



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

Aplikace antibakteriální nanovrstvy na kovové retainery a zubní rovnátka

Bakalářská práce

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

Autor práce: Eva Roiková
Vedoucí práce: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.





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

Application of Antibacterial Nanolayers for Metal Retainers and Dental Braces

Bachelor thesis

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

Author: Eva Roiková
Supervisor: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva Roiková**
Osobní číslo: **M15000148**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Aplikace antibakteriální nanovrstvy na kovové retainery
a zubní rovnátka**
Zadávající katedra: **Katedra chemie**

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

1. Provedte podrobnou literární rešerši z oblasti současně používaných kovových retainerů a rovnátek v ortodoncii. Zaměřte se na materiál (složení), ze kterého jsou vyráběny, na jejich odolnost vůči zubnímu biofilmu (plaku). Prostudujte, zda na trhu existují kovové retainery a rovnátka s povrchovou úpravou, která by odolávala zubnímu biofilmu. Prostudujte vliv zubní mikroflóry na zdraví zubů a ústní dutiny.
2. Naučte se syntézu antibakteriální solu metodou sol-gel a jeho aplikaci dip coatingem na výše uvedené kovové ortodontické pomůcky.
3. Určete mechanickou odolnost aplikované vrstvy.
4. Studujte antibakteriální odolnost vůči fyziologické bakteriální mikroflóře.
5. Provedte diskusi dosažených výsledků experimentů a navrhnete další možný postup prací.

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 40-50 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

1. KAMÍNEK, M.: Současné fixní ortodontické aparáty. Praha, Avicenum, 1976
2. KAMÍNEK, M., ŠTEFKOVÁ M.: Ortodoncie I. (skriptum). Olomouc, Univerzita Palackého, 2001
3. KOŤOVÁ, M.: Snímací ortodontické přístroje. Grada Publ., Praha, 1999
4. ELTER C, HEUER W, DEMLING A, HANNIG M, HEIDENBLUT T, BACH FW, et al. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. Int J Oral Maxillofac Implants. 2008;23:327-34.
5. BUSSCHER HJ, RINASTITI M, SISWOMIHARDJO W, et al. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. J Dent Res. 2010;89:657-65.

Vedoucí bakalářské práce: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.
Katedra chemie

Konzultant bakalářské práce: doc. Ing. Petr Exnar, CSc.
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: 10. října 2017

Termín odevzdání bakalářské práce: 14. května 2018

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan



prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

V Liberci dne 16. října 2017

Prohlášení

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

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

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

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

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

Datum: 14.5.2018

Podpis: Roškova!

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi s touto prací pomohli. Především děkuji své vedoucí doc. Mgr. Ireně Lovětinské Šlamborové, Ph.D. za vstřícnost, cenné rady, věcné připomínky a za odborné vedení při zpracování této práce. Také bych chtěla poděkovat doc. Ing. Petru Exnarovi, CSc. za pomoc s interpretací výsledků testů mechanických vlastností. A v neposlední řadě děkuji Marcele Krejčíkové za trpělivost a čas, který mi věnovala při práci v laboratoři

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřená na výzkum a testování vlastností antibakteriální nanovrstvy, určené k použití na kovové retainery a zubní rovnátka. Hlavní část testování tvoří mikrobiologické testy.

Teoretická část je zaměřená na popis lidského chrupu a fyziologické zubní mikroflóry, dále jsou popsány základní části současně používaných fixních a snímacích ortodontických aparátů. Je také zkoumán současný stav ortodontických aparátů s povrchovou úpravou, která by odolávala zubnímu biofilmu.

Experimentální část se věnuje přípravě antibakteriální nanovrstvy na bázi hybridního polymeru vzniklým reakcí 3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylátu (TMSPM) s tetraethyl orthosilikátem (TEOS) s přídavkem rozpustných solí stříbra, mědi a zinku. Antibakteriální vrstva byla syntetizována metodou sol-gel a aplikována metodou dip-coating. Dále jsou zde popsány testy mechanické odolnosti a měření kontaktního úhlu smáčení.

Nejobsáhlejší celek experimentální části tvoří popis mikrobiologických testů s použitím bakteriálních kmenů *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei*. Nejprve byly provedeny pilotní testy k určení chování vrstvy vzhledem k jednotlivým bakteriálním kmenům, jejich směsí a bakteriím fyziologického zubního biofilmu a poté byla zkoumána schopnost tvorby biofilmu jednotlivých bakterií.

Klíčová slova

Hybridní nanovrstva, sol-gel, zubní rovnátka, antibakteriální účinnost, biofilm

Abstract

The main purpose of this bachelor thesis is to investigate the properties of antibacterial nanolayer which is intended to use on metal retainers and dental braces. The main part of the study consists of microbiological tests.

The theoretical part is focused on description of human denture and physiological dental microflora, besides that the main parts of currently used retainers and fixed orthodontic devices are described. Also the current status of orthodontic devices with surface treatment which could resist dental biofilm is investigated.

The aim of the practical part is preparation of antibacterial nanolayer comprised of hybrid polymer formed by reaction of 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylat (TMSPM) and tetraethyl orthosilicate (TEOS) with the addition of soluble salts of silver, copper and zinc. Antibacterial nanolayer was synthesized by sol-gel method and coating of the nanolayer was made by using dip-coating method. Tests of mechanical properties and contact angle measurement are also described.

The most extensive part is made of microbiological tests which deal with bacterial strains *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. First, pilot tests were made to determine the behaviour of the layer relative to the individual bacterial strains, their mixtures and the physiological dental biofilm bacteria. And then biofilm formation capability of the individual bacteria was examined.

Key Words

Hybrid nanolayer, sol-gel, dental braces, antibacterial activity, biofilm

Obsah

1	Úvod	14
2	Teoretická část	15
2.1	Lidský chrup	15
2.1.1	Zuby	15
2.1.2	Zuby dočasné	16
2.1.3	Zuby trvalé	16
2.2	Fyziologická zubní mikroflóra.....	17
2.2.1	Princip vzniku zubního plaku	17
2.3	Zubní kaz	18
2.4	Ústní mikroflóra.....	18
2.5	Testované bakterie	18
2.5.1	<i>Streptococcus</i>	18
2.5.1.1	<i>Streptococcus mutans</i>	19
2.5.1.2	<i>Streptococcus salivarius</i>	19
2.5.2	<i>Lactobacillus</i>	19
2.5.3	<i>Actinomyces</i>	20
2.5.3.1	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	20
2.6	Snímací ortodontické přístroje.....	21
2.6.1	Ortodontické spony	21
2.6.2	Pružiny	22
2.6.3	Labiální oblouk	22
2.6.4	Ortodontický šroub	22
2.6.5	Báze deskového přístroje	22
2.7	Fixní aparáty	22
2.7.1	Zámek a kanylka	23
2.7.2	Kroužek.....	24
2.7.3	Drátěný oblouk	25
2.8	Současný stav.....	25
2.8.1	Ag-Pt.....	26
2.8.2	TiO ₂	26
2.8.2.1	TiO ₂	26
2.8.2.2	TiO ₂ dopované N.....	27
2.8.2.3	TiO ₂ dopované Ag.....	27

2.8.3	PTFE	27
2.8.4	GIC s obsahem stříbra a zinku	28
2.8.5	Vápenatosilikátová skla	28
2.8.6	Organosilany	29
2.9	Ocel 304	29
2.9.1	Složení	30
2.10	Metoda sol-gel	30
2.10.1	Dip-coating	30
2.11	Antibakteriální ionty vrstvy AD30	31
2.11.1	Ag.....	31
2.11.2	Cu.....	31
2.11.3	Zn.....	31
3	Experimentální část.....	32
3.1	Čištění podložních skel	32
3.2	Čištění kovových destiček	33
3.3	Antibakteriální sol AD 30.....	33
3.3.1	Chemikálie	33
3.3.2	Postup syntézy solu AD 30	34
3.3.3	Aplikace solu AD 30 na podložní skla, tepelná polymerace	35
3.3.4	Aplikace solu AD 30 na kovové destičky, tepelná polymerace	35
3.4	Kontaktní úhel smáčení	36
3.4.1	Základní informace	36
3.4.2	Metoda měření	37
3.5	Mechanické vlastnosti připravených vrstev na ocelových substrátech.....	37
3.5.1	Postup leštění kovové destičky	37
3.5.2	Postup měření mechanických vlastností	38
3.6	Testy antibakteriálních vlastností vrstvy	39
3.6.1	Kultivační půdy.....	39
3.6.2	Oživení lyofilizované kultury	40
3.6.3	Příprava inokula	41
3.6.4	Princip ředění vzorků.....	42
3.6.5	Očkování.....	42
3.6.6	Metody hodnocení antibakteriální účinnosti.....	42
3.6.6.1	Otisky	43

3.6.6.2	Kvantita – AATCC 100	43
3.6.7	Počítání kolonií	43
3.7	Modifikovaná Christensenova zkumavková metoda	44
3.7.1	Příprava kultivační půdy BHI	44
3.7.2	Antibakteriální testy	45
3.7.3	Test planktonických buněk	46
3.7.4	Stěry	47
4	Výsledky	48
4.1	Kontaktní úhel	48
4.2	Mechanické vlastnosti	48
4.3	Testy antibakteriálních vlastností vrstvy	50
4.4	Mikrobiologie a biofilm	53
5	Diskuze	56
6	Závěr	59
	Seznam použité literatury a zdrojů	61
	Přílohy	65
A	Obsah přiloženého CD	66
B	Fotodokumentace	67

Seznam obrázků

Obrázek 1: Lidský zub	16
Obrázek 2: Lidský chrup.....	17
Obrázek 3: A <i>Streptococcus mutans</i> ; B <i>Streptococcus salivarius</i>	19
Obrázek 4: A <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; B <i>Lactobacillus casei</i>	20
Obrázek 5: <i>Actinomyces odontolyticus</i>	21
Obrázek 6: Snímací rovnátka.....	21
Obrázek 7: Fixní rovnátka	23
Obrázek 8: A Dvojitý zámek; B Jednoduchá kanylka	24
Obrázek 9: Kroužek s usazovací opěrkou.....	25
Obrázek 10: Princip metody dip-coating	30
Obrázek 11: A Drop Shape Analyzer – DSA 30; B Metoda přisedlé kapky.....	36
Obrázek 12: Ampule s lyofilizovanou kulturou bakterií	41
Obrázek 13: Rozočkované bakteriální kolonie na MRS (A) a krevním agaru (B).....	45
Obrázek 14: Leštěná kovová destička s antibakteriální vrstvou.....	46
Obrázek 15: Kovová destička s antibakteriální vrstvou	47
Obrázek 16: Test planktonických buněk <i>Lactobacillus acidophilus</i>	53

Seznam grafů

Graf 1: Metoda AATCC 100, koncentrace aplikovaného inokula 10^5 CFU/ml	51
Graf 2: Metoda AATCC 100, koncentrace aplikovaného inokula 10^3 CFU/ml	52
Graf 3: Metoda AATCC 100, koncentrace aplikovaného inokula 10^8 a 10^5 CFU/ml....	52
Graf 4: Metoda stěry	55

Seznam tabulek

tab. 1: Chemikálie použité pro syntézu antibakteriálního solu AD 30	33
tab. 2: Složení MRS agaru	40
tab. 3: Tabulka ředění bakteriální suspenze	42
tab. 4: Složení BHI kultivační půdy	44
tab. 5: Kontaktní úhel a volná povrchová energie	48
tab. 6: Shrnutí výsledků vtiskové zkoušky	49
tab. 7: Shrnutí výsledků vrypové zkoušky	49
tab. 8: Metoda otisk, koncentrace bakteriálního inokula 10^5 CFU/ml	50
tab. 9: Metoda otisk, koncentrace bakteriálního inokula 10^3 CFU/ml	50
tab. 10: Test planktonických buněk	54
tab. 11: Metoda stěry	54
tab. B - 1: Metoda AATCC 100; <i>Lactobacillus acidophilus</i>	67
tab. B - 2: Metoda AATCC 100; <i>Lactobacillus casei</i>	68
tab. B - 3: Metoda AATCC 100; směs <i>L. acidophilus</i> a <i>L. casei</i>	69
tab. B - 4: Metoda AATCC 100; bakterie fyziologické zubní mikroflóry	70
tab. B - 5: Biofilm, metoda testování stěry	71
tab. B - 6: Biofilm, metoda testování planktonických buněk	72

Seznam zkratek a symbolů

AD30	Označení antibakteriálního solu
AISI	American Iron and Steel Institute
BHI	Brain Heart Infusion Agar (infuze mozkové a srdeční tkáně)
CFU	Colony Forming Units (jednotky tvořící kolonie)
ESEM	Enviromental Scanning Electron Microscope (environmentální rastrovací elektronová mikroskopie)
GIC	Glass Ionomer Cement (skloionomerní cement)
HGF	Hepatocyte Growth Factor (hepatocytární růstový faktor)
HV	Tvrdost podle Vickerse
IPA	Isopropylalkohol
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe Agar
OWRK	Metoda Owens, Wendt, Rabel a Kaelble
PTFE	Polytetrafluorethylen
SS	Stainless Steel (nerezová ocel)
TEOS	Tetraethyl orthosilikát
TMSPM	3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylát

1 ÚVOD

Zubní rovnátka už jistou dobu nejsou považována za nevzhlednou ortodontickou pomůcku, za kterou by se většina pacientů musela stydět. Naopak dochází k přizpůsobení potřeb pacientů a s tím spojeného komfortu nošení. Z estetického hlediska můžeme rovnátka rozdělit do několika kategorií. K těm více nápadným typům patří fixní kovová rovnátka a snímací aparáty, které však pacient s nepříliš závažnou vadou může nosit pouze na noc. Přijatelnějším řešením z hlediska estetického jsou fixní rovnátka tvořená keramickými zámky, které mají bílou barvu, tudíž jsou v ústech méně nápadná nebo dokonce lingvální rovnátka, která jsou lepena z vnitřní strany zubů a tak pro vnějšího pozorovatele neviditelná.

Co se týče estetického hlediska, má pacient velké možnosti výběru. Avšak otázka zdravotních komplikací, které mohou nastat při nošení ortodontických aparátů, z důvodů kumulace zubního plaku na špatně přístupných místech rovnátek, není stále vyřešena. Proto si tato bakalářská práce klade za cíl prozkoumat antibakteriální vlastnosti nanovrstvy, která by byla vhodná pro užití v ortodoncii.

Teoretická část bakalářské práce se věnuje základnímu popisu lidského chrupu, vlivu mikroflóry na zdraví zubů a ústní dutiny, přehledem jednotlivých částí současně používaných kovových retainerů a rovnátek v ortodoncii a také současnému stavu kovových retainerů a rovnátek s povrchovou úpravou, která by odolávala zubnímu biofilmu.

