát-co-ethylendimethakrylát)*

#### 4.3.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA

- Roztok DNA v TE pufru o objemu 3 μl byly nanесeny na čochku Label Gard<sup>TM</sup> mikrolitrové kyvety NanoPhotometru<sup>TM</sup>.
- Byla změřena absorbance pro vlnové délky 230 nm (minimum absorbance pro DNA), 260 nm (maximum absorbance pro DNA), 280 nm (maximum absorbance pro proteiny) a 320 nm oproti TE pufru.
- Z hodnoty absorbance pro 260 nm byla vypočtena koncentrace DNA ve vzorku. Z hodnoty  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  byla určena čistota vzorku DNA

#### 4.3.5 Polymerázová řetězová reakce

##### 4.3.5.1 Kvantitativní PCR

- Všechny komponenty (složení qPCR 2x SYTO-9 Mater Mixu je uvedené v Tabulce 3), uvádí Tabulce 4, byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány
- Bylo připraveno 25 μl směsi v pořadí, uvedeném v Tabulce 4 směsi byly namíchány v boxu vyzářeném UV lampou a napipetovány do 200 μl Eppendorfových zkumavek
- Použité primery pro kvantitativní PCR jsou uvedené v Tabulce 5 a Tabulce 6
- Byla připravena negativní kontrola, kdy místo 1 μl DNA matrice byl k 24 μl PCR směsi přidán 1 μl vody pro PCR.
- Všechny vzorky byly před PCR promíchány na centrifuze a vloženy do termocykleru s nastaveným specifickým programem uvádí Tabulka 7 a Tabulka 8
- Po skončení PCR byla provedena detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.6.

Tabulka 3: Složení qPCR 2x SYTO-9 Master Mix

| qPCR 2x SYTO-9 Master Mix                       |                      |
|-------------------------------------------------|----------------------|
| Komponenta                                      | Výsledná koncentrace |
| Tris-HCl, pH 8,8                                | 75 mM                |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 20 mM                |
| Tween 20                                        | 0,01 %               |
| MgCl <sub>2</sub>                               | 2,5 mM               |
| Každý dNTP                                      | 200 µM               |
| Taq DNA polymeráza                              | 25 U/ml              |
| Monoklonální protilátka anti-Taq                |                      |
| DNA barvivo Syto-9                              |                      |
| Stabilizátory a aditiva                         |                      |

Tabulka 4: Složení směsi pro kvantitativní PCR

| Pořadí | Komponenta                | Objem [µl] pro PCR |
|--------|---------------------------|--------------------|
| 1.     | Voda pro PCR              | 9,5                |
| 2.     | qPCR 2x SYTO-9 Master Mix | 12,5               |
| 3.     | Primer (10 pmol/µl)       | 1                  |
| 4.     | Primer (10 pmol/µl)       | 1                  |
| 5.     | Matrice DNA               | 1                  |

Tabulka 5: Primery specifické pro doménu Bacteria [12]

| Primery | Sekvence primerů (5'-3')           | Velikost PCR produktů |
|---------|------------------------------------|-----------------------|
| F_eub   | TCC TAC GGG AGG CAG CAG T          | 466 bp                |
| R_eub   | GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT |                       |

Tabulka 6: Primery specifické pro druh *Lactobacillus rhamnosus* [13]

| Primery  | Sekvence primerů (5'-3')        | Velikost PCR produktů |
|----------|---------------------------------|-----------------------|
| RhamFW   | TTG CAT CTT GAT TTA ATT TTG ACC | 683 bp                |
| UniverRV | TTC GCC ACT GGT GTT CTT CC      |                       |

Tabulka 7: Teplotní program pro doménu Bacteria

| Prodloužená denaturace DNA | Denaturace DNA | Hybridizace primerů | Syntéza nových řetězců DNA | Dosyntetizovaná DNA |
|----------------------------|----------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| 95 °C /5 min               | 95 °C 30 s     | 55 °C /30 s         | 72 °C /1 min               | 72 °C /5 min        |
|                            | 30 cyklů       |                     |                            |                     |

Tabulka 8: Teplotní program pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

| Primery  | Prodloužená denaturace DNA | Denaturace DNA | Hybridizace primerů | Syntéza nových řetězců DNA | Dosyntetizování DNA |
|----------|----------------------------|----------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| RhamFW   | 94 °C /5 min               | 94 °C /1 min   | 58 °C /1 min        | 72 °C /2 min               | 72 °C /10 min       |
| UniverRV |                            | 35 cyklů       |                     |                            |                     |

#### 4.3.5.2 Konvenční PCR

- Všechny komponenty, uvedené v Tabulce 9, byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány
- Bylo připraveno 25 µl směsi v pořadí, uvedeném v Tabulce 9, směsi byly namíchány v boxu vyzářeném UV lampou a napipetovány do 200 µl Eppendorfových zkumavek
- Použité primery pro konvenční PCR jsou uvedené v Tabulce 10 a Tabulce 11
- Následně byla směs rozpipetována po 24 µl do Eppendorfových zkumavek a do každé byl přidán 1 µl izolované DNA.
- Byla připravena negativní kontrola, kdy místo 1 µl DNA matrice byl k 24 µl PCR směsi přidán 1 µl vody pro PCR.
- Všechny vzorky byly před PCR promíchány na centrifuze a vloženy do termocykleru s nastaveným specifickým programem uvedeném v Tabulce 12 a Tabulce 13
- Po skončení PCR byla provedena detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy podle postupu uvedeném v kapitole 4.3.6.

Tabulka 9: Složení směsi pro konvenční PCR

| Pořadí | Komponenta                         | Objem [µl] pro PCR |
|--------|------------------------------------|--------------------|
| 1.     | Voda pro PCR                       | 19                 |
| 2.     | 10x reakční pufr kompletní         | 2,5                |
| 3.     | Směs dNTP (10 mM)                  | 0,5                |
| 4.     | Primer (10 pmol/µl)                | 0,5                |
| 5.     | Primer (10 pmol/µl)                | 0,5                |
| 6.     | <i>Taq</i> DNA-polymeráza (1 U/µl) | 1,0                |
| 7.     | Matrice DNA (10 ng/µl)             | 1,0                |

Tabulka 10: Primery specifické pro rod *Lactobacillus* [12]

| Primery   | Sekvence primerů (5'-3')           | Velikost PCR produktů |
|-----------|------------------------------------|-----------------------|
| F_alllact | TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA         | 92 bp                 |
| R_alllact | AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT |                       |

Tabulka 11: Primery specifické pro druh *Lactobacillus casei* [13]

| Primery | Sekvence primerů (5'-3')              | Velikost PCR produktů |
|---------|---------------------------------------|-----------------------|
| FcaseIS | CTA TAA GTA AGC TTT GAT CGC GAG ATT T | 132 bp                |
| RcaseIS | CTT CCT GCG GGT ACT GAG ATG T         |                       |

Tabulka 12: Teplotní program pro rod *Lactobacillus*

| Prodloužená denaturace DNA | Denaturace DNA | Hybridizace primerů | Syntéza nových řetězců DNA | Dosyntetizovaná DNA |
|----------------------------|----------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| 95 °C /5 min               | 94 °C /30 s    | 58 °C /30 s         | 72 °C /1 min               | 72 °C /5 min        |
|                            | 30 cyklů       |                     |                            |                     |

Tabulka 13: Teplotní program pro druh *Lactobacillus casei*

| Prodloužená denaturace DNA | Denaturace DNA | Hybridizace primerů | Syntéza nových řetězců DNA | Dosyntetizovaná DNA |
|----------------------------|----------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| 94 °C /5 min               | 94 °C /30 S    | 54 °C /30 S         | 72 °C /1 min               | 72 °C /10 min       |
|                            | 30 cyklů       |                     |                            |                     |

#### 4.3.6 Elektroforéza

- Byl připraven 1,6 % agarósový gel z 1,6 g agarósy na 100 ml 0,5 ml TBE pufru. Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě.
- Směs byla nalita do vaničky s hřebínkem, kde byla ponechána 30 min ztuhnout. Po ztuhnutí gelu byl odstraněn hřebínek.
- Na gel byly nanášeny vzorky po PCR po 15 µl, které byly míchány se 3 µl barviva.
- Na konec celé řady bylo napipetováno 5 µl DNA standardu.
- Gel byl dán do vany a zalit TBE pufrem
- Celá souprava byla zapojena do zdroje gelové elektroforézy, elektroforéza probíhala při napětí 80 V po dobu 3 hodin.
- Po skončení elektroforézy byl gel vložen do barvicího roztoku ethidium bromidu.
- Po odbarvení byl pozorován na transiluminátoru v UV světle a dokumentován fotograficky.

#### 4.3.7 Médium pro produkci stříbra

- Do 3 Erlenmeyerových zkumavek bylo napipetováno 50 ml modifikovaného média
- Do média bylo napipetováno 1 500 µl nakultivovaných bakterií
- Na závěr bylo přidáno 0,5 µl 1 M dusičnanu stříbrného

#### 4.3.8 MRS médium

- Do 3 Erlenmeyerových baněk bylo napipetováno 50 ml MRS tekutého média
- Do média bylo naočkováno 1 500 µl nakultivovaných bakterií
- Bakterie byly ponechány ke kultivaci po dobu 48 hodin
- Poté bylo k bakteriím přidáno 0,5 µl 1 M

#### 4.3.9 Nepřímé stanovení počtu buněk kultivační metodou

- Pro výše uvedené druhy *Lactobacilli* bylo provedeno desítkové ředění do sterilní vody.
- Bylo připraveno agarové médium podle návodu výrobce.
- Do 36 Petriho misek bylo rozlito 400 ml agaru a byl ponechán ztuhnout.
- Všechna ředění byla naočkována po 0,1 ml roztěrem na Petriho misky a ponechána ke kultivaci při 37°C na 48 hodin.
- Poté byl zjišťován počet narostlých kolonií.

#### **4.3.10 Stanovení růstových křivek bakteriálních kultur rodu *Lactobacillus***

- Do 20 ml tekutého MRS média a média s přidaným dusičnanem stříbrným v konečné koncentraci 0,1 mM a 0,01 mM bylo sterilně naočkováno 200 µl stacionární kultury rodu *Lactobacillus*
- Buňky byly kultivovány anaerobně při teplotě 37°C bez míchání
- V průběhu kultivace bylo po dvanácti hodinách od započetí kultivace odebíráno po 1 ml kultury, a byla měřena absorbance při vlnové délce 600 nm, jako blank bylo použito kultivační médium.
- Naměřené hodnoty optických hustot byly použity k vytvoření růstových křivek pomocí počítačového softwaru Microsoft Excel

#### **4.3.11 Produkce nanočástic stříbra**

- Po kultivaci buněk v tekutém médiu s přidaným dusičnanem stříbrným byly kultury centrifugovány při 6 000 ot/min po dobu 5 minut.
- Sedimenty buněk (asi 1,25 ml) byly promyty fosfátovým pufrům (1 ml), znovu centrifugovány a poté v 250 µl alikvotních množstvích přidávány do reakčních směsí.
- Do 15 ml zkumavek byla připravena reakční směs o celkovém objemu 5 ml. Směs obsahovala 4,72 ml fosfátového pufru o pH 7,0, 282 µl 1 mM glukózy a 250 µl sedimentu buněk.
- Do jednotlivých zkumavek byl ředěn 1,0 M zásobní roztok dusičnanu stříbrného na výsledné koncentraci 0,1mM, 1,0 mM, 2,0 mM a 4,0 mM.
- Byla připravena kontrola reakčních směsí bez dusičnanu stříbrného.
- Reakční směsi byly inkubovány ve tmě, při teplotě 37°C v hybridizační pídce a otáčeny rychlostí 6 ot/min po dobu 144 hodin a po té ve tmě při laboratorní teplotě, bez třepání.
- Po 24, 48, 72, 144 a 360 hodinách byly odebírány vzorky a analyzovány spektrometrií v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/VIS spektrometrie). Reakční směsi byly 20krát ředěny sterilní vodou, aby se eliminovala interference v průběhu měření.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Kultivace bakterií a kontrola čistoty

Bakterie byly kultivovány v tekutém MRS médiu. Čistota kultivovaných bakterií byla ověřena pomocí křížového roztěru na MRS agaru. Narostlé kultury byly přibližně stejné velikosti a tvaru. Ukázka jednoho z křížových roztěrů, *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup> na Obrázku 7.



Obrázek 7: Křížový roztěr bakteriální kultury *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup> na MRS agaru

### 5.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Lyzáty byly připravené z kultur rodu *Lactobacillus*, kultivované v MRS tekutém médiu. Izolace DNA byla provedena pomocí magnetických částic (Fkol 77ox, F/29/L3). Koncentrace a čistota DNA izolované pomocí magnetických nosičů byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje Nanodrop. Podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.4.

Pro kvantitativní PCR byly naměřeny koncentrace a čistota DNA uvedené v Tabulce 14.

Pro konvenční PCR byly naměřeny koncentrace a čistota DNA uvedené v Tabulce 15.

