

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

Bc. Lucie Břízová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Korelace mezi výsledky stanovení velikosti mikroorganismů

Bc. Lucie Břízová

Diplomová práce

2018

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

The correlation between the results in assessment of microorganism sizes

Bc. Lucie Břízová

Thesis

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Břízová**
Osobní číslo: **C16472**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Korelace mezi výsledky stanovení velikosti mikroorganismů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na možnosti stanovení velikosti, s důrazem na stanovení velikosti mikroorganismů.
2. Na základě literární rešerše proveďte na vytipovaných mikroorganismech stanovení jejich velikosti, výsledky experimentů vyhodnoťte a kriticky zhodnoťte.
3. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu" v platném znění.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jiří Palarčík, Ph.D.

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 5. 2018

Bc. Lucie Břízová

Děkuji svému vedoucímu práce Ing. Jířímu Palarčíkovi, Ph.D. za vedení diplomové práce, všestrannou pomoc, cenné rady, trpělivost a ochotu při jejím sepisování.

Rovněž velmi děkuji celé své rodině a blízkým za podporu během celého mého studia.

ANOTACE

Předmětem předkládané diplomové práce je studium korelace mezi výsledky stanovení velikosti mikroorganismů. Měřenými mikroorganismy byly *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Thiobacillus denitrificans*, *Desulfobacter hydrogenophilus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius* a *Escherichia coli*. Na základě jednotlivých měření byly výsledky vzájemně porovnány. Dále se diplomová práce zabývá měřením elektrokinetického potenciálu mikroorganismů.

KLÍČOVÁ SLOVA

velikost mikroorganismů, elektrokinetický potenciál, metody měření, barvení

ANNOTATION

The subject of this submitted diploma thesis is a correlation study between the results in assessment of microorganism sizes. The microorganisms subjected for measurements were *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Thiobacillus denitrificans*, *Desulfobacter hydrogenophilus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius* and *Escherichia coli*. Based on each individual measurement, the results were compared to each other. Furthermore, the diploma thesis deals with the measurements of electrokinetic potential in microorganisms.

KEYWORDS

size of microorganisms, electrokinetic potential, methods of measurement, coloring

OBSAH	
ANOTACE	7
SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	13
ÚVOD	14
TEORETICKÁ ČÁST	15
1 MIKROORGANISMY A JEJICH VLASTNOSTI	15
1.1 Vybrané mikroorganismy	15
1.1.1 Rod <i>Saccharomyces</i>	15
1.1.2 Rod <i>Micrococcus</i>	17
1.1.3 Rod <i>Pseudomonas</i>	18
1.1.4 Rod <i>Thiobacillus</i>	19
1.1.5 Rod <i>Desulfobacter</i>	20
1.1.6 Rod <i>Staphylococcus</i>	21
1.1.7 Rod <i>Escherichia</i>	22
2 ELEKTROKINETICKÉ JEVY	24
2.1 Elektrická dvojvrstva	25
2.2 Elektrokinetický potenciál	27
2.2.1 Měření elektrokinetického potenciálu	27
3 METODY MĚŘENÍ VELIKOSTI MIKROORGANISMŮ	29
3.1 Dynamický rozptyl světla	30
3.1.1 Měření dynamického rozptylu světla	31
3.1.2 Detekční optika 173° - detekce zpětného rozptylu	32
3.2 Mikroskopická analýza	32
3.2.1 Barvení preparátů	33
3.3 Akustická spektrometrie	35
CÍL PRÁCE	36
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4 MATERIÁL	37
4.1 Použité mikroorganismy	37
4.2 Pomůcky	37
4.3 Chemikálie a reagenty	37
4.4 Přístroje	38
5 PRACOVNÍ POSTUPY	39

5.1	Příprava kultivačního média.....	39
5.1.1	Masopeptonový agar	39
5.1.2	Sabouraud Dextrose Agar	39
5.2	Příprava bakteriální kultury	39
5.3	Příprava vzorku	40
5.4	Příprava fyziologického roztoku	40
5.5	Příprava roztoku KCl.....	40
5.6	Příprava zásobní kultury kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
5.7	Barvení dle Grama.....	40
5.8	Negativní barvení bakterií	41
5.9	Měření pomocí přístroje ZetaPALS	41
5.10	Měření pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS	42
5.11	Měření pomocí přístroje DT-1200.....	42
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
6.1	Měření velikosti <i>Pseudomonas fluorescens</i>	43
6.2	Měření ζ potenciálu <i>Pseudomonas fluorescens</i>	44
6.3	Měření velikosti <i>Desulfovibrio hydrogenophilus</i>	45
6.4	Měření ζ potenciálu <i>Desulfovibrio hydrogenophilus</i>	46
6.5	Měření velikosti <i>Micrococcus luteus</i>	46
6.6	Měření ζ potenciálu <i>Micrococcus luteus</i>	48
6.7	Měření velikosti <i>Thiobacillus denitrificans</i>	48
6.8	Měření ζ potenciálu <i>Thiobacillus denitrificans</i>	49
6.9	Měření velikosti <i>Staphylococcus epidermidis</i>	49
6.10	Měření ζ potenciálu <i>Staphylococcus epidermidis</i>	50
6.11	Měření velikosti <i>Staphylococcus intermedius</i>	51
6.12	Měření ζ potenciálu <i>Staphylococcus intermedius</i>	52
6.13	Měření velikosti <i>Escherichia coli</i>	52
6.14	Měření ζ potenciálu <i>Escherichia coli</i>	53
6.15	Měření velikosti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
6.16	Měření ζ potenciálu <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
6.17	Měření velikosti <i>Saccharomyces boulardii</i>	55
6.18	Měření ζ potenciálu <i>Saccharomyces boulardii</i>	56
6.19	Porovnání měření přístrojů	57

7 ZÁVĚR.....	63
POUŽITÁ LITERATURA	65

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
Obrázek 2 <i>Saccharomyces boulardii</i>	17
Obrázek 3 <i>Micrococcus luteus</i>	18
Obrázek 4 Buňky <i>Pseudomonas fluorescens</i> s fágem phiBB-PF7A	19
Obrázek 5 <i>Thiobacillus denitrificans</i>	20
Obrázek 6 <i>Desulfobacter hydrogenophilus</i> ve fázovém kontrastu	21
Obrázek 7 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	22
Obrázek 8 <i>Escherichia coli</i> v elektronovém mikroskopu	23
Obrázek 9 Elektrokinetické jevy	24
Obrázek 10 Schéma elektrické dvojvrstvy	26
Obrázek 11 Základní tvary bakterií	29
Obrázek 12 Schéma přístroje Zetasizer Nano ZS	31
Obrázek 13 Měření zpětného rozptylu	32
Obrázek 14 Mikroskop Nikon Eclipse 80i	33
Obrázek 15 <i>Micrococcus luteus</i> - Gramovo barvení	34
Obrázek 16 Roztírání barviva při negativním barvení	41
Obrázek 17 Negativní barvení <i>Pseudomonas fluorescens</i>	44
Obrázek 18 Negativní barvení <i>Micrococcus luteus</i>	47
Obrázek 19 Negativní barvení <i>Staphylococcus epidermidis</i>	50
Obrázek 20 Negativní barvení <i>Staphylococcus intermedius</i>	51
Obrázek 21 Negativní barvení <i>Escherichia coli</i>	53
Obrázek 22 Negativní barvení <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
Obrázek 23 Negativní barvení <i>Saccharomyces boulardii</i>	56
Tabulka 1 Seznam použitých chemikálií	37
Tabulka 2 Seznam použitých přístrojů	38
Tabulka 3 Složení Masopeptonového agaru	39
Tabulka 4 Složení Sabouraud Dextrose Agarů	39
Tabulka 5 Měření velikosti <i>Pseudomonas fluorescens</i>	43
Tabulka 6 Měření ζ potenciálu <i>Pseudomonas fluorescens</i>	45
Tabulka 7 Měření velikosti <i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>	45
Tabulka 8 Měření ζ potenciálu <i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>	46

Tabulka 9 Měření velikosti <i>Micrococcus luteus</i>	47
Tabulka 10 Měření ζ potenciálu <i>Micrococcus luteus</i>	48
Tabulka 11 Měření velikosti <i>Thiobacillus denitrificans</i>	48
Tabulka 12 Měření ζ potenciálu <i>Thiobacillus denitrificans</i>	49
Tabulka 13 Měření velikosti <i>Staphylococcus epidermidis</i>	49
Tabulka 14 Měření ζ potenciálu <i>Staphylococcus epidermidis</i>	50
Tabulka 15 Měření velikosti <i>Staphylococcus intermedius</i>	51
Tabulka 16 Měření ζ potenciálu <i>Staphylococcus intermedius</i>	52
Tabulka 17 Měření velikosti <i>Escherichia coli</i>	52
Tabulka 18 Měření ζ potenciálu <i>Escherichia coli</i>	53
Tabulka 19 Měření velikosti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
Tabulka 20 Měření ζ potenciálu <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
Tabulka 21 Měření velikosti <i>Saccharomyces boulardii</i>	56
Tabulka 22 Měření ζ potenciálu <i>Saccharomyces boulardii</i>	57
Graf 1 Výsečový graf - destilovaná voda	57
Graf 2 Výsečový graf - destilovaná voda	58
Graf 3 Výsečový graf - roztok KCl	59
Graf 4 Výsečový graf - roztok KCl	60
Graf 5 Výsečový graf - fyziologický roztok	61
Graf 6 Výsečový graf - fyziologický roztok	62

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AIDS Acquired Immune Deficiency Syndrome

D. *Desulfobacter*

DLS Dynamic light scattering

DNA Deoxyribonucleotide acid

E. *Escherichia*

FFR Fast Field Reserval

HIV Human Immunodeficiency Virus

M. *Micrococcus*

MPA Masopeptonový agar

P. *Pseudomonas*

PAGE Polyacrylamide gel electrophoresis

PALS Phase Analysis Light Scattering

PCR Polymerase Chain Reaction

PCS Photon Correlation Spectroscopy

S. *Saccharomyces*

SFR Slow Field Reserval

T. *Thiobacillus*

ÚVOD

Mikroorganismy mají v přírodě i v životě člověka velký význam, protože jsou jedním z hlavních činitelů ovlivňujících tvorbu a zachování životního prostředí. Mezi mikroorganismy se řadí bakterie, plísňe, kvasinky některé řasy a prvoci. Díky široké rozmanitosti metabolických drah, rychlosti rozmnožování a schopnosti dlouho přežít v nepříznivých podmínkách se mikroorganismy vyskytují téměř všude, např. v půdě, ve vodním prostředí, v ovzduší, v potravinách nebo na povrchu i uvnitř lidského těla.

Znalost zjišťovaných parametrů jako jsou velikost a tvar mikroorganismů je velmi důležitá, protože ovlivňují například u bílkovin jejich rozpustnost, distribuci v těle a nepřímo také technologii jejich výroby. S velikostí migrujících částic úzce souvisí i jejich tendence se shlukovat a vytváření větších agregátů. Tento proces závisí na velikosti povrchového náboje částic v daném prostředí. Informovanost o velikosti mikroorganismů má široké uplatnění v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu nebo ve zdravotnictví.

Pro porovnání velikosti buněk byly vybrány tyto mikroorganismy: *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Thiobacillus denitrificans*, *Desulfobacter hydrogenophilus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius* a *Escherichia coli*.

Existuje řada metod a přístrojů, které umožňují měření velikosti mikroorganismů. Běžně používané metody pro měření velikosti bakteriálních buněk jsou mikroskopické metody, disperzní analyzátoři nebo průtokové cytometry. Pro měření velikosti buněk vybraných bakteriálních kmenů a kvasinek bylo využito mikroskopických technik, dynamického rozptylu světla a elektroakustického spektrometru.

TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROORGANISMY A JEJICH VLASTNOSTI

Pro identifikaci mikroorganismů a charakterizaci jejich vlastností je důležité získat čistou kulturu. Čistá kultura se získá kultivací neboli pomnožením buněk jednoho druhu na kultivačních půdách. K identifikaci bakterií lze využít fenotypových a genotypových metod (Votava, 2003; Bednář, 1999).

Fenotypové metody jsou založeny na vyhodnocení morfologie kolonií (velikost buněk, okraj, barvení dle Grama – Gram-pozitivní/Gram-negativní, zápach), enzymatické aktivitě, patogenitě, vztahu ke kyslíku (aerobní/anaerobní), citlivosti k antibiotikům atd. (Bednář, 1999; Espy, 2006; Reischl, 2001).

Genotypové (molekulárně-biologické) metody využívají specifické sekvence DNA k určení rodu, druhu až kmene. Jedná se o metody založené na amplifikaci (PCR, tzn. polymerázová řetězová reakce) nebo na hybridizaci. Dále tyto metody slouží k odhalení genových mutací např. rezistence na antibiotika (Espy, 2006).

1.1 Vybrané mikroorganismy

1.1.1 Rod *Saccharomyces*

Název *Saccharomyces* (*S.*) byl odvozen z latinského názvu *Saccharo* (cukr) a *myces* (houba). Jedná se o jednobuněčný, eukaryotní organismus, který se při dostatečném přísunu potravy dokáže rychle rozmnožovat (Anaissie, 2003). Kvasinky tohoto rodu dosahují velikosti 3 – 15 μm a řadí se mezi fakultativně anaerobní organismy. Výraznou vlastností zástupců *Saccharomyces* je jejich schopnost přeměnit cukr na oxid uhličitý a alkohol pomocí enzymů (Barnett, 2003). Kvasinky vyrůstají na Sabouraudově glukózovém agaru při teplotě 28 – 30 °C. Živnou půdou pro kvasinky rodu *Saccharomyces* je především dostatečné množství cukrů, a proto se nejčastěji vyskytují na ovoci (rybíz, broskve, švestky atd.) (Mortimer, 2000). Patří mezi oportunní patogeny člověka, jejich nebezpečnost závisí na celkovém stavu člověka a na funkčnosti jeho imunitního systému (Votava, 2003). Nejznámější kvasinkou tohoto rodu je *Saccharomyces cerevisiae* (Anaissie, 2003).

Saccharomyces cerevisiae

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* slouží jako modelový organismus pro studium exprese DNA i bílkovin, přenos signálů, posttranslačních modifikací genového produktu, dále pro studium buněčného genomu, metabolismu a apoptózy u eukaryotních buněk

(Karathia, 2011). Jedná se o jednu z nejpoužívanějších kvasinek, díky ekonomicky výhodnému pěstování na levných kultivačních médiích a krátkému generačnímu času (Sherman, 2002). Kvasinka *S. cerevisiae* (obrázek 1) vytváří koloidní a elipsoidní buňky o velikosti 3,7 – 9,7 x 2,6 – 6,4 μm . Některé kmeny rostou ve tvaru cylindrické až protáhlé buňky. Vzhled a konzistence kolonií *S. cerevisiae* je krémovitá, světle hnědá, hladká a lesklá. V kapalném médiu *S. cerevisiae* tvoří sediment (Savická, 2018). Tato kvasinka není u zdravých jedinců považována za patogen. Jako slabý patogen je považována u jedinců s oslabeným imunitním systémem, např. nádorové bujení nebo popáleniny (Anaissie, 2003). Mezi vzácné onemocnění způsobené touto kvasinkou patří infekce kloubů a kostí (Seng, 2016). *S. cerevisiae* má široké využití ve vinařství, pekařství a pivovarnictví (Gallone, 2016).

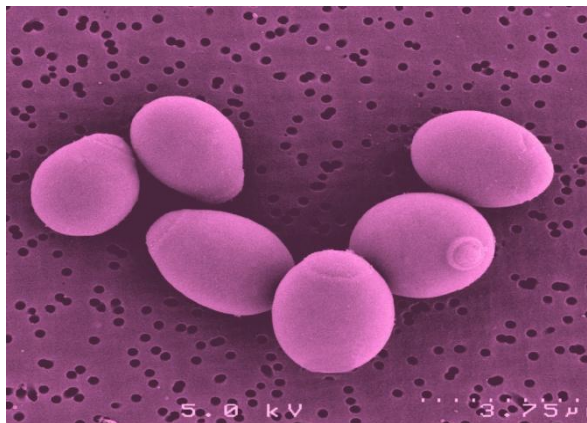


Obrázek 1 *Saccharomyces cerevisiae*
Upraveno a převzato z: ScienceNews, 2017

Saccharomyces boulardii

Saccharomyces boulardii je tropický druh kvasnic, který byl poprvé izolován z tropického ovoce liči a mangostanu v roce 1923 francouzským vědcem Henri Boulardem. Jedná se nepatogenní bioterapeutickou látkou, na rozdíl od *S. cerevisiae* (McFarland, 1993). Anaerobní buňky *S. boulardii* (obrázek 2) jsou oválné o délce přibližně 10 μm (Lesage, 2006). Kolonie kvasinky *S. boulardii* jsou ploché, lesklé, hladké, krémově zbarvené, schopné růst při nízkém pH a teplotě 37 °C (McFarland, 1993). Tato kvasinka se používá jako účinné probiotikum, které bojuje proti širokému spektru gastrointestinálních onemocnění (např. průjemové onemocnění vyvolané *Clostridium difficile*, průjemové onemocnění spojené s HIV/AIDS nebo spojené s podáním antibiotik). *S. boulardii* interaguje s řadou mikrobu v gastrointestinálním traktu lidského těla a vykazuje inhibiční účinky na agens způsobující

záněty (McFarland, 1993; Munoz, 2005). Dále podporuje sekreci imunoglobulinu A, který tvoří důležitou součást naší imunitní obrany proti příchozím patogenům a toxinům (Qamar, 2001).



Obrázek 2 *Saccharomyces boulardii*
Upraveno a převzato z: OptiBac, 2018

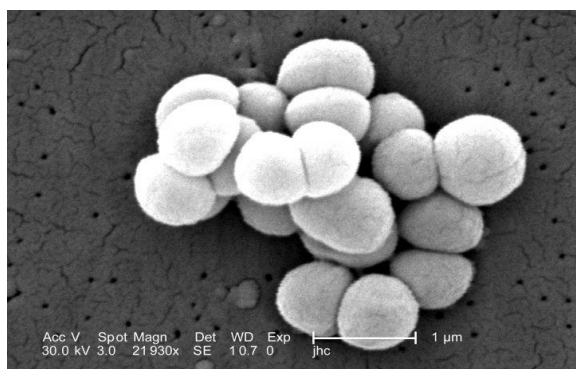
1.1.2 Rod *Micrococcus*

Na základě morfologických a růstových vlastností byly mikrokoky zařazeny do stejné kategorie jako stafylokoky. Analýza genomu prokázala, že se jedná o odlišné a vývojově vzdálené rody. Nejvýznamnější fenotypový rozdíl od stafylokoků je jejich striktně respirační metabolismus. Stafylokoky se řadí mezi fakultativně anaerobní, zatímco mikrokoky jsou striktně aerobní, což znamená, že prospívají v prostředí bohatém na kyslík. Přírodním místem výskytu pro mikrokoky je kůže savců, ale mohou se vyskytovat i v mase, půdě, prachu, vodě a v mléčných výrobcích. Mikrokoky jsou považovány za nepatogenní bakterie, ale u osob se sníženou imunitou mohou vyvolat závažné infekce (Bednář, 1999; Greenblatt, 2004). Mikrokoky mohou být zapleteny do jiných infekcí, včetně opakované bakteriémie, septického šoku, septické artritidy, endokarditidy nebo meningitidy (Greenblatt, 2004).