Experimentální část se věnuje přípravě antibakteriální vrstvy metodou sol-gel a její nanášení metodou dip-coating na podložní skla a kovové destičky, které jsou vyrobeny z oceli sloužící pro výrobu rovnátek; měření kontaktního úhlu smáčení; mechanické odolnosti vrstvy a antibakteriálními vlastnostem na vybraných bakteriích *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei*. V neposlední řadě byla pozornost věnována studiu a testování biofilmu na upraveném materiálu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lidský chrup

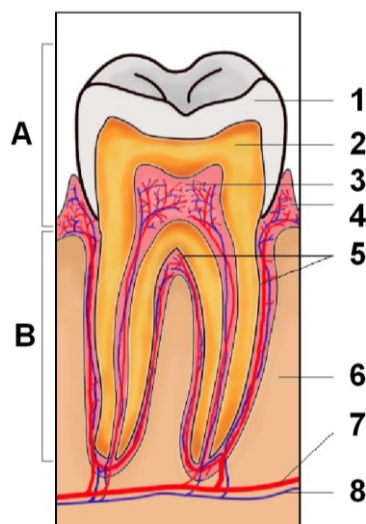
Zuby jsou tvrdé tkáně připomínající kosti, vývojově jsou však specializovanými deriváty ústní sliznice. Slouží k rozměňování potravy a tvorbě řeči. Chrup člověka je heterodontní, zuby jsou tvarově i funkčně specifické. Jednotlivé zuby se vyznačují morfologickými rozdíly, a to především v utváření korunky a kořene. Lidský chrup tvoří dva zubní oblouky, horní zubní oblouk a dolní zubní oblouk. Rozlišujeme dvě generace chrupu, zuby dočasné neboli mléčné a zuby stále neboli trvalé. [1]

2.1.1 Zuby

Každý zub (Obrázek 1) se skládá ze tří základních částí, z korunky, krčku a kořene. Kořen ukotvený v čelisti, plynule přechází v zubní krček. Zubní krček je zúžená prostřední část zubu, která je obalena dásní. Odděluje korunku od kořene. Kořen a krček jsou pokryty zubním cementem, který se skladbou i tvrdostí podobá kostní tkáni, chybí mu však Haversovy kanálky a lamely. V oblasti kořene je vrstva cementu nejsilnější, v oblasti krčku však tvoří jen tenkou vrstvu. [1, 2]

Z dásně následně vyčnívá korunka, která je pokrytá hladkou sklovinou. [1] Na korunce rozlišujeme plochy různého tvaru podle typu zubu a polohy na něm. Z plochy kousací vystupuje různý počet hrbolků, rozlišujeme na zuby bez hrbolků, zuby s jednoduchým hrotem a zuby s více hrbolky. Poté se na zubu nachází plocha patrná zvenčí (vestibulární), plocha přivrácená k jazyku (linguální) a styčné plochy mezi sousedícími zuby (mesiální, distální). [2]

Uvnitř zubu je zubní dřev, která je prokrvována čelistní tkání přes kořeny, tímto způsobem dochází také k přenosu nervového signálu. Proto zubní dřev funguje jako senzorický orgán detekující bolest. Zubovina tvoří největší část zubu, tudíž určuje jeho základní tvar. Její funkcí je ochrana zubní dřevě a opora skloviny. Skládá se ze svazků kolagenu, jehož vlákna jsou obklopena minerálními krystaly. Sklovina pokrývá zubovinu v rozsahu zubní korunky. Je nejvíce kalcifikovanou tkání v těle, tvořená šestibokými zvápenatělými hranoly. Za běžných podmínek to je jediná část zubu, které přijde do kontaktu s vnějším okolím. [1, 3]



Obrázek 1: Lidský zub A – korunka, B – kořen, 1 – zubní sklovina, 2 – zubovina, 3 – zubní dřeň, 4 – dásně, 5 – zubní cement, 6 – čelistní kost, 7 – céva, 8 – nerv [4]

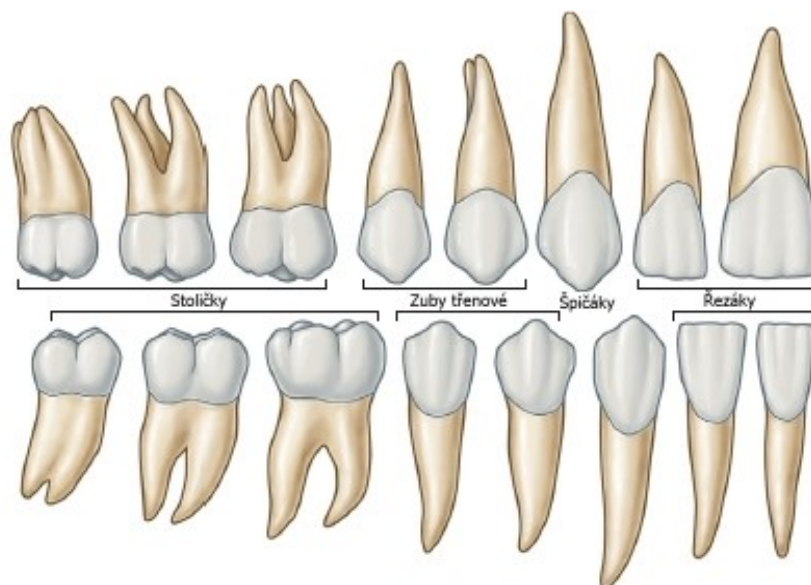
2.1.2 Zuby dočasné

První generací lidského chrupu jsou zuby mléčné neboli dočasné. Celkem jich je 20, v každé polovině horní i dolní čelisti jsou 2 řezáky, 1 špičák a 2 stoličky. [2]

2.1.3 Zuby trvalé

Zuby trvalé (Obrázek 2) jsou druhou generací lidského chrupu. Zahrnují celkem 32 zubů, v každé polovině horní i dolní čelisti jsou 2 řezáky, 1 špičák, 2 zuby třenové a 3 stoličky.

Korunka řezáků má tvar dlátka a vpředu je mírně konvexní. Řezáky mají pouze jeden kořen, stejně jako špičáky, jejichž korunka vybíhá v jeden hrot. Zuby třenové jsou zuby dvouhrbolkové a jednokořenové, u horních zubů třenových může dojít k rozdělení kořene. Stoličky jsou zuby vícekořenové, horní stoličky mají tři kořeny a dolní stoličky mají kořeny jen dva. Korunka horních a dolních stoliček se liší, a to tvarem kousací plochy. Obrys kousací plochy horních stoliček je zaobleně kosočtverečný, zatím co tvar kousací plochy dolních stoliček je zaoblený obdélník. Všechny stoličky mají čtyři kousací hrbolky. [2]



Obrázek 2: Lidský chrup převzato a upraveno z [5]

2.2 Fyziologická zubní mikroflóra

Zubní plak je extracelulární produkt mikroorganismů ústní dutiny. Pokud dojde k jeho mineralizaci, dochází ke vzniku zubního kamene. Zubní plak je charakterizován jako: „*Vysoce organizovaná ekologická jednotka sestávající z velkého množství bakterií usazených v makromolekulární matrix bakteriálního slinného původu.*“ Jelikož plak pevně lne k povrchu, který pokrývá, lze ho odstranit pouze mechanicky. Zubní plak se může kumulovat nejen na povrchu zubů, sliznic a jazyka, ale také na ortodontických přístrojích a zubních náhradách. [3, 6]

V okluzních trhlínách se spíše nacházejí gram-pozitivní bakterie (především streptokoky). Primárně metabolizují cukry a jsou fakultativně anaerobní. [7]

2.2.1 Princip vzniku zubního plaku

Nejprve dojde k vytvoření pelikuly na zubní plošce. Pelikula je tenká vrstva tvořena proteiny pocházející ze slin, umístěná mezi povrchem zubu a koloniemi bakterií, které ji postupně osidlují. Za časný stádium plaku se považuje interval 4–48 h. Osidlování kolonií není náhodné, ale dochází k němu v určeném pořadí. Nejprve dojde k adhezi gram-pozitivních koků *Streptococcus sanguis* a *Streptococcus mitis*. V časném plaku byly izolovány také aktinomycey a laktobacily. V průběhu několika dnů následují sekundární a terciární kolonizátoři. Typickým sekundárním kolonizátorem jsou aktinomycey a mezi pozdní kolonizátory patří *S. salivarius*, zástupci kmene *Prevotella*,

Propionibacterium, *Veillonella* aj. Do plně vyzrálého stavu se zubní plak dostane během 2–3 týdnů, kdy dojde k ustálení stálého společenstva bakterií. Nejčastěji k tomuto jevu dochází ve špatně přístupných místech např. v mezizubních prostorech nebo ve špatně dosažitelných místech zubních rovin. [6, 8, 9]

Ačkoliv je zubní plak přirozenou součástí ochranných mechanismů hostitele, je také hlavní příčinou tvorby zubního kamene, zubních kazů a onemocnění dásní. [8]

2.3 Zubní kaz

Se vznikem zubního kazu jsou spojovány především bakteriální kmeny *Streptococcus mutans* a *Lactobacillus*. [10] Vznik zubního kazu je výsledkem interakce mikrobiální flóry plaku, dostatečného příjmu sacharidů v dietě a odolnosti zubních tkání. Velkou roli při vzniku zubního kazu hrají mikroorganismy, jelikož jejich působením vznikají kyseliny, které se podílejí na demineralizaci skloviny. [6] Zubní kaz začíná v povrchových vrstvách skloviny a označuje se jako časná léze. Pokud zubní kaz demineralizuje celou tloušťku zubní skloviny, dostane se do zuboviny. Zde se kaz šíří mnohem rychleji, jelikož zubovina je mnohem méně mineralizovaná než sklovina a dochází k rychlé demineralizaci. V této fázi pacient začíná cítit bolesti zubu. [11]

2.4 Ústní mikroflóra

Z hlediska stavby buněčné membrány rozlišujeme bakterie na gram-pozitivní a gram-negativní. Buněčná membrána gram-negativních bakterií je tvořena záporně nabitými lipopolysacharidy a peptidoglykanem (tloušťky 7–8 nm). Gram-pozitivní bakterie mají buněčnou membránu tvořenou peptidoglykanem (tloušťky 20–80 nm) sestávajícího se z lineárních polysacharidových řetězců crosslinkovaných pomocí krátkých peptidových řetězců do tuhé třídimenzionální struktury. [12]

2.5 Testované bakterie

2.5.1 *Streptococcus*

Název tohoto kmene bakterií vznikl z řeckého streptos = řetízek a kokkos = kulička, jádro. Tyto bakterie jsou gram-pozitivní koky, které se seskupují do dvojic nebo řetízků. Jsou nepohyblivé, netvoří spory a jsou fakultativně anaerobní (rostou lépe v přítomnosti kyslíku, ale dokáží růst i bez něho). [13] Běžně rozkládají erytrocyty v krevním agaru, což má za následek nazelenalé zabarvení nebo úplné projasnění média. Tento jev se

nazývá hemolýza. Streptokoky nejčastěji osidlují ústní dutinu a horní část respiračního traktu. [14]

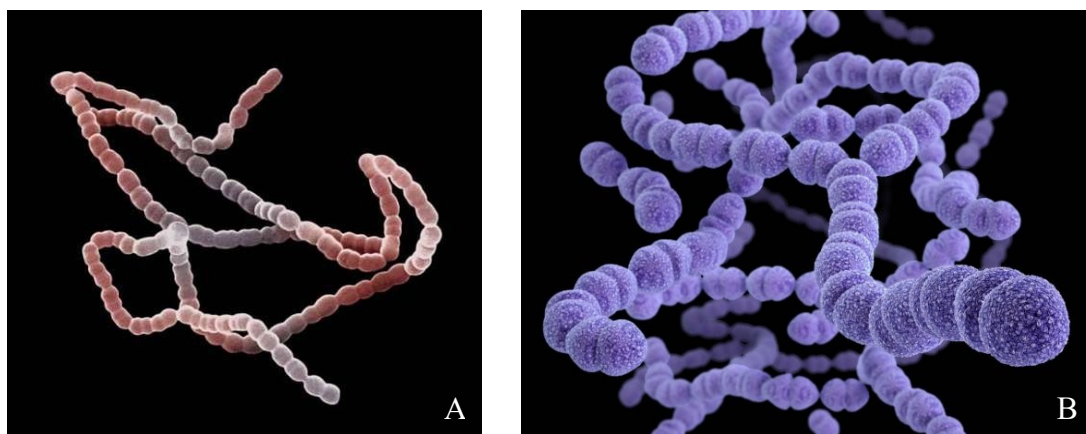
Izolace streptokoků může být provedena ze všech míst v dutině ústní. V průměru představují 28 % zubního plaku z celkové mikroflóry, 29 % v gingivální štěrbině, 45 % na jazyku a 46 % ve slinách. [15]

2.5.1.1 *Streptococcus mutans*

Bakterie *S. mutans* (Obrázek 3A) syntetizují ze sacharózy glukany a fruktany, lepidivé konzistence. Tyto polysacharidy slouží jednak k lepšímu přilnutí k zubní sklovině a také jako zásobárna živin v období sníženého přísunu cukrů v potravě. Tyto streptokoky jsou schopny z cukrů tvořit kyseliny, které narušují sklovinu a množit se i za nízkého pH, a zároveň dosahují hodnot pH nutných k demineralizaci skloviny rychleji než ostatní bakterie. [8]

2.5.1.2 *Streptococcus salivarius*

Z latinského saliva = slina. *S. salivarius* (Obrázek 3B) se běžně vyskytuje v dutině ústní a je považován za nepatogenní. Přednostně kolonizuje sliznice a jazyk a z hlediska nároků na kyslík je fakultativně anaerobní. [13]



Obrázek 3: A *Streptococcus mutans* [16]; B *Streptococcus salivarius* [17]

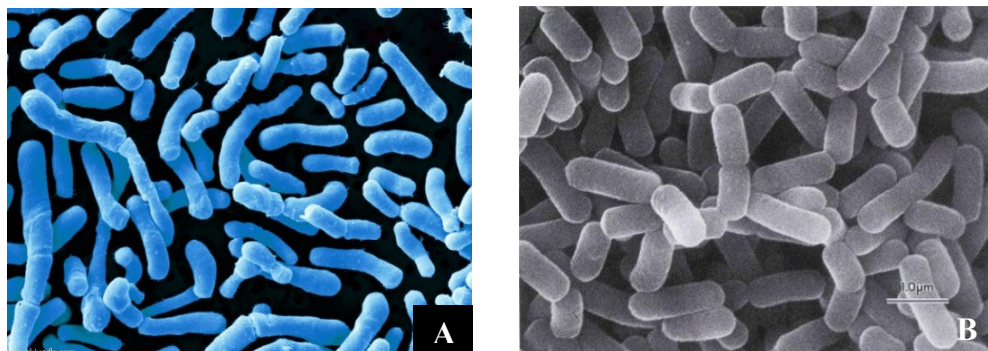
2.5.2 *Lactobacillus*

Z latinského lac = mléko. Do kmene *Lactobacillus* se řadí mléčné bakterie, které tvoří tenké tyčky, seskupené do řetízků. Jsou nepohyblivé, netvoří spory a jsou gram-pozitivní. Laktobacily jsou považovány za miko-aerofilní (slabý růst na vzduchu, ale lepší růst při redukované koncentraci kyslíku) nebo fakultativně či striktně

anaerobní. Při poklesu pH v kultivačním prostředí pod 4, dochází k poklesu růstu většiny laktobacilů. [13]

Ačkoliv se nejčastěji kmen *Lactobacillus* využívá v mlékárenství, můžeme ho také izolovat v ústní dutině člověka. [13]

Lactobacillus acidophilus (Obrázek 4A) a *Lactobacillus casei* (Obrázek 4B) byly použity pro testování antibakteriálních účinků připravené vrstvy.



Obrázek 4: A *Lactobacillus acidophilus* [18]; B *Lactobacillus casei* [19]

2.5.3 *Actinomyces*

Jsou gram-pozitivní, nepohyblivé, fakultativně anaerobní bakterie. Pro dobrý růst vyžadují vyšší tenzi CO₂. Vytvářejí dlouhá větvená štíhlá vlákna, která se splétají v tzv. mycelium. Také u nich dochází k pučení, které je kolmé k rovině vlákna. Pro aktinomycety jsou typická větvení ve tvaru písmen „V“, „Y“ a „T“. Vlákna se rozpadají na tyčky nebo koky. Jejich kolonie jsou drsné a někdy pigmentují. [13, 14]

Aktinomycety se běžně vyskytují v dutině ústní a na sliznicích člověka. [13]

2.5.3.1 *Actinomyces odontolyticus*

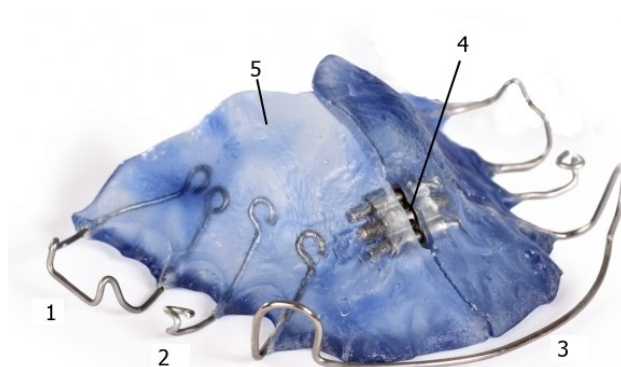
A. odontolyticus (Obrázek 5) je považován za časný kolonizátor úst kojenců, byl izolován z povrchu ústní sliznice už i u kojenců mladších dvou měsíců. *A. odontolyticus* je také spojován s velmi ranými stádii demineralizace skloviny a vzniku malých kazových lézí. [3]



Obrázek 5: *Actinomyces odontolyticus* [20]

2.6 Snímací ortodontické přístroje

Ortodontické přístroje jsou léčebné pomůcky, pomocí kterých dochází k ovlivnění chrupu. Dělíme je na přístroje působící na principech aktivní mechanoterapie, a na přístroje funkční. [21] Snímací rovnátka (Obrázek 6) jsou léčebné pomůcky, které jsou v dutině ústní umístěny tak, aby je pacient mohl sám volně vyjmout. [22]



Obrázek 6: Snímací rovnátka 1 – spona; 2 – pružina; 3 – labiální oblouk; 4 – šroub; 5 – báze
převzato a upraveno z [23]

2.6.1 Ortodontické spony

Tyto konstrukční prvky slouží k retenci a stabilizaci. Tzn. jejich úkolem je dobré upevnění ortodontického přístroje k molárům (stoličkám) v dutině ústní. Nejsou příliš vhodné pro způsobení pohybu zubů. Adamsova spona je nejužívanější ortodontickou sponou, dále se užívá také spona šípová a kuličková. Lze ji zhotovit na kterýkoliv zub a na sponu může být umístěna kanylka (viz kapitola 2.7.1) nebo háček. [21]

2.6.2 Pružiny

Pružina je aktivní konstrukční prvek z pérově tvrdého drátu. Používá se k aktivnímu posunu jednotlivých zubů nebo jejich skupin. Pružiny jsou otevřené nebo zavřené. Otevřené pružiny jsou kotveny jen jedním koncem a druhý konec, který je volný, je zakončen na zubu nebo mezi zuby. Uzavřené pružiny mají oba konce ukotveny v pryskyřici báze přístroje. Pružiny na zub působí na principu jednoramenné páky. [21]

2.6.3 Labiální oblouk

Labiální oblouk je drátěný konstrukční prvek. Využívá se ke stabilizaci a retenci, zároveň však může působit také aktivně. Klasický labiální oblouk se skládá ze střední horizontální části, ze dvou U-kliček a z retenčních zakončení. Oblouk může být rovný nebo tvarovaný. [21]

2.6.4 Ortodontický šroub

Ortodontický šroub je aktivní konstrukční prvek, který je zdrojem síly definované velikosti a směru, která působí přímo na zub. Moderní šrouby jsou charakteristické přesně určeným místem účinku, a také respektem k anatomii ovlivňované oblasti. [21]

Šroub se skládá z centrálního vřeténka a z jednoho nebo dvou vodících trnů. Šroub je možno roztočit o 6–8 mm. Účinek šroubu je přenášen na zuby pomocí báze přístroje. [21]

2.6.5 Báze deskového přístroje

Báze deskového přístroje slouží k zakotvení retenčních, stabilizačních a aktivních konstrukčních prvků včetně šroubů. Báze přístroje se nejčastěji umísťuje orálně od průběhu zubního oblouku. Tvarem připomíná podkovu tvořenou 2–3 mm vrstvou pryskyřice, pokud není nutno použít vrstvu tlustší, pro lepší zakotvení konstrukčních prvků. [21]

2.7 Fixní aparáty

Za fixní ortodontické aparáty (Obrázek 7) jsou považována zařízení, která jsou pevně spojená se zuby pacienta, jsou nasazena v ordinaci a jejich hlavním úkolem je úprava anomálií skusu. V porovnání se snímacími aparáty jsou v léčbě účinnější a jejich účinek je lépe kontrolovatelný lékařem.