Tabulka 14: Čistota a koncentrace DNA izolované z bakteriálních kmenů pro kvantitativní PCR

| Bakteriální kmen                            | Použité nosiče | A <sub>260</sub> | A <sub>280</sub> | A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> | c [ng/μl] |
|---------------------------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------------------------|-----------|
| <i>Lbc. casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup>     | Fkol 77 ox     | 0,467            | 0,327            | 1,43                               | 23,4      |
| <i>Lbc. casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup>     | F 79/L3        | 0,169            | 0,104            | 1,62                               | 8,4       |
| <i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup> | Fkol 77 ox     | 0,597            | 0,433            | 1,38                               | 29,8      |
| <i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup> | F 79/L3        | 0,345            | 0,275            | 1,26                               | 17,3      |

Tabulka 15: Čistota a koncentrace DNA izolované z bakteriálních kmenů pro konvenční PCR

| DNA                                         | Použité nosiče | A <sub>260</sub> | A <sub>280</sub> | A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> | c [ng/μl] |
|---------------------------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------------------------|-----------|
| <i>Lbc. casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup>     | Fkol 77 ox     | 0,472            | 0,358            | 1,32                               | 23,6      |
| <i>Lbc. casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup>     | F 79/L3        | 0,363            | 0,291            | 1,25                               | 18,1      |
| <i>Lbc. casei ssp. casei</i> CCM 7089       | Fkol 77ox      | 0,541            | 0,412            | 1,31                               | 27,0      |
| <i>Lbc. casei ssp. casei</i> CCM 7089       | F79/L3         | 0,209            | 0,154            | 1,36                               | 10,5      |
| <i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup> | Fkol 77 ox     | 0,235            | 0,165            | 1,43                               | 87,1      |
| <i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup> | F 79/L3        | 0,235            | 0,165            | 1,43                               | 11,8      |

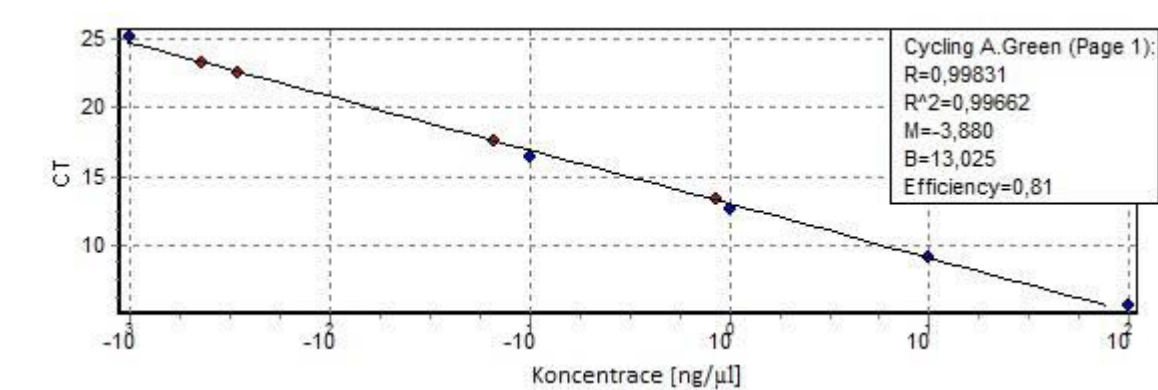
### 5.3 Polymerázová řetězová reakce

Po změření koncentrace izolované DNA a její čistoty, byla všechna DNA, jejíž koncentrace byla vyšší než 20 ng/μl ředěna na 10 ng/μl.

#### 5.3.1 Důkaz přítomnosti bakteriální DNA

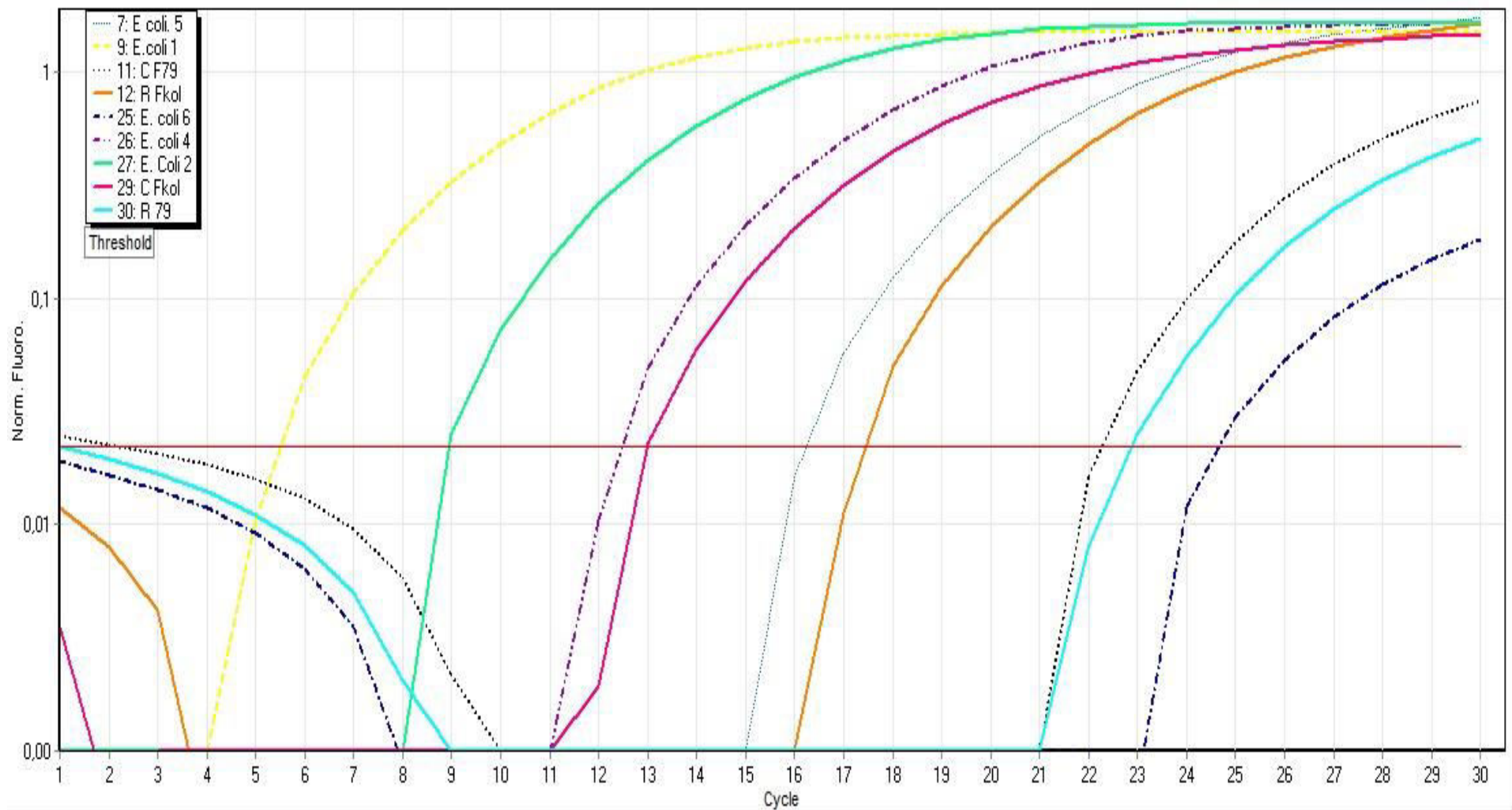
##### 5.3.1.1 Kvantitativní PCR

PCR byla provedena s primery specifickými pro doménu *Bacteria* (primery F\_eub a R\_eub) dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5.1. Ke stanovení koncentrace bakteriální DNA ve vzorcích byla vytvořena kalibrační křivka za použití komerční bakteriální DNA *Escherichia coli* v rozsahu koncentrací (100 ng/μl–1 pg/μl). Ze závislosti C<sub>T</sub> na koncentraci ve srovnání s kalibrační křivkou (bod 1 μg/μl byl pro výpočet zanedbán) byl pomocí softwaru pro cyklu Rotor-gene 6000 (verze 1. 7. 87) stanovena koncentrace cílové DNA v rozmezí 0,002-0,853 ng/μl. Dále byla stanovena reakční účinnost na 81 % (Efficiency), která byla vypočtena ze sklonu amplifikačních křivek (M). Spolehlivost reakce byla odhadnuta z korelačního koeficientu lineární regrese (R<sup>2</sup>) s hodnotou přibližně 0,997. Vše je znázorňuje Obrázek 8 a Obrázek 9. Přítomnost produktu PCR specifického pro doménu *Bacteria* byla potvrzena Melt analýza, její výsledky jsou uvedeny na Obrázek 10.



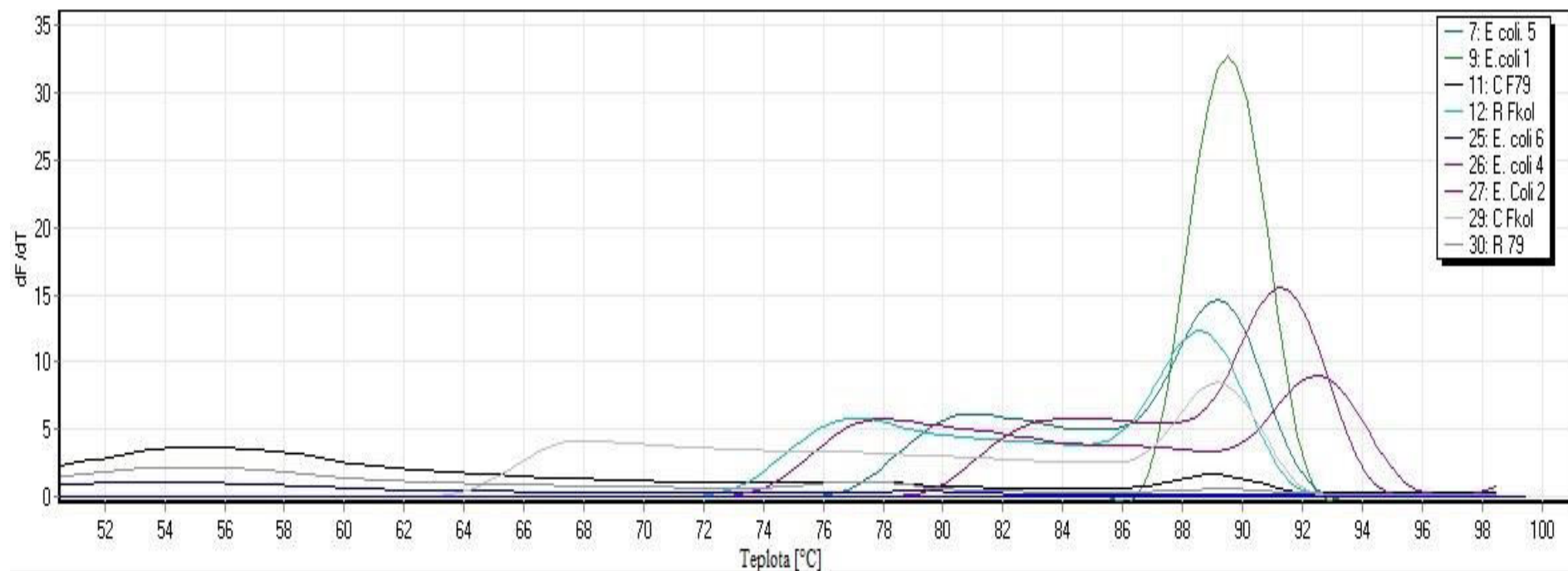
Legenda: modré body – kalibrační křivka sestavená pomocí DNA *Escherichia coli* v rozsahu koncentrací (100 ng/μl–1 pg/μl). červené body – analyzované vzorky

Obrázek 8: Kalibrační křivka - závislosti C<sub>T</sub> na koncentraci



Vysvětlivky: **E. coli 5** – *E. coli* 100 pg/μl, **E. coli 1** – *E. coli* 100 μg/μl, **C F79** – *Lbc. casei* CCM 7088T F 79/L3, **R Fkol** – *Lbc. rhamnosus* CCM 1825T Fkol 77 ox, **E. coli 6** – *E. coli* 10 pg/μl, **E. coli 4** – *E. coli* 1 μg/μl, **E. coli 2** – *E. coli* 10 μg/μl, **C Fkol** – *Lbc. casei* CCM 7088T Fkol 77 ox, **R 79** – *Lbc. rhamnosus* CCM 1825T F 79/L3

Obrázek 9: Amplifikační křivky – závislosti intenzity fluorescence na cyklu reakce



Vysvětlivky: **E. coli 5** – *E. coli* 100 pg/μl, **E. coli 1** – *E. coli* 100 μg/μl, **C F79** – *Lbc. casei* CCM 7088T F 79/L3, **R Fkol** – *Lbc. rhamnosus* CCM 1825T Fkol 77 ox, **E. coli 6** – *E. coli* 10 pg/μl, **E. coli 4** – *E. coli* 1 μg/μl, **E. coli 2** – *E. coli* 10 μg/μl, **C Fkol** – *Lbc. casei* CCM 7088T Fkol 77 ox, **R 79** – *Lbc. rhamnosus* CCM 1825T F 79/L3

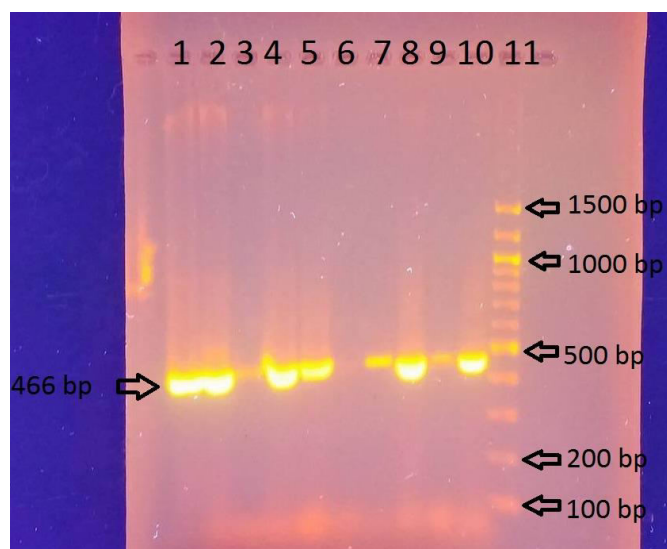
Obrázek 10: Melt analýza produktu PCR specifického pro doménu Bacteria

Výsledky kvantifikace a Met analýzy pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v Tabulce 16.