Micrococcus luteus

Micrococcus (M.) luteus patří mezi aerobní, nesporulující, nepohyblivé gram-pozitivní koky uspořádané do shluků tvořící tetrády. Aktivita katalázy, oxidázy a ureázy je pozitivní (Votava, 2003). *M. luteus* je koaguláza-negativní a vysoce citlivý na antibiotikum bacitracin (Greenblatt, 2004). Po 24 hodinové inkubaci při 37 °C *M. luteus* vytváří 0,5 – 3,5 μm velké jasně žluté kolonie s rovnými okraji (Macháček, 2010). Oválný až kulatý tvar buňky *M. luteus* (obrázek 3) dosahuje velikosti 0,9 – 1,8 μm (Savická, 2018). *M. luteus* se běžně vyskytuje

v lidských ústech, sliznici, hltanu a v horních cestách dýchacích. Pro imunokompromitované pacienty s AIDS nebo pro pacienty na chemoterapii představuje tato bakterie určité riziko, nicméně obvykle je *M. luteus* považován za nepatogenní (Greenblatt, 2004), ale i přesto je označován za hlavního původce infekční protézové endokarditidy (Uso, 2003; Seifert, 1995).



Obrázek 3 *Micrococcus luteus*
Upraveno a převzato z: Pixnio, 2016

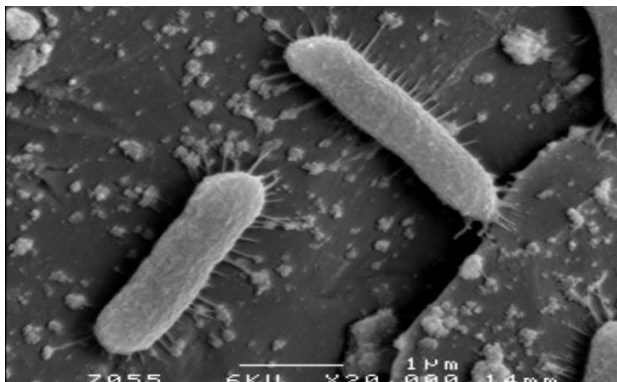
1.1.3 Rod *Pseudomonas*

Dle své morfologie je rod *Pseudomonas* reprezentován gram-negativními rovnými až lehce zakřivenými tyčinkami uspořádanými jednotlivě, ve dvojicích nebo v krátkých řetízcích. Jedná se o striktně aerobní pohyblivé bakterie nenáročné na kultivační média, které nevytváří spóry. Pseudomonády produkují katalázu a výrazně i oxidázu. Jejich přirozenými místy výskytu jsou říční a mořské vody, povrch rostlin, střevní trakt zvířat i člověka, potraviny a půda (Bednář, 1999). Většina druhů rodu *Pseudomonas* jsou přirozeně rezistentní vůči penicilinu a většině beta-laktamovým antibiotikům, naopak citlivé jsou např. na aminoglykosidy, mezi které patří gentamicin nebo amikacin (Ryan, 2004). Některé druhy rodu *Pseudomonas* (např. *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Pseudomonas fluorescens*) produkují žlutozelený nebo modrozelený pigment (Bednář, 1999).

Pseudomonas fluorescens

Pseudomonas (P.) fluorescens (obrázek 4) jsou gram-negativní pohyblivé aerobní tyčinky o velikosti 0,5 – 1,0 x 1,5 – 5,0 μm, které jsou schopné růst při pH 4 – 8. Jsou oxidáza, kataláza-pozitivní. Po aerobní 24 až 48 hodinové inkubaci při teplotě 27 – 32 °C vyrůstají na živném agaru bílé, pravidelné, okrouhlé a hladké kolonie. *P. fluorescens* produkuje fluorescenční žlutozelený pigment pyoverdín (Savická, 2018; Moore, 2006; Trapet, 2016). Tato bakterie se běžně vyskytuje ve zkažené potravě (vejčeka, ryby) nebo ji lze izolovat z klinických vzorků (Savická, 2018). *P. fluorescens* se obecně nepovažuje za

bakteriální patogen, nicméně může způsobit bakteriémiu u lidí, přičemž většina hlášených případů byla buď z transfúze kontaminovaných krevních přípravků, nebo použitím kontaminovaného zařízení spojeného s intravenózními infúzemi (Scales, 2014).



Obrázek 4 Buňky *Pseudomonas fluorescens* s fagy phiBB-PF7A
Upraveno a převzato z: Sillankorva, 2008

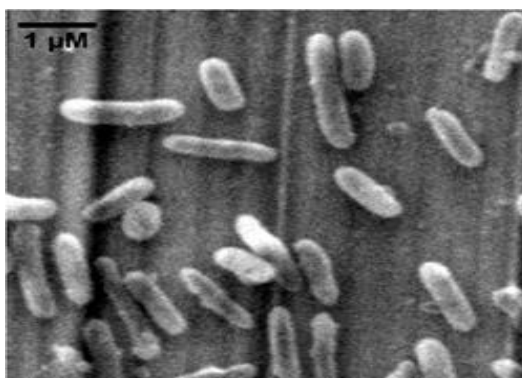
1.1.4 Rod *Thiobacillus*

Thiobacillus je rod gram-negativních betaproteobakterií. Je reprezentován, nesporulujícími bakteriemi ve tvaru tyčinek, které získávají energii z anorganických sloučenin síry (Kuenen, 1981; Vishniac, 1974). Zdrojem uhlíku je pro ně oxid uhličitý, jedná se tedy o autotrofní organismy. Bakterie rodu *Thiobacillus* jsou schopné růst v širokém rozmezí pH i teploty. Nejčastěji se vyskytují v prostředí, kde je přítomen kyslík a síra např. přechod mezi okysličenou vodou a anaerobními sedimenty. Dále je najdeme v zamokřených půdách, v kyselých sulfátových půdách, v říčních usazeninách, v kyselých a hydrotermálních pramenech nebo v odpadních vodách. Bakterie rodu *Thiobacillus* jsou často v půdě zodpovědné za rozpuštění sirných sloučenin (např. pyrit a další kovové sulfidy), což dělá síru dostupnou pro asimilaci jinými organismy a rostlinami (Donovan, 2000).

Thiobacillus denitrificans

Thiobacillus (T.) denitrificans jsou nesporulující gram-negativní krátké tyčinky (obrázek 5) o velikosti 0,5 x 1,0 – 3,0 μm. Pohyb jim je umožněn jedním polárně umístěným bičíkem. Chemolitotrofní bakterie *T. denitrificans* jsou fakultativně anaerobní, což je výjimka u sirných bakterií. *T. denitrificans* je nejlépe známý svou schopností spojit oxidaci anorganických sloučenin síry (sirovodík a thiosíran) za současné redukce dusičnanů (Straub, 1996; Donovan, 2000; Beller, 2006). Při kultivaci za anaerobních podmínek a teplotě 30 °C vytváří kolonie po 7 – 10 dnech. Zpočátku bezbarvé kolonie vlivem síry zbledají. Při aerobní kultivaci na pevných médiích může dojít k popraskání agarů způsobené

uvolňování dusíku, v tekutých médiích vidíme uvolňování dusíku v podobě bublinek. Optimální podmínky pro růst *T. denitrificans* jsou vlhčí prostředí, neutrální pH 6,8 – 7,4 a teplota okolo 30 °C (Donovan, 2000). *T. denitrificans* je schopen ovlivňovat nejen biogeochemické cykly dusíku, síry, ale i železa a uranu. Z hlediska životního prostředí má tato bakterie významný vliv při bioremediaci *in situ*. Podílí se na odstraňování dusičnanů, hlavních kontaminantů znečištěných vod. *T. denitrificans* nepatří mezi patogenní mikroorganismy (Straub, 1996; Pauwels, 1998; Beller, 2004).



Obrázek 5 *Thiobacillus denitrificans*
Upraveno a převzato z: Beller, 2006

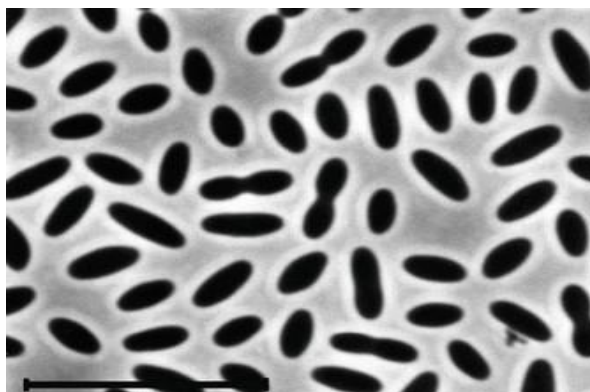
1.1.5 Rod *Desulfobacter*

Bakterie rodu *Desulfobacter* jsou nesporulující, gram-negativní oválné až tyčinkovité nebo mírně zakřivené anaerobní buňky ve tvaru vibrio o velikosti 0,5 – 2,5 x 1,5 – 8 μm. Buňky jsou uspořádány jednotlivě nebo ve dvojicích. Zástupci rodu *Desulfobacter* mohou být pohyblivé, ovšem jejich pohyblivost se může měnit v důsledku kultivace. Optimální podmínky pro jejich růst je teplota v rozmezí 28 – 34 °C a pH v rozmezí 6,5 – 7,4. Bakterie rodu *Desulfobacter* mají schopnost oxidovat acetát na oxid uhličitý a mohou využívat sírany, siřičitany nebo thiosulfáty k redukcí na sulfan. Nejčastěji se vyskytují v mořských sedimentech, bezkyslíkatých sladkovodních sedimentech nebo v aktivovaném kalu (Kuever, 2015).

Desulfobacter hydrogenophilus

Desulfobacter (D.) hydrogenophilus jsou gram-negativní anaerobní protáhlé oválné buňky (obrázek 6) o velikosti 1 – 1,3 x 2 – 3 μm. Bakterie je nepohyblivá a nesporulující. *D. hydrogenophilus* roste při teplotě 29 – 32 °C a pH 5,5 – 7,6 (Widdel, 1987). *D. hydrogenophilus* má důležitou roli v ekologii vodních systémů. Jeho nejdůležitější funkcí

je redukce síranu na sulfid, hraje velkou roli v cyklu síry v jezerech, zátokách a vodních sedimentech. Vyskytuje se v široké škále prostředí, byl objeven jak v mořském tak ve sladkovodním prostředí (Londry, 2003; Garrity, 2005; Kuever, 2015). *D. hydrogenophilus* se využívá v procesech čištění odpadních vod, je schopen degradovat uhlík do jednodušších forem, a také poskytuje různé formy síry dalším mikroorganismům přítomným v kalu. (Widdel, 1987).



Obrázek 6 *Desulfobacter hydrogenophilus* ve fázovém kontrastu
Měřítka 10 μm . Upraveno a převzato z: Kuever, 2005

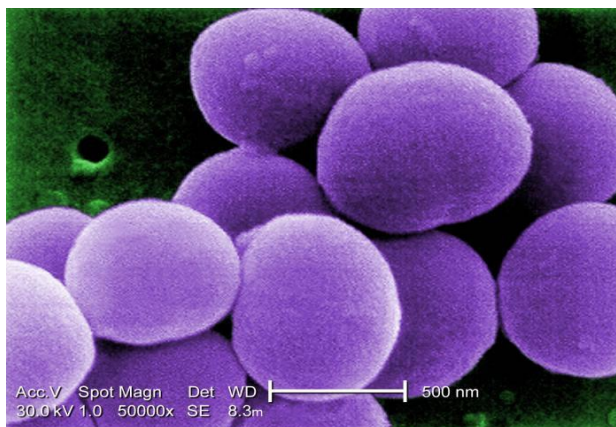
1.1.6 Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou gram-pozitivní koky uspořádané jednotlivě, v párech nebo v tetradách, ve velmi krátkých řetězcích především v nepravidelných shlucích tvaru hroznů. Až na výjimky jsou fakultativně anaerobní, kataláza-pozitivní, nesporulující, nepohyblivé a většinou neopouzdržené koky o průměru 1 μm . Rod *Staphylococcus* lze rozdělit na dvě skupiny podle jejich schopnosti koagulovat plazmu, na stafylokoky koaguláza-pozitivní (např. *Staphylococcus intermedius*) a koaguláza-negativní (např. *Staphylococcus chromogenes*). Rostou v přítomnosti 10% NaCl, jsou rezistentní k bacitracinu a citlivé k furazolidinu (Votava, 2003). Po 24 hodinové inkubaci při teplotě 37 °C vyrůstají v okrouhlých, hladkých, lesklých a lehce mazlavých koloniích o průměru 1 – 3 mm. V bujonu vytváří zákal a sediment (Bednář, 1999). Stafylokoky se vyskytují v klinických vzorcích, u zvířat a v potravinách (Votava, 2003).

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus epidermidis (obrázek 7) jsou fakultativně anaerobní, nepohyblivé gram-pozitivní koky uspořádané po dvou nebo po čtyřech o velikosti 0,5 – 1,5 μm . Jsou koaguláza-negativní, kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Po 24 hodinové inkubaci při teplotě 37 °C vytváří porcelánově bílé kolonie o průměru 1 – 2 mm (Savická, 2018;

Votava, 2003). *Staphylococcus epidermidis* se vyskytuje na kůži, ale má tendenci obsazovat i vlhká místa těla jako je nos nebo podpaží (Gillen, 2009). Často bývá označován jako oportunní patogen v souvislosti s cizími předměty používanými v medicíně k vyšetřování či léčbě. Proto je infekce tímto mikroorganismem často nozokominální s multirezistencí na antibiotika. Mezi onemocnění vyvolané bakterií *Staphylococcus epidermidis* řadíme septikémie, endokarditidy, infekce operačních ran, močového traktu, oka, kloubních protéz a další (Fey, 2010; Savická, 2018). Antibiotika jsou z velké části neúčinná při odstraňování biofilmů, proto je nejvhodnější léčbou těchto infekcí odstranění nebo nahrazení infikovaného implantátu. Nejúčinnější volbou mezi antibiotiky je vankomycin, rifampicin nebo aminoglykosidy (Otto, 2009).



Obrázek 7 *Staphylococcus epidermidis*
Upraveno a převzato z: Gillen, 2009

Staphylococcus intermedius

Bakterie *Staphylococcus intermedius* jsou gram-pozitivní, fakultativně anaerobní koky o velikosti 0,5 – 1,5 μm , které se řadí mezi koaguláza-pozitivní stafylokoky (VetBact, 2015; Bednář, 1999). Nejčastěji se *Staphylococcus intermedius* vykytuje u psů, lišek, norků nebo u řady druhů volně žijících ptáků. Jsou označovány jako potencionální patogen pro zvířata. *Staphylococcus intermedius* způsobuje pyodermie a otitidy u psů. Vzácně je možný přenos na člověka, který přichází do častého kontaktu s infikovanými zvířaty nebo z hnisajících ran po kousnutí kolonizovaným hostitelem (Bednář, 1999; Biberstein, 1984; Boerlin, 2001).

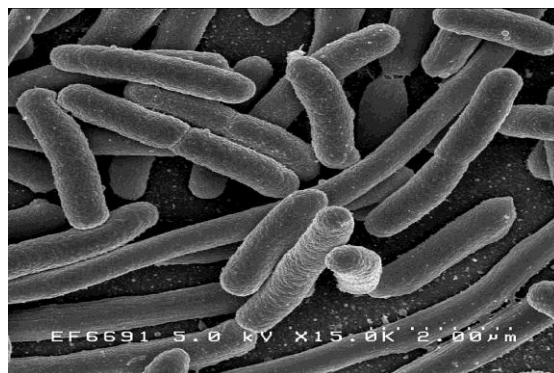
1.1.7 Rod *Escherichia*

Bakterie tohoto rodu jsou gram-negativní, nesporulující, fakultativně anaerobní, většinou pohyblivé a biochemicky značně aktivní tyčinky. Optimální teplota růstu je 37 °C s krátkou generační dobou. Mnoho bakterií rodu *Escherichia* jsou neškodnými komenzály, ale

určité kmeny jsou pro člověka patogenní. Jsou známy jako nejčastějšími původci infekcí močových cest, infekcí trávicího traktu a dalších patologických stavů. Nejznámějším a nejdůležitějším zástupcem tohoto rodu je *Escherichia coli* (Ronald, 2003; Votava, 2003).

Escherichia coli

Bakterie získala název podle Theodora von Escherichia, rakouského lékaře a bakteriologa, který jí izoloval roku 1885 (Bednář, 1999). Enterobakterie *Escherichia coli* (obrázek 8) patří mezi fakultativně anaerobní, gram-negativní rovné tyčky, které jsou uspořádány jednotlivě nebo po dvou. Velikost buňky je 2 – 6 x 1,1 – 1,5 μm. *Escherichia coli* (*E.*) je pohyblivá, kataláza pozitivní a oxidáza negativní (Savická, 2018; Greenwood, 1999). Bakterie *E. coli* vyrůstají v bezbarvých hladkých koloniích o průměru 2 – 3 mm. Bakterie *E. coli* slouží jako modelový organismus, na kterém byla prokázána bakteriální konjugace a replikace DNA. Do jejího genomu byly vkládány cizí geny pro tvorbu různých látek, např. inzulín, interferon nebo geny kódující antigeny jiných mikrobů, čehož bylo využito k tvorbě rekombinantních vakcín. *E. coli* je běžný komenzál tlustého střeva u teplokrevných živočichů a člověka. Jedná se o podmíněně patogenního mikroba vyvolávající i chorobné stavy. *E. coli* podle místa působení způsobuje extraintestinální onemocnění (onemocnění močových cest, septická onemocnění, infekce ran nebo hnisavé procesy) a intestinální onemocnění (infekce provázené průjmy). Mikrob se přenáší fekálně orálně, přenos je možný i kontaktem. K léčbě extraintestinálních onemocnění se používají cefalosporiny, fluorované chinoliny, nitrofurantoiny a u intestinálních forem je důležitá rehydratace (Bednář, 1999; Greenwood, 1999; Votava, 2003).