Jejich výhoda spočívá také v tom, že dokáží provádět pohyby zubů, které nelze dosáhnout s aparáty snímacími. Avšak také mají svá omezení. Během léčby je nutná

velice dobrá ústní hygiena chrupu, jelikož dochází ke zvýšené adhezi zubního plaku k fixnímu aparátu, což může způsobit vznik zubního kamene, zubního kazu a demineralizaci zubní skloviny. [22]



Obrázek 7: Fixní rovnátka [24]

2.7.1 Zámek a kanylka

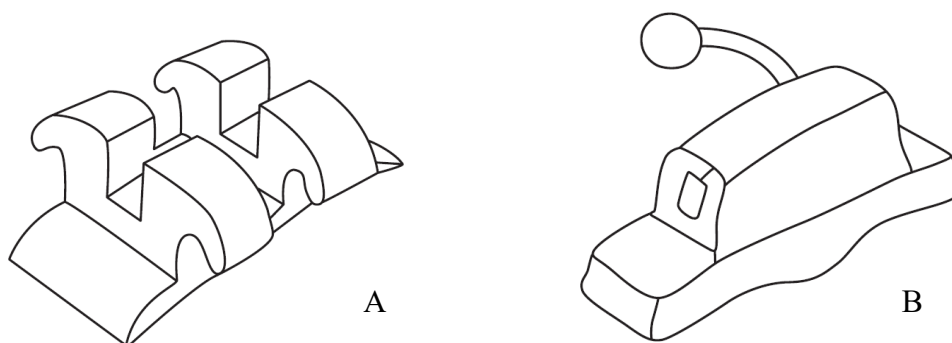
Zámky a kanylky slouží k fixaci drátěných oblouků. Jsou lepeny přímo na zubní sklovinu nebo pro spolehlivější fixaci jsou upevněny na ortodontických kroužcích. Kanylka (Obrázek 8B) je kovová trubička upevněná na zevní stranu zubu, do které se zasune konec oblouku, obvykle se tudíž používají pouze u molárových zubů. [22]

Nejčastěji se používá zámek pro čtyřhranný oblouk (Obrázek 8A). Uprostřed zámku je drážka, která slouží k umístění oblouku. Ze zámku vyčnívají křídélka, která slouží k fixaci oblouku pomocí drátěné ligatury nebo elastické gumičky. Aplikace gumiček je podstatně rychlejší, ale nevýhodou je, že se při každé návštěvě lékaře musí měnit a jsou méně hygienické. I při důkladném čištění dochází k usazování nečistot, které má za následek větší kumulaci zubního plaku. Oblouk může být v zámku fixován také pomocí samolingujícího zařízení. [22]

V ortodoncii se používají kovové zámky, keramické zámky a také zámky z plastické hmoty. Kovové zámky jsou vyrobeny z nerezové oceli, používají se také zámky titanové, ty jsou zejména vhodné pro pacienty alergické na nikl. Kovové zámky jsou vyráběny s důrazem na nízké tření mezi drážkou zámku a obloukem, tím je umožněn posun zubu po drátu s minimálním odporem. Jediná možná nevýhoda je jejich estetická nápadnost. [22]

Keramické zámky jsou vyrobeny z polykrystalického oxidu hlinitého. Ačkoliv jsou z estetického hlediska vhodnější než zámky kovové, mají několik nevýhod. Jsou náchylné k odlamování, jejich povrch je drsnější, a tudíž i frikce mezi zámkem a obloukem je větší. Zámky z plastické hmoty jsou vyrobeny z polykarbonátu nebo polyuretanu. Podobně jako keramické zámky jsou vhodné z hlediska estetického, ale také mají podobné nevýhody. Jsou náchylné k odlamování jednotlivých částí. Zámky jsou průsvitné, ale mohou podléhat změně barvy. [22]

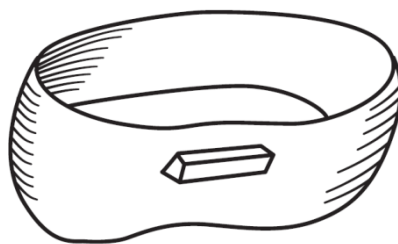
Z hlediska usazování zubního plaku jsou nejvhodnější kovové zámky, na kterých je nejlépe vidět usazený plak. U estetických zámků je přítomnost plaku, kvůli nedostatečnému čištění hůře detekovatelná. [22]



Obrázek 8: A Dvojitý zámek [22] ; B Jednoduchá kanylka [22]

2.7.2 Kroužek

Kroužek (Obrázek 9) obepíná zubní korunku a slouží k upevnění fixního aparátu na zuby. Nejčastěji jsou vyrobeny z nerezové oceli. Na komerčně dostupných kroužcích jsou připevněné kanylky, zámky a háčky, které slouží k pevnému ukotvení fixního aparátu. K připojování těchto elementů se používá elektrické odporové sváření. Kroužky se používají všude tam, kde by lepení zámků adhezivní technikou nebylo spolehlivé a nevyhovující. Jejich nejčastější aplikace je na všechny stoličky a u dětí a mladistvých také na horní i dolní zuby třenové, podle konkrétní anomálie skusu. [22]



Obrázek 9: Kroužek s usazovací opěrkou [22]

2.7.3 Drátěný oblouk

Drátěný oblouk, který je velice pružný, je připevněn k zubům pomocí zámků a ovlivňuje polohu jednotlivých zubů. Oblouk je typicky vyroben z nerezové oceli, chrom-kobaltové slitiny, nikl-titanové slitiny nebo titan-molybdenové slitiny. Nejčastěji se používá oblouk z nerezové oceli, ostatní slitiny se používají převážně pro speciální účely. Průřez oblouku je kulatý nebo čtyřhranný. [22]

2.8 Současný stav

Bylo zjištěno, že pokud se v normálním orálním prostředí objeví změny, dojde k disbalanci ústní mikroflóry. Tyto změny mohou být způsobeny mimo jiné také zavedením ortodontických aparátů. Kovové zámkové indukují specifické změny, jakými jsou snížení pH a zvýšená kumulace zubního plaku, která je doprovázena zvýšením výskytu bakteriálního kmene *Streptococcus mutans* a *Lactobacillus*. Kmeny *S. mutans* a *L. acidophilus* jsou spojovány se vznikem zubního kazu. [10] Proto by bylo vhodné nalézt způsob, jak snížit kumulaci zubního plaku na ortodontických přístrojích.

Povrchová úprava kovů je také vhodná z hlediska zvýšení jejich bioaktivity a biokompatibility. Vrstva, která tvoří povrchovou úpravu, také chrání kov před korozí a zabraňuje uvolňování cytotoxických iontů. [25]

Po důkladném prozkoumání komerčně prodáváných kovových ortodontických přístrojů, v nabídce žádného prodejce nebyly nalezeny rovnátka nebo retainery s povrchovou úpravou, která by odolávala zubnímu biofilmu. Bylo však nalezeno těchto několik typů povrchových úprav kovů, které se podařilo připravit laboratorně, a jsou potenciálně vhodné pro použití v medicíně.

2.8.1 Ag-Pt

Tato vrstva, tloušťky 1,03–2,34 nm, byla připravena simultánním napařováním stříbra na nerezovou ocel v inertní argonové atmosféře. Lepší přilnavost vrstvy k substrátu byla zajištěna přidáním platiny. Tvrdost vzorku s vrstvou Ag-Pt (cca 270 HV) byla nižší než u vzorku bez povrchové úpravy (cca 370 HV), ale zároveň byla vyšší než u vzorku s vrstvou Ag (cca 200 HV). [26]

Bylo ověřeno, že vrstva není cytotoxická. Ačkoliv dochází k uvolňování Ag iontů z vrstvy, při kontaktu s buňkami HGF (Hepatocyte Growth Factor) nedochází k jejich poškození. Při antibakteriálních testech na kmenech bakterií *Streptococcus mutans* a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* došlo ke snížení počtu bakterií na vzorku s povrchovou vrstvou přibližně o 60 % vzhledem ke standardu bez povrchové úpravy. [26]

2.8.2 TiO₂

Oxid titaničitý je chemicky stabilní sloučenina, která neprokazuje škodlivé účinky na člověka. Je to fotokatalytický materiál, který se vyznačuje také biokompatibilitou, vysokým potenciálem k samočištění a antibakteriálními účinky. Může tvořit dvě krystalické formy: rutil a anatas. Rutil je více termodynamicky stabilní, ale anatas má na druhou stranu lepší fotoaktivní vlastnosti. Při Teplotách 900 °C anatas přechází na krystalickou strukturu rutilu. [27, 28]

2.8.2.1 TiO₂

Vrstva byla připravena metodou sol-gel a nanese na ortodontické dráty z nerezové oceli metodou dip-coating. Adheze kmene *Streptococcus mutans* k povrchu ortodontického drátu byla nižší u vzorku s vrstvou TiO₂. K určení množství uchycených bakterií *Streptococcus mutans* byla použita metoda zkoumání změny hmotnosti vzorku. Po 24 hodinové inkubaci došlo k nárůstu hmotnosti na standardu bez povrchové úpravy o 4,97 %. Zatím co u vzorku s vrstvou TiO₂, který byl v bakteriální suspenzi ozářen UV-A došlo k nárůstu hmotnosti o pouhých 0,33 %. [27]

Dráty s vrstvou TiO₂, ozářené po dobu 60 min UV-A vykazovaly míru přežití *Streptococcus mutans* 100 CFU (Colony Forming Units), zatím co dráty bez povrchové úpravy 720 CFU. [27]

2.8.2.2 TiO₂ dopované N

U čistého TiO₂ se fotokatalytické účinky projevují při ozáření UV ($\lambda = 380$ nm), což zahrnuje jen 3–5 % solární energie. U TiO₂ který je dopovaný dusíkem, se fotokatalytický účinek projevuje také při použití záření viditelného spektra, jehož vlnová délka je v intervalu $\lambda = 380–750$ nm, tudíž se zvyšuje i podíl využití solární energie. [28]

Vrstva byla nanášena na nerezovou ocel pomocí radiofrekvenčního magnetronového rozprašování. Nejvyšší fotokatalytická účinnost (91 %) byla dosažena u vrstvy tloušťky 488 nm. Antibakteriální testy na kmenech *Lactobacillus acidophilus* a *Candida albicans* probíhaly po dobu 12 h. U vrstvy s nejvyšší fotokatalytickou účinností došlo k poklesu životaschopných bakterií na 9,1 % u *L. acidophilus* a 11,2 % u *C. albicans*. Experiment potvrdil, že čím vyšší je fotokatalytická účinnost vrstvy, tím vyšší je její antibakteriální aktivita. [28]

2.8.2.3 TiO₂ dopované Ag

Jako substrát, pro nanášení vrstvy, byla použita slitina titanu. Slitiny Ti₆Al₄V a NiTi mají dostatečnou pevnost a odolnost vůči únavě materiálu proto jsou vhodné k chirurgickým aplikacím. Křemík je biokompatibilní prvek, který zlepšuje pevnost titanových slitin. Vrstva byla připravena metodou sol-gel a nanášena metodou dip-coating. [12]

Antibakteriální vlastnosti byly ověřeny 24 h inkubací s bakteriálními kmeny *Escherichia coli* (gram-negativ), *Staphylococcus epidermidis* (gram-pozitiv). Vrstvy s vyšší koncentrací Ag projevily lepší antibakteriální vlastnosti vůči *E. coli* (míra inhibice 80–95 %). U vrstev s nižší koncentrací Ag byla míra inhibice jen 20–50 %. Pro bakterie *S. epidermis* u vrstev s vyšší koncentrací Ag byla míra inhibice po 24 hodinách 100%, ale pro 4 hodinový test nebyla inhibice bakterií pozorována. Nebyla pozorována odlišná antibakteriální účinnost u vrstev se stejnou koncentrací, ale odlišnou formou stříbra. [12]

2.8.3 PTFE

Polytetrafluorethylen je fluorovaný polymer, známý jako teflon. Tato bílá látka, se používá k přípravě nepřilnavých povrchů. Kontaktní úhel vody na hladkém PTFE je 120°. [29]

PTFE byl nanesen na opískované dentální zámky z nerezové oceli. Demling (2010) uvádí, že tato povrchová úprava je vhodná nejen z hlediska nepřilnavosti povrchu PTFE, ale také díky jeho bílé barvě, která je zvláště vhodná z estetického hlediska. [30]

Testování PTFE vrstvy proběhlo in situ. Třinácti adolescentním pacientům byly do úst umístěny po dobu 8 týdnů dva dentální zámky. Jeden zámek s vrstvou PTFE a druhý bez úpravy. Zámky byly umístěny na první nebo druhou stoličku. Procentuální zastoupení biofilmu na povrchu zámku s povrchovou úpravou bylo $(4,0 \pm 3,6) \%$ zatím co u zámku bez povrchové úpravy $(22,2 \pm 5,4) \%$. [30]

2.8.4 GIC s obsahem stříbra a zinku

Skloionomerní cement (Glass Ionomer Cement), je adhezivní cement, který se používá v zubním lékařství. [31]

Cement byl nanesen na slitinu titanu Ti_6Al_4V . Antibakteriální vlastnosti byly testovány na bakteriálních kmenech *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Značná část zinku a stříbra byla uvolněna během prvních 24 hodin inkubace. Větší antibakteriální účinnost projevila vrstva s větším obsahem stříbra a menším podílem zinku. Ačkoliv množství uvolněného stříbra bylo pod biocidní mezí (3,25 ppm), jeho přítomnost měla rušivý účinek na strukturu cementu, což způsobilo, že bylo uvolňováno více iontů zinku. Tento kumulativní účinek přispívá k antibakteriální povaze cementu. Množství uvolněného zinku mělo biocidní koncentraci, ale stále pod hranicí toxicity pro člověka. [32]

2.8.5 Vápenatosilikátová skla

Vrstva vápenatosilikátového skla byla připravena metodou sol-gel a nanесena metodou dip-coating na titanové implantáty. Byla ověřena její bioaktivita, a to ponořením do simulované tělní tekutiny na dobu 21 dní. Po skončení inkubace měly všechny vzorky na svém povrchu globulární krystaly, což vypovídá o jejich bioaktivitě. Všechny vzorky s povrchovou úpravou byly více bioaktivní než samotný titan. [25]

Pro test biokompatibility byly použity myší fibroblasty. Jako mez 100% životaschopnosti byly použity buňky umístěné na polystyrén. Všechny vzorky s povrchovou úpravou měly vyšší procento životaschopnosti buněk než samotný titan. Mírné snížení životaschopnosti buněk bylo pozorováno u vzorku, který obsahoval největší množství Ag, toto může být vysvětleno uvolňováním reziduálních nitrátových iontů, kterých bylo v této vrstvě nejvíce. [25]

Antibakteriální vlastnosti vrstvy byly testovány na bakteriálním kmenu *Staphylococcus aureus*. Adheze a polifereace bakterií na vrstvách byla hodnocena pomocí ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope). Na disku bez povrchové úpravy byl zaznamenán jednotný film bakterií. Počet bakterií na povrchu se snižoval se zvyšujícím procentem stříbra obsaženého ve vrstvě. [25]

2.8.6 Organosilany

Organosilany mají na jednom konci molekuly organickou skupinu a na druhém konci skupinu hydrolyzovatelnou, obecně alkoxy skupinu, která je připojená na konec uhlíkového řetězce.