Tabulka 16: Výsledky kvantifikace a Melt analýzy pro jednotlivé vzorky

| Vzorek                                                 | C <sub>t</sub> | c [ng/μl] | T <sub>m</sub> [°C] |
|--------------------------------------------------------|----------------|-----------|---------------------|
| <i>E. coli</i> 100 ng/μl                               | 5,68           | 78,143    | 97,7                |
| <i>E. coli</i> 10 ng/μl                                | 9,17           | 9,852     | 91,3                |
| <i>E. coli</i> 1 ng/μl                                 | 12,61          | 1,281     | 92,5                |
| <i>E. coli</i> 100 pg/μl                               | 16,44          | 0,132     | 96                  |
| <i>E. coli</i> 10 pg/μl                                | 25,11          | 0,001     | 92,5                |
| <i>Lbc. casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup> F 79/L3        | 22,56          | 0,003     | 95,8                |
| <i>Lbc. casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup> Fkol 77 ox     | 13,29          | 0,853     | 95,8                |
| <i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup> F 79/L3    | 23,27          | 0,002     | 89,2                |
| <i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup> Fkol 77 ox | 17,59          | 0,067     | 95,7                |

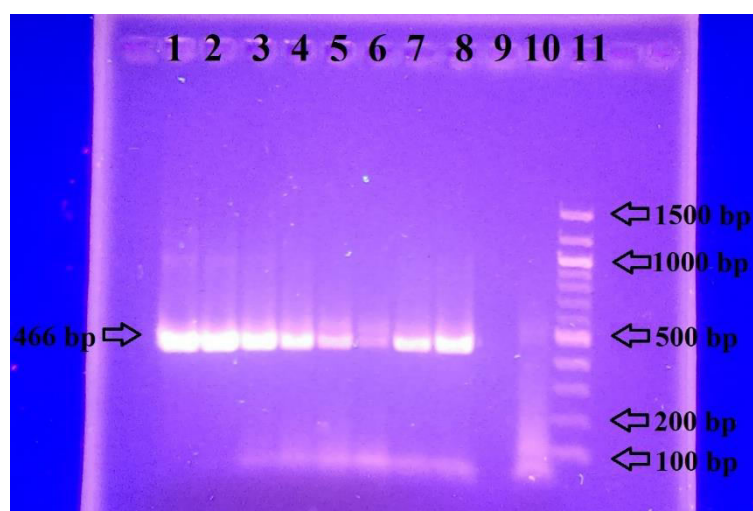
Pro potvrzení výsledků kvantitativní PCR byla provedena agarózová gelová elektroforéza. Výsledkem byl amplifikovaný specifický produkt PCR – úsek o délce 466 bp. Výsledky agarózové gelové elektroforézy jsou zaznamenány na Obrázku 11 a Obrázku 12



| Běh | DNA                                                    | Detekce produktu PCR (466 bp) |
|-----|--------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1.  | <i>E. coli</i> 100 ng/μl                               | +++                           |
| 2.  | <i>E. coli</i> 10 ng/μl                                | +++                           |
| 3.  | <i>E. coli</i> 1 ng/μl                                 | +                             |
| 4.  | <i>E. coli</i> 1 ng/μl                                 | +++                           |
| 5.  | <i>E. coli</i> 100 pg/μl                               | +++                           |
| 6.  | <i>E. coli</i> 10 pg/μl                                | -                             |
| 7.  | <i>Lbc. casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup> F 79/L3        | ++                            |
| 8.  | <i>Lbc. casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup> Fkol 77 ox     | +++                           |
| 9.  | <i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup> F 79/L3    | +                             |
| 10. | <i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup> Fkol 77 ox | +++                           |
| 11. | Standard                                               | 100 bp                        |

Intenzita signálu: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, - nedetekován

Obrázek 11: Výsledek elektroforézy na agarósovém gelu pro doménu Bacteria (466 bp)



| Běh | DNA                                   | Detekce produktu PCR (466 bp) |
|-----|---------------------------------------|-------------------------------|
| 1.  | <i>E. coli</i> 100 ng/μl              | +++                           |
| 2.  | <i>E. coli</i> 10 ng/μl               | +++                           |
| 3.  | <i>E. coli</i> 1 ng/μl                | +++                           |
| 4.  | <i>E. coli</i> 100 pg/μl              | +++                           |
| 5.  | <i>E. coli</i> 10 pg/μl               | ++                            |
| 6.  | <i>E. coli</i> 1 pg/μl                | +                             |
| 7.  | <i>Lbc. casei</i> CCM 7089 Fkol 77 ox | +++                           |
| 8.  | <i>Lbc. casei</i> CCM 7089 F 79/L3    | +++                           |
| 9.  |                                       |                               |
| 10. | Negativní kontrola                    | -                             |
| 11. | Standard                              | 100 bp                        |

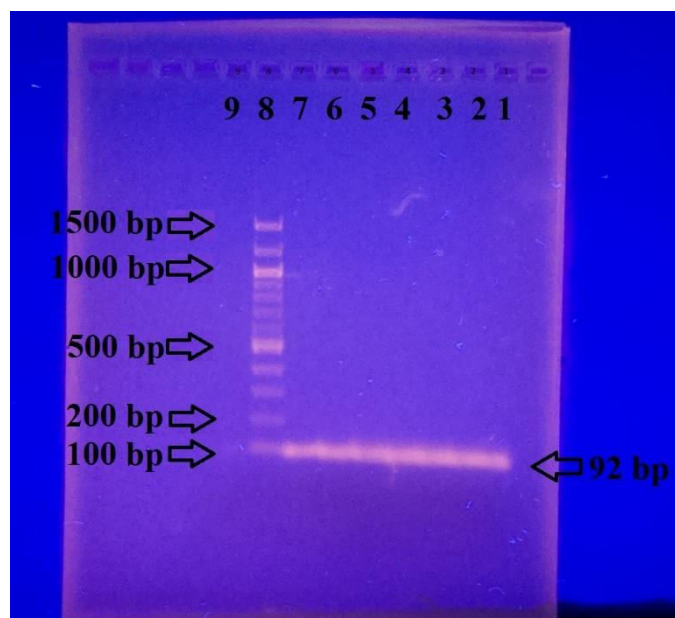
Legenda: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, - nedetekován

Obrázek 12: Výsledek elektroforézy na agarósovém gelu pro doménu Bacteria (466 bp)

Přítomnost specifického produktu PCR pro doménu *Bacteria* o velikosti 466 bp byla prokázána ve všech vzorcích. Tím byla ve všech vzorcích potvrzena přítomnost bakteriální DNA.

### 5.3.2 PCR pro rod *Lactobacillus*

Důkaz přítomnosti bakteriální DNA rodu *Lactobacillus* byla provedena metodou PCR e primery specifickými pro rod *Lactobacillus* [12] podle postupu uvedenému v kapitole 4.3.5.2. Byl amplifikován specifický úsek o délce 92 bp. Specifické amplifikační produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy jejíž výsledek je uveden na Obrázku 13.



| Běh | DNA                                                | Použité nosiče | Detekce produktu PCR |
|-----|----------------------------------------------------|----------------|----------------------|
| 1   | <i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup>        | Fkol 77ox      | +++                  |
| 2   | <i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup>        | F79/L3         | +++                  |
| 3   | <i>Lbc. casei ssp. casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup> | F79/L3         | +++                  |
| 4   | <i>Lbc. casei ssp. casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup> | Fkol 77ox      | +++                  |
| 5   | <i>Lbc. casei ssp. casei</i> CCM 7089              | F79/L3         | +++                  |
| 6   | <i>Lbc. casei ssp. casei</i> CCM 7089              | Fkol 77ox      | +++                  |
| 7   | Pozitivní kontrola                                 |                | +++                  |
| 8   | DNA standart                                       |                | 100 bp               |
| 9   | Negativní kontrola                                 |                | -                    |

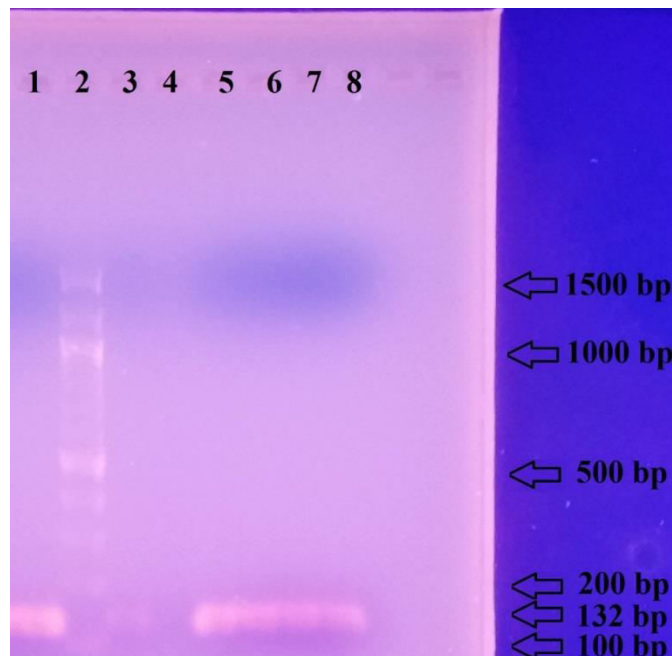
Intenzita signálu: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, - nedetekován

Obrázek 13: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu pro rod *Lactobacillus* (úsek 92 bp)

Detekovaný specifický produkt o velikosti 92 bp potvrdil přítomnost DNA rodu *Lactobacillus* ve všech zkoumaných vzorcích.

### 5.3.3 PCR specifická pro druh *Lactobacillus casei* ssp. *casei*

Důkaz přítomnosti DNA specifické pro druh *Lactobacillus casei* byla provedena metodou PCR se specifickými primery [13]. Metoda byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5.2. Jako pozitivní kontrola byl použit *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> (15,8 ng/μl). Byl amplifikován specifický produkt o délce 132 bp. Přítomnost specifických amplifikačních produktů PCR pro druh *Lactobacillus casei* byla potvrzena na agarózové gelové elektroforéze uvedené na Obrázku 14.



| Běh | DNA                                                       | Magnetické nosiče | Detekce produktu PCR |
|-----|-----------------------------------------------------------|-------------------|----------------------|
| 1   | Pozitivní kontrola                                        |                   | +++                  |
| 2   | Standart                                                  |                   | 100 bp               |
| 3   | Negativní kontrola                                        |                   | -                    |
| 4   |                                                           |                   |                      |
| 5   | <i>Lbc. casei</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup> | F79/L3            | ++                   |
| 6   | <i>Lbc. casei</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup> | Fkol 77ox         | ++                   |
| 7   | <i>Lbc. casei</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7089              | F79/L3            | ++                   |
| 8   | <i>Lbc. casei</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7089              | Fkol 77ox         | +                    |

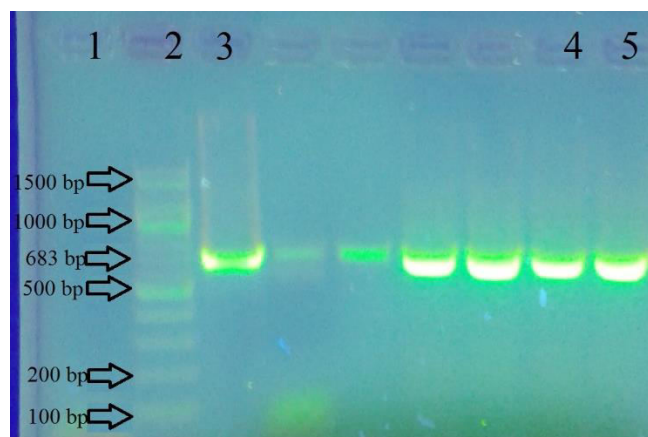
Intenzita signálu: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, - nedetekován

Obrázek 14: Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu pro druh *Lactobacillus casei* ssp. *casei*

Detekovaný specifický produkt o délce 132 bp potvrdil přítomnost DNA druhu *Lactobacillus casei* ssp. *casei* ve všech vzorcích.