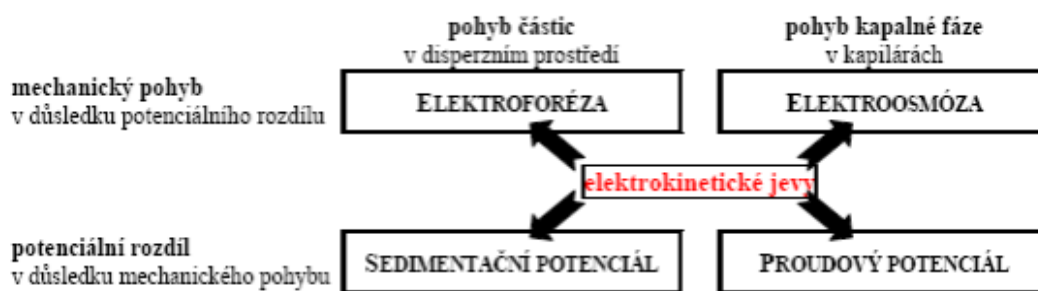


Obrázek 8 *Escherichia coli* v elektronovém mikroskopu
Upraveno a převzato z: Poole, 2009

2 ELEKTROKINETICKÉ JEVY

Koloidní soustavy jsou ovlivňovány vnějším elektrickým polem, kde dochází k pohybu koloidních částic. Tyto jevy se označují jako elektrokinetické jevy (obrázek 9), které souvisí s existencí povrchového náboje na částicích. Tento náboj je měřen jako elektrokinetický potenciál ζ , který představuje potenciální stabilitu koloidního systému (Bartovská, 2005). Mezi oblíbené materiály pro studium jejich elektrokinetických vlastností řadíme jemně porézní pevné látky, koloidní částice, kapiláry apod. (Grahame, 1947).

Rozeznáváme čtyři základní typy elektrokinetických jevů – elektroforéza, elektroosmóza, sedimentační potenciál a proudový potenciál. Tyto jevy lze využít pro určení elektrokinetického (zeta) potenciálu (Oakes, 1955; Hiemenz, 1997). Největší praktické využití má elektroforéza, méně často elektroosmóza a proudový potenciál. Sedimentační potenciál se měří velmi zřídka (Bartovská, 2005; Duncan, 2003).



Obrázek 9 Elektrokinetické jevy
Upraveno a převzato z: Bartovská, 2009

- **Elektroforéza**

Elektroforéza je řazena mezi separační metody. Pod vlivem vnějšího elektrického pole se částice disperzní fáze mající nenulový povrchový náboj pohybují v závislosti na znaménku náboje ke kladné nebo záporné elektrodě (Righetti, 1983).

Z hlediska praktického využití je elektroforéza nejvýznamnějším elektrokinetickým jevem. Velmi často se používá elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAGE). Jedná se o materiál, který je mechanicky pevný, inertní a nabízí možnost přípravy nosiče různých předem určených vlastností (např. hustota zesíťování). Nejčastěji se elektroforéza využívá pro separaci biologicky významných molekul (bílkoviny, DNA) a pro charakterizaci povrchů organismů (viry, bakterie), (Grossman, 1992; Hiemenz, 1997; Bird, 2001; Landers, 2008; Duncan, 2003).

- **Elektroosmóza**

Stacionární fází je kapilára nebo porézní zátka a mobilní fází je elektricky vodivý roztok, většinou pufr, pohybující se působením elektrického pole. Na vnitřní stěně kapiláry dochází ke styku kapalného roztoku s pevnou stěnou kapiláry a vzniká elektrická dvojrstva. Vrstvička opačného náboje v kapalině blízko stěny kapiláry podléhá působení hnacího pole, dochází k pohybu směrem k příslušnému pólu a strhnutí celého průřezu kapaliny v kapiláře (Bartovská, 2009; Heimenz, 1997).

Elektroosmóza se využívá při studiu elektrických vlastností fázového rozhraní, odvodňování porézních a práškovitých materiálů (jíly, hlíny) a vysušování porézních materiálů (vlhkého zdiva). Dále má elektroosmóza velké uplatnění v analytické chemii pro kvalitativní a kvantitativní stanovení chemických látek (Bartovská, 2005).

- **Sedimentační potenciál**

Inverzním jevem k elektroforetickému pohybu je tzv. sedimentační potenciál. Tento potenciál vzniká při jednosměrném pohybu nabitých disperzních částic s elektrickou dvojrstvou v disperzním prostředí způsobené mechanickou silou (gravitace, odstředivé pole).

Velikost sedimentačního potenciálu závisí na výškovém rozdílu, viskozitě prostředí, rozměru a koncentraci částic, rozdílu hustot částic a disperzního prostředí. Praktické využití tohoto potenciálu je však téměř nulové (Bartovská, 2009; Hunter, 1988).

- **Proudový potenciál**

Kapalina se pohybuje kapilárou nebo porézní přepážkou, která je umístěna mezi elektrodami. Pozorujeme vznik elektrického proudu a rozdílu potenciálů na koncích porézní přepážky (Hunter, 1988). Proudový potenciál je jev inverzní k elektroosmóze (Bartovská, 2009).

Proudový potenciál vzniká při protékání přírodních vod zemskou kůrou nebo u větších vodopádů. Dále se proudový potenciál vyskytuje v medicíně při proudění krve v kapilárách organismů (Bartovská, 2005).

2.1 Elektrická dvojrstva

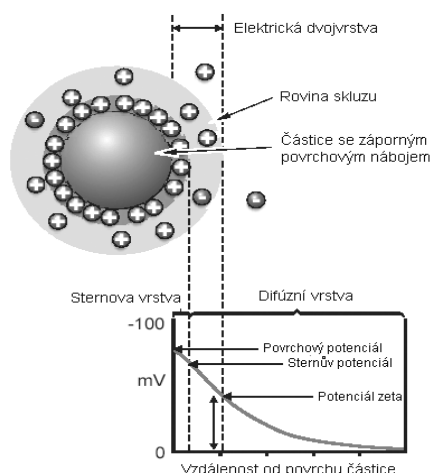
Na povrchu koloidních částic dochází ke vzniku elektrického náboje buď disociací, rozpouštěním (ionizace funkčních skupin povrchových molekul) nebo adsorpcí iontů přítomných v disperzním prostředí. Vzniklý nabitý povrch při styku s roztokem přitahuje ionty opačného znaménka (protiionty), jejichž náboj neutralizuje náboj povrchu a vzniká tak

útvár složený ze dvou vrstev opačně nabitých iontů, tzv. elektrická dvojrstva (Bartovská, 2005; Duncan, 2003). Pro popis tohoto uspořádání elektrické dvojrstvy byl vytvořen Helmholtzův, Goüyův-Chapmanův a Sternův model (Bartovská, 2005).

První model elektrické dvojrstvy vypracoval Helmholtz, který vycházel z představy, že dvojrstva je tvořena dvěma vrstvy nábojů opačného znaménka rovnoměrně rozdělených po povrchu, kde dochází k vykompenzování náboje opačně nabitých částic vyskytujících se ve druhé vrstvě (Bartovská, 2005).

Model elektrické dvojrstvy později rozvinuli Goüy a Chapman. Jejich teorie se zabývá poklesem potenciálu ve vnější difúzní vrstvě, kde postupně docházelo k poklesu koncentrace iontů s rostoucí vzdáleností od pevného nabitého povrchu (Bartovská, 2005). Nedostatkem Goüyovy-Chapmanovy teorie bylo, že ionty považovala za bodové náboje a nepočítala tedy s jejich skutečnými rozměry (Kvítek, 2007).

Stern vypracoval novou teorii elektrické dvojrstvy (obrázek 10), která zahrnuje rozměry iontů a jejich specifické neelektrické interakce. Dle Sternovy teorie jsou k vnitřní vrstvě iontů přitahovány elektrostatickými a adsorpčními silami ionty opačného znaménka. Těsně k povrchu přiléhá tzv. Sternova vrstva (vrstva protiiontů), která je tvořena ionty vázanými převážně adsorpčními silami. Společně s ionty vázanými na povrchu částice vytváří kompaktní vnitřní vrstvu. Součástí difúzní vrstvy jsou další protiionty, které se pohybují ve větší vzdálenosti od částice a jsou přitahovány elektrostatickými silami (Bartovská, 2005; Pouchlý, 2008). Uvnitř difúzní vrstvy existuje teoretická hranice, kde ionty a částice tvoří stabilní jednotku. Tato hranice je označována jako povrch hydrodynamického smyku nebo rovina skluzu. Potenciál na této hranici je označován jako elektrokinetický potenciál (CSCA, 2008).



Obrázek 10 Schéma elektrické dvojrstvy
Upraveno a převzato z: CSCA, 2008

2.2 Elektrokinetický potenciál

Jedná se o potenciál tzv. pohybového rozhraní mezi přiléhající tenkou nepohyblivou vrstvou protiiontů (ionty opačného znaménka) a kapalinou, tedy na rozhraní mezi pevnou a difúzní částí elektrické dvojvrstvy. Elektrokinetický potenciál označovaný jako ζ (zeta) potenciál je funkcí uspořádání fázového rozhraní, na rozdíl od elektrochemického potenciálu, který je dán termodynamickými vlastnostmi objemových fází (Bartovská, 2005). O velikosti ζ potenciálu rozhodují adsorbované ionty ale i iontová síla roztoku. Se zvyšující se koncentrací roztoku elektrolytu přecházejí opačně nabitě ionty z difúzní části elektrické dvojvrstvy blíže k vnitřní části elektrické dvojvrstvy. Dochází ke zmenšení difúzní vrstvy, což vede ke snížení ζ potenciálu a tím ke ztrátě stability koloidních částic (Kvítek, 2007). Pokud je absolutní hodnota ζ potenciálu vyšší než 30 mV, jedná se o stabilní systém (Bartovská, 2005; CSCA, 2008). V některých případech např. čištění odpadních vod je požadován nízký ζ potenciál, který vyvolá vložkování částic a napomáhá tak procesu čištění (Bumiller, 2012). Hodnota elektrokinetického potenciálu nebývá vyšší než 0,1 V.

Elektrokinetický potenciál je ovlivňován řadou faktorů, např. koncentrací iontů, pH nebo teplotou, proto má každé rozhraní svůj ζ potenciál. Se zvyšující teplotou dochází ke zvýšení hodnoty elektrokinetického potenciálu, protože roste intenzita pohybu iontů a zvyšuje se tloušťka elektrické dvojvrstvy (Bartovská, 2005).

2.2.1 Měření elektrokinetického potenciálu

Měření elektrokinetického potenciálu má důležité uplatnění v celé řadě průmyslových odvětví včetně zpracování keramiky, ve farmaceutickém průmyslu, zpracování nerostných surovin, elektroniky, úpravy vod a studiu nabitých povrchů (Honary, 2013; Malvern, 2017).

- **Technika měření M3-PALS**

Jedná se o kombinaci metody laserové Dopplerovy velocimetrie a fázové analýzy rozptylu světla (Malvern, 2004). Pomocí této metody M3-PALS lze analyzovat vzorky s velmi nízkou pohyblivostí a vypočítat distribuci jejich pohyblivosti (CSCA, 2008).

Technika M3 je složena z měření „Pomalého obrácení pole“ (SFR; z angl. Slow Field Reserval) a „Rychlého obrácení pole“ (FFR; z angl. Fast Field Reserval). Z tohoto důvodu název Měření ve smíšeném režimu. Klasické elektroforetické měření se provádí měřením částic ve stacionární fázi, přesná poloha blízko stěn cely. Měření pomocí metody M3 se provádí uprostřed cely, místo ve stacionární vrstvě. Existuje mnoho důvodů proč měření

provádět uprostřed cely, např. měřicí zóna je dále od stěny cely, a tak se sníží možnost záření z blízkého povrchu. Měření M3 se provádí v následujících krocích:

- Měření rychlého obrácení pole ve středu cely umožňuje přesné stanovení průměru.
- Měření pomalého obrácení pole. Získá lepšího rozlišení, ale hodnoty pohyblivosti jsou posunuté účinkem elektroosmózy.
- Průměrné ζ potenciály vypočítané z měření FFR a SRF jsou odečteny k určení osmotického toku. Použití této hodnoty pro normalizování distribuce pomalého obrácení pole.
- Hodnota pro elektroosmózu se používá pro výpočet ζ potenciálu stěny cely.

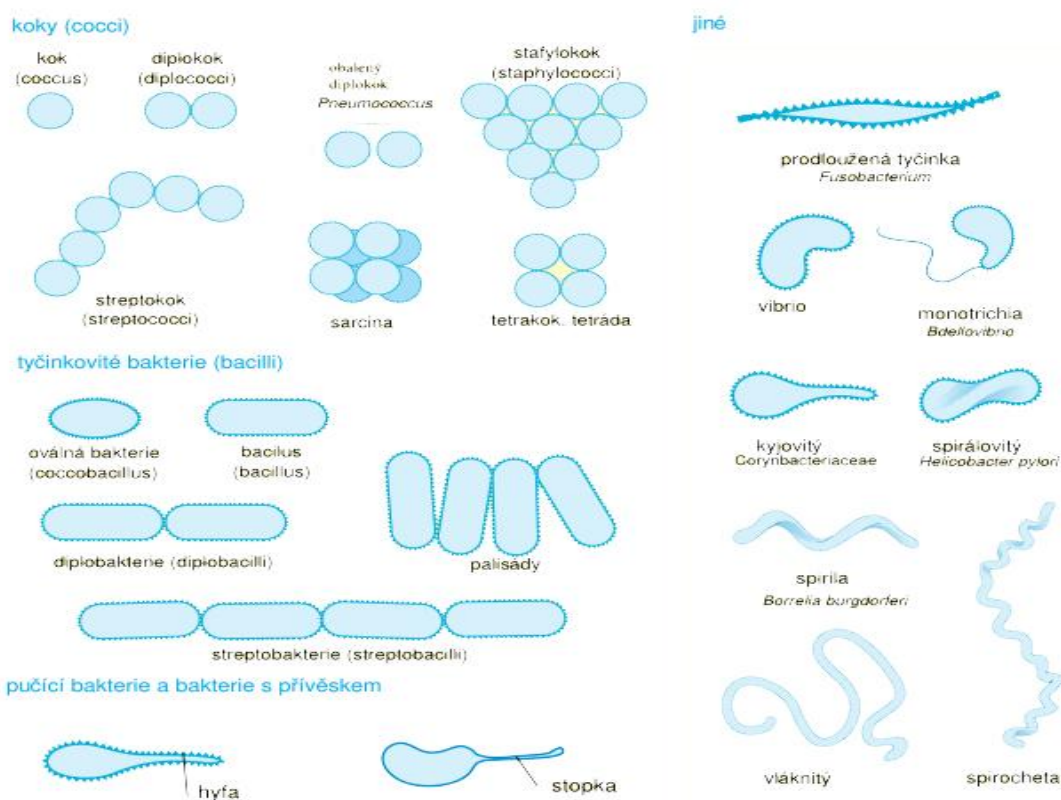
Pomocí M3 je zjednodušeno měření ζ potenciálu. Obsluha nemusí volit jakékoli parametry systému pro měření, protože příslušná nastavení se vypočítají jako součást posloupnosti M3. Snížením počtu proměnných měření dochází k zlepšení opakovatelnosti a přesnosti měření metody.

Fázová analýza rozptylu světla (PALS) zlepšuje měření nízkých pohyblivostí částic a umožňuje měření vzorků s vysokou vodivostí. Tato metoda používá pro měření rychlosti částic fázový posun. Fáze se zachová ve světle rozptýleném pohybujícími se částicemi, ale je posunutá ve fázi v poměru k jejich rychlosti. Tento fázový posun se měří srovnáním fáze světla rozptýleného částicemi s fází referenčního paprsku. Pro oddělení referenčního paprsku z původního laserového paprsku se využívá dělič paprsků. Díky implementaci M3 je elektroosmóza nevýznamná, proto rozdíl mezi dvěma fázemi bude konstantní. Pokud dojde k nějakému pohybu částic tak se tento vztah fází změní. Detekce změny fáze je citlivější na změny pohyblivosti, než tradiční detekce posunu frekvence. Elektroforetická pohyblivost a následně ζ potenciál je stanoven sečtením fázových posunů změřených během části FFR měření (Malvern, 2004).

3 METODY MĚŘENÍ VELIKOSTI MIKROORGANISMŮ

Existuje řada metod a přístrojů, které umožňují měření velikosti mikroorganismů. Běžné metody používané pro měření velikosti bakteriálních buněk jsou mikroskopické metody, disperzní analyzátoři nebo průtokové cytometry. Výsledky velikosti částic se mohou lišit podle použité metody měření (Fuhrman, 1981).

Hlavním rysem bakterií je tvar bakteriálních buněk (obrázek 11) a jejich kolonií. Dle tvaru se rozlišují následující typy: tyčinkovitý (tyčky, tyčinky), větvený (např. mykobakterie), zakřivený (vibrioidní, spirálovité či helikální) nebo kulovitý (koky, diplokoky, tetrakoky). Jen výjimečně je bakterie nesymetrického tvaru. Velikost bakterií se obvykle pohybuje v rozmezí desetin až desítek mikrometrů (Bednář, 1999). Tvar buněk kvasinek je určen rodovou příslušností, ale částečně souvisí i se způsobem vegetativního rozmnožování (pučení) a do jisté míry je ovlivněn i vnějšími podmínkami (složení živného prostředí nebo povrchové napětí). Za základní tvar kvasinek se považuje rotační elipsoid, který má kulatý, podlouhlý až vláknitý tvar (Šašek, 1969).



Obrázek 11 Základní tvary bakterií
Upraveno a převzato z: Mikrobiologie, 2014

Na velikost mikroorganismů má vliv řada faktorů – fixace, barvení, stáří buňky a další. Velikost buňky se proto udává v rozmezí, kde je uvedena minimální a maximální hodnota.

Pro přesnější určení rozměrů buňky a jejich struktur je třeba získat větší počet hodnot (Vytřasová, 2014).

Znalost zjišťovaných parametrů je důležitá, protože vlastnosti částic jako jsou velikost a tvar ovlivňují například u bílkovin jejich rozpustnost, distribuci v těle a nepřímo také technologii jejich výroby. Tyto informace lze využít například v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, pro ochranu životního prostředí nebo ve zdravotnictví (Arzenšek, 2010).

3.1 Dynamický rozptyl světla

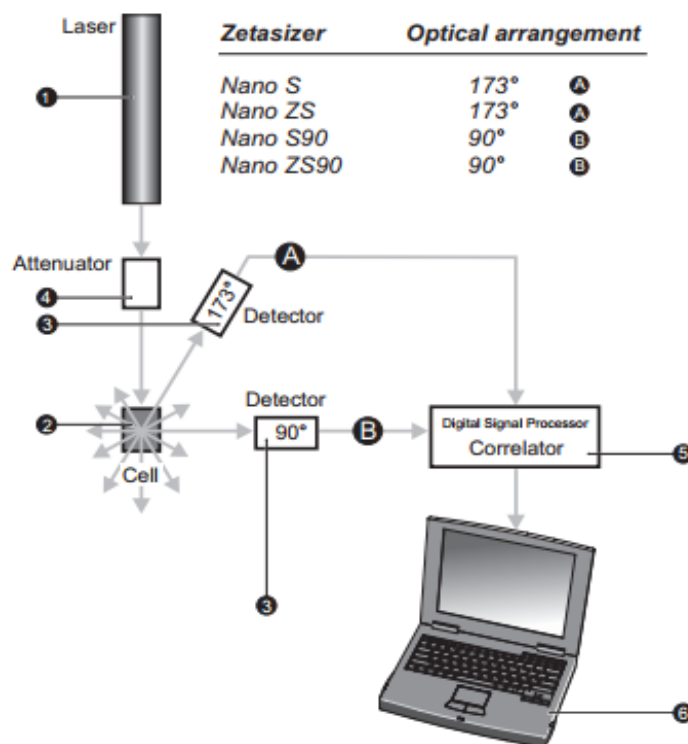
Metoda dynamického rozptylu světla (DLS z anglického Dynamic Light Scattering), nazývaná rovněž jako fotonová korelační spektroskopie (PCS z anglického Photon Correlation Spectroscopy) je fyzikální analytická metoda, která se využívá pro měření velikosti částic. Tato metoda je založena na principu měření intenzity světla rozptýleného molekulami ve vzorku roztoku v průběhu času. Měří se Brownův pohyb ve vzorku, který je na základě vyhodnocení fluktuací rozptýleného světla na pohybujících se částicích spojován s velikostí částic. Podle pohybu částic vůči detektoru se frekvence rozptýleného světla buď zvyšuje, nebo snižuje a vzniká fázový rozdíl mezi rozptýlenými vlnami, které mezi sebou interferují. Rychlost změny intenzity rozptýleného záření přímo závisí na pohybu molekuly (Malvern, 2004).