Vrstva organosilanů byla nanášena na destičky z nerezové oceli, na kterých byl měřen kontaktní úhel a na komerčně dostupné dentální zámky z nerezové oceli, které byly použity pro studium chování biofilmu. Kontaktní úhel vrstvy na nerezové destičce, která byla před nanášením vrstvy opískovaná, byl $122,6^\circ$. Vrstva na destičce, která nebyla před nanášením povrchové vrstvy upravená, měla kontaktní úhel nižší ($107,4^\circ$). Z toho vyplývá, že zdrsnění povrchu nerezové destičky před samotným nanášením vrstvy má vliv na zvětšení hydrofobních vlastností vzorku s povrchovou úpravou. [33]

Retence biofilmu byla zjišťována po 12 a 24 hodinách. Po 12 hodinové inkubaci v roztoku lidských slin se neprojevila odlišná retence biofilmu na vzorku s hydrofobní úpravou vzhledem k standardu. U skupiny vzorků, jejichž inkubace probíhala po dobu 24 h, měla hydrofobní úprava povrchu podstatný vliv na snížení retence biofilmu. Bylo zjištěno, že retence biofilmu exponenciálně klesá se vzrůstající hodnotou kontaktního úhlu. [33]

2.9 Ocel 304

Kovově destičky použité pro nanášení antibakteriální nanovrstvy byly vyrobeny z oceli 304.

Austenitická ocel nebo také ocel série 300, tvoří přes 70 % veškeré produkce nerezové oceli. Obsahuje alespoň 18 % chromu, minimum uhlíku a také nikl. Tento typ oceli nelze vytvrdit teplem a obvykle je nemagnetický. Ocel 304 je extrémně odolná proti korozi. Lze ji snadno čistit proto je vhodná k použití v místech kde je potřeba dbát na hygienu. Austenitická ocel se dobře tvaruje i svařuje, lze ji také použít v širokém spektru provozních teplot. [34]

2.9.1 Složení

Většina kovových ortodontických přístrojů je vyrobena z nerezové oceli AISI (American Iron and Steel Institute) typu 304L SS (Stainless Steel), která má vhodné fyzikální vlastnosti a dobře odolává proti korozi. Tato ocel obsahuje 18–20 % chromu a 8–10 % niklu s malým množstvím manganu a křemíku, obsahuje také uhlík, typicky méně než 0,03 %. [35]

- Ocel 18-8: 18-8 SS = Cr 18%, Ni 8%, C 0,08–0,15%, Mn 0,8–1,5%, Si 0,8% + Fe (také varianta bez Ni pro alergiky – Noninium, fa Dentaureum)

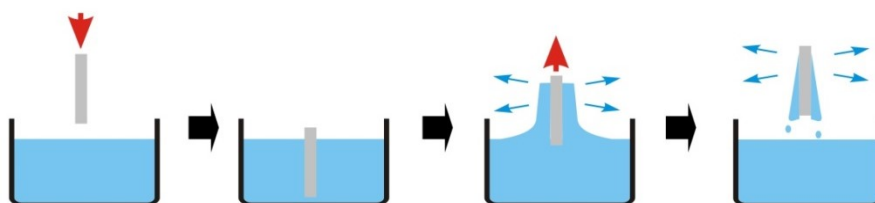
2.10 Metoda sol-gel

Metoda sol-gel je proces, při kterém dochází ke vzniku oxidických materiálů. Vyznačuje se tím, že nejprve dojde k homogenizaci výchozích látek ve formě roztoku. Roztok je převeden na sol a následně dojde k přeměně na gel. [36]

Postupy přípravy metody sol-gel se dělí do dvou skupin. První skupina zahrnuje postupy, které vycházejí z alkoxidů a druhá skupina postupy vycházející ze stabilizovaných vodných solů oxidů, typickým příkladem je sol oxidu křemičitého. Obě skupiny se liší výchozími surovinami i probíhajícími reakcemi. V některých případech je možné z postupu první skupiny přejít do klasických postupů skupiny druhé, opačně však nikoliv. [36, 37]

2.10.1 Dip-coating

Metoda dip-coating neboli vytahování (Obrázek 10) je proces nanášení tenkých vrstev, při kterém je substrát ponořen do solu a následně vytahován přesně definovanou rychlostí. Tloušťka vrstvy závisí na rychlosti vytahování a viskozitě solu. S rostoucí rychlostí tažení, roste také tloušťka vrstvy. [36, 38]



Obrázek 10: Princip metody dip-coating [39]

2.11 Antibakteriální ionty vrstvy AD30

Stříbro, měď a zinek jsou antibakteriální činidla.

2.11.1 Ag

Obecně se stříbro a jeho soli řadí mezi nejčastěji používané antimikrobiální látky. Rozpusťné ionty stříbra tvoří bioaktivní formu a mohou být uvolňovány různými způsoby. [40]

Stříbrný iont se váže na negativně nabitě složky v proteinech a nukleových kyselinách, čímž způsobuje strukturální změny buněčných stěn bakterií, membrán a nukleových kyselin, které ovlivňují životaschopnost bakteriálních buněk. [32] Ag nanočástice menší než 10 nm vykazují mnohem větší antibakteriální aktivitu, než částice větší. [12]

Záporný náboj liposacharidů buněčné membrány gram-negativních bakterií, viz kapitola 2.4, přitahuje pozitivně nabitě stříbrné ionty. Tento fakt podporuje antibakteriální vlastnosti stříbrných iontů. Na rozdíl od gram-pozitivních bakterií, jejichž buněčná membrána má kladný náboj, který stříbrné ionty odpuzuje a bakteriím tak poskytuje lepší rezistenci vůči těmto iontům. [12]

2.11.2 Cu

Antibakteriální vlastnosti měďnatých iontů fungují na podobném principu jako antibakteriální vlastnosti stříbrných iontů. Iont mědi má také kladný náboj, který se váže na „negativně nabitě“ buněčné stěny bakteriálních buněk a ovlivňuje jejich životaschopnost. [41]

2.11.3 Zn

Zinek v bakteriální buňce inhibuje glykolýzu a transmembránové protonové translokace. [32]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části této práce byla syntéza antibakteriálního solu metodou sol-gel a jeho aplikace dip-coatingem na kovové destičky ze stejného materiálu, který se používá na výrobu ortodontických přístrojů – nerezová ocel (viz kapitola 2.9.1). U aplikované vrstvy byla testována její mechanická odolnost, kontaktní úhel smáčení a také antibakteriální odolnost vůči fyziologické bakteriální mikroflóře.

3.1 Čištění podložních skel

Podložní skla bylo potřeba před nanášením vrstvy důkladně očistit. Případné nečistoty jako je mastnota, prach nebo zbytky alkálií by mohly způsobit špatnou adhezi vrstvy při nanášení. Při čištění skel byly použity skleněné boxy pro 8 ks skel (skla jsou zde od sebe oddělena a nedotýkají se). Při manipulaci byla použita teflonová pinzeta. Na každé čištění a oplach byl použit nový skleněný box.

Vlastní postup:

1. 1x oplach v technickém acetonu 3 min.
2. 1x oplach v acetonu p.a. 3 min.
3. 2x oplach v destilované vodě (odstranění acetonu)
4. Do 250 ml vysoké skleněné kádinky bylo připraveno 200 ml ředěné HNO_3 1:1 a ohřáto na 70 až 80 °C. Sklíčka postupně byla opřena o stěnu kádinky a čištěna 10 min v teplé kyselině dusičné
5. 2x oplach v destilované vodě
6. 2 min oplach v destilované vodě s ultrazvukem
7. 1x oplach v destilované vodě
8. 1x oplach v izopropylalkoholu p.a.
9. 3 min oplach v IPA p.a.

Skla vyčištěna výše uvedeným postupem byla uložena do kádinky s IPA tak, aby byla celá ponořena.

3.2 Čištění kovových destiček

Použité vzorky:

6 ks kovových destiček rozměr (3 x 6) cm, dodané firmou Beznoska – pro aplikaci solu

2 ks kovových destiček – standardní vzorky neupravené

Vlastní postup:

1. 2 minuty v technickém acetonu
2. 2 minuty v acetonu p.a.
3. Oplach v izopropylalkoholu p.a. 99%
4. 2 minuty v ultrazvukové lázni v izopropylalkoholu p.a. 99%
5. Oplach v izopropylalkoholu p.a. 99%
6. Dočištění v parách izopropylalkoholu p.a. 99%.

Ihned po dočištění v parách IPA byla na kovové destičky nanášena antibakteriální vrstva, proto nemusely být uloženy do kádinky s izopropylalkoholem tak jako podložní skla.

3.3 Antibakteriální sol AD30

3.3.1 Chemikálie

tab. 1: Chemikálie použité pro syntézu antibakteriálního solu AD30 a jejich zkratky

Chemikálie	Zkratka
Isopropylalkohol 99,8% p.a.	IPA
Tetraethyl orthosilicate $\geq 99.0\%$ (GC)TEOS	TEOS
3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate $\geq 98\%$	TMSPM
Luperox® A75, benzoyl peroxide 75%, remainder water	BPO
Silver nitrate ACS reagent, $\geq 99.0\%$	AgNO ₃
Copper(II) nitrate trihydrate, puriss. p.a., 99-104%	Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O
Zinc nitrate hexahydrate, purum p.a., crystallized, $\geq 99.0\%$	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O
Kyselina dusičná c = 2 mol/dm ³ připravena z kyseliny dusičné 65% p.a.	2 M HNO ₃
Destilovaná voda	H ₂ O
Tlaková láhev s argonem	Ar

3.3.2 Postup syntézy solu AD30

Suchá dvouhrdlá varná baňka s kulatým dnem, teflonovým kroužkem a teflonovým míchadlem, byla upevněná svorkou na stojan. Na varnou baňku s teflonovým kroužkem byl nasazen zpětný chladič, který byl ke stojanu upevněn také svorkou. Celá aparatura byla ponořena do olejové lázně tak, aby se varná baňka nedotýkala stěn ani dna nádoby. Olejová lázeň (500 ml silikonového oleje v hliníkové nádobě o $V = 2\text{ l}$) byla umístěna na míchačce. Na vývod chladiče uprostřed byl umístěn přívod argonu, do bočních vývodů byly umístěny hadice na přítok a odtok vody.

Na míchačce bylo spuštěno míchání, následně byl puštěn argon a následující 3 minuty byl ponechán boční vývod z baňky otevřený, aby bylo argonu umožněno důkladně prostoupit celou aparaturou a vysušit případné zbytky vody.

Navážka AgNO_3 zvážená na analytických vahách byla vsypána bočním vývodem do baňky a okamžitě zalita IPA. Boční vývod baňky byl uzavřen septem. Argon byl přiváděn do aparatury po celou dobu syntézy solu. Celá baňka byla zakryta pevným alobalem, aby se zabránilo přístupu světla. Roztok byl míchán do úplného rozpuštění AgNO_3 . Poté byl do roztoku přidán TEOS a TMSPM. Následně bylo vsypáno navážené množství BPO a uzavřeno septum. Směs byla míchána do rozpuštění BPO.

Do Erlenmayerovy baňky byla připravena směs IPA, 2M HNO_3 , destilované vody, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Vzniklý roztok v Erlenmayerově baňce měl světle modrou barvu. Roztok byl intenzivně protřepán, aby se zcela rozpustily krystalky dusičnanů.

Po rozpuštění BPO byly zvýšeny otáčky a průtok argonu, septum bylo odstraněno a do středu pomocí nálevky s dlouhou trubicí bočním vývodem byl nalit celý obsah rozpuštěné směsi z Erlenmayerovy baňky. Boční vývod baňky byl znova uzavřen septem a průtok argonu byl snížen. Celá směs byla míchaná 30 minut za zvýšených otáček.

Po 30 minutách byl vypnut přívod argonu a puštěna voda do chladiče. Teplotní čidlo bylo umístěno do lázně 1 cm pod hladinou silikonového oleje a nedotýkalo se dna ani stěn nádoby. Byl zapnut ohřev lázně a čekalo se do doby varu solu. Od prvních známek varu byl stopován čas 35 minut. Sol měl po celou dobu plynulý var a míchání.

Po ukončení varu solu byla baňka zvednuta z olejové lázně. Z baňky byl sejmут chladič a baňka byla dochlazena v nádobě se studenou vodou. Po ochlazení solu na pokojovou

teplotu, byl sol přelit do tmavé vyčištěné a vysušené polyethylenové lahve (PE vzorkovnice). Na vzorkovnici byla umístěna etiketa s názvem a datem přípravy.

Dvouhrdlá baňka ve které byl připravován sol, byla vypláchnuta technickým IPA. Následně byl do ní nalit 30–40% NaOH, baňka byla následující den umyta standardním způsobem.

Syntéza antibakteriálního solu je patentově chráněná.¹

3.3.3 Aplikace solu AD30 na podložní skla, tepelná polymerace

Použité vzorky: 26 ks podložních skel (7,6 x 2,6) cm

Použitý sol: AD30 : IPA ředění 1 : 1

Postup aplikace:

Skla, která byla vyčištěna postupem uvedeným v kapitole 3.1, byla před aplikací solu dočištěna v parách izopropylalkoholu.

Do plastové 100 ml nízké kádinky bylo připraveno 100 ml solu AD 30 : IPA ředění 1:1. Vyčištěné suché sklíčko bylo zavěšeno svisle ve svorce přístroje pro nanášení metodou dip-coating a ponořeno v solu po dobu 30 sekund. Sol byl aplikován na maximální plochu vzorku. Po 30 sekundách bylo sklo vytahováno stanovenou rychlostí 6 cm/min. a po aplikaci bylo ponecháno zavěšené 30 sekund ve svorce přístroje. Vzorek byl ponechán 30 minut volně při laboratorní teplotě opřený ve stojánku. Po 30 minutách byl přemístěn do sušárny, kde proběhla tepelná polymerace při 150 °C po dobu 2 hodin. Vzorky byly po tepelné polymeraci uloženy po 1 ks do PE sáčku.

3.3.4 Aplikace solu AD30 na kovové destičky, tepelná polymerace

Použité vzorky: 6 ks kovových destiček rozměr (3 x 6) cm, dodané firmou Beznoska

Použitý sol: AD30 : IPA ředění 1 : 1

Postup aplikace:

Po dočištění v parách IPA p.a. 99% se na kovové destičky aplikoval sol AD30 : IPA ředění 1:1 na maximální plochu vzorku. Vyčištěná suchá kovová destička byla zavěšena kolmo ve svorce přístroje pro nanášení metodou dip-coating a ponořena v solu po dobu 1 minuty. Po uplynutí 1 minuty byla destička vytahována stanovenou rychlostí

¹ Šlamborová I., Zajícová V., Exnar P., Stibor I.: Antibacterial hybrid layer active against pathogenic bacteria, particularly against the MRSA bacterial strain, and the method of its production. CZ Patent Application PV2013 - 656, submitted 28.8.2013

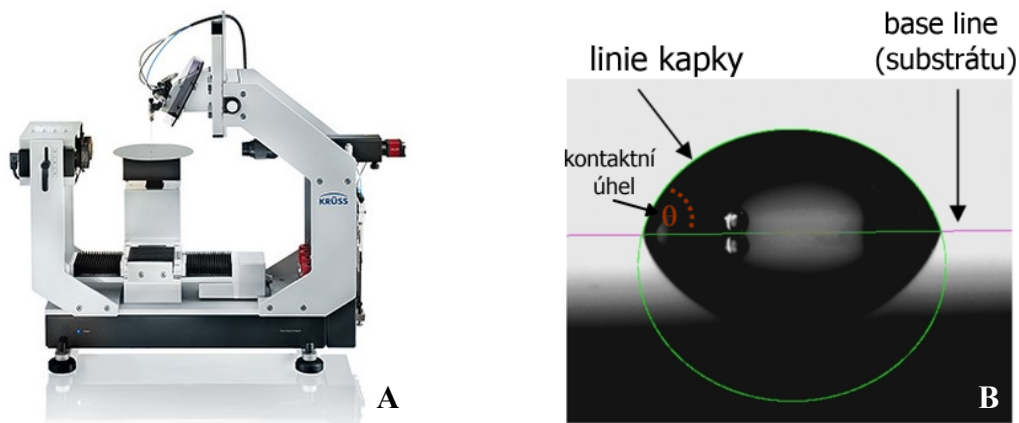
6 cm/min. a po aplikaci byla ponechána zavěšená 1 minutu ve svorce přístroje. Vzorek byl ponechán 30 minut volně při laboratorní teplotě opřený kolmo v kádince. Po 30 minutách byl přemístěn do sušárny, kde proběhla tepelná polymerace při 150 °C po dobu 2 hodin. Vzorky byly po tepelné polymeraci uloženy po 1 ks do PE sáčku.