### 5.3.4 PCR specifická pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Důkaz přítomnosti DNA specifické pro druh *Lactobacillus rhamnosus* byl proveden metodou kvantitativní PCR se specifickými primery [13]. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>. Metoda byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5.1. Byl amplifikován specifický úsek o délce 683 bp. Přítomnost specifických amplifikačních produktů PCR pro druh *Lactobacillus rhamnosus* byla prokázána pomocí agarózové gelové elektroforézy uvedené na Obrázku 15.



| Běh | DNA                                         | Magnetické nosiče | Detekce produktu PCR |
|-----|---------------------------------------------|-------------------|----------------------|
| 1   | Negativní kontrola                          |                   | -                    |
| 2   | Standart                                    |                   | 100 bp               |
| 3   | Pozitivní kontrola                          |                   | +++                  |
| 4   | <i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup> | Fkol 77ox         | +++                  |
| 5   | <i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup> | F79/L3            | +++                  |

Intenzita signálu: +++ silná, ++ středně silná, + slabá, - nedetekován

Obrázek 15: Výsledek agarózové gelové elektroforézy druhu *Lactobacillus rhamnosus* (úsek 683 bp)

Byl detekován specifický produkt o délce 683 bp potvrzující přítomnost DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus*.

## 5.4 Kultivace v médiu s přidaným dusičnanem stříbrným

Po ověření čistoty a specifity bakteriálních kultur pomocí PCR byla testována produkce částic stříbra vybranými bakteriálními kmeny.

### 5.4.1 Růstové křivky bakteriálních kmenů *Lactobacillus*

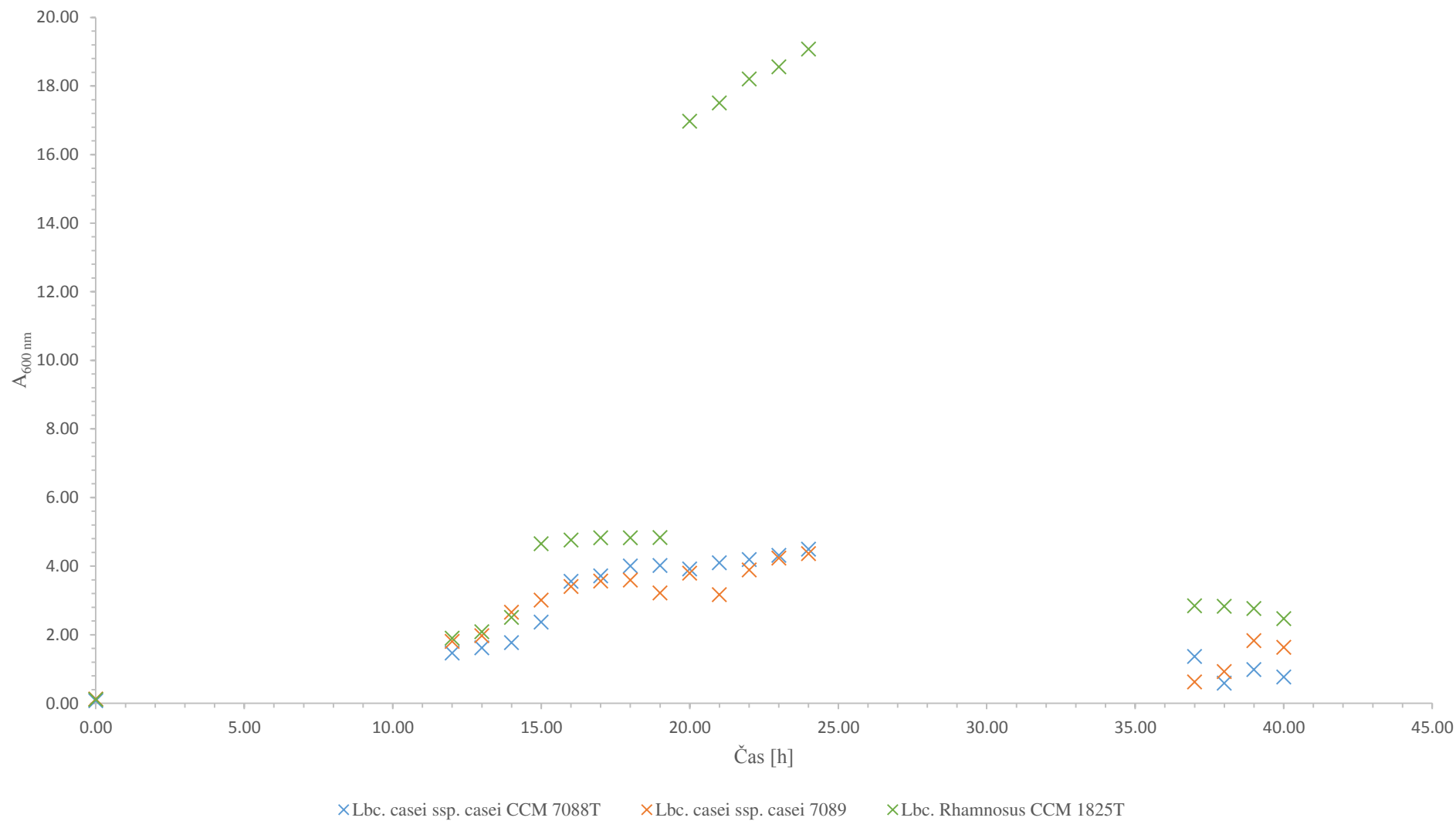
K testování produkce nanočástic stříbra vybranými bakteriálními kmeny rodu *Lactobacillus* byla sestavena růstová křivka. Bakterie byly kultivovány v MRS médiu a médiu s přidaným dusičnanem stříbrným v konečné koncentraci 0,01 mM a 0,1 mM. Podle postupu a při podmínkách uvedených v kapitole 4.3.10

#### 5.4.1.1 Růstové křivky kmenů *Lactobacillus* v MRS médiu

Během kultivace bakteriálních buněk v MRS médiu byly v hodinových intervalech odebírány vzorky těchto kultur a byla měřena absorbance při vlnové délce 600 nm ( $A_{600nm}$ ). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 17. Hodnoty absorbancí byly použity k sestavení růstových křivek bakterií pomocí softwaru Excel. Srovnání růstových křivek buněk testovaných kmenů je znázorněno na Obrázek 16. Růstové křivky jednotlivých kmenů jsou uvedeny v **Příloze 1**.

Tabulka 17: Hodnoty absorbancí při vlnové délce  $A_{600nm}$  testovaných kmenů v MRS médiu

| Čas[h] | <i>Lbc. casei ssp. casei</i><br>CCM 7088 <sup>T</sup> | <i>Lbc. casei ssp casei</i><br>CCM 7089 | <i>Lbc. rahmnosus</i><br>CCM 1825 <sup>T</sup> |
|--------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|
| 0      | 0,071                                                 | 0,117                                   | 0,104                                          |
| 12     | 1,463                                                 | 1,796                                   | 1,896                                          |
| 13     | 1,611                                                 | 1,963                                   | 2,083                                          |
| 14     | 1,761                                                 | 2,650                                   | 2,500                                          |
| 15     | 2,362                                                 | 3,006                                   | 4,650                                          |
| 16     | 3,552                                                 | 3,398                                   | 4,756                                          |
| 17     | 3,711                                                 | 3,555                                   | 4,820                                          |
| 18     | 4,000                                                 | 3,584                                   | 4,820                                          |
| 19     | 4,010                                                 | 3,210                                   | 4,830                                          |
| 20     | 3,912                                                 | 3,792                                   | 16,968                                         |
| 21     | 4,092                                                 | 3,162                                   | 17,500                                         |
| 22     | 4,182                                                 | 3,883                                   | 18,200                                         |
| 23     | 4,310                                                 | 4,230                                   | 18,550                                         |
| 24     | 4,490                                                 | 4,360                                   | 19,068                                         |
| 37     | 1,360                                                 | 0,620                                   | 2,840                                          |
| 38     | 0,580                                                 | 0,920                                   | 2,820                                          |
| 39     | 0,980                                                 | 1,820                                   | 2,760                                          |
| 40     | 0,760                                                 | 1,630                                   | 2,460                                          |



Obrázek 16: Růstové křivky testovaných kmenů rodu *Lactobacillus*

Z růstové křivky je patrné, že lag fáze trvala po dobu asi 12 hodin u všech testovaných kmenů. Fáze logaritmická (exponenciální) trvala u *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> po dobu asi 10 hodin, podobně to bylo u *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7089. U *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> trvala po dobu 11 hodin. Po 25 hodině docházelo u všech kmenů k stacionární fázi a po 35 hodině k fázi odumírání. Z grafu je patrné, že největší absorbance je u *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>.

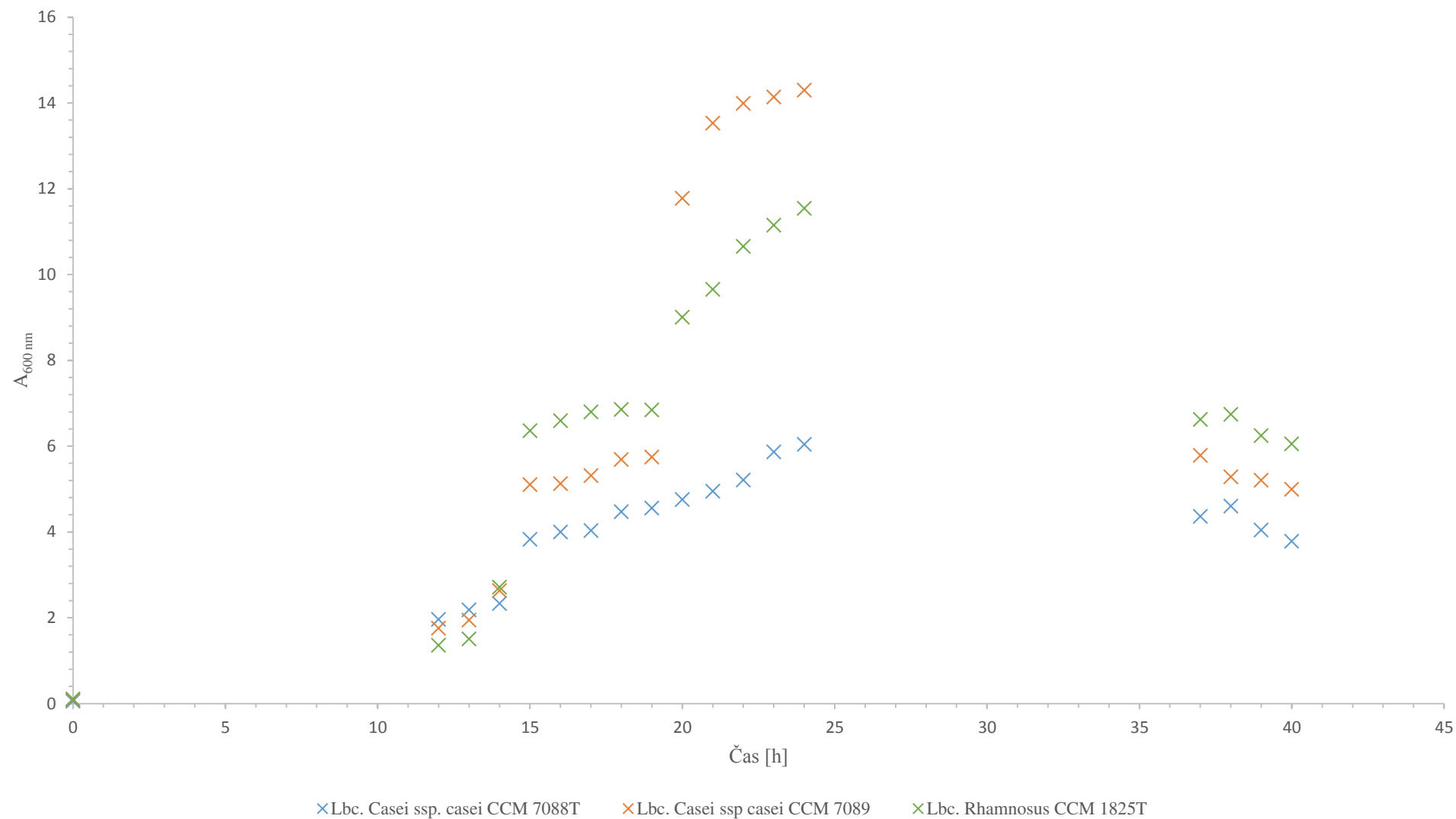
#### 5.4.1.2 Růstové křivky kmenů *Lactobacillus* v MRS médiu s 0,01 mM dusičnanem stříbrným

Bakteriální buňky rodu *Lactobacillus* byly naočkovány do MRS média s přidaným dusičnanem stříbrným v konečné koncentraci 0,01 mM podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.10.