Faktory ovlivňující rychlost pohybu molekuly jsou teplota, viskozita rozpouštědla a velikost molekuly. Brownův pohyb je závislý na velikosti částic, větší částice se v kapalině pohybují pomalu, naopak čím menší částice, tím je pohyb rychlejší. Při nižší viskozitě rozpouštědla a vyšší teplotě se molekuly pohybují rychleji, naopak pomaleji se molekuly pohybují při nižší teplotě a vyšší viskozitě rozpouštědla (Pecora, 1993; Malvern, 2004). Při konstantní teplotě a rozpouštědlu je změna intenzity rozptýleného světla přímo úměrná velikosti molekuly. Tato veličina je označována jako hydrodynamický poloměr. Aby množství rozptýleného světla bylo konstantní, musí se molekuly v roztoku chovat stacionárně (Pecora, 1993). Rozsah metody je od 0,3 nm do 10 μm , což je obtížné dosáhnout jinými technikami (Arzenšek, 2010).

Metoda DLS je vhodná pro přesné stanovení velikosti nejlépe kulovitých částic. Tato metoda se stala důležitou technikou pro studium vlastností suspenzí a koloidních roztoků, biologických roztoků makromolekul a polymerů. Zajímavé je také její uplatnění ve farmaceutickém průmyslu a v mikrobiologické oblasti pracující s bakteriemi, proteiny, viry a DNA. Jedná se o neinvazivní a nedestruktivní techniku (Arzenšek, 2010).

3.1.1 Měření dynamického rozptylu světla

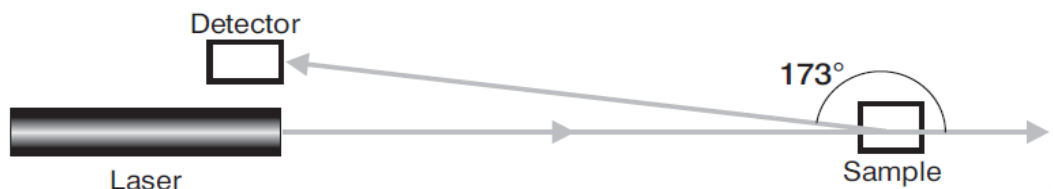
Velikost bakterií lze měřit pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS, který pracuje na principu dynamického rozptylu světla. Jako zdroj světla pro ozáření vzorku uvnitř cely se používá laser. Většina paprsku světla projde vzorkem nezměněna, pouze malá část je rozptýlena částicemi uvnitř vzorku. Částice rozptylují světlo ve všech směrech, proto je teoreticky možné umístit detektor do jakékoli polohy a stále bude měřena intenzita rozptýleného světla. V přístroji Zetasizer Nano (obrázek 12) je detektor umístěn buď v úhlu 173° nebo 90° . Aby detektor mohl intenzitu rozptýleného světla změřit, musí být v určitém rozsahu hodnot. Příliš mnoho světla, může způsobit, přetížení detektoru. Zeslabovač slouží k snížení intenzity laserového paprsku, a tím dochází i ke snížení intenzity rozptýleného světla. Toho se využívá u velmi koncentrovaných vzorků nebo při měření velkých částic. Zeslabovač může fungovat i opačně, tedy že propustí více laserového světla, pokud je to nutné. Například více laserového světla je potřeba při měření velmi malých velikostí částic nebo vzorků o nízké koncentraci, tedy u vzorků, které rozptylují málo světla. Uvnitř přístroje se nachází digitální korelátor, který měří stupeň podobnosti dvou signálů v určité době. V počítači se analyzují data korelátoru, ze kterých se odvodí informace o velikosti měřených částic (Malvern, 2004).



Obrázek 12 Schéma přístroje Zetasizer Nano ZS
1 – laser, 2 – cely, 3 – detektor, 4 – zeslabovač, 5 – korelátor, 6 – počítač
Upraveno a převzato z: Malvern, 2004

3.1.2 Detekční optika 173° - detekce zpětného rozptylu

Detekční optika přístroje je umístěna pod úhlem 173°, tzv. detekce zpětného rozptylu světla. Detekce zpětného rozptylu (obrázek 13) pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS měří informace o rozptylu záření v blízkosti 180° (Malvern, 2004).



Obrázek 13 Měření zpětného rozptylu
Upraveno a převzato z: Malvern, 2004

Při měření zpětného rozptylu nemusí světelný paprsek procházet celým vzorkem, prochází tedy kratší optickou drahou, a proto je možné měřit vzorky o vyšší koncentraci. Při těchto měřeních se eliminuje výskyt mnohonásobného rozptylu světla, což znamená, že rozptýlené světlo na jedné částici je rozptylováno i na dalších částicích. Snížením výskytu mnohonásobného rozptylu světla můžeme měřit koncentrovanější vzorky. Měření zpětného rozptylu je možné snížit efekt prachu neboli kontaminujících látek v disperzním prostředí. Částičky prachu jsou oproti částicím ve vzorku mnohem větší a velké částice rozptylují světlo ve směru primárního paprsku. Použitím pohyblivé čočky lze dosáhnout většího rozsahu koncentrací vzorku. Pro vzorky o nízké koncentraci nebo pro vzorky, které obsahují malé částice je výhodnější větší množství rozptylu ve vzorku, měřící bod je více u středu. Pro více koncentrované vzorky nebo pro velké částice je naopak výhodnější mít měřící bod blíže ke stěně cely, protože tím se sníží efekt mnohonásobného rozptylu (Malvern, 2004).

Výsledky jsou obvykle v přiměřené shodě s výsledky získanými pomocí mikroskopu. Liší se výsledky mohou být způsobeny rozdíly mezi hydrodynamickým poloměrem a skutečným poloměrem nebo změnami ve velikosti částice vznikající při přípravě vzorku (Kvítek, 2006).

3.2 Mikroskopická analýza

Pro určení velikosti částic lze použít mikroskop Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou (obrázek 14), který disponuje širokou řadou možností nastavení a zobrazení preparátů. Jedná se o optický přístroj umožňující rozeznat struktury, které nejsou viditelné pouhým okem. Mikroskop je složen z objektivu a sadou výměnných objektivů pro větší zvětšení

a binokuláru, kterým obraz pozorujeme. Další částí mikroskopu je zdroj světla, polarizátor s analyzátozem a kamera, která přenáší obraz do programu NIS Elements, pomocí kterého lze určit velikost částic (Beyer, 1988; Pawley, 1990). Vyhodnocovat je možné jak živý tak archivovaný obraz. Pomocí světelné mikroskopie lze určit tvar a velikost buněk, zda se jedná o tyčinky nebo koky a určit jejich délku a zakřivení bez zdlouhavého vývoje metody (Newman, 2002).



Obrázek 14 Mikroskop Nikon Eclipse 80i
Upraveno a převzato z: Nikon, 2004

3.2.1 Barvení preparátů

Barvení preparátů slouží ke zjištění typu buněčné stěny, tvaru buněk a uspořádání jejich shluků, přítomnost pouzder a životaschopnosti buněk. Pro určení morfologie buněk a charakteristických shluků používáme jednoduché barvení buněčné stěny, např. krystalovou violetí. Vitální barvení se používá pro určení živých/mrtvých buněk, protože mrtvé buňky přijímají barvivo nebo ho efluxními systémy nevylučují. Diagnostické barvení slouží jako jedna z metod při klasifikaci bakterií. Nejpoužívanější je Gramovo barvení, dále pak acidorezistentní nebo barvení dle Giemsky. Pro přesné určení tvaru a velikosti buněk se používá negativní barvení (Kopecká, 2017; Šilhánková, 1993; Frébortová, 2015).

Před barvením se preparát vždy fixuje (kromě negativního a vitálního barvení). Účelem fixace je usmrcení buněk a jejich lepší přilnutí k podkladu, aby nebyly při barvení či oplachování odplaveny. Bakterie se fixují většinou plamenem, kvasinky a plísně nejčastěji chemikáliemi (Frébortová, 2015).

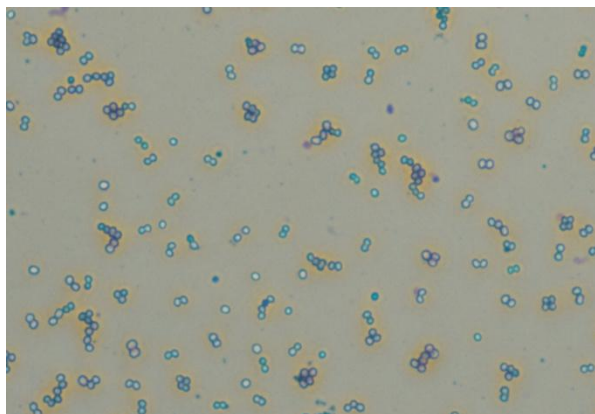
K barvení preparátů se používají zředěné vodné roztoky organických barviv, obvykle soli. Bazická barviva, kde je barevnou složkou kationt např. krystalová violet, safranin, methylenová modř, malachitová zeleň nebo bazický fuchsin. U kyselých barviv je barevnou

složkou aniont, např. eosin. Barvení lze zvýraznit mořením buněk (fenol, anilin nebo Lugolův roztok), kde mořidlo má vyšší afinitu k buňce a zároveň k barvivo než je afinita buňky k samotnému barvivo (Kopecká, 2017; Šilhánková, 1993).

- **Barvení podle Grama**

Gramova metoda, je metoda, která se používá k rozlišení a klasifikaci bakteriálních druhů na dvě velké skupiny. Gram-pozitivní (G^+) bakterie, které se barví modře až fialově (obrázek 15) a gram-negativní (G^-) bakterie, které se barví červeně. Existují i bakterie, které se někdy barví pozitivně a někdy negativně. Tyto mikroorganismy označujeme jako gram-labilní (G^\pm) (Jandová, 1996).

Gram-pozitivní bakterie zadržují primární barvivo (krystalová violet), zatímco gram-negativní bakterie se snadno odbarvují a odbarvené bakterie jsou barveny sekundárním barvivem (safraninem nebo karbofuchsinem). Rozdílné barvení je dáno rozdíly v chemickém složení buněčné stěny. Princip spočívá v tom, že krystalová violet se nejprve váže na buňku a jód reaguje s krystalovou violetí za tvorby komplexu. U gram-negativních buněk odbarvovací činidlo rozpustí vnější lipopolysacharidovou vrstvu a komplex krystalové violeti s jódem se pomocí organického rozpouštědla (etanol nebo aceton) vymyje přes tenkou vrstvu peptidoglykanu. Gramova reakce je nejspolehlivější u mladé kultury (méně než 24 hodin), zatímco starší kultury nemusejí zadržovat primární barvivo a výsledky jsou nepřesné (Frébortová, 2015).



Obrázek 15 *Micrococcus luteus* - Gramovo barvení
Upraveno a převzato z: autor

- **Negativní barvení**

Metoda negativního barvení spočívá v obarvení pozadí, buňky zůstávají nezbarvené, jejich obrysy jsou ohraničeny barvivem (Jandová, 1996). Při běžných metodách barvení

jednotlivé kroky postupu mohou velikost buněk výrazně měnit např. fixace ohněm nebo barvením. Pro obarvení pozadí se používá barvivo Nigrosin nebo Kongo červeň. Buňky poté pozorujeme jako světlé útvary na barevně odlišném pozadí (Frébortová, 2015; Jandová, 1996).

3.3 Akustická spektrometrie

Přístroj DT-1200 Acoustic Spectrometer společnosti Dispersion Technology umožňuje analýzu vysoce koncentrovaných částicových suspenzí bez nutnosti ředění a měřit velikost částic o velikosti 5 nm až 1000 μm (Quantachrome, 2017). Umožňuje přímé měření velikosti částic a elektrokinetického potenciálu. Akustický analyzátor má dva samostatné senzory pro nezávislé měření akustických a elektroakustických signálů (Dukhin, 2000). Akustický senzor charakterizuje distribuci velikosti částic měřením útlumu ultrazvuku o frekvenci od 1 do 100 MHz a rychlosti zvuku. Potřebný objem vzorku pro měření je 120 ml (Dispersion, 2012). Nejčastěji měřenými materiály jsou pigmenty, emulze, keramika, farmaceutika a další (Quantachrome, 2017). Data snímaná z elektroakustického senzoru udávají koloidní vibrační proud, který poskytuje informaci o ζ potenciálu (Dukhin, 2000).

CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši zaměřenou na možnosti stanovení velikosti, s důrazem na stanovení velikosti mikroorganismů. Cílem experimentální části bylo provést na vytipovaných mikroorganismech stanovení jejich velikosti a získané výsledky experimentů vyhodnotit a kriticky zhodnotit.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4 MATERIÁL

4.1 Použité mikroorganismy

Pro měření velikosti bakterií byl použit referenční kmen *Saccharomyces cerevisiae* (komerčně dodávané sušené kvasinky vinné Boletus), *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 siccatus (preparát ENTEROL), *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115, *Micrococcus luteus* CCM 735, *Thiobacillus denitrificans* DSM 12475, *Desulfobacter hydrogenophilus* DSM 3380, *Escherichia coli* CCM 3954, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 z České sbírky mikroorganismů, Brno a sbírkový kmen Univerzity Pardubice *Staphylococcus intermedius*.

4.2 Pomůcky

Odměrné kádinky různých objemů, odměrné válce různých objemů, Erlenmayerovy baňky, stříčky, skleněné zkumavky (15 ml) a gumové špunty, mikropipety (1000 µl), špičky, kyvety, jednorázové očkovací kličky (1 µl a 10 µl), podložní sklíčka, Petriho misky, buničitá vata.

4.3 Chemikálie a reagenty

V tabulce 1 je uveden seznam všech použitých chemikálií a reagentů.

Tabulka 1 Seznam použitých chemikálií

Název	Vzorec	Výrobce
Destilovaná voda	H ₂ O	UPa
Etanol denaturovaný	C ₂ H ₅ OH	Penta
Chlorid draselný, p.a.	KCl	Lach-Ner
Chlorid sodný, p.a.	NaCl	Lach-Ner
Kongo červeň	C ₃₂ H ₂₂ N ₆ O ₆ S ₂ Na ₂	Penta
Krystalová violet	C ₂₅ H ₃₀ N ₃ Cl	Merck
Kyselina chlorovodíková	HCl	Lach-Ner
Lugolův roztok	KI ₃	Merck
Masopeptonový agar		HiMedia
Sabouraud Dextrose Agar		HiMedia
Safranin	C ₁₈ H ₁₂ N _x	Merck

4.4 Přístroje

V tabulce 2 je uveden seznam všech použitých přístrojů a jejich výrobců.

Tabulka 2 Seznam použitých přístrojů

Název	Výrobce
Akustický spektrometr	DT-1200 Acoustic Spectrometer
Analytické váhy	Kern ABJ
Autokláv	System VX-40
Denzitometr DEN-1B	BioSan
Digestoř	Merci
Horkovzdušný sterilizátor	Memmert
Lednice	Electrolux
Magnetické míchačka s ohřevem	IKA RH Digital
Mikroskop	Nikon Eclipse 80i s dig. kamerou DSFI-1
Předvážky	Kern 440-49N
Termostat	Memmert
ZetaPALS	Brookhaven
Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments

5 PRACOVNÍ POSTUPY

5.1 Příprava kultivačního média

5.1.1 Masopeptonový agar

Dle pokynů výrobce (tabulka 3) bylo naváženo 40 g přípravku do 1 litru destilované vody. Směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a následně byla nalita do sterilních plastových Petriho misek o tloušťce pohybující se mezi 3 – 4 mm. Takto připravené půdy byly uchovávány v chladničce při teplotě 5 °C.

Tabulka 3 Složení Masopeptonového agaru

Složení	Gram/litr
Masový pepton	10,0
Hovězí extrakt	5,0
Chlorid sodný	5,0
Agar	20,0
Konečné pH (při 25 °C 7,2 ± 0,2)	

5.1.2 Sabouraud Dextrose Agar

Dle pokynů výrobce (tabulka 4) bylo naváženo 65 g přípravku do 1 litru destilované vody. Směs byla zahřívána do úplného rozpuštění. Poté směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a byla nalita do sterilních plastových Petriho misek. Takto připravené půdy byly uchovávány v chladničce při teplotě 5 °C.

Tabulka 4 Složení Sabouraud Dextrose Agaru

Složení	Gram/litr
Mykologický pepton	10,0
Dextrosa	40,0
Agar	15,0
Konečné pH (při 25 °C 5,6 ± 0,2)	

5.2 Příprava bakteriální kultury

Bakteriální kultura byla připravena oživením dlouhodobě skladované kultury v kryozkumavkách a byla inkubována 24 hodin při 30 °C, poté byla přeočkována na nové

médium a opět inkubována 24 hodin při 30 °C. Po inkubaci byly kultury uloženy do chladničky při teplotě 5 °C pro pozdější manipulaci.

5.3 Příprava vzorku

Kolonie mikroorganismů z Petriho misky byly přeneseny sterilní kličkou do tekutého kultivačního média, tak aby bylo dosaženo zákalu 0,1 McFarland. Takto připravený vzorek byl inkubován 24 hodin při teplotě 30 °C. Poté bylo odebráno 500 µl ze vzorku do 12 ml destilované vody, roztoku KCl a do fyziologického roztoku. Takto připravenými vzorky byly naplněny květy, které byly následně vloženy do přístroje k proměření.

5.4 Příprava fyziologického roztoku

Bylo připraveno 0,5 litru fyziologického roztoku pro ředění mikrobiální kultury. Do 0,5 l destilované vody bylo přidáno 4,5 g NaCl. Roztok byl sterilizován při 121 °C po dobu 15 minut.

5.5 Příprava roztoku KCl

Byl připraven 1 litr roztoku KCl pro ředění mikrobiální kultury. Do 1 litru destilované vody bylo přidáno 0,075 g KCl.