3.4 Kontaktní úhel smáčení

Kontaktní úhel je úhel, který svírá tečna k profilu kapky v místě styku s rovinou pevné látky. Smáčivost je vlastnost kapaliny přilnout k povrchu některých pevných látek. Kontaktní úhel představuje kvantitativní vyjádření rozsahu smáčení pevných látek kapalinami. Pokud je kontaktní úhle větší než 90° povrch je nesmáčivý. Čím menší je kontaktní úhel, tím více je povrch smáčivý, při 0° dochází k roztékání kapaliny po povrchu.

3.4.1 Základní informace

Kontaktní úhel byl měřen v prostorách firmy SurfaceTreat, a.s v Turnově. Pro měření byl použit přístroj Drop Shape Analyzer – DSA 30 firmy Krüss (Obrázek 11A). K výpočtu povrchové energie byla použita metoda OWRK (Owens, Wendt, Rabel a Kaelble). Pro výpočet povrchové energie touto metodou, bylo potřeba změřit kontaktní úhel vrstvy alespoň pro dvě různé kapaliny. V tomto případě byla použita deionizovaná voda vyrobená na Technické univerzitě v Liberci a diiodomethan dodaný firmou SigmaAldrich.



Obrázek 11: A Drop Shape Analyzer – DSA 30; B Metoda přisedlé kapky; převzato a upraveno z [42]

3.4.2 Metoda měření

Kontaktní úhel smáčení byl měřen na antibakteriální vrstvě, která byla nanесena na podložní sklo a kovovou destičku. Byla použita metoda měření úhlu smáčení na přisedlé kapce (sessile drop metod), tento úhel byl vyhodnocen z obrázku kapky (Obrázek 11B), pořízeném pomocí videokamery.

3.5 Mechanické vlastnosti připravených vrstev na ocelových substrátech

Mechanické vlastnosti připravených hybridních vrstev byly měřeny ve Společné laboratoři optiky UP a FZÚ AV ČR Olomouc [43].

Nejprve byla kovová destička vyleštěna Společnou laboratoří optiky. Poté na destičku byla nanесená antibakteriální vrstva postupem uvedeným v kapitole 3.3.4 a následně byla tvrdost vrstvy změřena opět Společnou laboratoří optiky.

3.5.1 Postup leštění kovové destičky

1. Připevnění vzorků neleštěnou stranou bez vrstvy na skleněné nosiče optickým nalepovacím voskem.
2. Hrubé broušení na rovinné litinové desce pomocí vodné suspenze volného abraziva (korund) o zrnitosti 54 (dle normy FEPA 42-D-1986, max. velikost zrna 355 μm).
3. Postupné broušení pod vodou na litinových kotoučích s nalepenými brusnými papíry
 - WA FLEX 28 – P600 (zrno max. 36 μm)
 - WS FLEX 18C – P1200 (zrno max. 15 μm)
 - Silicon Carbide P2400 (zrno max. 10 μm)(použité značení dle normy FEPA pro brusné papíry)
4. Leštění na podložce Syntepol Meopta tl. 3 mm diamantovou pastou FEPA D6 7/5 (velikost zrna 5–7 μm)
5. Odlepení a závěrečné mytí (toluen, destilovaná voda)

3.5.2 Postup měření mechanických vlastností

Experimenty byly provedeny na měřicím systému NanoTest™ NTX a skládaly se ze dvou samostatných částí, vtiskové zkoušky a vrypové zkoušky.

Při vtiskové zkoušce byl do vzorku velmi malou silou 0,1 mN po dobu 10 s vtlačován trojboký hranol (systém Berkovich). Vzhledem k podmínkám a výsledné hloubce vtisku se jedná o nanointendaci. Z časové závislosti hloubky vtisku byly pomocí software přístroje vypočítány vybrané mechanické vlastnosti vrstev – tvrdost H a redukovaný modul pružnosti E_r . Na každém vzorku bylo provedeno nejméně 8 samostatných vtisků a výsledné hodnoty byly průměrovány.

Druhou zkouškou byla vrypová zkouška (scratch test). Při ní kulovitý indenter o průměru 10 μm při postupném zatěžování přejížděl po povrchu připravených vrstev. Nejprve byla použitým hrotem nasnímána počáteční topografie povrchu vzorku po celé dráze budoucího vrypu. Aplikována byla pouze minimální topografická síla 0,02 mN, při níž nedochází k poškození povrchu vzorku. Takto byla získána data pro určení náklonu a další charakteristiky povrchu vzorku.

V průběhu následujícího „zátěžového“ přejezdu byla již aplikována zátěžná síla. Testy při různých maximálních silách byly použity pro studium odezvy vrstev na různě velká namáhání. Každý z testů byl na konkrétním vzorku proveden třikrát a výsledné hodnoty byly zprůměrovány. Vyhodnocení vrypových zkoušek bylo provedeno na základě vyšetřování záznamu polohy hrotu a zátěžné síly. Reziduální vrypy byly zkoumány pomocí laserového konfokálního mikroskopu OLS LEXT 5000.

3.6 Testy antibakteriálních vlastností vrstvy

Doposud nebylo ještě nikým testováno chování antibakteriální vrstvy AD30 vůči nepatogenním bakteriím vyskytujících se v dutině ústní. Z tohoto důvodu bylo vybráno těchto pět bakteriálních kmenů: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei*.

Pro tyto testy byla použita antibakteriální vrstva nanesená na podložní skla. Nejprve došlo k optimalizaci použité koncentrace bakteriálního inokula a také doby jeho působení. Jako první bylo testováno chování bakteriálního inokula o koncentraci 10^8 CFU/ml. Při této koncentraci byla doba působení 30 minut. Jelikož koncentrace 10^8 CFU/ml byla moc vysoká, nebylo možné kvantifikovat počet bakteriálních kolonií. Po 24 hodinové kultivaci byla Petriho miska s kultivační půdou, pro vzorek i standard, pokryta kompaktním výsevem bakterií. Z tohoto důvodu byly pro další testy zvoleny nižší koncentrace, a to 10^5 a 10^3 CFU/ml. Následně byla také optimalizována doba působení bakteriálního inokula. Doba působení byla prodloužena z 30 minut na 2 hodiny.

Výsledky testů s koncentrací aplikovaného bakteriálního inokula 10^8 CFU/ml a doby působení 30 minut, byly pouze orientační a sloužily k určení dalšího postupu a podmínek testování, proto v této práci nejsou uvedeny.

3.6.1 Kultivační půdy

Pro kultivaci a stanovení počtu bakteriálních kolonií byly použity následující kultivační půdy.

- Krevní agar – od firmy BIO-RAD, s.r.o. Praha
- Medium 6 – LACTOBACILLUS MEDIUM (MRS) – výrobce Carl Roth GmbH + Co. KG

Krevní agar byl použit pro kultivaci kmene *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* a *Actinomyces odontolyticus*. Bakterie kmene *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* byly kultivovány na kultivační půdě označené jako medium 6 – MRS agar, jehož složení je popsáno v tab. 2.

tab. 2: Složení MRS agaru použitého pro kultivaci *L. acidophilus* a *L. casei*

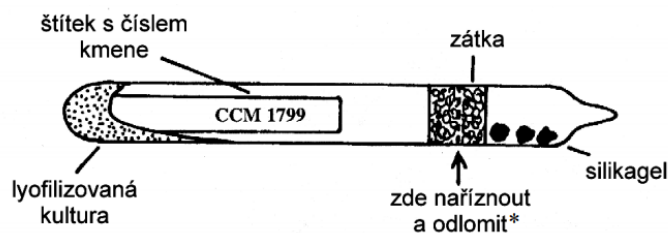
Chemikálie	Navážka
Pepton	10 g
Kvasnicový extrakt	4 g
Hovězí extrakt	8 g
Glukóza	20 g
Fosforečnan draselný	2 g
Octan sodný	5 g
Citronan amonný	2 g
Síran hořečnatý	0,2 g
Síran manganatý	0,05 g
Polysorbát 80	1 g
Agar	10 g
Destilovaná voda	1000 ml
pH	6,2 ± 0,2

3.6.2 Oživení lyofilizované kultury

Nejdříve bylo potřeba oživit dané bakteriální kmeny, které byly pořízeny z České sbírky mikroorganismů v Brně.

- *Streptococcus salivarius* CCM 4046
- *Streptococcus mutans* CCM 7409
- *Actinomyces odontolyticus* CCM 4740
- *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833
- *Lactobacillus casei* CCM 4791

Kultury bakterií jsou dodávány ve skleněné ampuli v lyofilizovaném stavu. Ampule s lyofilizovanou kulturou (Obrázek 12) byla naříznutá pilníkem ve středu molitanové zátky, horní konec byl odlomen. K lyofilizované suspenzi bylo přidáno malé množství fyziologického roztoku a několik minut se nechal roztok odstát. Suspenze byla přenesena na kultivační půdu do Petriho misky, která byla následně umístěna do inkubátoru, kde se inkubovala několik dní při teplotě 37 °C. Takto nakultivované kmeny bakterií je možno uchovávat v kryozkumavce s kuličkami z porézního materiálu ve speciálním roztoku v hlubokomrazícím boxu při teplotě –85 °C.



Obrázek 12: Ampule s lyofilizovanou kulturou bakterií [44]

Kultury bakterií *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* a *Actinomyces odontolyticus*, byly již nakultivovány dříve a uchovávány v kryozkumavkách v hlubokomrazicím boxu. Z kryozkumavky byla sterilní pinzetou vyjmuta jedna kulička z porézního materiálu a umístěna do malého množství fyziologického roztoku. Po několika minutách byl 1 ml bakteriální suspenze naočkován na Petriho misku, která se kultivovala v inkubátoru při 37 °C.

Fyziologická zubní mikroflóra (žena, 21 let) byla z povrchu zubů odebrána sterilním výtěrovým tamponem. Zalomený výtěrový tampon byl umístěn do sterilního plastového kontejneru s 10 ml fyziologického roztoku. Poté byl kontejner uzavřen, zvortexován a 1 ml bakteriální suspenze bylo vyočkováno na Petriho misku s krevním agarem, která byla v inkubátoru kultivována 24 h při teplotě 37 °C.

3.6.3 Příprava inokula

Inokulum (určitý počet zárodků v suspenzi) bylo připraveno pomocí Denzi-LA-Metru, který umožňuje měření zákalu roztoků, pracuje na principu měření optické absorbance, naměřené hodnoty ukazuje přímo v jednotkách dle McFarlanda. Zákalová stupnice dle McFarlanda se srovnává podle zákalové stupnice BaSO₄.

Pro ředění koncentrace bakterií byl použit fyziologický roztok, který byl připraven rozpuštěním 8,5 g NaCl v 1000 ml destilované vody a poté byl sterilizován 1 hodinu při 100 °C v autoklávu.

Z Petriho misky, na které byla oživena kultura bakterií, byly tyto bakterie odebrány očkovací kličkou a přeneseny do fyziologického roztoku umístěného ve speciální zkumavce pro Denzi-La-Meter. Obsah zkumavky byl důkladně zvortexován a promíchán. Zákal takto připraveného roztoku byl změřen na Denzi-La-Metru. Hodnota $1,0 \pm 0,1$ v jednotkách Denzi-La-Metru odpovídá koncentraci 10^8 CFU/ml.

3.6.4 Princip ředění vzorků

Pro získání nižší koncentrace bakteriálního inokula nežli 10^8 CFU/ml bylo potřeba původní inokulum naředit fyziologickým roztokem. Obecně zde platí, že při odběru 0,1 ml suspenze určité koncentrace bakterií do 10 ml fyziologického roztoku, se koncentrace sníží o dva řády. Odebere-li se 1 ml ze suspenze o určité koncentraci bakterií do 9 ml fyziologického roztoku, koncentrace se sníží o jeden řád.

tab. 3: Tabulka ředění bakteriální suspenze

Koncentrace	Odebrání	Získaná koncentrace
z 10^8 bakterií /ml	0,1 ml do 10 ml fyz. roztoku	10^6 bakterií /ml
z 10^6 bakterií /ml	1 ml do 9 ml fyz. roztoku	10^5 bakterií /ml
z 10^5 bakterií /ml	0,1 ml do 10 ml fyz. roztoku	10^3 bakterií /ml
z 10^3 bakterií /ml	0,5 ml do 4,5 ml fyz. roztoku	10^2 bakterií /ml

3.6.5 Očkování

Obecně při očkování neboli inokulaci dochází k přenesení dané kultury bakterií, označovaného jako inokulum, do sterilní kultivační půdy, kde dochází k jejich pěstování neboli kultivaci.

Při testech antibakteriálních vlastností vrstvy nanesené na podložní sklo, bylo inokulum očkováno do Petriho misek s obsahem krevního nebo MRS agaru. Pomocí pipety, byl odebrán 1 ml inokula, který byl pipetován do Petriho misky. Inokulum bylo rozlito krouživými pohyby po celé ploše kultivační půdy. Dále se může také očkovat do zkumavky na šikmý agar, do tekutého kultivačního média nebo vpichem do ztužené půdy.

3.6.6 Metody hodnocení antibakteriální účinnosti

Pro prvotní zjištění chování jednotlivých kmenů bakterií v závislosti na koncentraci inokula a jeho doby setrvání na antibakteriálním povrchu byly provedeny dva typy testů. Bakteriální inokulum bylo vždy nanášeno na vzorek – podložní sklo s antibakteriální vrstvou a standard – očištěné podložní sklo postupem uvedeným v kapitole 3.1

Nejdříve bylo testováno chování antibakteriální vrstvy vůči jednotlivým bakteriálním kmenům *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei*, poté vůči směsi kmenů *S. salivarius*, *S.*

mutans, *A. odontolyticus* a směsi *L. acidophilus* a *L. casei* a nakonec vůči fyziologické zubní mikroflóře.

3.6.6.1 Otisky

Na vzorek i standard bylo nanášeno bakteriální inokulum objemu 200 µl. Po uplynutí 2 hodin, byl na podložní sklíčka v místě nanášeného inokula přiložen sterilní filtrační papír o rozměrech (2 x 2) cm. Po vsáknutí bakteriálního inokula byl filtrační papír přenesen na Petriho misku s kultivační půdou. Po jedné minutě byl filtrační papír odstraněn z misky. Petriho misky byly umístěny do inkubátoru o teplotě 37 °C a po dobu 24 hodin se nechaly kultivovat. Po 24 hodinách byly kolonie spočítány.

3.6.6.2 Kvantita – AATCC 100

Na vzorek i standard bylo nanášeno bakteriální inokulum o objemu 200 µl. Po uplynutí 2 hodin, byla kapka bakteriálního inokula spláchnuta 10 ml fyziologického roztoku do sterilního plastového kontejnerku. Po zvortexování – promíchání byl odebrán 1 ml inokula, který byl pipetován na Petriho misku s kultivační půdou. Inokulum bylo rovnoměrně rozlito po agaru pomocí krouživých pohybů, případně rozetřeno mikrobiologickou kličkou. Očkováno bylo v tripletech. Petriho misky byly umístěny do inkubátoru o teplotě 37 °C a po dobu 24 hodin se nechaly kultivovat. Po 24 hodinách byly kolonie spočítány.

3.6.7 Počítání kolonií

Po 24 hodinové kultivaci v inkubátoru byly Petriho misky vyjmuty. Byl spočítán počet kolonií v každé misce a u tripletů se počítal jejich průměr. Následně byl porovnán počet kolonií na standardu a vzorku pro každý bakteriální kmen a jednotlivou metodu hodnocení antibakteriální účinnosti.

3.7 Modifikovaná Christensenova zkumavková metoda

Po pilotních testech provedených pro zjištění chování antibakteriální vrstvy, nanesené na podložní skla, vůči jednotlivým bakteriálním kmenům, jejich směsí a bakteriím fyziologického zubního biofilmu, bylo provedeno testování antibakteriální účinnosti vrstvy nanesené na kovových destičkách vůči jednotlivým bakteriálním kmenům v kultivační půdě BHI.

Christensenova zkumavková metoda slouží k prokázání schopnosti daného mikroorganismu tvořit biofilm.

Dalším testem byl průkaz tzv. planktonických buněk v biofilmu.