Během kultivace byl sledován růst bakterií jako závislost absorbance při vlnové délce 600 nm ( $A_{600nm}$ ) na čase. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 18. Hodnoty absorbancí byly použity k sestavení růstových křivek bakterií pomocí softwaru Excel. Srovnání růstových křivek buněk testovaných kmenů je znázorněno na Obrázku 17. Růstové křivky jednotlivých kmenů jsou uvedeny v Příloze 1.

Tabulka 18: Hodnoty absorbancí při vlnové délce  $A_{600nm}$  testovaných kmenů v MRS médiu s přidaným dusičnanem stříbrným v konečné koncentraci 0,01 mM

| Čas [h] | <i>Lbc. casei</i> ssp. <i>casei</i><br>CCM 7088 <sup>T</sup> | <i>Lbc. casei</i> ssp. <i>casei</i><br>CCM 7089 | <i>Lbc. rhamnosus</i><br>CCM 1825 <sup>T</sup> |
|---------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 0       | 0,052                                                        | 0,085                                           | 0,105                                          |
| 12      | 1,956                                                        | 1,756                                           | 1,356                                          |
| 13      | 2,182                                                        | 1,940                                           | 1,503                                          |
| 14      | 2,326                                                        | 2,630                                           | 2,710                                          |
| 15      | 3,825                                                        | 5,097                                           | 6,354                                          |
| 16      | 3,995                                                        | 5,120                                           | 6,587                                          |
| 17      | 4,028                                                        | 5,312                                           | 6,795                                          |
| 18      | 4,470                                                        | 5,685                                           | 6,850                                          |
| 19      | 4,554                                                        | 5,742                                           | 6,840                                          |
| 20      | 4,752                                                        | 11,774                                          | 9,002                                          |
| 21      | 4,944                                                        | 13,524                                          | 9,653                                          |
| 22      | 5,206                                                        | 13,985                                          | 10,653                                         |
| 23      | 5,863                                                        | 14,136                                          | 11,147                                         |
| 24      | 6,040                                                        | 14,296                                          | 11,541                                         |
| 37      | 4,360                                                        | 5,780                                           | 6,620                                          |
| 38      | 4,600                                                        | 5,280                                           | 6,740                                          |
| 39      | 4,040                                                        | 5,200                                           | 6,240                                          |
| 40      | 3,780                                                        | 4,990                                           | 6,050                                          |



Obrázek 17: Růstové křivky testovaných kmenů *Lactobacillus* kultivovaných v MRS médiu s přítomností 0,01 mM dusičnanu stříbrného

Kultivace bakterií v MRS médiu s přidaným dusičnanem stříbrným v konečné koncentraci 0,01 mM probíhala podobně jako bez dusičnanu stříbrného. Došlo k prodloužení lag fáze, která trvala přibližně 14 hodin, exponenciální fáze trvala u všech kmenů stejně a to 10 hodin. Bakterie se zde liší pouze absorbancí, kdy největší absorbanci má *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7089. Po 24 hodině došly bakterie do stacionární fáze a po 35 hodině došlo k odmírání bakterií.

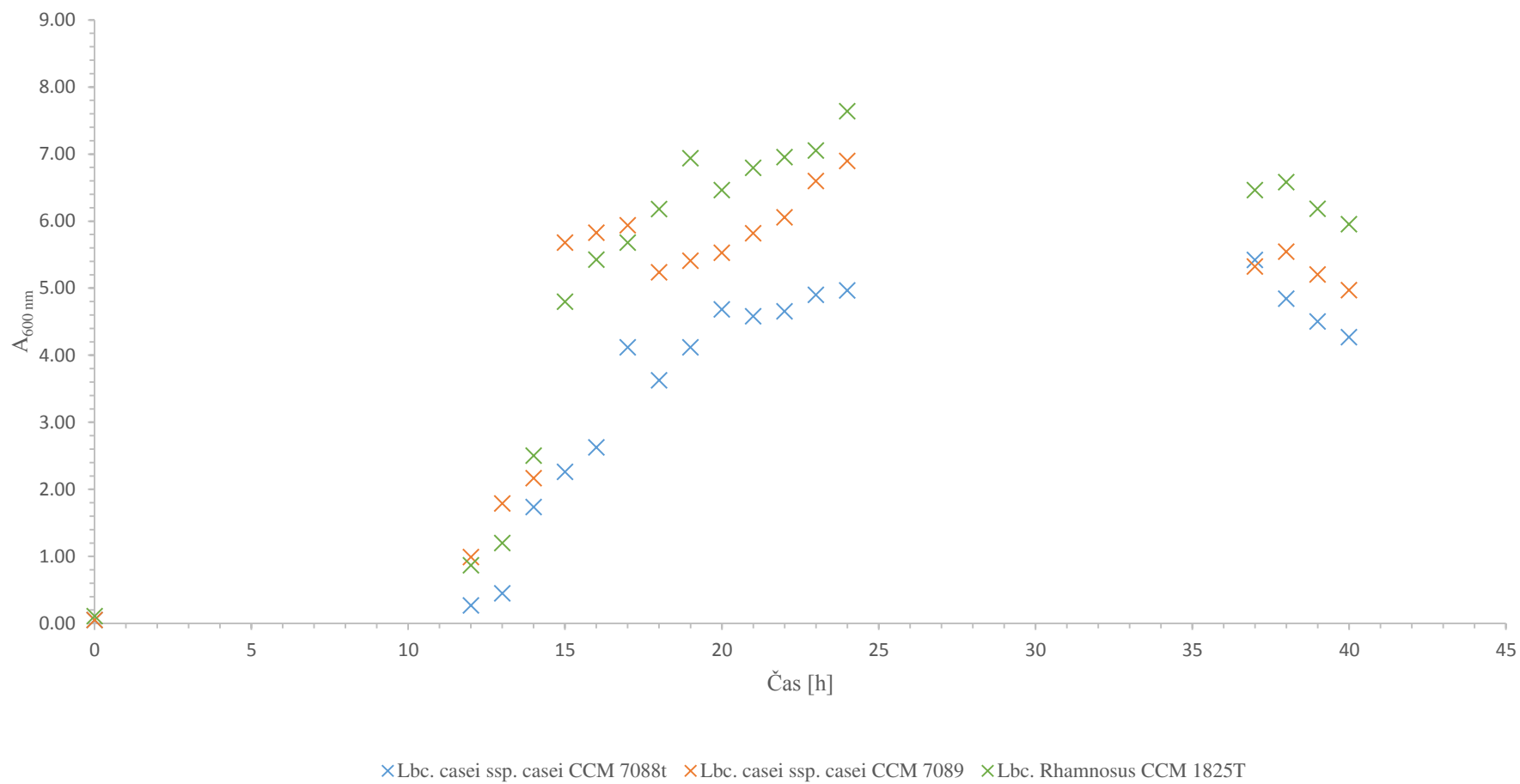
#### 5.4.1.3 Růstové křivky kmenů *Lactobacillus* v MRS médiu s 0,1 mM dusičnanem stříbrným

Bakteriální buňky rodu *Lactobacillus* byly naočkovány do MRS média s přidaným dusičnanem stříbrným v konečné koncentraci 0,1 mM podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.10.

Během kultivace byl sledován růst bakterií jako závislost absorbance při vlnové délce 600 nm ( $A_{600nm}$ ) na čase. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 19. Hodnoty absorbancí byly použity k sestavení růstových křivek bakterií pomocí softwaru Excel. Srovnání růstových křivek buněk testovaných kmenů je znázorněno na Obrázku 18. Růstové křivky jednotlivých kmenů jsou uvedeny v Příloze 1.

Tabulka 19: Hodnoty absorbancí při vlnové délce  $A_{600nm}$  testovaných kmenů v MRS médiu s přidaným dusičnanem stříbrným v konečné koncentraci 0,1 mM

| Čas [h] | <i>Lbc. casei</i> ssp. <i>casei</i><br>CCM 7088 <sup>T</sup> | <i>Lbc. casei</i> ssp. <i>casei</i><br>CCM 7089 | <i>Lbc. rhamnosus</i><br>CCM 1825 <sup>T</sup> |
|---------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 0       | 0,049                                                        | 0,048                                           | 0,104                                          |
| 12      | 0,265                                                        | 0,985                                           | 0,863                                          |
| 13      | 0,445                                                        | 1,785                                           | 1,196                                          |
| 14      | 1,732                                                        | 2,165                                           | 2,500                                          |
| 15      | 2,256                                                        | 5,676                                           | 4,794                                          |
| 16      | 2,621                                                        | 5,824                                           | 5,424                                          |
| 17      | 4,113                                                        | 5,936                                           | 5,676                                          |
| 18      | 3,624                                                        | 5,235                                           | 6,175                                          |
| 19      | 4,115                                                        | 5,406                                           | 6,936                                          |
| 20      | 4,680                                                        | 5,523                                           | 6,461                                          |
| 21      | 4,578                                                        | 5,816                                           | 6,792                                          |
| 22      | 4,652                                                        | 6,053                                           | 6,953                                          |
| 23      | 4,896                                                        | 6,593                                           | 7,050                                          |
| 24      | 4,963                                                        | 6,893                                           | 7,636                                          |
| 37      | 5,420                                                        | 5,320                                           | 6,460                                          |
| 38      | 4,840                                                        | 5,540                                           | 6,580                                          |
| 39      | 4,500                                                        | 5,200                                           | 6,180                                          |
| 40      | 4,265                                                        | 4,968                                           | 5,950                                          |



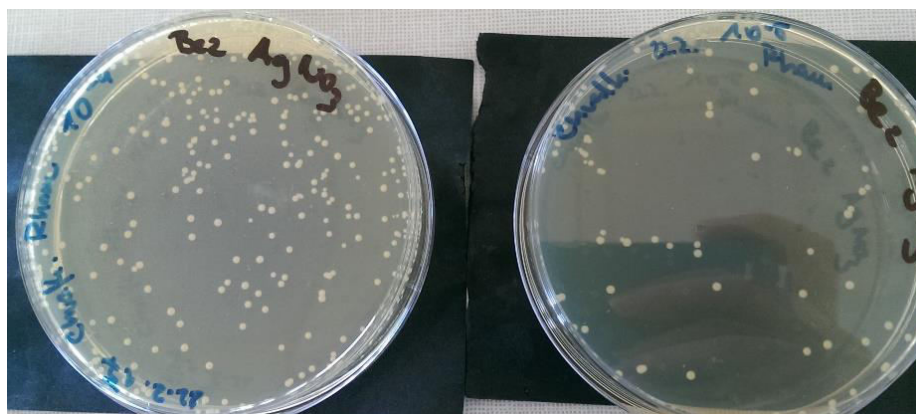
Obrázek 18: Růstové křivky testovaných kmenů *Lactobacillus* kultivovaných v MRS médiu s přidavkem 0,1 mM dusičnanu stříbrného

Během kultivace bakterií s přidaným dusičnanem stříbrným v konečné koncentraci 0,1 mM došlo stejně jako u koncentrace 0,01 mM k prodloužení lag fáze na 16 hodin. Exponenciální fáze trvala přibližně 9 hodin. I v tomto případě byla největší absorbance detekována u sbírkového kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>. Po 25 hodině následovala stacionární fáze a po 34 hodině došlo k fázi odumírání buněk.

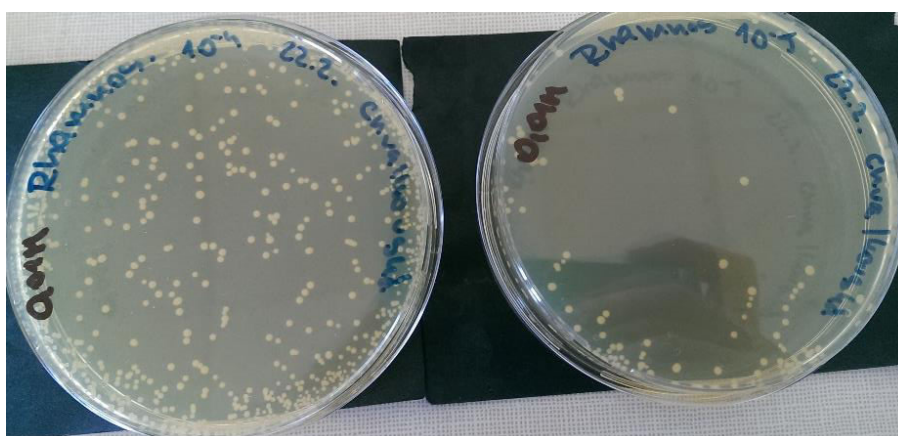
#### 5.4.2 Stanovení počtu buněk v pozdní exponenciální fázi

Pro sledování produkce nanočástic stříbra byly bakteriální buňky *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7089 a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> kultivovány v třech typech médií. První typ byl MRS médium bez dusičnanu stříbrného, další MRS médium s přidaným dusičnanem stříbrným v konečné koncentraci 0,01 mM a poslední bylo MRS médium s dusičnanem stříbrným v konečné koncentraci 0,1 mM. Všechny buňky byly kultivovány do pozdní exponenciální fáze růstu tj. po dobu 22 hodin. Poté byly suspenze buněk sériově ředěny a vysety po 0,2 ml na Petriho misky s MRS agarem bez dusičnanu stříbrného, s 0,01 mM dusičnanem stříbrným a 0,1 mM dusičnanem stříbrným.