5.6 Příprava zásobní kultury kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*

Obsah sáčku 0,6 g (komerčně dodávané sušené kvasinky vinné Boletus) byl vysypán do 2 l odměrné Erlenmayerovy baňky. Poté bylo do Erlenmayerovy baňky přidáno 1,6 g živné soli pro kvasinky (komerčně dodávaná Vínka Živná sůl pro kvasinky). Dále byly přidány 2 l převařené vychladlé vody. Následně bylo přidáno $28 \pm 0,5$ g cukru krystal. Víčkem zakrytá Erlenmayerova baňka (zamezení před kontaminací) se zásobní kulturou byla vložena na magnetické míchadlo, aby bylo docíleno úplné homogenizace. Zásobní kultura byla zahřívána na 30 °C a inkubována 48 hodin při laboratorní teplotě 27 ± 2 °C.

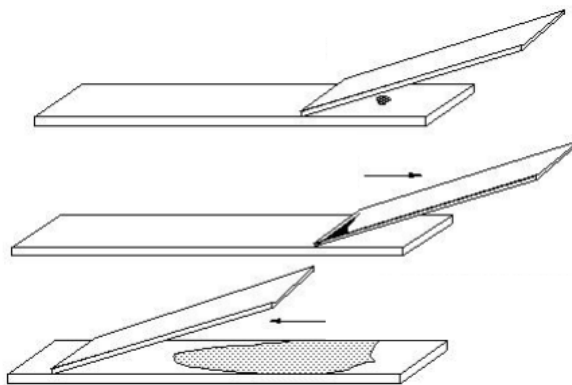
5.7 Barvení dle Grama

Na podložním sklíčku byla v kapce fyziologického roztoku rozetřena bakteriální kultura. Po zaschnutí byla provedena fixace ohněm. Bylo provedeno barvení krystalovou violetí po dobu 60 s. Barvivo bylo slito a preparát byl překryt Lugolovým roztokem po dobu 20 s a opláchnut destilovanou vodou po dobu 5 s. Poté byl použit dekolorizující roztok 20 s. Preparát byl dobarven safraninem po dobu 1 minuty a opláchnut destilovanou vodou po dobu

5 s. Takto připravený preparát byl pozorován pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i v režimu fázového kontrastu při celkovém zvětšení 1000x s imerzí.

5.8 Negativní barvení bakterií

Buňky byly asepticky přeneseny do kapky Kongo červeně na podložním sklíčku, ve kterém byla bakteriální kultura dostatečně rozmíchána. Kapka byla rozetřena jemným tahem druhého sklíčka (obrázek 16) přiloženého pod úhlem 45° po celé ploše podložního sklíčka. Vzorek byl nechán zaschnout na vzduchu a poté byl odbarven z červené na modrou barvu parami koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Takto připravený preparát byl pozorován pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i ve světlém poli při celkovém zvětšení 1000x s imerzí. V každém vzorku bylo změřeno 20 hodnot, ze kterých byla vypočítána průměrná hodnota velikosti buňky.



Obrázek 16 Roztírání barviva při negativním barvení
Upraveno a převzato z: UPa, 2014

5.9 Měření pomocí přístroje ZetaPALS

Nejprve byla měřena velikost částic. Kyveta byla naplněna po rysku připraveným vzorkem bakterií, uzavřena víčkem, vložena do přístroje a bylo provedeno měření. Každé měření velikosti bakterií proběhlo v deseti cyklech a bylo provedeno 2x. Z naměřených hodnot byly vypočítány průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.

Před měřením ζ potenciálu byla připraveným vzorkem bakterií opláchnuta elektroda. Kyveta byla naplněna do poloviny svého objemu a poté byla elektroda vsunuta do kyvety, tak aby na ní nebyly bublinky vzduchu. Kyveta byla vložena do přístroje a byla zapojena měřicí elektroda. V programu přístroje byly zadány identifikační veličiny a bylo spuštěno měření. Každé měření ζ potenciálu proběhlo v deseti cyklech a bylo provedeno 2x. Ze získaných hodnot byly vypočítány průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.

5.10 Měření pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS

Pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS společnosti Malvern Instruments byla nejprve měřena velikost mikroorganismů. Kyveta byla naplněna měřeným vzorkem po rysku, uzavřena víčkem, vložena do přístroje a bylo provedeno měření. Přístroj Zetasizer Nano ZS provedl před samotným měřením temperaci vzorku po dobu 60 vteřin na teplotu 25 °C. Každé měření velikosti proběhlo v deseti cyklech a bylo provedeno 2x. Ze získaných hodnot byly vypočítány průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.

Před měřením ζ potenciálu byla elektroda opláchnuta připraveným vzorkem. Kyveta byla naplněna měřeným roztokem do poloviny svého objemu a poté byla elektroda vsunuta do kyvety, tak aby na ní nebyly bublinky vzduchu. Kyveta společně s elektrodou byla vložena do přístroje. V programu přístroje byly zadány identifikační veličiny a bylo spuštěno měření. Každé měření ζ potenciálu proběhlo v deseti cyklech a bylo provedeno 2x. Ze získaných hodnot byly vypočítány průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.

5.11 Měření pomocí přístroje DT-1200

Měřicí cela byla naplněna připraveným vzorkem bakterií o objemu 120 ml. V programu přístroje byly nastaveny potřebné identifikační veličiny. Bylo uvedeno míchadlo do chodu a bylo zahájeno měření velikosti bakterií a následně měření ζ potenciálu. Měření každého vzorku bylo provedeno 2x ze kterých byly vypočítány průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této kapitole je pozornost věnována výsledkům měření velikosti mikroorganismů a výsledkům měření elektrokinetického potenciálu různými typy přístrojů a jejich vzájemné porovnání.

6.1 Měření velikosti *Pseudomonas fluorescens*

Pro měření velikosti bakterie *Pseudomonas fluorescens* (tabulka 5) byly použity dva přístroje pracující na principu dynamického rozptylu světla (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS), jeden elektroakustický přístroj (elektroakustický spektrometr DT-1200) a mikroskop (Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou). Postupy a principy měření byly popsány v kapitolách 3. 1. 1, 3. 3, 5. 8, 5. 9, 5. 10 a 5. 11. Dle literatury je bakterie *Pseudomonas fluorescens* tyčinka a její velikost je 0,5 – 1,0 x 1,5 – 5,0 μm (Savická, 2018).

Tabulka 5 Měření velikosti *Pseudomonas fluorescens*

<i>Pseudomonas fluorescens</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
Velikost Zetasizer Nano ZS [μm]	1,6 \pm 0,4	1,9 \pm 0,5	1,8 \pm 0,3
Velikost ZetaPALS [μm]	0,9 \pm 0,01	1,0 \pm 0,05	1,0 \pm 0,06
Velikost DT-1200 [μm]	1,2 \pm 0,04	1,1 \pm 0,08	1,1 \pm 0,06

Z výsledků měření velikosti *Pseudomonas fluorescens* vyplývá, že naměřené hodnoty pomocí přístrojů Zetasizer Nano ZS, ZetaPALS a DT – 1200 jsou v rozsahu velikostí, které pro *Pseudomonas fluorescens* uvádí literatura (Savická, 2018). Nejnižší hodnoty velikosti byly u všech tří použitých médií naměřeny na přístroji ZetaPALS, naopak nejvyšší na přístroji Zetasizer Nano ZS. Přestože oba tyto přístroje měří velikost částic na principu DLS, jsou si daleko bližší výsledky naměřené na přístrojích ZetaPALS a DT – 1200, než právě na přístrojích ZetaPALS a Zetasizer Nano ZS. Výhodou měření založeného na principu DLS je, že není potřeba znát údaje o měřených částicích, resp. mikroorganismech. Oproti tomu u elektroakustického spektrometru DT – 1200 je potřeba parametry týkající se měřených částic zadat, což u neznámých vzorků a vzorků mikroorganismů nese značné komplikace. Většinou jsou pak zadané parametry (např. hustota aj.) pouhým odhadem, což následně vnáší do měření značné nepřesnosti. Nevýhodou je také fakt, že přístroj je primárně určen pro stanovování velikosti částic a ζ potenciálu koncentrovaných disperzí (cca 5 – 60 hm %) a pro

vzorky s nízkou koncentrací mikroorganismů (částic) není příliš vhodný. Tento aspekt se projevil u dále zmiňovaných mikroorganismů. Vy výsledkové části práce je tato technika uvedena pouze u dvou měřených mikroorganismů (*Pseudomonas fluorescens* a *Desulfobacter hydrogenophilus*). U dalších bylo dosaženo tak nereálných výsledků, že bylo od použití elektroakustického spektrometru DT – 1200 upuštěno.



Obrázek 17 Negativní barvení *Pseudomonas fluorescens*

Měření velikosti *Pseudomonas fluorescens* (obrázek 17) bylo provedeno pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou. Z výsledků měření vyplývá, že výsledná velikost bakterie *Pseudomonas fluorescens* pomocí mikroskopu je $0,4 \pm 0,3 \times 1,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$, což se shoduje s hodnotami získanými z literatury (Savická, 2018). Dále má v porovnání s optickými a elektroakustickými metodami tu výhodu, že jsme schopni určit také tvar daného mikroorganismu, což předchozí techniky neumožňují a pro výpočet velikosti předpokládají kulový tvar měřených objektů.

6.2 Měření ζ potenciálu *Pseudomonas fluorescens*

Pro měření ζ potenciálu bakterie *Pseudomonas fluorescens* (tabulka 6) byly použity dva přístroje pracující na principu Dopplerova posunu frekvence laserového paprsku (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS). Elektroakustický spektrometr DT – 1200, který také umožňuje měření zeta potenciálu se pro měření mikroorganismů ukázal jako zcela nevhodný a nebylo dosaženo žádných relevantních výsledků. Proto bylo následně od použití tohoto přístroje zcela upuštěno. Principy a postupy měření byly popsány v kapitolách 2. 2. 1, 5. 9 a 5. 10.

Tabulka 6 Měření ζ potenciálu *Pseudomonas fluorescens*

<i>Pseudomonas fluorescens</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
ζ potenciál Zetasizer Nano ZS [mV]	$-14,2 \pm 1,6$	$-14,8 \pm 2,2$	$-7,6 \pm 2,9$
ζ potenciál ZetaPALS [mV]	$-19,9 \pm 2,8$	$-17,3 \pm 3,6$	$-7,0 \pm 2,5$

Naměřený ζ potenciál bakterie *Pseudomonas fluorescens* dosahuje záporných hodnot, z čehož vyplývá, že je její povrch záporně nabitý. Obecně se za hranici stability koloidního systému považují hodnoty ζ potenciálu, které nabývají absolutní hodnoty vyšší než 30 mV. Jako bod nejvyšší nestability je považována nulová hodnota ζ potenciálu, tedy izoelektrický bod. Z výsledků měření vyplývá, že koloidní roztok bakterie *Pseudomonas fluorescens* je nejméně stabilní ve fyziologickém roztoku, nicméně na základě obecného pravidla stability lze konstatovat, že stabilní nebyl ani jeden z měřených vzorků.

6.3 Měření velikosti *Desulfobacter hydrogenophilus*

Pro měření velikosti bakterie *Desulfobacter hydrogenophilus* (tabulka 7) byly použity dva přístroje pracující na principu dynamického rozptylu světla (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS) a jeden elektroakustický přístroj (elektroakustický spektrometr DT-1200). Postupy a principy měření byly popsány v kapitolách 3. 1. 1, 3. 3, 5. 9, 5. 10 a 5. 11. Dle literatury je bakterie *Desulfobacter hydrogenophilus* tyčinka a její velikost je $1 - 1,3 \times 2 - 3 \mu\text{m}$ (Widdel, 1987).

Tabulka 7 Měření velikosti *Desulfobacter hydrogenophilus*

<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
Velikost Zetasizer Nano ZS [μm]	$3,4 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,8$
Velikost ZetaPALS [μm]	$2,8 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,8$	$2,4 \pm 0,4$
Velikost DT-1200 [μm]	$2,3 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,06$	$1,8 \pm 0,1$

Z výsledků měření velikosti *Desulfobacter hydrogenophilus* vyplývá, že naměřené hodnoty pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS jsou opět vyšší než u zbylých dvou přístrojů a že jsou dokonce i mimo rozsah velikosti, kterou udává pro tuto bakterii literatura. Naměřené hodnoty pomocí přístroje ZetaPALS a DT – 1200 se shodují s hodnotami získanými

z literatury (Widdel, 1987). Mikroskopická analýza bakterie nebyla provedena, jelikož *Desulfobacter hydrogenophilus* na MPA neprokazoval žádný viditelný výsledek růstu a nebylo tedy možné vyhotovit jeho mikroskopický preparát. *Desulfobacter hydrogenophilus* roste v modifikovaném Van Houten médiu, ze kterého se nepodařilo vyhotovit snímek.

6.4 Měření ζ potenciálu *Desulfobacter hydrogenophilus*

Pro měření ζ potenciálu bakterie *Desulfobacter hydrogenophilus* (tabulka 8) byly použity dva přístroje pracující na principu Dopplerova posunu frekvence laserového paprsku (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS). Principy a postupy měření byly popsány v kapitolách 2. 2. 1, 5. 9 a 5. 10.

Tabulka 8 Měření ζ potenciálu *Desulfobacter hydrogenophilus*

<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
ζ potenciál Zetasizer Nano ZS [mV]	$-29,1 \pm 2,2$	$-28,7 \pm 2,4$	$-27,4 \pm 2,5$
ζ potenciál ZetaPALS [mV]	$-35,3 \pm 2,2$	$-34,0 \pm 2,8$	$-24,3 \pm 3,7$

Naměřený ζ potenciál bakterie *Desulfobacter hydrogenophilus* dosahuje záporných hodnot, z čehož vyplývá, že je její povrch záporně nabitý. Z výsledků měření vyplývá, že koloidní roztok bakterie *Desulfobacter hydrogenophilus* je stabilní téměř ve všech testovaných prostředích. Výsledky dále opět ukazují na rozdíl v hodnotách stanovených na přístroji Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS s tím, že přístroj ZetaPALS vykazuje ve všech případech vyšší absolutní hodnotu zeta potenciálu.

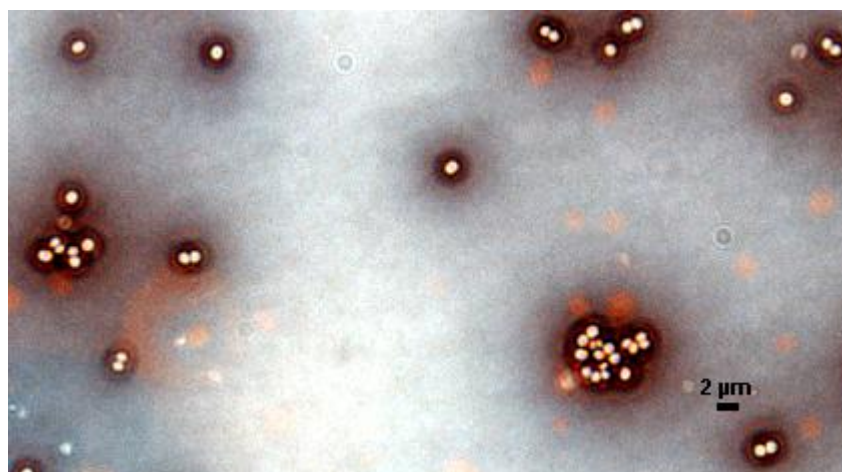
6.5 Měření velikosti *Micrococcus luteus*

Pro měření velikosti bakterie *Micrococcus luteus* (tabulka 9) byly použity dva přístroje pracující na principu dynamického rozptylu světla (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS) a mikroskop (Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou). Postupy a principy měření byly popsány v kapitolách 3. 1. 1, 5. 8, 5. 9, a 5. 10. Dle literatury jsou bakterie *Micrococcus luteus* koky a jejich velikost je 0,9 – 1,8 μm (Savická, 2018).

Tabulka 9 Měření velikosti *Micrococcus luteus*

<i>Micrococcus luteus</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
Velikost Zetasizer Nano ZS [μm]	$2,9 \pm 0,1$	$3,8 \pm 1,0$	$2,8 \pm 0,4$
Velikost ZetaPALS [μm]	$1,2 \pm 0,09$	$1,3 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$

Z výsledků měření velikosti *Micrococcus luteus* vyplývá, že naměřené hodnoty pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS se liší v porovnání s hodnotami získanými z literatury. Výsledky naměřené pomocí přístroje ZetaPALS se s hodnotami nalezenými v literatuře shodují (Savická, 2018).



Obrázek 18 Negativní barvení *Micrococcus luteus*

Měření velikosti *Micrococcus luteus* (obrázek 18) bylo provedeno pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou. Na mikroskopickém snímku jsou zobrazeny světlé koky bakterie *Micrococcus luteus* a červené skvrny (zbytky barviva Kongo červeně). Z výsledků měření vyplývá, že výsledná velikost bakterie *Micrococcus luteus* pomocí mikroskopu je $1,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$, což se shoduje s hodnotami získanými z literatury (Savická, 2018). Na mikroskopickém snímku jsou také patrné shluky bakterií. Porovnáme-li toto zjištění s hodnotami a směrodatnými odchylkami výsledků obou optických přístrojů, pak lze vyslovit úvahu, že zatímco přístroj ZetaPALS měřil pravděpodobně velikost samotných bakterií, u přístroje Zetasizer Nano ZS byly detekovány i shluky bakterií, což vedlo jak k navýšení velikosti, tak směrodatné odchylky. Tento rozdíl ve výsledcích může být způsoben rozdílným způsobem detekce rozptýleného světla. Zatímco u přístroje Zetasizer Nano ZS je detektor umístěn pod úhlem 173° , u přístroje ZetaPALS je detektor umístěn pod úhlem 90° .

6.6 Měření ζ potenciálu *Micrococcus luteus*

Pro měření ζ potenciálu bakterie *Micrococcus luteus* (tabulka 10) byly použity dva přístroje pracující na principu Dopplerova posunu frekvence laserového paprsku (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS). Principy a postupy měření byly popsány v kapitolách 2. 2. 1, 5. 9 a 5. 10.

Tabulka 10 Měření ζ potenciálu *Micrococcus luteus*

<i>Micrococcus luteus</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
ζ potenciál Zetasizer Nano ZS [mV]	$-27,2 \pm 1,3$	$-26,9 \pm 1,0$	$-12,3 \pm 0,6$
ζ potenciál ZetaPALS [mV]	$-34,7 \pm 1,8$	$-29,3 \pm 0,9$	$-8,7 \pm 1,6$

Naměřený ζ potenciál bakterie *Micrococcus luteus* dosahuje opět záporných hodnot, z čehož vyplývá, že je její povrch záporně nabitý. Z výsledků měření vyplývá, že koloidní roztok bakterie *Micrococcus luteus* je stabilní v destilované vodě a v roztoku KCl. Nejméně stabilní je ve fyziologickém roztoku.

6.7 Měření velikosti *Thiobacillus denitrificans*

Pro měření velikosti bakterie *Thiobacillus denitrificans* (tabulka 11) byly použity dva přístroje pracující na principu dynamického rozptylu světla (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS). Postupy a principy měření byly popsány v kapitolách 3. 1. 1, 5. 9, a 5. 10. Dle literatury je bakterie *Thiobacillus denitrificans* tyčinka a její velikost je $0,5 \times 1,0 - 3,0 \mu\text{m}$ (Beller, 2006).