3.7.1 Příprava kultivační půdy BHI

Kultivační půda BHI (Brain Heart Infusion Agar) je výživné pufované kultivační médium, které obsahuje infuzi mozkové a srdeční tkáně a peptony aby dodalo proteiny a další výživné látky nezbytné pro podporu růstu mikroorganismů. Složení BHI, které bylo vyrobeno společností FLUKA s dodavatelem Sigma Aldrich spol. s r.o. je uvedeno v tab. 4

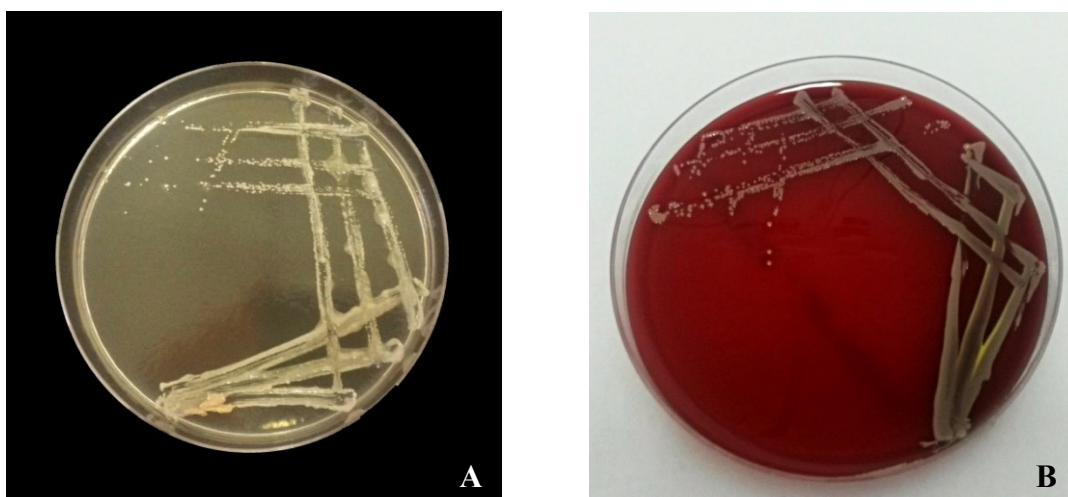
tab. 4: Složení BHI kultivační půdy

Chemikálie	Koncentrace
Agar	7,5 g/l
Mozkový extrakt	3,9 g/l
Dextróza	1,0 g/l
Hydrogen fosforečnan disodný Na_2HPO_4	1,25 g/l
Extrakt srdeční tkáně	4,85 g/l
Pepton P	5,0 g/l
Chlorid sodný	2,5 g/l
pH	7,4 ± 0,2

V 500 ml destilované vody bylo rozpuštěno 13 g BHI a sterilizováno při 120 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí bylo do pěti plastových kontejnerů (pro každý bakteriální kmen jeden) nalito vždy 50 ml BHI.

3.7.2 Antibakteriální testy

Bakteriální kmeny, které byly oživeny při pilotních testech antibakteriálních vlastností vrstvy, která byla nanášena na podložní skla viz kapitola 3.6.2, byly znova rozočkovány a nakultivovány na kultivačních půdách vhodných pro danou bakterii při 37 °C. *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus* na krevním agaru a *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* na MRS agaru. Po 24 hodinách bylo odebráno očkovací kličkou z Petriho misky cca 10 µl bakteriálních kolonií. Kolonie byly rozočkovány na sterilní Petriho misku s kultivační půdou, standardním postupem pomocí roztěrů očkovací kličky. Po dalších 24 hodinách bylo pomocí 1 µl očkovací kličky odebráno pět kolonií bakteriálního kmene z kultivační půdy (Obrázek 13) a umístěno do plastového uzavíratelného kontejneru s 50 ml BHI. Obsah kontejnerů byl řádně zvortexován po dobu jedné minuty. Kontejnerky byly umístěny do inkubátoru, při teplotě 37 °C se nechaly kultivovat po dobu 24 hodin.



Obrázek 13: Rozočkované bakteriální kolonie na MRS (A) a krevním agaru (B) [zdroj: autorka]

Po 24 hodinách bylo BHI s bakteriálními koloniemi přelito do pěti skleněných boxů. Do každého boxu byla vložena kovová destička bez povrchové úpravy – standard a destička s antibakteriální vrstvou – vzorek a skleněný box byl uzavřen víčkem. Skleněné boxy byly umístěny v inkubátoru při teplotě 37 °C po dobu 72 hodin.

Do skleněného boxu s bakteriálním kmenem *Actinomyces odontolyticus* byla přidána také třetí destička (Obrázek 14). Tato destička se od těch předešlých lišila tím, že před samotným nanášením vrstvy byla vyleštěna podle postupu v kapitole 3.5.1. Bakteriální kmen *Actinomyces odontolyticus* byl vybrán z důvodů nejvýraznějšího působení

antibakteriální vrstvy, která způsobila u tohoto kmene nejmarkantnější redukci počtu kolonií jak pro koncentraci bakteriálního inokula 10^5 CFU/ml, tak také pro koncentraci 10^3 CFU/ml (viz kapitola 4.3). Leštěná destička byla použita z důvodu prověření, zda leštění před samotným nanesením antibakteriální vrstvy má vliv na tvorbu biofilmu na jejím povrchu.



Obrázek 14: Leštěná kovová destička s antibakteriální vrstvou před provedením sčtu [zdroj: autorka]

3.7.3 Test planktonických buněk

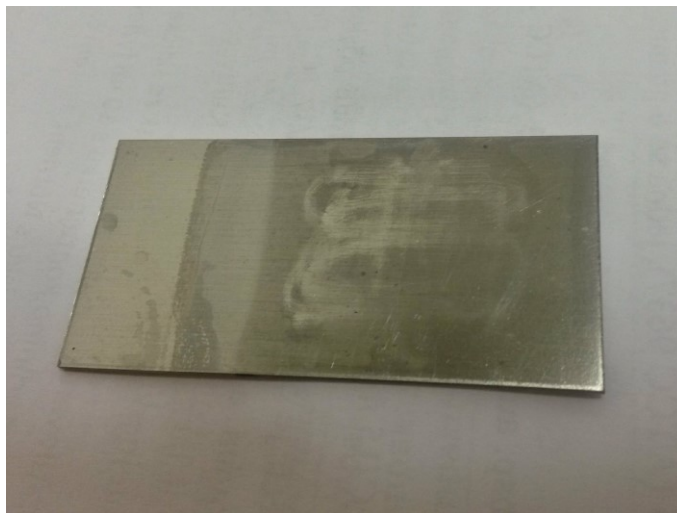
Test planktonických buněk biofilmu byl proveden proto, aby se zjistilo množství buněk, které nejsou v biofilmové matrix pevně uchyceny, ale na tvorbě biofilmu se aktivně podílejí.

Po inkubaci byly destičky vyjmuty ze skleněných boxů a opatrně opláchnuty destilovanou vodou, aby došlo k odstranění BHI, které se uchytilo na destičkách. Destičky zbavené zbytků BHI byly vloženy do plastového kontejneru, zde byly opláchnuty 10 ml fyziologického roztoku, aby došlo k uvolnění planktonických buněk, které nebyly pevně přichyceny k vrstvě. Po zvortexování kontejneru s roztokem byl odebrán 1 ml a vyočkován na Petriho misku s agarem. *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus* na krevní agar a *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* na MRS agar. Očkováno bylo v tripletech. Petriho misky byly umístěny do inkubátoru a při teplotě 37 °C byly kultivovány 24 hodin.

3.7.4 Stěry

Pro provedení stěrů bylo potřeba nejdříve připravit fosfátový pufr s pH 7,2. Ten byl připraven smícháním dvou roztoků 0,1 M KH_2PO_4 a 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. První roztok byl vytvořen rozpuštěním 3,4025 g KH_2PO_4 v 250 ml destilované vody. Druhý roztok byl vytvořen rozpuštěním 8,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ v 500 ml destilované vody. Fosfátový pufr vznikl smísením 150 ml prvního roztoku s 350 ml druhého roztoku.

Stěry byly provedeny na destičkách opláchnutých v destilované vodě s následným oplachem ve fyziologickém roztoku, který sloužil pro vyplavení planktonických buněk. Pomocí sterilního vatového tamponu, který byl namočen do fosfátového pufru, byly provedeny stěry kovové destičky o velikosti (2 x 2) cm (Obrázek 15). Tento postup je modifikovanou variantou normy ČSN ISO 17604 – vyšetření celkového počtu mikroorganismů; a vyhlášky MZd 289/207 Sb. v platném znění - stěry z plochy 10 cm^2 . Zalomený vatový tampon byl umístěn do sterilního kontejnerku s 10 ml fyziologického roztoku. Po zvortexování byl odebrán 1 ml a vyočkován na Petriho misku s agarem. *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus* na krevním agaru a *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* na MRS agaru. Očkováno bylo v tripletech. Petriho misky byly umístěny do inkubátoru a při teplotě 37°C byly kultivovány 24 hodin.



Obrázek 15: Kovová destička s antibakteriální vrstvou po provedení stěru [zdroj: autorka]

4 VÝSLEDKY

4.1 Kontaktní úhel

Na každý vzorek s antibakteriální vrstvou bylo nanесeno deset kapek přesně definovaného objemu 3 μl kapaliny pomocí mikropipety. Kontaktní úhel společně s jeho směrodatnou odchylkou byl z obrázku každé kapky určen pomocí programu, který je dodáván firmou Krüss společně s přístrojem. Výsledný kontaktní úhel odpovídá průměru ze všech deseti měření. Výsledné kontaktní úhly a velikost volné povrchové energie jsou uvedeny v tab. 5

tab. 5: Kontaktní úhel a volná povrchová energie

Vzorek	Voda		Dijodomethan		Volná povrchová energie	
	kontaktní úhel [°]	s_x [°]	kontaktní úhel [°]	s_x [°]	[mN/m]	s_x [mN/m]
Podložní sklo	75,96	1,78	47,26	1,26	41,66	1,45
Kovová destička	113,24	3,02	70,8	2,12	22,43	1,19

Poznámka: s_x je směrodatná odchylka příslušného měření

4.2 Mechanické vlastnosti

Postup měření byl již popsán v kapitole 3.5.2. Čtyři vzorky hybridních vrstev AD30 (zředění 1 : 1 IPA) na leštěných kovových podložkách byly taženy metodou dip-coating čtyřmi různými rychlostmi (2, 4, 6 nebo 15 cm/min) a tepelně zpracovány při 150 °C po dobu 2 hodin. Vzorky se lišily tloušťkou vrstvy, nejtenčí byla vrstva tažená rychlostí 2 cm/min, nejtlustší (cca 2,8krát tlustší) tažená rychlostí 15 cm/min.

V tab. 6 jsou shrnuty výsledky stanovení nanotvrdosti vtiskovou zkouškou. Tvrdost H charakterizuje tvrdost vlastní vrstvy. Jak z výsledků vyplývá, mimo nejtenčí vrstvy, kde se mohla projevit velmi malá tloušťka vrstvy, jsou hodnoty prakticky konstantní. Pro představu o tvrdosti H těchto vrstev slouží porovnání s tvrdostí anodicky připravených ochranných vrstev oxidu hlinitého na hliníku, které obdobnou metodou měřili Datcheva a kol. [45] a jejichž hodnota H se pohybovala v rozmezí 0,7 až 5,1 MPa. Naproti tomu redukovaný modul pružnosti E_r silně závisí na tloušťce vrstvy a s růstem tloušťky vrstvy silně klesá.

tab. 6: Shrnutí výsledků vtiskové zkoušky

Vzorek	Rychlost tažení	Tvrdość H		Redukovaný modul pružnosti E_r	
	[cm/min]	H [GPa]	s_x [GPa]	E_r [GPa]	s_x [GPa]
1	2	2,3	0,2	104	12
2	4	1,9	0,1	90	6
3	6	1,8	0,2	49	5
4	15	1,9	0,2	38	3

Poznámka: s_x je směrodatná odchylka příslušného měření

Vrypovou zkouškou (scratch testem) je simulováno abrazivní opotřebení povrchů.

Odezva vrstev na vrypové namáhání byla hodnocena na základě pozorování reziduálních vrypů a vyhodnocení záznamů hloubky a síly. Pro kvantifikaci vrypové zkoušky byly zvoleny dvě kritické síly L_{c1} a L_{c2} . Jejich experimentální hodnoty jsou uvedeny v tab. 7. První kritická síla L_{c1} odpovídá normálové síle, při které je možno pozorovat plastickou deformaci. Druhá kritická síla L_{c2} reprezentuje počátek proškrábnutí vrstvy a odhalení substrátu.

tab. 7: Shrnutí výsledků vrypové zkoušky

Vzorek	Rychlost tažení	Kritická síla L_{c1}		Kritická síla L_{c2}	
	[cm/min]	L_c [mN]	s_x [mN]	L_c [mN]	s_x [mN]
1	2	45	1	51	2
2	4	37	4	66	10
3	6	42	2	69	4
4	15	39	3	59	4

Poznámka: s_x je směrodatná odchylka příslušného měření

Primárním dějem poškození vrstev je postupná plastická deformace. Praskání vrstvy nebo odtržení vrstvy od podkladu nebylo pozorováno. Za daných experimentálních podmínek dochází pouze k postupnému proškrábnutí vrstvy. Hodnoty první kritické síly L_{c1} reprezentující počátky plastické deformace jsou si pro jednotlivé vzorky velmi blízké. Určitý trend lze pozorovat pro druhou kritickou sílu L_{c2} , kde k proškrábnutí vrstvy dochází později pro vzorky tažené vyššími rychlostmi (s větší tloušťkou vrstvy). Rozdíl je však mnohem menší, než by odpovídalo rozdílu tloušťky vrstvy (až 2,8krát).

4.3 Testy antibakteriálních vlastností vrstvy

Po 24 hodinové kultivaci v inkubátoru byly spočítány narostlé bakteriální kolonie. Pro metodu otisků byl počet kolonií zaznamenán pro koncentraci aplikovaného bakteriálního inokula 10^5 CFU/ml do tab. 8 a pro koncentraci 10^3 CFU/ml do tab. 9. Výsledek v procentech, který se nachází v tab. 8 pro směs *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* označuje, jak velká část otisku na MRS agaru byla po kultivaci pokryta bakteriálními koloniemi. Z důvodů jejich vzájemného překrytí nebylo možné jednotlivé kolonie spočítat.

tab. 8: Metoda otisk - počet kolonií, který na kultivační půdě vyrostl pro koncentraci bakteriálního inokula 10^5 CFU/ml, dobu jeho působení 2 h a kultivaci 24 h při 37 °C

OTISK 10^5 CFU/ml	Standard	Vzorek
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	1
<i>Streptococcus mutans</i>	0	1
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0	0
<i>S. salivarius</i> + <i>S. mutans</i> + <i>A. odontolyticus</i>	1	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0	0
<i>Lactobacillus casei</i>	9	0
<i>L. acidophilus</i> + <i>L. casei</i>	70 %	70 %

tab. 9: Metoda otisk - počet kolonií, který na kultivační půdě vyrostl pro koncentraci bakteriálního inokula 10^3 CFU/ml, dobu jeho působení 2 h a kultivaci 24 h při 37 °C

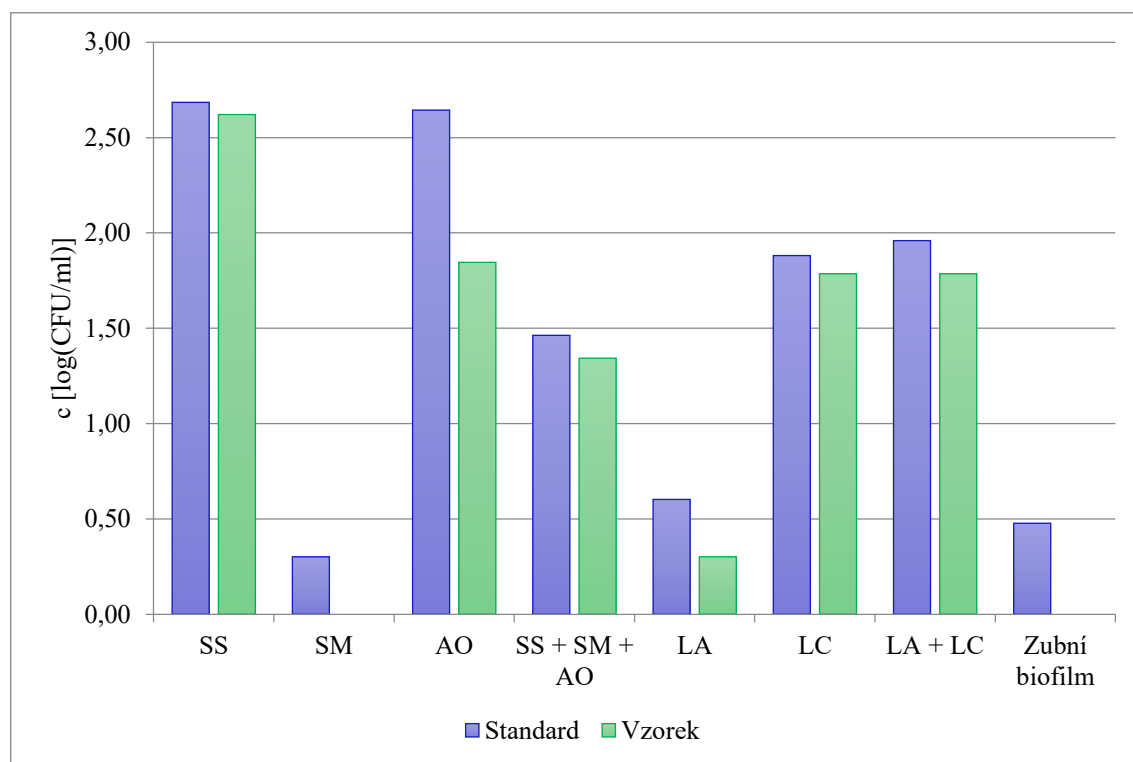
OTISK 10^3 CFU/ml	Standard	Vzorek
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	0
<i>Streptococcus mutans</i>	0	1
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	4	0
<i>S. salivarius</i> + <i>S. mutans</i> + <i>A. odontolyticus</i>	4	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0	0
<i>Lactobacillus casei</i>	0	3
<i>L. acidophilus</i> + <i>L. casei</i>	1	1