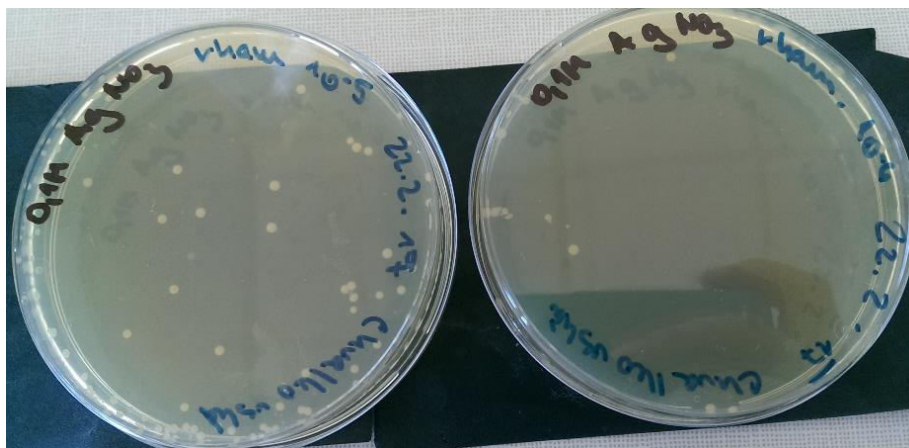
Nárůst kolonií *L. rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> po výsevu uvádí Obrázek 19, Obrázek 20 a Obrázek 21.



Obrázek 19: Kolonie *L. rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> narostlé na MRS agaru po sériovém ředění (zleva: 10 000×; 10 0000×)



Obrázek 20: Kolonie *L. rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> narostlé na MRS agaru s 0,01mM AgNO<sub>3</sub> po sériovém ředění (zleva: 10 000×; 10 0000×)



Obrázek 21: Kolonie *L. rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> narostlé na MRS agaru s 0,1 mM AgNO<sub>3</sub> po sériovém ředění (zleva: 10 000×; 1 000 000×)

- průměrná koncentrace buněk v MRS médiu bez dusičnanu stříbrného byla  $2,4 \times 10^{10}$  KTJ/ml
- průměrná koncentrace buněk v MRS médiu s 0,01 mM dusičnanem stříbrným byla  $4,1 \times 10^{10}$  KTJ/ml
- průměrná koncentrace buněk v MRS médiu s 0,1 mM dusičnanem stříbrným byla  $3,8 \times 10^{10}$  KTJ/ml

#### 5.4.3 Produkce nanočástic stříbra

Bakterie byly kultivovány v MRS médiu s přidaným dusičnanem stříbrným, jakmile vyrostly, byly bakterie přeneseny do zkumavek s reakční směsí. Produkce stříbrných nanočástic byla po dobu 360 hodin kontrolována vizuálně a pomocí spektrometru.

Absorbance jednotlivých koncentrací a bakterií v průběhu experimentu jsou znázorněny v Tabulce 20, Tabulce 21 a Tabulce 22. V průběhu experimentu docházelo ke zbarvování směsí, s rostoucí koncentrací dusičnanu stříbrného ve vzorku byla barva směsi tmavší.

Tabulka 20: Hodnoty absorbancí *Lactobacillus casei* ssp. *casei* 7088<sup>T</sup> v průběhu experimentu

| Bakteriální kmen                                        | Koncentrace AgNO <sub>3</sub> [mM] | Čas [h] |      |      |      |      |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------|---------|------|------|------|------|
|                                                         |                                    | 24      | 48   | 72   | 144  | 360  |
| <i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup> | 0,1                                | 0,11    | 0,08 | 0,12 | 0,08 | 0,07 |
|                                                         | 1                                  | 0,17    | 0,10 | 0,18 | 0,11 | 0,16 |
|                                                         | 2                                  | 0,18    | 0,24 | 0,30 | 0,14 | 0,11 |
|                                                         | 4                                  | 0,21    | 0,12 | 0,15 | 0,18 | 0,21 |

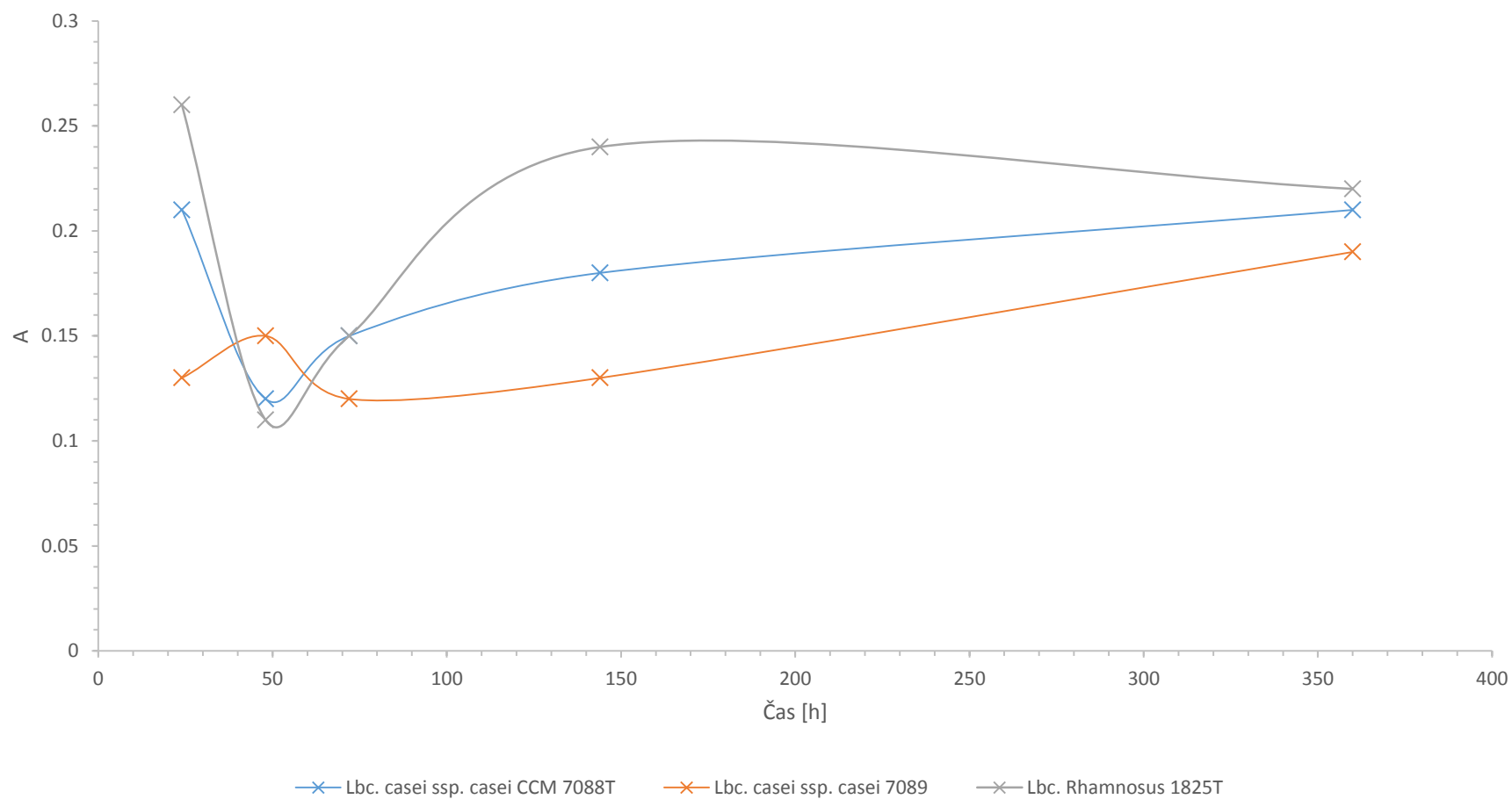
Tabulka 21: Hodnoty absorbancí *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7089 v průběhu experimentu

| Bakteriální kmen                           | Koncentrace AgNO <sub>3</sub> [mM] | Čas [h] |      |      |      |      |
|--------------------------------------------|------------------------------------|---------|------|------|------|------|
|                                            |                                    | 24      | 48   | 72   | 144  | 360  |
| <i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7089 | 0,1                                | 0,30    | 0,01 | 0,09 | 0,06 | 0,02 |
|                                            | 1                                  | 0,02    | 0,09 | 0,18 | 0,08 | 0,15 |
|                                            | 2                                  | 0,09    | 0,30 | 0,50 | 0,08 | 0,11 |
|                                            | 4                                  | 0,13    | 0,15 | 0,12 | 0,13 | 0,19 |

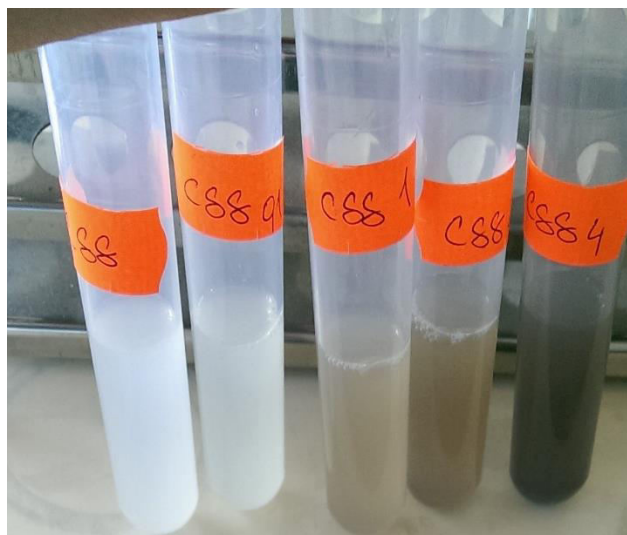
Tabulka 22: Hodnoty absorbancí *Lactobacillu rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> v průběhu experimentu

| Bakteriální kmen                          | Koncentrace AgNO <sub>3</sub> [mM] | Čas [h] |      |      |      |      |
|-------------------------------------------|------------------------------------|---------|------|------|------|------|
|                                           |                                    | 24      | 48   | 72   | 144  | 360  |
| <i>L. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup> | 0,1                                | 0,07    | 0,11 | 0,31 | 0,15 | 0,05 |
|                                           | 1                                  | 0,09    | 0,10 | 0,20 | 0,14 | 0,10 |
|                                           | 2                                  | 0,04    | 0,07 | 0,10 | 0,20 | 0,09 |
|                                           | 4                                  | 0,26    | 0,11 | 0,15 | 0,24 | 0,22 |

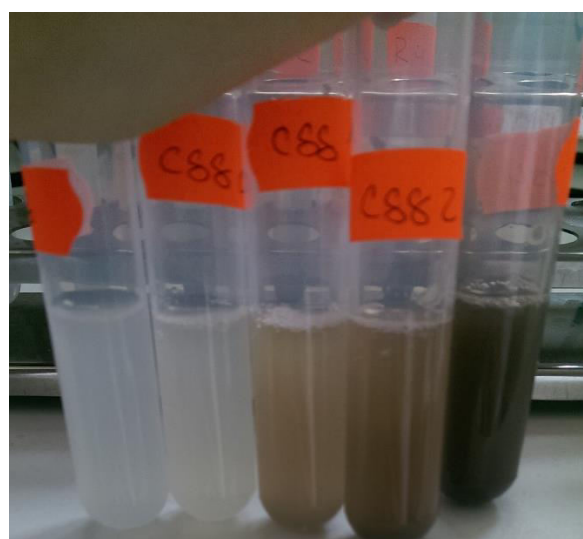
Produkce nanočástic stříbra byla také sledována na turbidimetru pomocí měření absorbance. Absorbance se u jednotlivých roztoků měnily v průběhu experimentu. Absorbance se zvyšovala se zvyšující koncentrací AgNO<sub>3</sub> ve vzorku a také s časem. Nejvyšší hodnota absorbance byla naměřena u reakčních směsí s buňkami kmenu *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7089 a *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> po různých dobách inkubace.