Tabulka 11 Měření velikosti *Thiobacillus denitrificans*

<i>Thiobacillus denitrificans</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
Velikost Zetasizer Nano ZS [μm]	$3,3 \pm 1,5$	$4,1 \pm 2,6$	$3,6 \pm 2,3$
Velikost ZetaPALS [μm]	$2,3 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,2$

Z výsledků měření velikosti *Thiobacillus denitrificans* vyplývá, že naměřené hodnoty pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS se mírně liší v porovnání s hodnotami získanými z literatury (Beller, 2006). *Thiobacillus denitrificans* na MPA neprokazoval žádný viditelný výsledek růstu. Tato bakterie roste v médiu S8, ze kterého se nepodařilo vyhotovit mikroskopický snímek.

6.8 Měření ζ potenciálu *Thiobacillus denitrificans*

Pro měření ζ potenciálu bakterie *Thiobacillus denitrificans* (tabulka 12) byly použity dva přístroje pracující na principu Dopplerova posunu frekvence laserového paprsku (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS). Principy a postupy měření byly popsány v kapitolách 2. 2. 1, 5. 9 a 5. 10.

Tabulka 12 Měření ζ potenciálu *Thiobacillus denitrificans*

<i>Thiobacillus denitrificans</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
ζ potenciál Zetasizer Nano ZS [mV]	$-32,7 \pm 4,3$	$-35,2 \pm 7,4$	$-32,8 \pm 4,5$
ζ potenciál ZetaPALS [mV]	$-26,8 \pm 2,9$	$-28,7 \pm 3,0$	$-17,4 \pm 3,4$

Naměřený ζ potenciál bakterie *Thiobacillus denitrificans* dosahuje záporných hodnot, z čehož vyplývá, že je její povrch záporně nabitý. Z výsledků měření vyplývá, že koloidní roztok bakterie *Thiobacillus denitrificans* je velmi stabilní v destilované vodě a v roztoku KCl. Oproti dřívějším měřením v případě bakterie *Thiobacillus denitrificans* byly absolutní hodnoty ζ potenciálu naměřené na přístroji Zetasizer Nano ZS vyšší, než hodnoty z přístroje ZetaPALS.

6.9 Měření velikosti *Staphylococcus epidermidis*

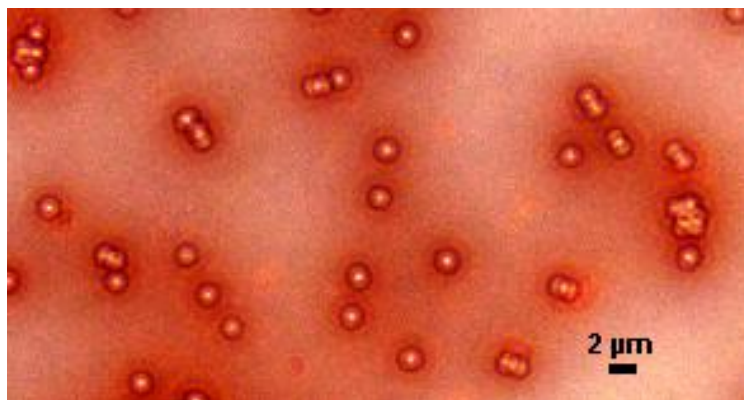
Pro měření velikosti bakterie *Staphylococcus epidermidis* (tabulka 13) byly použity dva přístroje pracující na principu dynamického rozptylu světla (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS) a mikroskop (Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou). Postupy a principy měření byly popsány v kapitolách 3. 1. 1, 5. 8, 5. 9, a 5. 10. Dle literatury je bakterie *Staphylococcus epidermidis* kok a jeho velikost je 0,5 – 1,5 μm (Savická, 2018).

Tabulka 13 Měření velikosti *Staphylococcus epidermidis*

<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
Velikost Zetasizer Nano ZS [μm]	$2,1 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,03$
Velikost ZetaPALS [μm]	$0,9 \pm 0,07$	$1,0 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$

Z výsledků měření velikosti *Staphylococcus epidermidis* vyplývá, že naměřené hodnoty pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS se opět liší v porovnání s hodnotami získanými

z literatury. Naměřené hodnoty pomocí přístroje ZetaPALS se shodují s hodnotami získanými z literatury (Savická, 2018).



Obrázek 19 Negativní barvení *Staphylococcus epidermidis*

Měření velikosti *Staphylococcus epidermidis* (obrázek 19) bylo provedeno pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou. Z výsledků měření vyplývá, že výsledná velikost bakterie *Staphylococcus epidermidis* pomocí mikroskopu je $1,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$, což se shoduje s hodnotami získanými z literatury (Savická, 2018).

6.10 Měření ζ potenciálu *Staphylococcus epidermidis*

Pro měření ζ potenciálu bakterie *Staphylococcus epidermidis* (tabulka 14) byly použity dva přístroje pracující na principu Dopplerova posunu frekvence laserového paprsku (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS). Principy a postupy měření byly popsány v kapitolách 2. 2. 1, 5. 9 a 5. 10.

Tabulka 14 Měření ζ potenciálu *Staphylococcus epidermidis*

<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
ζ potenciál Zetasizer Nano ZS [mV]	$-38,8 \pm 0,9$	$37,8 \pm 0,2$	$-22,0 \pm 0,3$
ζ potenciál ZetaPALS [mV]	$-42,3 \pm 1,5$	$-39,6 \pm 2,9$	$-13,2 \pm 2,0$

Naměřený ζ potenciál bakterie *Staphylococcus epidermidis* dosahuje záporných hodnot, z čehož vyplývá, že je její povrch záporně nabitý. Z výsledků měření vyplývá, že koloidní roztok bakterie *Staphylococcus epidermidis* je velmi stabilní v destilované vodě a v roztoku KCl. Méně stabilní je ve fyziologickém roztoku.

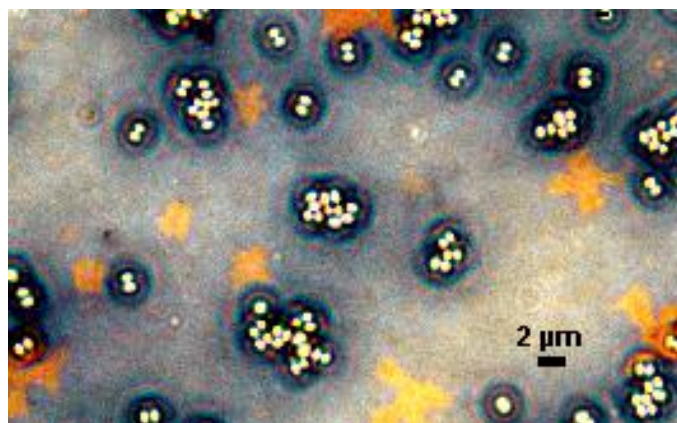
6.11 Měření velikosti *Staphylococcus intermedius*

Pro měření velikosti bakterie *Staphylococcus intermedius* (tabulka 15) byly použity dva přístroje pracující na principu dynamického rozptylu světla (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS) a mikroskop (Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou). Postupy a principy měření byly popsány v kapitolách 3. 1. 1, 5. 8, 5. 9, a 5. 10. Dle literatury je bakterie *Staphylococcus intermedius* kok a jeho velikost je 0,5 – 1,5 μm (VetBact, 2015).

Tabulka 15 Měření velikosti *Staphylococcus intermedius*

<i>Staphylococcus intermedius</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
Velikost Zetasizer Nano ZS [μm]	1,5 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2	1,4 \pm 0,07
Velikost ZetaPALS [μm]	0,9 \pm 0,08	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,03

Z výsledků měření velikosti *Staphylococcus intermedius* vyplývá, že naměřené hodnoty pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS jsou mírně vyšší v roztoku KCl v porovnání s hodnotami získanými z literatury. Naměřené hodnoty pomocí přístroje ZetaPALS se s hodnotami získanými z literatury shodují (VetBact, 2015).



Obrázek 20 Negativní barvení *Staphylococcus intermedius*

Měření velikosti *Staphylococcus intermedius* (obrázek 20) bylo provedeno pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou. Na mikroskopickém snímku jsou zobrazeny koky *Staphylococcus intermedius* a zbytky barviva (žluté skvrny). Z výsledků měření vyplývá, že výsledná velikost bakterie *Staphylococcus intermedius* pomocí mikroskopu je 1,1 \pm 0,2 μm , což se shoduje s hodnotami získanými z literatury (VetBact, 2015). Na snímku jsou opět patrné shluky jednotlivých bakterií, které patrně mají

za následek vyšší hodnotu směrodatné odchylky u výsledků velikosti částic z přístroje Zetasizer Nano ZS.

6.12 Měření ζ potenciálu *Staphylococcus intermedius*

Pro měření ζ potenciálu bakterie *Staphylococcus intermedius* (tabulka 16) byly použity dva přístroje pracující na principu Dopplerova posunu frekvence laserového paprsku (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS). Principy a postupy měření byly popsány v kapitolách 2. 2. 1, 5. 9 a 5. 10.

Tabulka 16 Měření ζ potenciálu *Staphylococcus intermedius*

<i>Staphylococcus intermedius</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
ζ potenciál Zetasizer Nano ZS [mV]	$-35,0 \pm 0,8$	$-32,7 \pm 0,8$	$-19,8 \pm 0,7$
ζ potenciál ZetaPALS [mV]	$-40,6 \pm 3,4$	$-38,8 \pm 6,0$	$-12,1 \pm 1,3$

Naměřený ζ potenciál bakterie *Staphylococcus intermedius* dosahuje záporných hodnot, z čehož vyplývá, že je její povrch záporně nabitý. Z výsledků měření vyplývá, že koloidní roztok bakterie *Staphylococcus intermedius* je velmi stabilní v destilované vodě a v roztoku KCl. Jako nejméně stabilní je tento mikroorganismus opět ve fyziologickém roztoku.

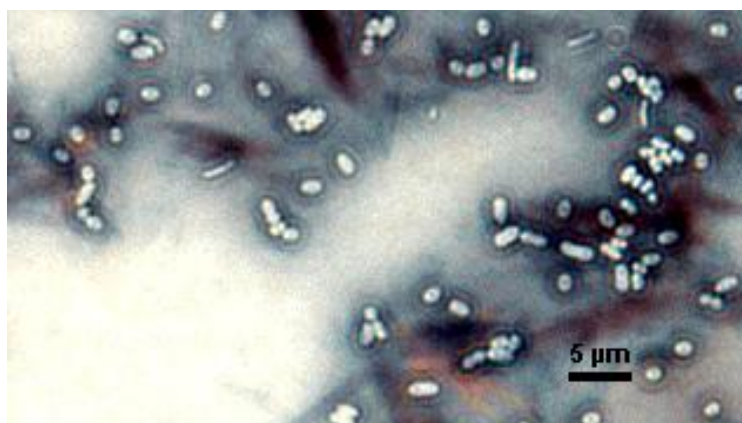
6.13 Měření velikosti *Escherichia coli*

Pro měření velikosti bakterie *Escherichia coli* (tabulka 17) byly použity dva přístroje pracující na principu dynamického rozptylu světla (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS) a mikroskop (Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou). Postupy a principy měření byly popsány v kapitolách 3. 1. 1, 5. 8, 5. 9, a 5. 10. Dle literatury je bakterie *Escherichia coli* tyčka a její velikost je $1,1 - 1,5 \times 2 - 6 \mu\text{m}$ (Savická, 2018).

Tabulka 17 Měření velikosti *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
Velikost Zetasizer Nano ZS [μm]	$1,5 \pm 0,8$	$1,6 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,3$
Velikost ZetaPALS [μm]	$1,0 \pm 0,06$	$1,0 \pm 0,08$	$0,9 \pm 0,04$

Z výsledků měření velikosti *Escherichia coli* vyplývá, že naměřené hodnoty pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS a přístroje ZetaPALS odpovídají rozsahu velikostí, který je uváděn v literatuře. Byť v tomto případě také hodnoty naměřené na přístroji Zetasizer Nano ZS odpovídají hodnotám v literatuře, opět v porovnání s druhým přístrojem vidíme významně vyšší směrodatné odchytky měření (Savická, 2018).



Obrázek 21 Negativní barvení *Escherichia coli*

Měření velikosti *Escherichia coli* (obrázek 21) bylo provedeno pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou. Z výsledků měření vyplývá, že výsledná velikost bakterie *Escherichia coli* pomocí mikroskopu je $2,2 \pm 0,5 \times 1,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$, což se shoduje s hodnotami získanými z literatury (Savická, 2018).

6.14 Měření ζ potenciálu *Escherichia coli*

Pro měření ζ potenciálu bakterie *Escherichia coli* (tabulka 18) byly použity dva přístroje pracující na principu Dopplerova posunu frekvence laserového paprsku (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS). Principy a postupy měření byly popsány v kapitolách 2. 2. 1, 5. 9 a 5. 10.

Tabulka 18 Měření ζ potenciálu *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
ζ potenciál Zetasizer Nano ZS [mV]	$-42,4 \pm 2,2$	$-42,1 \pm 2,7$	$-13,4 \pm 0,5$
ζ potenciál ZetaPALS [mV]	$-48,2 \pm 2,0$	$-42,6 \pm 3,8$	$-11,6 \pm 2,7$

Naměřený ζ potenciál bakterie *Escherichia coli* dosahuje záporných hodnot, z čehož vyplývá, že je její povrch záporně nabitý. Z výsledků měření vyplývá, že koloidní roztok bakterie *Escherichia coli* je nejstabilnější v destilované vodě a nejméně stabilní

ve fyziologickém roztoku. Hodnoty z obou přístrojů jsou srovnatelné, můžeme také pozorovat, že hodnoty v KCl jsou velmi blízké hodnotám zeta potenciálů v destilované vodě.

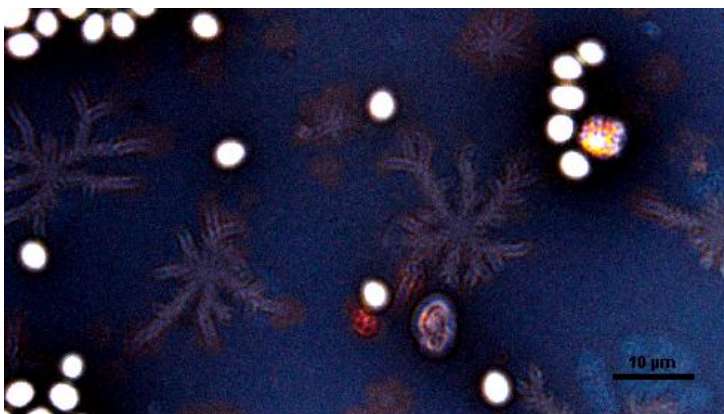
6.15 Měření velikosti *Saccharomyces cerevisiae*

Pro měření velikosti kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (tabulka 19) byly použity dva přístroje pracující na principu dynamického rozptylu světla (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS) a mikroskop (Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou). Postupy a principy měření byly popsány v kapitolách 3. 1. 1, 5. 8, 5. 9, a 5. 10. Dle literatury je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* elipsoidní buňka o velikosti 3,7 – 9,7 x 2,6 – 6,4 μm (Savická, 2018).

Tabulka 19 Měření velikosti *Saccharomyces cerevisiae*

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
Velikost Zetasizer Nano ZS [μm]	21,7 \pm 6,2	21,5 \pm 9,4	23,7 \pm 8,8
Velikost ZetaPALS [μm]	3,3 \pm 0,9	2,9 \pm 0,8	2,8 \pm 0,3

Z výsledků měření velikosti *Saccharomyces cerevisiae* vyplývá, že naměřené hodnoty pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS se výrazně liší v porovnání s hodnotami získanými z literatury, lze tedy konstatovat, že tento přístroj není nevhodný pro měření velikosti kvasinek. Naměřené hodnoty pomocí přístroje ZetaPALS se shodují s hodnotami získanými z literatury, lze tedy považovat přístroj za použitelný pro tato měření (Savická, 2018).



Obrázek 22 Negativní barvení *Saccharomyces cerevisiae*

Měření velikosti *Saccharomyces cerevisiae* (obrázek 22) bylo provedeno pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou. Na mikroskopickém snímku pozorujeme kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* na tmavě obarveném pozadí se zbytky barviva (červené

skvrny). Z výsledků měření vyplývá, že výsledná velikost kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* pomocí mikroskopu je $2,7 \pm 0,4 \times 3,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$, což se shoduje s hodnotami získanými z literatury (Savická, 2018).

6.16 Měření ζ potenciálu *Saccharomyces cerevisiae*

Pro měření ζ potenciálu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (tabulka 20) byly použity dva přístroje pracující na principu Dopplerova posunu frekvence laserového paprsku (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS). Principy a postupy měření byly popsány v kapitolách 2. 2. 1, 5. 9 a 5. 10.

Tabulka 20 Měření ζ potenciálu *Saccharomyces cerevisiae*

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
ζ potenciál Zetasizer Nano ZS [mV]	$-14,7 \pm 0,7$	$-12,9 \pm 0,4$	$-8,2 \pm 1,9$
ζ potenciál ZetaPALS [mV]	$-15,7 \pm 1,6$	$-15,2 \pm 0,9$	$-5,3 \pm 1,0$

Naměřený ζ potenciál kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* dosahuje záporných hodnot, z čehož vyplývá, že je její povrch záporně nabitý. Z výsledků měření vyplývá, že koloidní roztok kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je nejméně stabilní ve fyziologickém roztoku. Dále měření prokázala obecnou nízkou stabilitu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ve všech třech testovaných prostředích. Toto odpovídá praktickým zkušenostem s kulturami kvasinek, kdy prakticky vždy můžeme sledovat jejich sediment na dně nádoby.

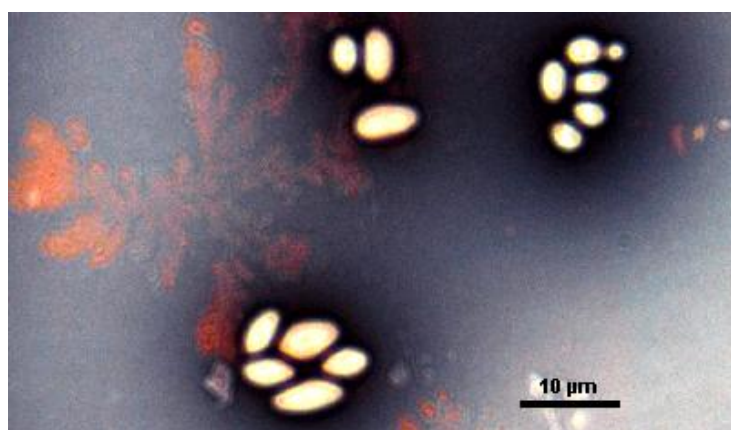
6.17 Měření velikosti *Saccharomyces boulardii*

Pro měření velikosti kvasinky *Saccharomyces boulardii* (tabulka 21) byly použity dva přístroje pracující na principu dynamického rozptylu světla (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS) a mikroskop (Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou). Postupy a principy měření byly popsány v kapitolách 3. 1. 1, 5. 8, 5. 9, a 5. 10. Dle literatury je kvasinka *Saccharomyces boulardii* oválné buňky o velikosti $10 \mu\text{m}$ (Lesage, 2006).