U metody AATCC 100 byl vypočten průměr počtu kolonií z vyočkovaných tripletů. Průměrný počet kolonií byl zlogaritmován a vyneseno do grafů. Graf 1 zobrazuje logaritmus počtu kolonií pro koncentraci aplikovaného bakteriálního inokula

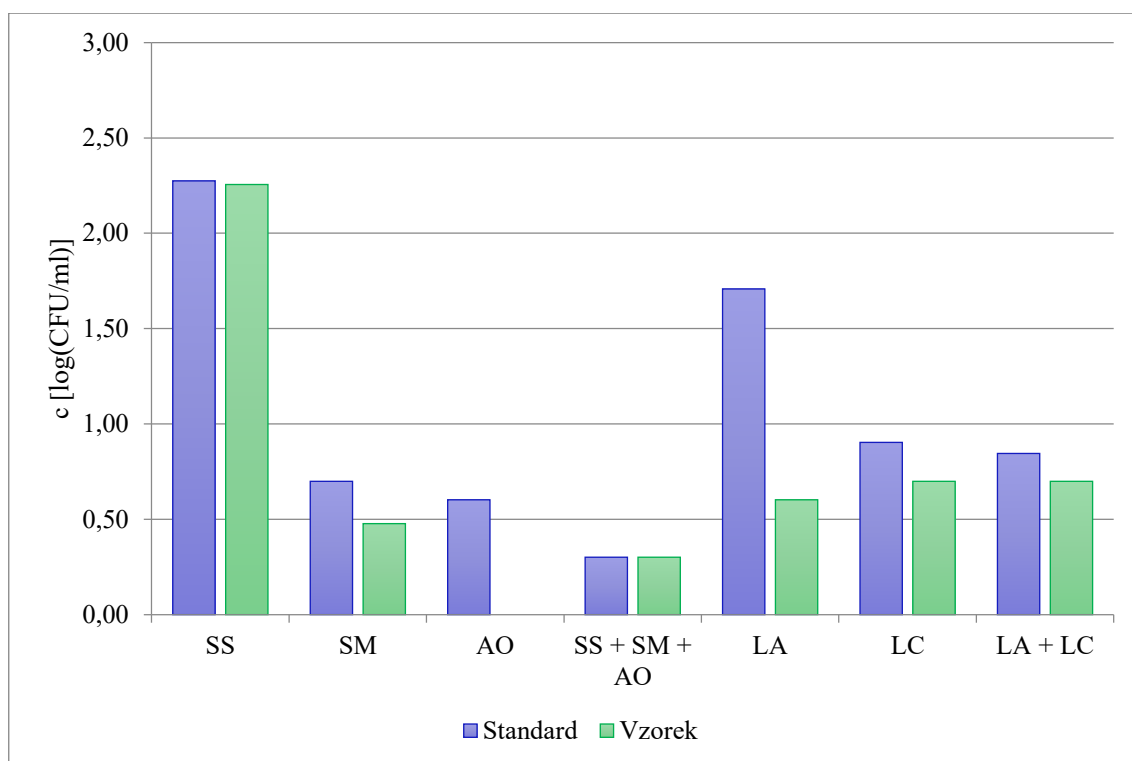
10^5 CFU/ml. Graf 2 zobrazuje logaritmus počtu kolonií pro koncentraci aplikovaného bakteriálního inokula 10^3 CFU/ml.

Metoda AATCC 100 byla také použita pro hodnocení chování antibakteriální vrstvy vůči bakteriím fyziologické zubní mikroflóry. Pro tyto testy byla zvolená koncentrace bakteriálního inokula 10^8 CFU/ml a 10^5 CFU/ml. Graf 3 zobrazuje porovnání logaritmu počtu kolonií pro koncentraci bakteriálního inokula 10^8 a 10^5 CFU/ml.

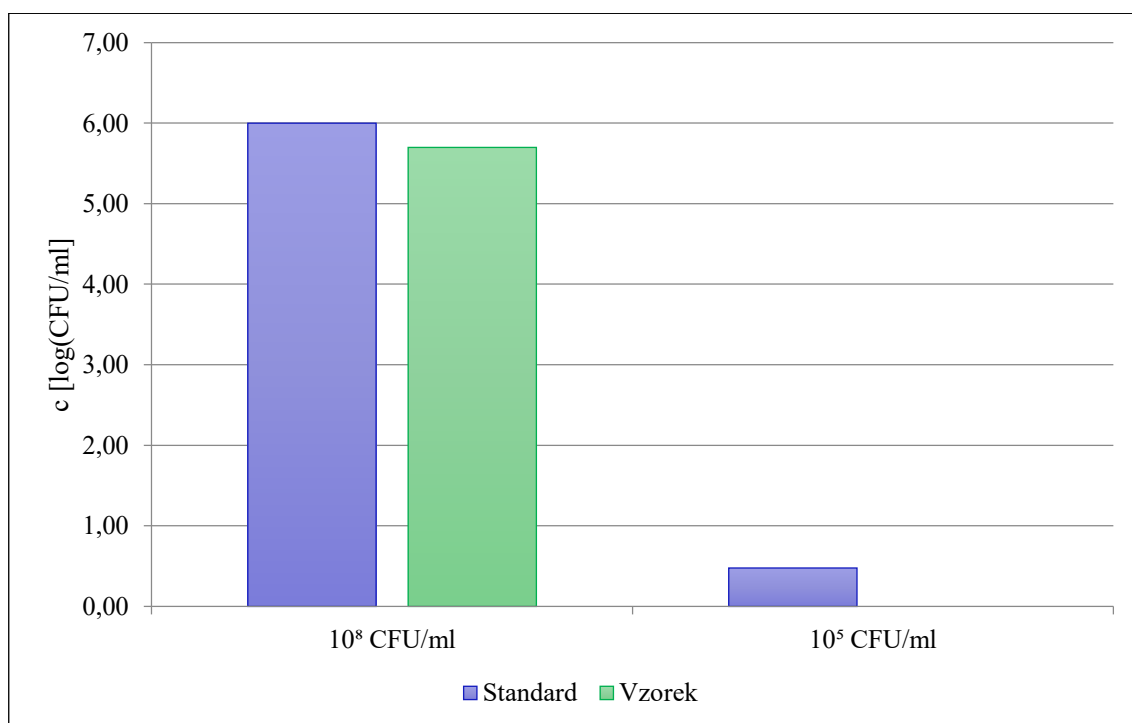
V příloze B jsou umístěny fotografie Petriho misek po inkubaci. V tab. B - 1 jsou fotografie kmene *Lactobacillus acidophilus*, v tab. B - 2 fotografie kmene *Lactobacillus casei*, v tab. B - 3 fotografie pro směs *L. acidophilus* a *L. casei* a v tab. B - 4 jsou fotografie bakterií fyziologické zubní mikroflóry. Bakteriální kmeny *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus* foceny nebyly.



Graf 1: Metoda AATCC 100, logaritmus počtu kolonií bakteriálních kmenů SS – *Streptococcus salivarius*, SM – *Streptococcus mutans*, AO – *Actinomyces odontolyticus*, LA – *Lactobacillus acidophilus* a LC – *Lactobacillus casei*, jejich směsí SS + SM + AO a LA + LC a fyziologické zubní mikroflóry, pro koncentraci aplikovaného inokula 10^5 CFU/ml, dobu jeho působení 2 h a kultivaci 24 h při 37 °C



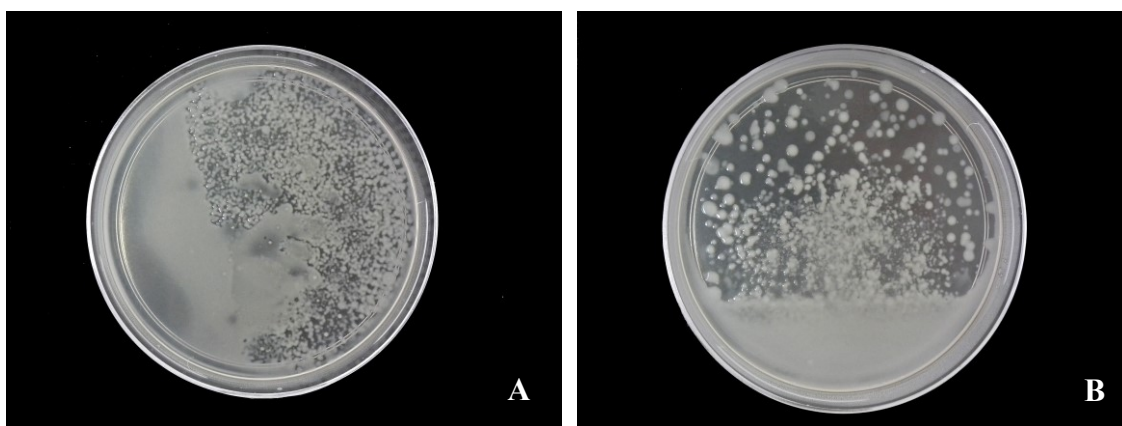
Graf 2: Metoda AATCC 100, logaritmus počtu kolonií bakteriálních kmenů SS – *Streptococcus salivarius*, SM – *Streptococcus mutans*, AO – *Actinomyces odontolyticus*, LA – *Lactobacillus acidophilus* a LC – *Lactobacillus casei*, jejich směsí SS + SM + AO a LA + LC, pro koncentraci aplikovaného inokula 10^3 CFU/ml, dobu jeho působení 2 h a kultivaci 24 h při 37 °C



Graf 3: Metoda AATCC 100, logaritmus počtu kolonií fyziologické zubní mikroflóry, pro koncentraci aplikovaného inokula 10^8 CFU/ml a 10^5 CFU/ml, dobu jeho působení 2 h a kultivaci 24 h

4.4 Mikrobiologie a biofilm

Po vyočkování bakteriálního inokula a 24 hodinové inkubaci byly narostlé kolonie spočítány a výsledky byly vyhodnoceny. Počet kolonií, který vyrostl na kultivační půdě určené pro test planktonických buněk, je zapsán v tab. 10 a pro metodu stěrů v tab. 11. Procentuální vyjádření v tabulkách (tab. 10 a tab. 11) pro bakteriální kmeny *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* určují přibližný odhad kolik procent kultivační půdy (MRS agaru) bylo pokryto bakteriemi. Kolonie nemohly být přesně spočítány, jelikož došlo k jejich přerůstání, tudíž vytvořily větší jednotlivé celky (Obrázek 16). *Actinomyces odontolyticus* – lesk v tab. 10 a tab. 11 je označení pro použití kovové destičky, která byla před nanesením antibakteriální vrstvy vyleštěna.



Obrázek 16: Test planktonických buněk *Lactobacillus acidophilus*: A – standard, B – vzorek (obrázek pro ilustraci chování bakteriálních kmenů *L. acidophilus* a *L. casei*) [zdroj: autorka]

Bylo také vypočítáno procento redukce bakterií R následujícím způsobem:

$$R = \frac{B - A}{B} \cdot 100 \quad (1)$$

Kde

A... množství obnovených buněk bakterií u upraveného vzorku s násobkem inokula a po požadované době inkubace

B... množství obnovených buněk bakterií u neupraveného vzorku s násobkem inokula a po požadované době inkubace

tab. 10: Test planktonických buněk - průměrný počet kolonií, který na kultivační půdě narostl po 24 h inkubaci při 37 °C; procento redukce bakterií

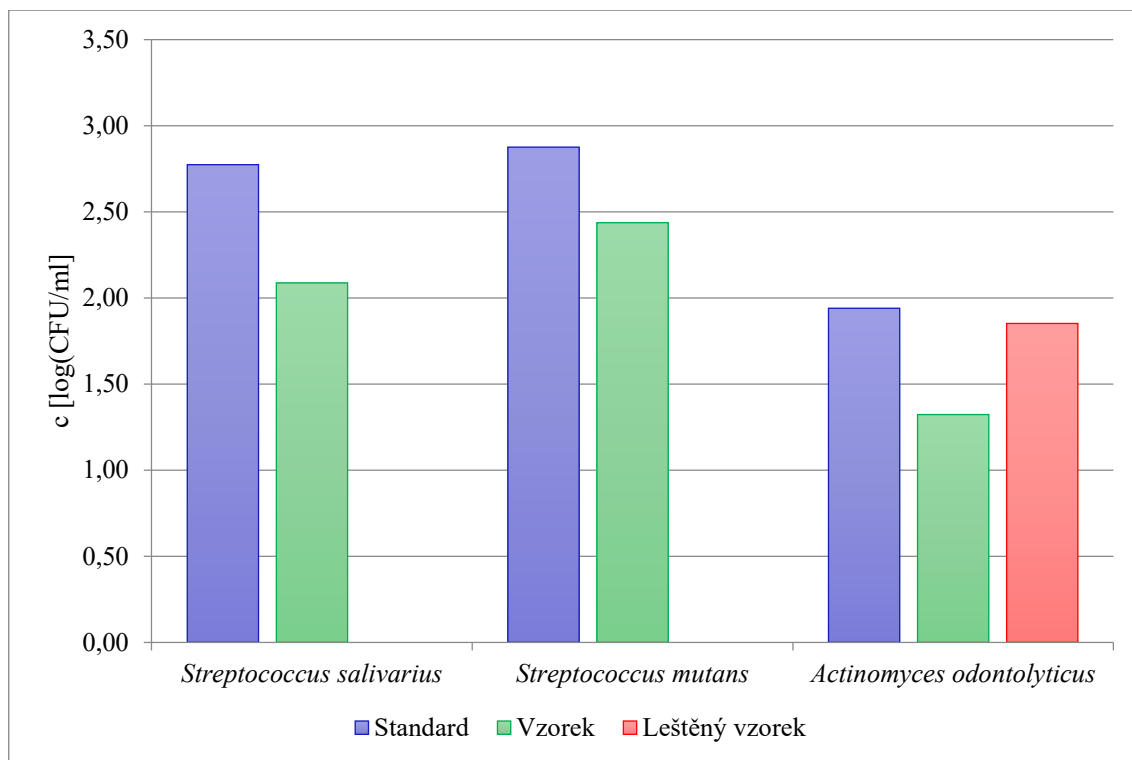
PLANKTONICKÉ BUŇKY	Standard ø	Vzorek ø	R [%]
<i>Streptococcus salivarius</i>	KV	KV	0
<i>Streptococcus mutans</i>	KV	KV	0
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	KV	KV	0
<i>Actinomyces odontolyticus</i> – lesk	KV	KV	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KV	50 %	50
<i>Lactobacillus casei</i>	80 %	65 %	18,75

tab. 11: Metoda stěry - průměrný počet kolonií, který na kultivační půdě narostl po 24 h inkubaci při 37 °C; logaritmus průměrného počtu narostlých bakterií; procento redukce bakterií

STĚRY	Standard		Vzorek		R [%]
	ø	log (CFU/ml)	ø	log (CFU/ml)	
<i>Streptococcus salivarius</i>	593	2,77	122	2,09	79,43
<i>Streptococcus mutans</i>	750	2,88	273	2,44	63,6
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	87	1,94	21	1,32	75,86
<i>A. odontolyticus</i> – lesk	87	1,94	71	1,85	18,39
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	45 %		70 %		55,56
<i>Lactobacillus casei</i>	40 %		60 %		50

Pro metodu stěry byl vypočten logaritmus počtu vyrostlých kolonií pro bakteriální kmeny *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* a *Actinomyces odontolyticus* (Graf 4). Logaritmus počtu vyrostlých kolonií pro bakteriální kmeny *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei*, nebyl zobrazen v grafu, z důvodů procentuálního vyjádření plochy kultivační půdy osídlené koloniemi bakterií, nikoliv jejich počtů.

V příloze B jsou umístěny fotky Petriho misek po inkubaci. V tab. B - 5 jsou fotografie pro metodu stěry a v tab. B - 6 jsou fotografie pro test planktonických buněk.