Obrázek 22: Srovnání závislosti absorbance reakčních směsí obsahující buňky testovaných kmenů s přidáním dusičnanem stříbrným v konečné koncentraci 4,0 mM



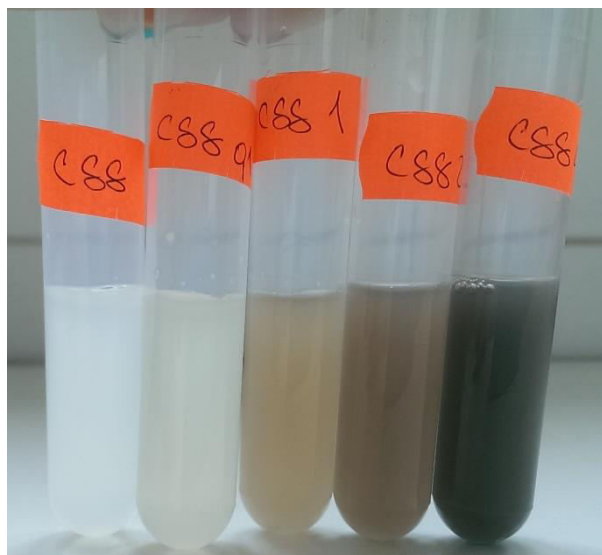
Obrázek 23: Produkce nanočástic stříbra po 24 hodinách *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088<sup>T</sup>



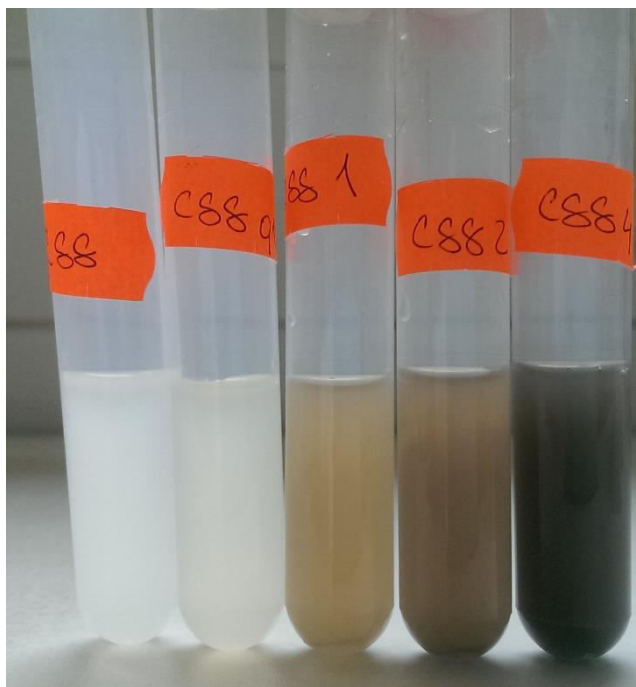
Obrázek 24: Produkce nanočástic stříbra po 48 hodinách *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088<sup>T</sup>



Obrázek 25: Produkce nanočástic stříbra po 72 hodinách *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088<sup>T</sup>



Obrázek 26: Produkce nanočástic stříbra po 144 hodinách *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088<sup>T</sup>



Obrázek 27: Produkce nanočástic stříbra po 360 hodinách *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088<sup>T</sup>

## 6 DISKUSE

### 6.1 Kultivace bakterií

Bakteriální kmeny rodu *Lactobacillus* byly kultivovány anaerobně v komerčním tekutém MRS médiu při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. V MRS médiu kmeny rodu *Lactobacillus* rostly dobře a narostlý sediment byl u všech kmenů dostatečně velký. Poté byly přeočkovány na MRS agar křížovým roztěrem a byly kultivovány anaerobně při teplotě 37 °C. Kultivace probíhala opět po dobu 48 hodin, kdy byl pozorovatelný nárůst jednotlivých kolonií. Narostlé kolonie byly bílé, lesklé, s přibližně stejnou velikostí a tvarem, hladkým povrchem a rovnoměrným ohraničením. Ze vzniklých kolonií je tedy patrné, že bakteriální kmeny byly čisté.

### 6.2 Spektrofotometrické stanovené koncentrace a čistoty izolované DNA

DNA byla z narostlých bakteriálních kmenů izolována pomocí magnetických částic uvedených v Tabulka 2. Čistota izolované DNA byla měřena na přístroji NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), jako poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm. Čistá DNA by měla mít poměr absorbancí 1,8–2,0. Pokud je poměr nižší je DNA znečištěná proteiny, vyšší poměr značí přítomnost RNA ve vzorku. Čistota izolovaných DNA se pohybovala v rozmezích 1,25–1,62. Koncentrace nukleových kyselin ve vzorcích byla v rozmezí 8,4–81,1 ng/μl. Výsledné koncentrace byly závislé na použití magnetických nosičů, kdy vyšší koncentrace byly u magnetického nosiče Fkol 77 ox. Koncentrace a čistoty u jednotlivých vzorků jsou uvedeny v Tabulka 14 a Tabulka 15.

Pro použití vzorků pro metodu PCR bylo potřeba některé koncentrace zředit. Koncentrace vyšší než 20 ng/μl byly ředěné na 10 ng/μl.

### 6.3 Kvantitativní PCR

#### 6.3.1 Důkaz přítomnosti bakteriální DNA

PCR pro doménu *Bacteria* byla provedena pomocí primerů F\_eub a R\_eub [12]. PCR byla provedena za účelem zjištění přítomnosti bakteriální DNA ve vzorcích, ale také pro zjištění přesné koncentrace izolované bakteriální DNA ve vzorcích.

Izolovaná dna byla pomocí primerů pro doménu *Bacteria* [12] amplifikována a PCR produkt byl detegován na agarózové gelové elektroforéze. Jako pozitivní kontrola byla použita kalibrační křivka sestavená z použité bakteriální DNA *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) v rozsahu 100 ng/μl–0,001 pg/μl. Na 1,6% agarózovém gelu byl detekován produkt o délce 466 bp. Pásky byly jak pro detekované vzorky, tak pro pozitivní kontrolu zřetelně viditelné. Na základě těchto pásek můžeme říct, že izolovaná DNA spadá do domény *Bacteria* [11]. Běh pro negativní kontrolu není viditelný, nedošlo tedy ke kontaminaci vzorků v průběhu přípravy a tím pádem nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek.

### 6.3.2 PCR specifická pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Pomocí kvantitativní PCR byla také provedena PCR pro druh *Lactobacillus rhamnosus* se specifickými primery (RhamFW a UniverRV [13]). Jako pozitivní kontrola byl použit *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>. Výsledný amplifikovaný produkt PCR byl nanesen na 1,6% agarózový gel. Po proběhnutí elektroforézy byl detekován specifický produkt o délce 683 bp. Pásky byly jak prozkoumané vzorky, tak pro pozitivní kontrolu zřetelně viditelné. Na základě těchto pásek můžeme říct, že izolovaná DNA z bakteriálních kultur náleží do druhu *Lactobacillus rhamnosus* [12]. Běh pro negativní kontrolu není viditelný, nedošlo tedy ke kontaminaci vzorků v průběhu přípravy a tím pádem nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek.

## 6.4 Konvenční PCR

### 6.4.1 PCR specifická pro rod *Lactobacillus*

PCR pro rod *Lactobacillus* byla provedena pomocí konvenční PCR se specifickými primery (F\_alllact a R\_alllact [12]). Jako pozitivní kontrola byl použit *Lactobacillus gasseri* K7. Výsledný amplifikovaný produkt byl nanesen na 1,6% agarózový gel a pomocí elektroforézy byl detekován specifický produkt o délce 92 bp. Pásky byly jak pro zkoumané vzorky, tak pro pozitivní kontrolu zřetelně viditelné. Na základě těchto pásek můžeme říct, že izolovaná DNA spadá do rodu *Lactobacillus* [12]. Běh pro negativní kontrolu není viditelný, nedošlo tedy ke kontaminaci vzorků v průběhu přípravy a tím pádem nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek.

### 6.4.2 PCR specifická pro druh *Lactobacillus casei* ssp. *casei*.

Byla provedena konvenční PCR specifická pro druh *Lactobacillus casei* ssp. *casei* pomocí specifických primerů (FcaseIS a RcaseIS [13]) Jako pozitivní kontrola byl použit *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> (15,8 ng/μl). Výsledný amplifikovaný produkt byl nanesen na 1,6% agarózový gel a byl detekován specifický produkt o délce 132 bp. Pásky byly jak pro zkoumané vzorky, tak pro pozitivní kontrolu zřetelně viditelné. Na základě těchto pásek můžeme říct, že izolovaná DNA spadá do druhu *Lactobacillus casei* ssp. *casei* [13]. Běh pro negativní kontrolu je viditelný, je tedy možné, že v průběhu přípravy vzorků, došlo k jejich kontaminaci a díky tomu mohou být výsledky ovlivněny falešně pozitivním výsledkem.

## 6.5 Kultivace v médiu s přidaným dusičnanem stříbrným

### 6.5.1 Růstová křivka

Pro zjištění neoptimálnější doby pro odběr buněk pro produkci stříbrných nanočástic byla u bakteriálních kmenů sledovaná růstová křivka v MRS broth médiu bez dusičnanu stříbrného a s dusičnanem stříbrným v konečné koncentraci 0,01 mM a 0,1 mM. Dále byl sledován rozdíl mezi kultivací buněk s v MRS broth médiu bez dusičnanu stříbrného a s dusičnanem stříbrným v koncentracích 0,01 mM a 0,1 mM.

Podle literatury je pro bakterie druhu *Lactobacillus casei* ssp. *casei* v MRS broth médiu bez dusičnanu stříbrného optimální doba pro odběr buněk mezi 12 a 13 hodinou. To odpovídá pozdní exponenciální fázi. Pokud jsou bakteriální kmeny kultivovány s dusičnanem stříbrným, prodlužuje se lag-fáze a exponenciální fáze nastává až po 15 hodině. Což je nezbytný čas pro přizpůsobení mikroorganismu na nové prostředí [2].

U získaných křivek byly rozpoznány jednotlivé fáze růstu. K chybám během měření růstové křivky mohlo dojít při ředění vzorků, kdy i přes centrifugaci mohlo dojít k rychlé sedimentaci buněk, a tedy mohl být nabrán menší objem buněk. Křivky, získané během měření, byly použity na odhadnutí pozdní exponenciální fáze pro odběr buněk. Lag-fáze trvala u všech bakterií kultivovaných v MRS

broth médiu bez dusičnanu stříbrného přibližně 12 hodin. S přidaným dusičnanem stříbrným v koncentraci 0,01 mM se lag-fáze prodloužila na 13 hodin, stejně tak s přidaným dusičnanem stříbrným v koncentraci 0,1 mM. Prodloužení lag-fáze souviselo s adaptací bakterií na nové prostředí. Exponenciální fáze se se zvyšující koncentrací dusičnanu stříbrného prodlužovala spolu se zvyšující absorbancí, což potvrzuje produkci stříbrných nanočástic. Trvala 10 až 12 hodin a pozdní exponenciální fáze probíhala ještě kolem 24 hodiny od započetí kultivace.

### 6.5.2 Produkce stříbrných nanočástic

Bakterie byly naočkovány do reakční směsi obsahující glukózu (56 mM) a přidaný dusičnan stříbrný v koncentracích 0,1; 1; 2; 4 mM. V průběhu experimentu byla sledována změna zbarvení reakční směsi a měřena absorbance na turbidimetru pro zjištění neoptimálnější koncentrace dusičnanu stříbrného pro produkci stříbrných nanočástic. Během experimentu docházelo ke zbarvení směsi přes žlutou barvu až k hnědé, při vyšších koncentracích dusičnanu stříbrného ve vzorku docházelo až k černému zbarvení. Změna zbarvení směsi je způsobena tvorbou koloidní suspenze nanočástic stříbra, tmavě hnědá a černá barva je způsobena excitací povrchové rezonance v nanočásticích. [2] Ke zřetelné změně zbarvení došlo u reakčních směsí s  $\text{AgNO}_3$  v koncentracích 1; 2; 4 mM již po 24 hodinách. Reakční směsi s buňkami obsahující  $\text{AgNO}_3$  v koncentraci 0,1 mM se zřetelně zbarvily až po 48 hodinách. Barva se v průběhu experimentu ztmavovala v důsledku produkce nanočástic stříbra.

Produkce nanočástic stříbra byla také sledována na turbidimetru pomocí měření absorbance. Absorbance se u jednotlivých roztoků měnily v průběhu experimentu. Absorbance se zvyšovala se zvyšující koncentrací  $\text{AgNO}_3$  ve vzorku a také s časem. Nejvyšší hodnota absorbance byla naměřena u reakčních směsí s buňkami kmenu *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7089 a *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> po různých dobách inkubace.

U všech testovaných kmenů byla prokázána schopnost produkce nanočástic stříbra. Podle získaných výsledků, je podle zbarvení směsi pro produkci nanočástic stříbra nejvhodnější koncentrace dusičnanu stříbrného 4 mM. Podle absorbance je u *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> a *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> vhodná koncentrace dusičnanu stříbrného 2 mM. U *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> je tato koncentrace 4 mM.

## 7 ZÁVĚR

Teoretická část bakalářské práce pojednává bakteriích žijících v přírodě a obsahujících tzv. magnetozomy, díky kterým produkují stříbrné nanočástice. Dále o jejich tvorbě, složení, možnosti separace a jejich využití. V bakalářské práci se také zabývám možností vytvoření umělé magnetické bakterie, produkující stříbrné nebo železné nanočástice, jejich přípravy, využití a charakterizaci.

V experimentální části jsem se pomocí vybraných bakterií rodu *Lactobacillus*, konkrétně druhů *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7089 a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> pokusila o přípravu stříbrných nanočástic. Pro potvrzení čistoty vybraných kmenů byla provedena izolace DNA pomocí magnetických nanočástic a následně provedena identifikace pomocí metody polymerázové řetězové reakce. Za použití konvenční a kvantitativní polymerázové řetězové reakce a specifických primerů byla ověřena příslušnost k odpovídajícím rodům a druhům.