Tabulka 21 Měření velikosti *Saccharomyces boulardii*

<i>Saccharomyces boulardii</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
Velikost Zetasizer Nano ZS [μm]	$38,4 \pm 13,5$	$32,5 \pm 16,1$	$45,2 \pm 17,5$
Velikost ZetaPALS [μm]	$3,1 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,4$

Z výsledků měření velikosti *Saccharomyces boulardii* vyplývá, že naměřené hodnoty pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS se opět výrazně liší v porovnání s hodnotami získanými z literatury, lze tedy tento přístroj označit za nevhodný pro měření velikosti kvasinek. Naměřené hodnoty pomocí přístroje ZetaPALS se shodují s hodnotami získanými z literatury (Lesage, 2006).



Obrázek 23 Negativní barvení *Saccharomyces boulardii*

Měření velikosti *Saccharomyces boulardii* (obrázek 23) bylo provedeno pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou. Na mikroskopickém snímku pozorujeme kvasinky *Saccharomyces boulardii* na tmavém pozadí a zbytky barviva (červené skvrny). Z výsledků měření vyplývá, že výsledná velikost kvasinky *Saccharomyces boulardii* pomocí mikroskopu je $5,1 \pm 1,4 \times 2,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$, což se shoduje s hodnotami získanými z literatury (Lesage, 2006).

6.18 Měření ζ potenciálu *Saccharomyces boulardii*

Pro měření ζ potenciálu kvasinky *Saccharomyces boulardii* (tabulka 22) byly použity dva přístroje pracující na principu Dopplerova posunu frekvence laserového paprsku (Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS). Principy a postupy měření byly popsány v kapitolách 2. 2. 1, 5. 9 a 5. 10.

Tabulka 22 Měření ζ potenciálu *Saccharomyces boulardii*

<i>Saccharomyces boulardii</i>			
Měřené prostředí	Destilovaná voda	KCl	Fyziologický roztok
ζ potenciál Zetasizer Nano ZS [mV]	$-15,6 \pm 1,4$	$-12,2 \pm 1,5$	$-3,0 \pm 1,1$
ζ potenciál ZetaPALS [mV]	$-17,2 \pm 5,9$	$-13,3 \pm 4,8$	$-4,7 \pm 1,4$

Naměřený ζ potenciál kvasinky *Saccharomyces boulardii* dosahuje záporných hodnot, z čehož vyplývá, že je její povrch záporně nabitý. Z výsledků měření vyplývá, že koloidní roztok kvasinky *Saccharomyces boulardii* je nejméně stabilní ve fyziologickém roztoku. Stejně jako u předešlého druhu kvasinek i zde pozorujeme jejich obecně nižší stabilitu ve všech třech testovaných systémech.

6.19 Porovnání měření přístrojů

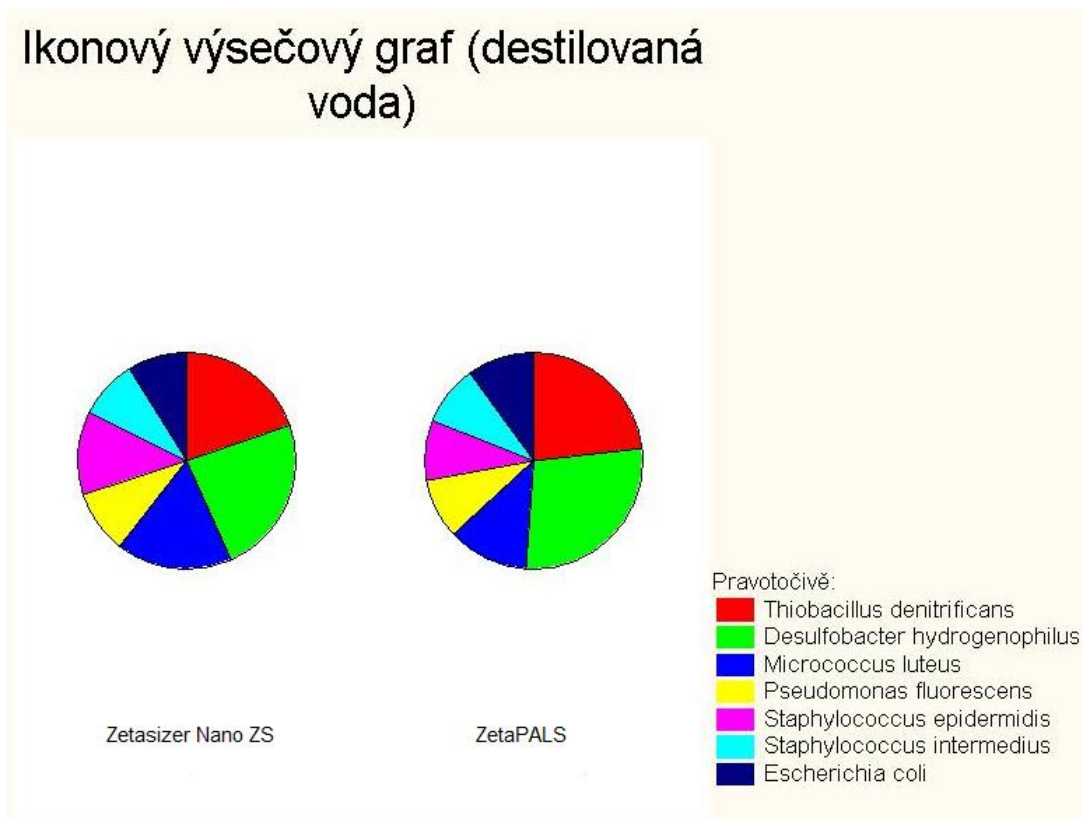
Přístroje Zetasizer Nano ZS a ZetaPALS byly mezi sebou vzájemně porovnány pomocí programu Statistica. Porovnání výsledků bylo provedeno pomocí výsečového grafu. Výsledky měření byly porovnávány v měrném prostředí destilované vody, roztoku KCl a ve fyziologickém roztoku.



Graf 1 Výsečový graf - destilovaná voda

V grafu č. 1 je znázorněné porovnání přístroje Zetasizer Nano ZS a přístroje ZetaPALS měřících velikost buněk v destilované vodě. Z grafu č. 1 jsou patrné vybočující

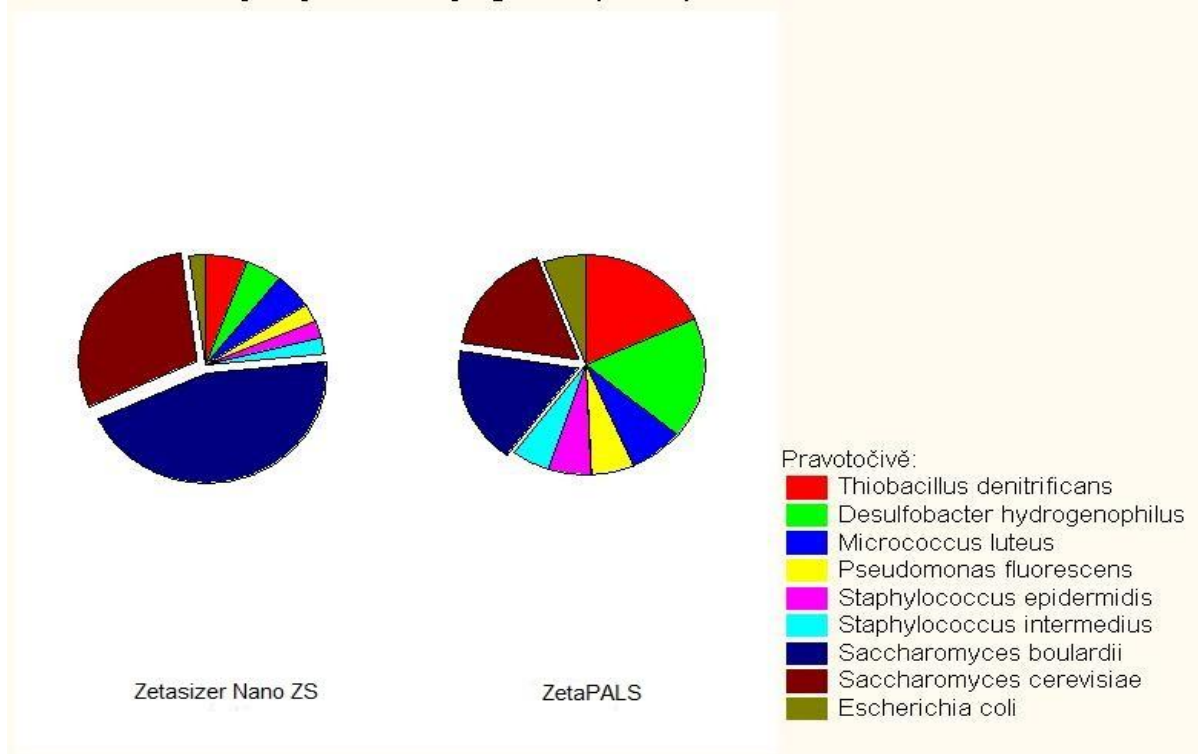
měření velikosti kvasinek *Saccharomyces boulardii* a *Saccharomyces cerevisiae*, které byly v grafu 2 vynechány pro přesnější vyhodnocení.



Graf 2 Výsečový graf - destilovaná voda

V grafu č. 2 je znázorněné porovnání přístroje Zetasizer Nano ZS a přístroje ZetaPALS měřících velikost buněk v destilované vodě pomocí výsečového grafu. Pro lepší porovnání byly odstraněny hodnoty měřených kvasinek *Saccharomyces boulardii* a *Saccharomyces cerevisiae* (odlehle body). Jednotlivé výseče jsou si vzájemně velmi podobné. Určitý rozdíl je pozorován u měření velikosti *Thiobacillus denitrificans*, kde se výsledky naměřené přístrojem Zetasizer Nano ZS v porovnání s literaturou liší (Beller, 2006). Dále je rozdíl pozorován u *Desulfobacter hydrogenophilus* u přístroje Zetasizer Nano ZS, kde se v porovnání s literaturou výsledky liší (Widdel, 1987). I přes rozdílné výsledky mezi přístroji u bakterie *Micrococcus luteus* jsou výsledky měření velikosti souhlasné s literaturou (Savická, 2018).

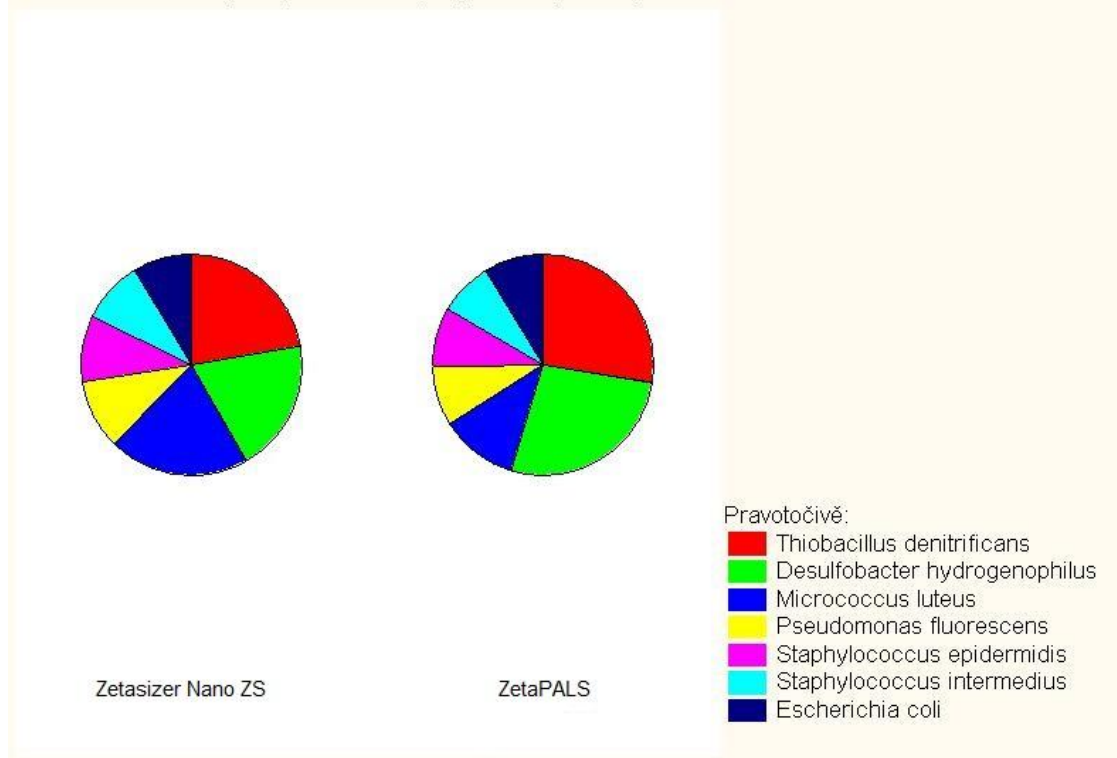
Ikonový výsečový graf (KCl)



Graf 3 Výsečový graf - roztok KCl

V grafu č. 3 je znázorněné porovnání přístroje Zetasizer Nano ZS a přístroje ZetaPALS měřících velikost buněk v roztoku KCl. Z grafu č. 3 jsou patrné vybočující hodnoty měření velikosti kvasinek *Saccharomyces boulardii* a *Saccharomyces cerevisiae*, které byly v grafu č. 4 vynechány pro přesnější vyhodnocení.

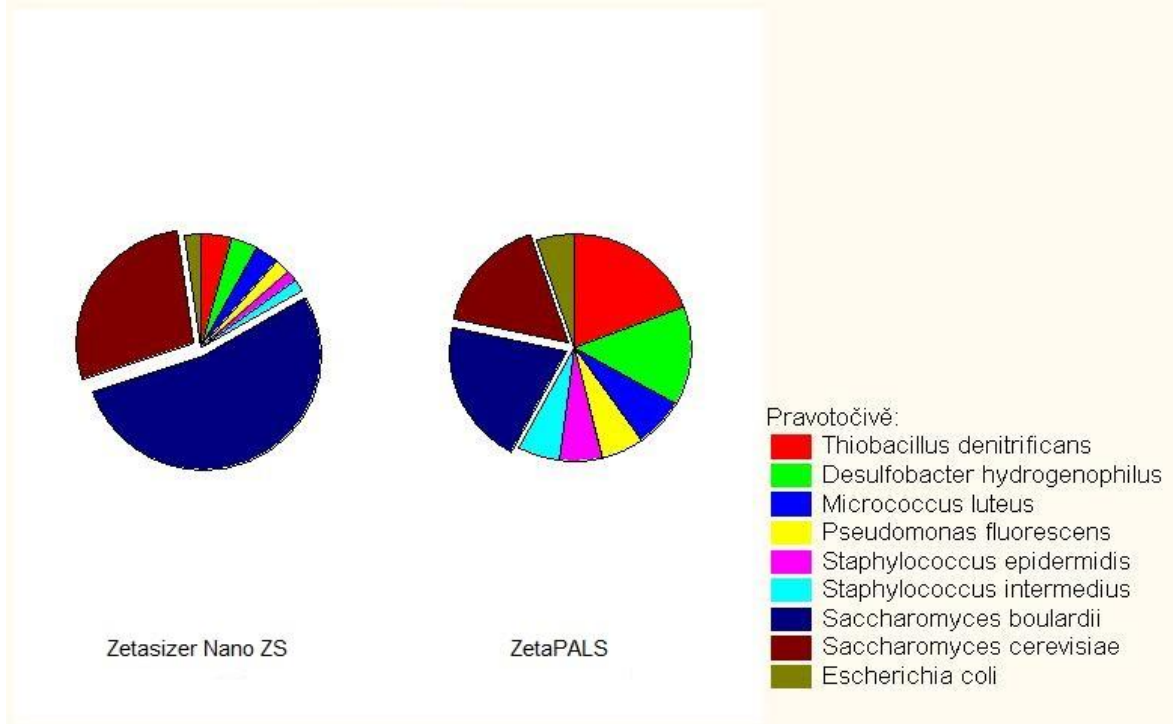
Ikonový výsečový graf (KCl)



Graf 4 Výsečový graf - roztok KCl

V grafu č. 4 je znázorněné porovnání přístroje Zetasizer Nano ZS a přístroje ZetaPALS měřících velikost buněk v roztoku KCl pomocí výsečového grafu. Pro lepší porovnání byly odstraněny hodnoty měřených kvasinek *Saccharomyces boulardii* a *Saccharomyces cerevisiae* (odlehlé body). Jednotlivé výseče jsou si vzájemně velmi podobné. Určitý rozdíl je pozorován u měření velikosti *Thiobacillus denitrificans*, kde se výsledky v porovnání s literaturou liší u obou přístrojů (Beller, 2006). Dále je rozdíl měření mezi přístroji pozorován u *Desulfobacter hydrogenophilus*, kde se výsledky z obou přístrojů v porovnání s literaturou odlišují (Widdel, 1987). I přes rozdílné výsledky mezi přístroji u bakterie *Micrococcus luteus* jsou výsledky měření velikosti souhlasné s literaturou (Savická, 2018).

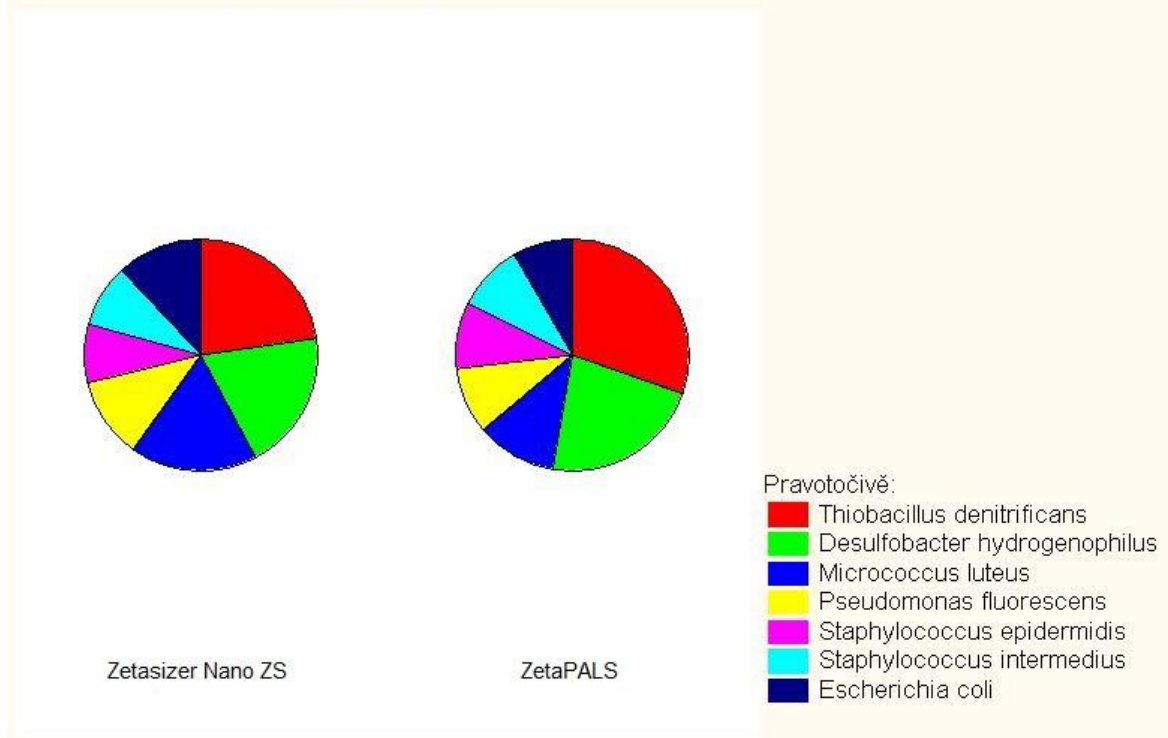
Ikonový výsečový graf (fyziologický roztok)



Graf 5 Výsečový graf - fyziologický roztok

V grafu č. 5 je znázorněné porovnání přístroje Zetasizer Nano ZS a přístroje ZetaPALS měřících velikost buněk ve fyziologickém roztoku. Z grafu č. 5 jsou patrné vybočující hodnoty měření velikosti kvasinek *Saccharomyces boulardii* a *Saccharomyces cerevisiae*, které byly v grafu č. 6 vynechány pro přesnější vyhodnocení.

Ikonový výsečový graf (Fyziologický roztok)



Graf 6 Výsečový graf - fyziologický roztok

V grafu č. 6 je znázorněné porovnání přístroje Zetasizer Nano ZS a přístroje ZetaPALS měřících velikost buněk ve fyziologickém roztoku pomocí výsečového grafu. Pro lepší porovnání byly odstraněny hodnoty měřených kvasinek *Saccharomyces boulardii* a *Saccharomyces cerevisiae* (odlehle body). Jednotlivé výseče jsou si vzájemně velmi podobné. Určitý rozdíl je pozorován u měření velikosti *Thiobacillus denitrificans*, kde se výsledky v porovnání s literaturou liší u obou přístrojů (Beller, 2006). Dále je rozdíl měření mezi přístroji pozorován u *Desulfobacter hydrogenophilus*, a *Micrococcus luteus*, i přes rozdílné výsledky mezi přístroji jsou výsledky souhlasné s literaturou (Widdel, 1987; Savická, 2018).

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo studium korelace mezi výsledky stanovení velikosti mikroorganismů různými postupy. Pro toto studium byly vybrány následující mikroorganismy: *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Thiobacillus denitrificans*, *Desulfobacter hydrogenophilus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius* a *Escherichia coli*.

Velikost mikroorganismů byla měřena pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS, ZetaPALS, elektroakustického spektrometru DT - 1200 a mikroskopu Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou. Výsledky měření velikosti mikroorganismů byly následně porovnány s literaturou. Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že elektroakustický spektrometr DT - 1200 je nevhodný pro měření velikosti mikroorganismů a jejich elektrokinetického potenciálu. Pro většinu mikroorganismů nebylo možné stanovit ani velikost částic, ani zeta potenciál. U tohoto přístroje je navíc možnost stanovení hodnoty zeta potenciálu podmíněno znalostí velikosti částice, což u dalších testovaných přístrojů potřeba není.

Přístroj Zetasizer Nano ZS byl vyhodnocen jako jednoznačně nevhodný pro měření velikosti kvasinek. Také u ostatních mikroorganismů vykazoval větší odlišnost od hodnot velikosti získaných v literatuře, vyšší byly také směrodatné odchylky jednotlivých měření. Tato skutečnost může být způsobena tím, že velká část bakterií se v prostředí nevyskytuje samostatně, ale tvoří kolonie, shluky apod. a tento přístroj je na tuto skutečnost daleko citlivější, než druhý testovaný přístroj ZetaPALS.

Přístroj ZetaPALS se pro měření velikosti mikroorganismů zdá být jako vhodnou alternativou k mikroskopickým metodám. Má samozřejmě své limity, které jsou dány hlavně faktem, že není schopen rozlišit tvar jednotlivých objektů a vždy počítá s kulovou částicí, ale pro některé aplikace, kdy není důležitý tvar je jistě vhodnou a rychlou alternativou. Uplatnění by mohl nalézt například pro stanovení velikosti bakterií, jejichž mikroskopické preparáty jsou obtížně získatelné (viz např. *Thiobacillus denitrificans* a *Desulfobacter hydrogenophilus*).

Jako nejvhodnější metodu lze tedy pro měření velikosti mikroorganismů označit mikroskopickou metodu. Její nevýhodou je pracnější příprava mikroskopického preparátu a potřeba proměření více vzorků pro získání reprezentativních dat, to je ale vyváženo nejen získáním informace o velikosti jednotlivých mikroorganismů, ale také o jejich tvaru, tvorbě kolonií, shluků atd.

Diplomová práce se dále zabývá měřením elektrokinetického potenciálu mikroorganismů. Naměřený elektrokinetický potenciál všech testovaných suspenzí bakterií a kvasinek dosahuje záporných hodnot, z čehož vyplývá, že jejich povrch je záporně nabitý. Obecně se jako prostředí s nejmenší stabilitou dá označit fyziologický roztok, nejvyšších absolutních hodnot bylo dosahováno v destilované vodě.

POUŽITÁ LITERATURA

ANAISSE E. J., MCGINNIS M. PFALLER R., M. A. *Clinical mycology*. New York: Churchill Livingstone. 2003, 608 p. ISBN 04-430-7937-4.

ARZENŠEK D. *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions*. University of Ljubljana. Faculty of Mathematics and Physics. 2010; 1-18.

BARNETT J. A. *Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research*. Microbiology. 2003; 149: 557-567

BARTOVSKÁ L., *Fázová rozhraní a koloidy kolem nás*. VŠCHT Praha. 2009. [cit. 2017-07-12]. Dostupné z: < <http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/08-Fazova-rozhrani.pdf>>.

BARTOVSKÁ L., ŠIŠKOVÁ M., *Co je co v povrchové a koloidní chemii*. VŠCHT Praha, 2005. [cit. 2017-07-11]. Dostupné z: < http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/ebook.help.htm>

BEDNÁŘ M., FRAŇKOVÁ V. a kol. *Lékařská mikrobiologie*. Marvil, 1999.

BELLER H. R., CHAIN P. S. G., LETAIN T. E., et al. *The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium Thiobacillus denitrificans*. J. Bacteriol. 2006; 188:1473-1488.

BELLER H. R., MADRID V., HUDSON G. B., McNAB W. W., CARLSEN T. *Biogeochemistry and natural attenuation of nitrate in groundwater at an explosives test facility*. Appl. Geochem. 2004; 19:1483-1494.

BEYER, H., RIESENBERG, H. *Handbuch der Mikroskopie*. VEB Verlag Technik Berlin, 3. přepracované vydání, 1988.

BIBERSTEIN E. L., JANG S. S., HIRSH D. C. *Species distribution of coagulase-positive Sta-phylococci in animals*. J Clin Microbiol 1984; 19:610-5.

BIRD R. B., STEWART W. E., LIGHTFOOT E. N. *Transport Phenomena*. 2nd edition, 2001.

BOERLIN P., EUGSTER S., GASCHEN F. et al. *Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital*. Vet Microbiol 2001; 82:347-59.

BUMILLER M. *Review: ISO 13099 Colloidal systems — Methods for zeta potential determinativ*. 2012

CSCA. In: *Czech and Slovak Crystallographic Association*. ZETA POTENCIÁL. [online]. 2008 [cit. 2017-09-14]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>

DISPERSION TECHNOLOGY. *Dispersion Technology Instruments*. 2012. [cit 2018-02-17] Dostupné z: <http://www.dispersion.com/downloads>

DONOVAN P. K., WOOD P. *Confirmation of Thiobacillus denitrificans as a species of the genus Thiobacillus, in the β - subclass of the Proteobacteria, with strain NCIMB 9548 as the*

type strain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2000; 50, 547–550.

DUKHIN A.S., GOETZ J. P., WINES T. H., P. SOMASUNDARAN. *Acoustic and electroacoustic spectroscopy*, Colloids & Surfaces, A, 173, 1–3, 127–159, 2000.

DUNCAN J. S. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. Antony Rowe Ltd, Eastbourne 2003, ISBN 07506 11820

ESPY MJ, UHL JR, SLOAN LM, JONES MF, VETTER EA, et al. *Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing*. Clin Microbiol Rev 2006;19:165–256.

FEY P. D., OLSON M. E. *Current concepts in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis*. Future Microbiology .2010. 5 (6): 917–933.

FRÉBORTOVÁ J. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. 2015

FUHRMAN J. A. *Influence of methods on the apparent size distribution of bacterioplankton cells: epifluorescence microscopy compared to scanning electron microscopy*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 1981. 5: 103-106.

GALLONE B., STEENSELS J., PRAHL T. *Domestication and Divergence of Saccharomyces cerevisiae Beer Yeasts*. 2016. Cell 166, 1397-1410.

GARRITY G, BRENNER G., KRIEGL D. J., STALEY N. R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition*. 2005 New York: Springer. ISBN 978-0-387-28022-6.

GILLEN A. L. *The Genesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Answers in Depth, Vol. 4, 2009, pp. 66–72.

GRAHAME, D. C.: *The electrical double layer and the theory of electrocapillarity*. Chem. Rev. 41. 1947; 441-501.

GREENBLATT C. L., BAUM J., KLEIN B. Y., CANO R. J. et al. *Micrococcus luteus – Survival in Amber*. Microbial Ecology. 2004. 48(1): 120-127.

GREENWOOD D., PEUTHERER J., SLACK R. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Grada, 1999. ISBN 8071693650.

GROSSMAN P. D, COLBURN J. C et al. *Capillary Electrophoresis – Theory and Practice*, Academic Press Inc., San Diego. 1992

HIEMENZ P. C. *Principles of colloid and surface chemistry*. New York: M. Dekker, 1997. ISBN 0824793978.

- HONARY S.; ZAHIR F. *Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1)*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2013, 12 (2), 255–264.
- HUNTER J. R., *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. 1988
- JANDOVÁ B., KOTOUČKOVÁ L. *Praktikum z mikrobiologie*. 1996. ISBN 80-210-1374-5.
- KARATHIA H., VILAPRINYO E., SORRIBAS A., ALVES R. *Saccharomyces cerevisiae as a Model Organism: A Comparative Study*. PLoS ONE. 2011. [cit. 2018-03-31] Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0016015>
- KOPECKÁ J., ROTKOVÁ G. *Gramovo barvení, negativní barvení, nativní preparát*. 2017. [cit. 2018-04-03] Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/gramovo_barveni.html
- KUENEN J. G., TUOVINEN O. H. *The genera Thiobacillus and Thiomicrospira*. 1981. p. 1023-1036
- KUEVER J., RAINEY F. A., WIDDEL F. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 Part C. The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. 2005. pp. 922-1144.
- KUEVER J., RAINEY F. A., WIDDEL R. *Desulfobacter*. 2015. [cit. 2018-04-03] Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118960608.gbm01011>
- KVÍTEK L., *Metody studia koloidních soustav*. Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc. 2006
- KVÍTEK L., PANÁČEK A. *Základy koloidní chemie*. Olomouc. 2007 [cit 2018-02-13] Dostupné z: <http://fch.upol.cz/wp-content/uploads/2015/07/Kolonoidni-chemie-text.pdf>
- LANDERS J. P. *Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Techniques*. CRS Press. 2008.
- LESAGE G., BUSSEY H. *Cell Wall Assembly in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev. 2006, 70 (2): 317-343.
- LONDRY K. L., DES MARAIS D. J. *Stable carbon isotope fractionation by sulfate-reducing bacteria*. Applied and Environmental Microbiology. 2003. 69 (5): 2942–2949.
- MACHÁČEK T. *Micrococcus luteus*. 2010 [cit 2018-01-03] Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id829389/>
- MALVERN INSTRUMENTS LRD. *Zetasizer Nano User Manual*. 2004
- MALVERN. *Zeta potential* 2017 [cit. 2017-09-14] Dostupné z: <https://www.malvern.com/en/products/measurement-type/zeta-potential>

- MCFARLAND L., BERNASCONI P. *Saccharomyces boulardii: a review of an innovative biotherapeutic agent*. Microb Ecol Health Dis. 1993. 6:157-71.
- MIKROBIOLOGIE. *Tvar a velikost*. 2014. [cit. 2018-04-07] Dostupné z: <http://www.mikrobiologie.estranky.cz/clanky/bakterie/tvar-a-velikost.html>
- MOORE E. R. B., TINDALL B. J., DOS SANTOS V. A. P. M. et al. *Nonmedical: Pseudomonas*. 2006. p 646–703
- MORTIMER R. K. *Evolution and Variation of the Yeast (Saccharomyces) Genome*. Genome. 2000. 10, p 403-409.
- MUNOZ P., BOUZA E. et al. *Saccharomyces cerevisiae fungemia: an emerging infectious disease*. Clin Infect Dis. 2005; 40(11):1625-34.
- NEWMAN A. W., BRITAIN H. G. *Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*. Marcel Dekker, New York 2002.
- NIKON. *Základní metody světelné mikroskopie*. Brno, 2004. [cit 2018-02-17] Dostupné z: file:///C:/Users/Uzivatel/Desktop/ZAKLADNI_METODY_SVETELNE_MIKROSKOPIE.pdf
- OAKES D. T., BURCIK J. E. *Elektrokinetic phenomena in colloidal Clar*. The Pennsylvania state university. 1955. 225-239.
- OPTIBAC. *Saccharomyces boulardii*. 2018. [cit. 2018-03-31] Dostupné z: <https://www.optibacprobiotics.co.uk/shop/saccharomyces-boulardii>
- OTTO M. *Staphylococcus epidermidis — the 'accidental' pathogen*. Nature Reviews Microbiology, 2009 7 (8): 555–567
- PAUWELS H., KLOPPMANN W., FOUCHER J. C., MARTELAT A. and FRITSHE V. *Field tracer test for denitrification in a pyrite-bearing schist aquifer*. 1998. Appl. Geochem. 13:767-778.
- PAWLEY, J. B. *Handbook of Confocal Microscopy*. Plenum Press. New York, 1990.
- PECORA R. *Dynamic light scattering: the method and some applications*. Editor Wyn Brown. Oxford [England]: Clarendon Press, 1993, 735 s. Monographs on the physics and chemistry of materials. ISBN 978-0-19-853942-1.
- PIXNIO. *Micrococcus luteus*. 2016. [cit. 2018-03-31] Dostupné z: <https://pixnio.com/science/microscopy-images/micrococcus-luteus/gram-positive-micrococcus-luteus-bacteria>
- POOLE A. J. D. *Fueron las Bacterias las Primeras Formas de Vida en la Tierra*. 2009. [cit. 2018-04-14] Dostupné z: http://www.actionbioscience.org/esp/nuevas_fronteras/jeffares_y_poole.html

POUCHLÝ J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha. VŠCHT. 2008 [cit 2017-09-04] Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-978-80-7080-674-6/pages-img/195.html

QAMAR A., ABOUDOLA S., WARNY M. et al. *Saccharomyces boulardii Stimulates Intestinal Immunoglobulin A Immune Response to Clostridium difficile Toxin A in Mice* Infect. Immun. 2001,69(4):2762–2765.

QUANTACHROME. *Dispersion Technology, Inc.* 2017. [cit 2018-02-17] Dostupné z: http://www.quantachrome.co.uk/en/particle-size/Particle_Size_AnalyzersDispersion_Technology.asp

REISCHL U, WITTEWER C, COCKERILL F, et al. *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*, Heidelberg: Springer Press, 2001.

RIGHETTI G. P., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. 1983, Vol 11, pp 1-86

RONALD A. *The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens*. Dis Mon. 2003 49 (2): 71–82.

RYAN K. J., RAY G. C., eds. *Sherris Medical Microbiology (4th ed.)*. McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.

SAVICKÁ D. PÁČOVÁ Z., KUBÁTOVÁ A., et al. *Miniatlas mikroorganismů*. 2018. [cit. 2018-03-31] Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/sacch.htm>

SCALES S. B., DICKSON R. P., LIPUMA J. J., HUFFNAGLE G. B. *Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the Pseudomonas fluorescens Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans*. 2014. Clinical Microbiology Reviews p. 927–948.

SCIENCE NEWS. *Scientists move closer to building synthetic yeast from scratch*. 2017. [cit. 2018-03-31] Dostupné z: <https://www.sciencenews.org/article/scientists-move-closer-building-synthetic-yeast-scratch>

SEIFERT H, KALTHEUNER M, PERDREAU-REMINGTON F: *Micrococcus luteus endocarditis: case report and review of the literature*. Zbl Bakt 1995, 282:431-435.

SENG P., CERLIER A., CASSAGNE C. et al. *Saccharomyces cerevisiae osteomyelitis in an immunocompetent baker*. IDCases. 2016. 5, p 1-3

SHERMAN F. *Getting Started with Yeast*. Methods. Enzymology. 2002. 350, p 3-41.

SILLANKORVA S., NEUBAUER P., AZEREDO J. *Pseudomonas fluorescens biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A*. BMC Biotechnol. 2008. 8:79.

STRAUB K. L., BENZ M., SCHINK B., WIDDEL F. *Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron*. Appl. Environ. Microbiol. 1996, 62 1458–1460.

ŠAŠEK V. BECKER G. E. *Effect of different nitrogen Sources on the cellular form of Trigonopsis variabilis*. J. Bacteriol. 1969. 99: 891-892.

ŠILHÁNKOVÁ L., DEMNEROVÁ K. *Návody pro laboratoře z mikrobiologie*. 2. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1993. ISBN 80-7080-184-0.

TRAPET P., AVOSCAN L., KLINGUER A. et al. *The Pseudomonas fluorescens Siderophore Pyoverdine Weakens Arabidopsis thaliana Defense in Favor of Growth in Iron-Deficient Conditions*. American Society of Plant Biologists. 2016; p 675-693.

UPa. Studijní materiály. *Mikroskopické preparáty: Negativní barvení*. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2014.

USO J, GILL M, GOMILA B, TIRADO MD: *Endocarditis due to Micrococcus luteus*. Microbiol Clin 2003, 21:116-117

VETBACT. *Staphylococcus intermedius*. 2015. [cit. 2018-04-14] Dostupné z: <http://www.vetbact.org/?artid=22>

VISHNIAC W. V. *Thiobacillus Beijerinck 1904*, 597, 1974, p. 456-461.

VOTAVA M., a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

VYTRÁSOVÁ J., BÍLKOVÁ Z. *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. 2014. ISBN 978-80-7395-747-6.

WIDDEL F. *New types of acetate-oxidizing, sulfate-reducing Desulfobacter species, D. hydrogenophilus sp. nov., D. latus sp. nov., and D. curvatus sp. nov.* Archives of Microbiology. 1987. 148 (4): 286–291.