Samotným experimentem byla potvrzena schopnost produkce stříbrných nanočástic u všech testovaných druhů rodu *Lactobacillus*. Největší produkce stříbrných nanočástic byla pozorována u kmenu *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7089. Jako nejvhodnější koncentrace pro produkci stříbrných nanočástic byla ustanovena koncentrace 4 mM.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ARAUJO, Ana, Fernanda ABREU, Karen SILVA, Dennis BAZYLINSKI a Ulysses LINS. Magnetotactic Bacteria as Potential Sources of Bioproducts. *Marine Drugs* [online]. 2015, 13(1), 389-430 [cit. 2016-05-13]. DOI: 10.3390/md13010389. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/13/1/389/>.
- [2] KORBOKANDI, H., et al. Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2012, vol. 87, p. 932–937. DOI: 10.1002/jctb.3702.
- [3] GHORBANI, H., et al. Biological and Non-biological Methods for Silver Nanoparticles Synthesis. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 2011, vol. 25, no. 3, p. 317–326.
- [4] TRAN, Q., et al. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 2013, vol. 4, 033001, DOI: 10.1088/2043-6262/4/3/033001.
- [5] MARTÍN, Miguel, Fernando CARMONA, Rafael CUESTA, Deyanira RONDÓN, Natividad GÁLVEZ a José M. DOMÍNGUEZ-VERA. Artificial Magnetic Bacteria: Living Magnets at Room Temperature. *Advanced Functional Materials* [online]. 2014, 24(23), 3489-3493 [cit. 2016-05-13]. DOI: 10.1002/adfm.201303754. ISSN 1616-301x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adfm.201303754>.
- [6] DAS, Vidhya Lakshmi, Roshmi THOMAS, Rintu T. VARGHESE, E. V. SONIYA, Jyothis MATHEW a E. K. RADHAKRISHNAN. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. *3 Biotech* [online]. 2014, 4(2), 121-126 [cit. 2016-05-13]. DOI: 10.1007/s13205-013-0130-8. ISSN 2190-572x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-013-0130-8>.
- [7] KANNAN, Natarajan; SELVARAJ, Subbalaxmi; MURTY, Ramachandra V. Microbial production of silver nanoparticles. *Digest journal of nanomaterials and biostructures*, 2010, 5.1: 135-140.
- [8] RAI, M., DURAN, N. (ed.). *Metal Nanoparticles in Microbiology*. 1st ed. Berlin: Springer-Verlag, 2011. 303 p. ISBN 978-3-642-18311-9.
- [9] KLUSON, P., et al. Vítejte v „nanosvětě“. *Chemické Listy*, 2007, vol. 101, p. 262–272.
- [10] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [11] SÁSKOVÁ, Denisa. *Identifikace a charakterizace vybraných vlastností některých kmenů bakterií mléčného kvašení*. 2015.
- [12] HAARMAN, M. a J. KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal *Lactobacillus* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, 72(4), 2359-2365 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>.

[13] GRILLOVÁ, Linda. *Vyhledávání genů kódujících probiotické a další vlastnosti vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií*. 2012. PhD Thesis. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Alena Španová.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ag – stříbro

AgNO<sub>3</sub> – dusičnan stříbrný

bp – pár bází

CFU – počet jednotek tvořící kolonie

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – 2'-deonukleotid-5'-trifosfát

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> – oxid železnato-železitý

Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub> – sulfid železnato-železitý

HCl – kyselina chlorovodíková

NaCl – chlorid sodný

NaOH – hydroxid sodný

PCR – polymerázová řetězová reakce

SDS – dodecyl sulfát sodný

Taq DNA-polymeráza – termostabilní enzym izolovaný z bakterie *Thermus aquaticus*

TBE pufr – Tris-borát-EDTA pufr

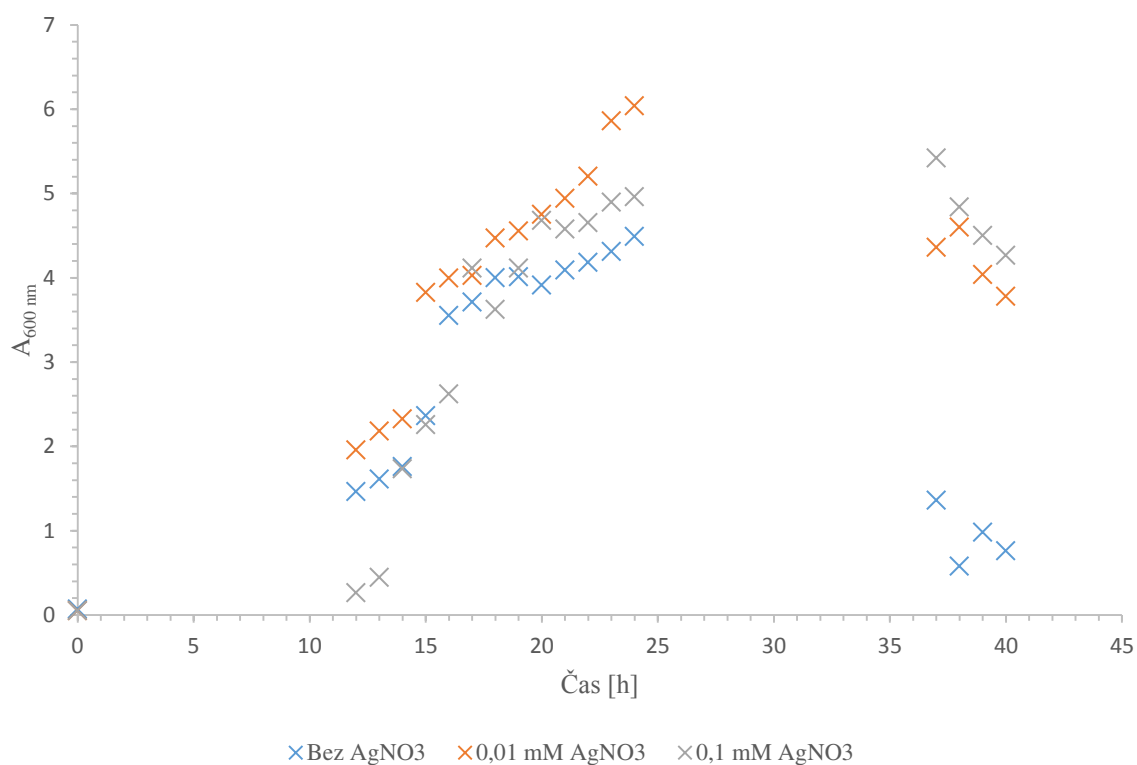
TE pufr – Tris-EDTA pufr

UV – ultrafialové světlo

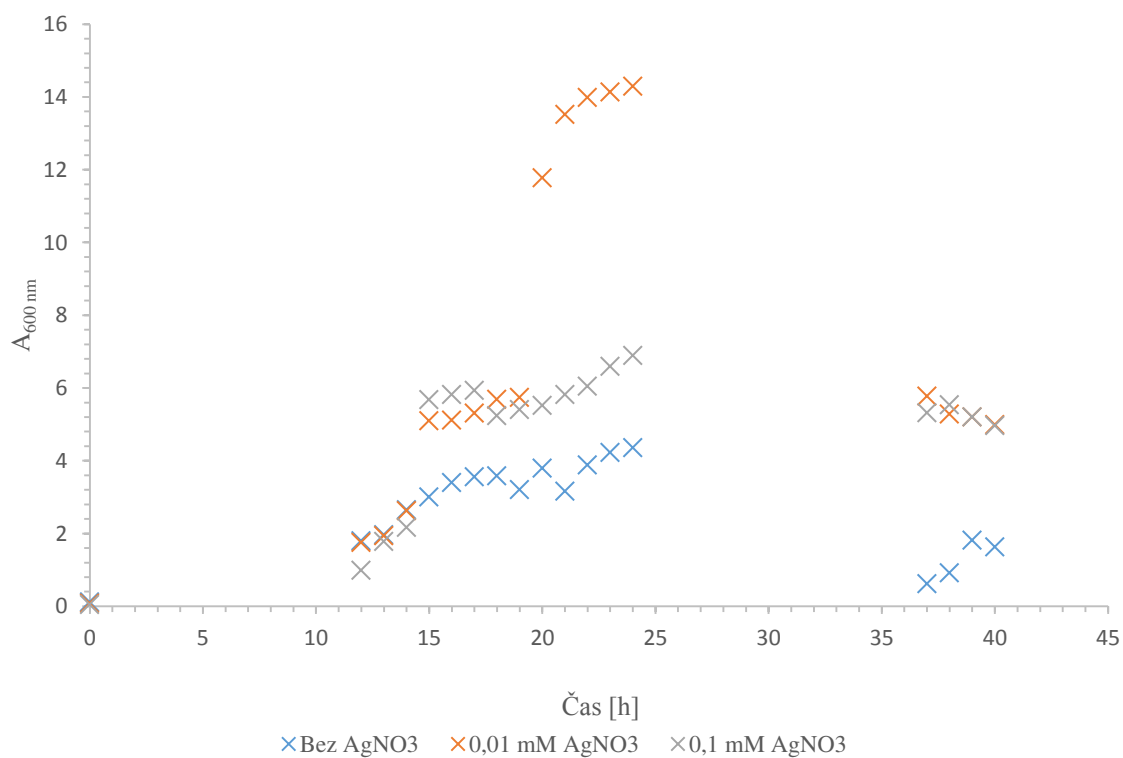
## SEZNAM PŘÍLOH

**Příloha 1:** Porovnání růstových křivek jednotlivých kmenů bez a s různými koncentracemi dusičnanu stříbrného v MRS médiu

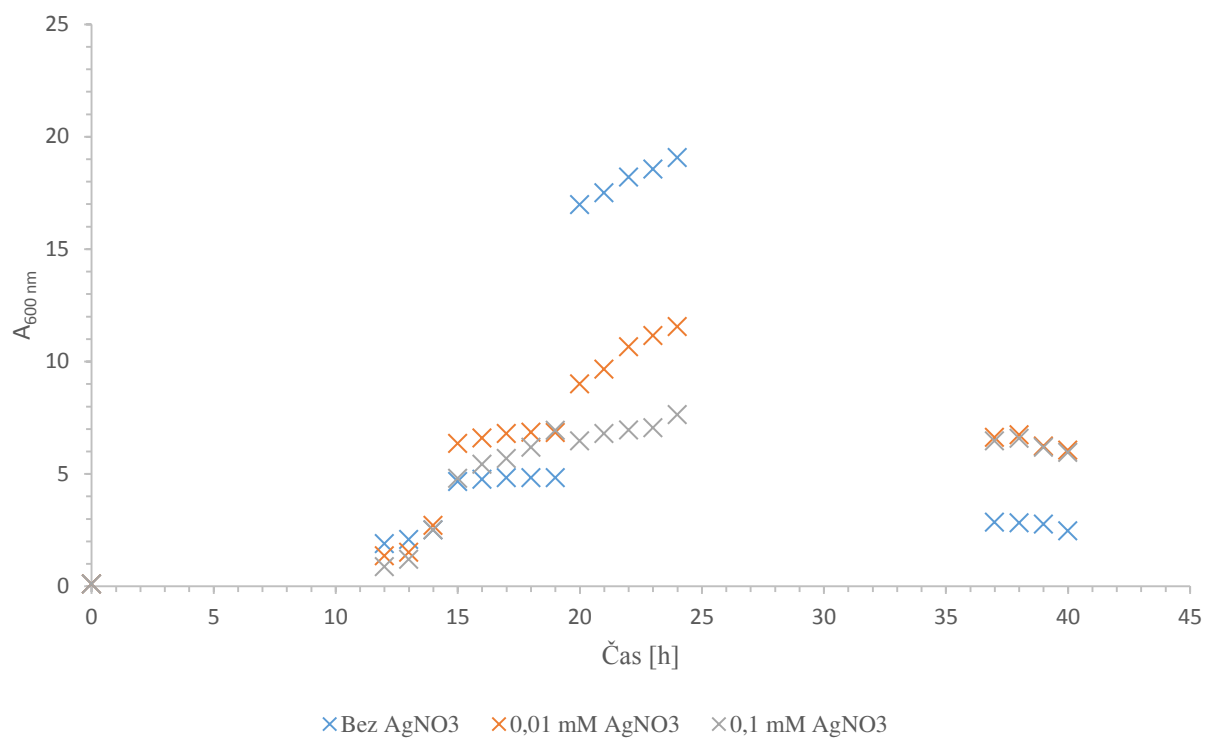
**Příloha 1:** Porovnání růstových křivek jednotlivých kmenů bez a s různými koncentracemi dusičnanu stříbrného v MRS médiu



Obrázek 28: Růstová křivka *Lbc. casei* ssp. *casei* 7088<sup>T</sup> s rozdílnými koncentracemi dusičnanu stříbrného v MRS médiu



Obrázek 29: Růstová křivka *Lbc. casei* ssp. *casei* 7089 s rozdílnými koncentracemi dusičnanu stříbrného v MRS médiu



Obrázek 30: Růstová křivka *Lbc. rhamnosus* 1825<sup>T</sup> s rozdílnými koncentracemi dusičnanu stříbrného v MRS médiu