Graf 4: Metoda stěry - logaritmus počtu kolonií bakteriálních kmenů *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus*, který na krevním agaru narostl po 24 h kultivaci při 37 °C

5 DISKUZE

Byl vytvořen antibakteriální sol na bázi hybridního polymeru vzniklým reakcí 3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylátu (TMSPM) s tetraethyl orthosilikátem (TEOS) s přidavkem rozpustných solí stříbra, mědi a zinku metodou sol-gel. Tento sol byl nanesen na podložní skla a kovové destičky metodou dip-coating. Rychlost tažení byla 6 cm/min. Vrstva byla dále testována z hlediska mechanické odolnosti. Byl určen kontaktní úhel smáčení a také byly provedeny mikrobiologické testy a testy průkazu biofilmu, které sloužily ke stanovení antibakteriálních vlastností vrstvy.

Mechanické vlastnosti byly zkoumány pro čtyři vzorky hybridních vrstev AD30 s různou rychlostí tažení. Nanotvrdost stanovená vtiskovou zkouškou byla pro všechny vrstvy, kromě té nejtenčí, kde se mohla projevit velmi malá tloušťka vrstvy, konstantní. Pro vrstvu nataženou rychlostí 6 cm/min tvrdost odpovídá hodnotě 1,8 GPa. Z naměřených dat však vyplývá, že redukovaný model pružnosti E_r silně závisí na tloušťce vrstvy, s růstem tloušťky vrstvy silně klesá. Pro vrstvu nataženou rychlostí 6 cm/min E_r odpovídá hodnotě 49 GPa. V případě hodnoty E_r nemáme z literatury porovnání a jeho význam se projeví až při porovnání s vlastnostmi obdobných vrstev při dalších testech.

Vrypovou zkouškou bylo pozorováno pouze postupné proškrábnutí vrstvy, k praskání nebo odtržení vrstvy nedocházelo. Počátek plastické deformace vrstvy natažené rychlostí 6 cm/min byl určen hodnotou první kritické síly na 42 mN. K proškrábnutí této vrstvy došlo při hodnotě druhé kritické síly 69 mN. Z porovnání dat pro jednotlivé vrstvy vyplývá, že tloušťka vrstvy není kritickou hodnotou pro její praktické použití a že adheze vrstvy na kovovém povrchu je vynikající.

Kontaktní úhel smáčení byl měřen jak na vrstvě nanesené na podložní sklo, tak také na kovové destičce. Na kovové destičce dosáhl hodnoty 113° což znamená, že vrstva nanesená na kovovou destičku je hydrofobní. Naměřený kontaktní úhel na vrstvě nanesené na podložní sklo byl menší (75°). Přestože se kontaktní úhel naměřený na vrstvě nanesené na podložní sklo nenachází v hydrofobní oblasti, nedochází k dokonalému smáčení povrchu. Hydrofobicita vrstvy je bezpochyby jeden z faktorů, který také přispívá k jejím antibakteriálním schopnostem, a to proto, že hydrofobní vlastnosti snižují adhezi mikroorganismů na povrchu, a tudíž dochází ke snížení kumulace biofilmu.

Co se týče antibakteriálních testů, nejprve bylo potřeba ověřit, jak se vrstva chová vůči mikroorganismům, které tvoří zubní biofilm. Byly vybrány bakteriální kmeny *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei*. Testy byly provedeny kvantitativní metodou AATCC 100 a metodou otiskovou. Nejprve bylo potřeba optimalizovat koncentraci aplikovaného bakteriálního inokula a dobu jeho působení. Po prvních testech s použitím koncentrace inokula 10^8 CFU/ml a doby působení 30 min, byla koncentrace optimalizována na hodnotu 10^5 a 10^3 CFU/ml a doba působení na 2 hodiny.

Metodou AATCC 100 bylo prokázáno, že antibakteriální vrstva je různě účinná. Největší redukce počtu bakterií byla pozorována pro bakteriální kmen *Actinomyces odontolyticus*, která dosáhla pro obě koncentrace inokula 10^5 a 10^3 CFU/ml hodnot vyšších než 75 %. Redukce počtu bakterií kmene *Lactobacillus acidophilus* při použití inokula o koncentraci 10^5 CFU/ml byla 50 % a u použití inokula o koncentraci 10^3 CFU/ml byla redukce počtu bakterií dokonce 92 %. U ostatních bakteriálních kmenů se redukce počtu bakterií pohybovala mezi 13–50 %. Redukce počtu bakterií pro směs *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* a *Actinomyces odontolyticus* byla 24 % při koncentraci 10^5 CFU/ml, u koncentrace inokula 10^3 CFU/ml však prokázána nebyla. Pro směs *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* dosáhla redukce počtu bakterií při koncentraci 10^5 CFU/ml 33 % a při koncentraci 10^3 CFU/ml 29 %.

Chování vrstvy vůči bakteriím fyziologického zubního biofilmu bylo také zkoumáno použitím metody AATCC 100. Koncentrace použitého inokula byly 10^8 CFU/ml a 10^5 CFU/ml a doba působení inokula byla 2 hodiny. Redukce počtu bakterií při koncentraci 10^8 CFU/ml byla 50 % při použití inokula s koncentrací 10^5 CFU/ml dosáhla dokonce 100 %.

Výsledky metody otisků, jsou obtížně interpretovatelné, z důvodu malého počtu bakteriálních kolonií, které na kultivační půdě vyrostly jak po otisku na standardu tak také na vzorku.

Po zjištění chování antibakteriální vrstvy vůči jednotlivým bakteriálním kmenům, jejich směsí a fyziologickému zubnímu biofilmu, přišlo na řadu testování schopnosti daného mikroorganismu tvořit na vrstvě biofilm. Tyto testy probíhaly s vrstvami nanesenými na kovové destičky. Destičky byly umístěny do BHI do kterého bylo předem umístěno pět

bakteriálních kolonií a 24 h inkubováno. Destičky byly v BHI ponechány 72 hodin při teplotě 37 °C a poté proběhly testy planktonických buněk a stěry.

Pro všechny bakteriální kmeny kromě *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* byly po testech planktonických buněk Petriho misky s kultivační půdou, jak pro vzorek, tak pro standard, osídleny kompaktním výsevem bakterií. U bakteriálního kmene *Lactobacillus acidophilus* byl počet vyrostlých kolonií u vzorku o 50 % nižší než u standardu. U bakteriálního kmene *Lactobacillus casei* bylo u vzorku o 19 % méně bakteriálních kolonií nežli na standardu.

U metody stěrů se redukce počtu bakterií pohybovala mezi 63–80 % pro bakteriální kmeny *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* a *Actinomyces odontolyticus*. Avšak vrstva nanesená na leštěné destičce prokázala redukci počtu bakterií *Actinomyces odontolyticus* pouze 18 %. Tento výsledek je v rozporu s teorií (i se získanými výsledky na neleštěných substrátech), která říká, že čím je povrch hladší, tím je adheze mikroorganismů nižší. Při aplikaci antibakteriálního solu a jeho tepelné polymeraci, pravděpodobně došlo ke změnám, které se projeví negativně na biologických vlastnostech nanovrstvy. Tento efekt je velmi zajímavý, a proto bude dále studován v diplomové práci přesto, že se nepředpokládá, že by byly substráty pro jednotlivé díly rovnátek, leštěny.

U bakteriálních kmenů *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* redukce počtu bakterií prokázána nebyla, u vzorku byl pozorován cca 50% nárůst počtu bakteriálních kolonií vzhledem ke standardu, tento výsledek je však pouze přibližný z důvodů obtížného určení počtu narostlých kolonií. Je to možná způsobeno také tím, že na vzorku bylo více biofilmu, který byl přichycený na povrchu, než na standardu, a proto se nevyplavilo více planktonických buněk, ale zůstalo jich více přichycených na povrchu vzorku. Menší počet planktonických buněk mohl být způsoben také tím, že se testované bakterie v biofilmu nemnožily dostatečně rychle.

6 ZÁVĚR

Bylo prokázáno, že antibakteriální vrstva má různou účinnost k jednotlivým vybraným bakteriálním kmenům a k jejich směsím. Dle získaných výsledků lze konstatovat, že inhibuje růst jednotlivých bakteriálních kmenů a zamezuje tvorbě biofilmu. Dosažené výsledky jsou unikátní a jedinečné, avšak výzkum chování vrstvy je stále na začátku a bude nutné provést další testy.

Pro následující výzkum bude pokračováno ve spolupráci se Stomatologickou klinikou 1. LF UK a VFN Univerzita Karlova Praha. Antibakteriální vrstva bude podrobena dalšímu testování mikrobiálního biofilmu – planktonické buňky a stěry u bakteriálních kmenů *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei*. Protože biofilm není tvořen pouze jednotlivými bakteriálními kmeny, ale vždy jejich směsí, budou tyto biofilmové směsi testovány a rozšířeny o další bakteriální kmeny. Testy budou rozšířeny i barvením biofilmu k určení biofilm pozitivních a biofilm negativních bakteriálních kmenů pomocí Christensenovy metody.

Z hlediska mechanické odolnosti vrstvy bude pozornost věnována počtu simulovaných čistících cyklů a druhu použité zubní pasty. Výběr zubních past by měl zahrnovat hlavně ty druhy past, které jsou primárně doporučovány uživatelům ortodontických pomůcek.

V neposlední řadě by mělo dojít k testům postupného uvolňování iontů z vrstvy. Bude simulována ústní tekutina (sliny) a v navrženém časovém horizontu bude studováno uvolňování iontů a doba účinnosti nanovrstvy.

Porovnání vlastností antibakteriální nanovrstvy AD30 se současným stavem vrstev, které jsou schopny odolávat zubnímu biofilmu, viz kapitola 2.8, není jednoduché z důvodu odlišných metod zkoumání vlastností. Co se týče tvrdosti antibakteriální vrstvy AD30 (1,8 GPa) je menší nežli tvrdost vrstvy Ag-Pt 270 HV, což je v přepočtu 2,65 GPa. Kontaktní úhel byl změřen u vrstvy PTFE (120°) a vrstvy z organosilanů, kde záleželo, zda nerezová destička byla před nanesením vrstvy opískovaná nebo ne. U opískované destičky byl kontaktní úhel 122,6° u neopískované 107,4°, u této vrstvy bylo také zjištěno, že retence biofilmu exponenciálně klesá se vzrůstající hodnotou kontaktního úhlu. Kontaktní úhel vrstvy AD30 nanesené na nerezovou destičku byl 113° což se nachází v rozmezí kontaktních úhlu vrstvy PTFE a vrstvy organosilanů na

neopískované nerezové destičce. Vzhledem k odlišným metodám mikrobiologických testů nelze zcela přesně porovnat antibakteriální vlastnosti vrstvy AD30 s vrstvami, jejichž vlastnosti jsou zkoumány v kapitole 2.8.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

- [1] DOKLÁDAL, Milan. *Anatomie zubů a chrupu*. Brno: Masarykova univerzita, 1994. ISBN 978-80-210-0999-8.
- [2] ČIHÁK, Radomír, Miloš GRIM, Rastislav DRUGA, Milan MED a Ivan HELEKAL. *Anatomie 2*. Praha: Grada, 2002. ISBN 978-80-7169-970-5.
- [3] MARSH, Philip a Michael MARTIN. *Oral microbiology*. 5th ed. Edinburgh ; New York: Elsevier, 2009. ISBN 978-0-443-10144-1.
- [4] FENTRESS, Sam. *Lidský zub* [online]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=575615>
- [5] Os Dentes. *Anatomia Online* [online]. [vid. 2018-03-09]. Dostupné z: <https://www.anatomiaonline.com/dentes/>
- [6] KILIAN, Jan. *Prevence ve stomatologii*. Praha: Galén, 1999. ISBN 978-80-7184-976-6.
- [7] MARSH, Philip D., David A. HEAD a Deirdre A. DEVINE. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – Implications for treatment. *Journal of Oral Biosciences* [online]. 2015, **57**(4), 185–191. ISSN 1349-0079. Dostupné z: doi:10.1016/j.job.2015.08.002
- [8] HOLÁ, Veronika. Mikrobiální biofilmy 3. Biofilmová společenstva lidského těla a biofilmové infekce. *Živa*. 2012, **2012**(6), 271–275.
- [9] ELTER, Cornelius, Wieland HEUER, Anton DEMLING, Matthias HANNIG, Torsten HEIDENBLUT, Friedrich-Wilhelm BACH a Meike STIESCH-SCHOLZ. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2008, **23**(2), 327–334. ISSN 0882-2786.
- [10] ANHOURY, Patrick, Dan NATHANSON, Christopher V. HUGHES, Sigmund SOCRANSKY, Magda FERES a Laisheng Lee CHOU. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *The Angle Orthodontist* [online]. 2002, **72**(4), 338–343. ISSN 0003-3219. Dostupné z: doi:10.1043/0003-3219(2002)072<0338:MPOMAC>2.0.CO;2
- [11] STEJSKALOVÁ, Jitka. *Konzervační zubní lékařství*. Praha: Galén, 2008. ISBN 978-80-7262-540-6.
- [12] HORKAVCOVÁ, Diana, Pavel NOVÁK, Iva FIALOVÁ, Martin ČERNÝ, Eva JABLONSKÁ, Jan LIPOV, Tomáš RUML a Aleš HELEBRANT. Titania sol-gel coatings containing silver on newly developed TiSi alloys and their antibacterial effect. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **76**(Supplement C), 25–30. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.02.137

- [13] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén, 2005. ISBN 978-80-7262-341-9.
- [14] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4207-0.
- [15] PRCHALOVÁ, Jaroslava. *Mikroflóra dutiny ústní u ortodonticky léčených pacientů* [online]. Zlín. 2014. Dostupné z: <https://theses.cz/id/1919xe/>
- [16] *Streptococcus mutans* | bacterium. *Encyclopedia Britannica* [online]. [vid. 2018-03-06]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Streptococcus-mutans>
- [17] EDITOR. Probiotics *S. salivarius* K12 and *S. salivarius* M18 Strengthen Oral Health. *BioFoundations* [online]. 31. březen 2017 [vid. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://biofoundations.org/probiotics-s-salivarius-k12-s-salivarius-m18-strengthen-oral-health/>
- [18] *Lactobacillus acidophilus*. *Botica Magistral Informes* [online]. [vid. 2018-03-06]. Dostupné z: <http://www.botica.com.py/prospecto-digital/lactobacillus-acidophilus/>
- [19] *Lactobacillus casei* - Wuxi AccoBio Biotech Inc. [online]. [vid. 2018-03-06]. Dostupné z: <http://www.accobio.com/product.asp?id=212&classid=14>
- [20] NULL, Last edited. *Actinomyces odontolyticus* Bacteria, the pathogen of Actinomycosis. TEM. *Getty Images* [online]. [vid. 2018-03-06]. Dostupné z: <https://www.gettyimages.com/detail/photo/actinomyces-odontolyticus-bacteria-the-high-res-stock-photography/145094969>
- [21] KOŤOVÁ, Magdalena. *Snímací ortodontické přístroje*. Praha: Grada, 1999. ISBN 978-80-7169-822-7.
- [22] KAMÍNEK, Milan. *Ortodoncie*. Praha: Galén, 2014. ISBN 978-80-7492-112-4.
- [23] VANCOUVER ORTHODONTICS. *Retainer* [online]. Dostupné z: <https://www.vancouverorthodontics.com/site/retainer-expander-instructions>
- [24] Metal Braces. *The Look Orthodontics* [online]. 7. září 2015 [vid. 2018-03-06]. Dostupné z: <https://thelookortho.com.au/metal-braces/>
- [25] CATAURO, M., F. BOLLINO, F. PAPALE a S. VECCHIO CIPRIOTI. Investigation on bioactivity, biocompatibility, thermal behavior and antibacterial properties of calcium silicate glass coatings containing Ag. *Journal of Non-Crystalline Solids* [online]. 2015, **422**(Supplement C), 16–22. ISSN 0022-3093. Dostupné z: doi:10.1016/j.jnoncrysol.2015.04.037
- [26] RYU, Hwang-Sog, In-Ho BAE, Kyung-Gu LEE, Hyeon-Shik HWANG, Ki-Heon LEE, Jeong-Tae KOH a Jin-Hyoung CHO. Antibacterial effect of silver-platinum coating for orthodontic appliances. *The Angle Orthodontist*. 2011, Vol. 82, No. 1, pp. 151-157. [online]. Dostupné z: doi:10.2319/021411-111.1

- [27] CHUN, Mi-Jin, Eunju SHIM, Eun-Hee KHO, Keum-Joo PARK, Jarang JUNG, Jin-Man KIM, Byunghoon KIM, Ki-Heon LEE, Dong-Lyun CHO, Dong-Hoon BAI, Syng-Ill LEE, Hyeon-Shik HWANG a Seung-Ho OHK. Surface modification of orthodontic wires with photocatalytic titanium oxide for its antiadherent and antibacterial properties. *The Angle Orthodontist* [online]. 2007, **77**(3), 483–488. ISSN 0003-3219. Dostupné z: doi:10.2319/0003-3219(2007)077[0483:SMOOWW]2.0.CO;2
- [28] CAO, Shuai, Bo LIU, Lingying FAN, Ziqi YUE, Bin LIU a Baocheng CAO. Highly antibacterial activity of N-doped TiO₂ thin films coated on stainless steel brackets under visible light irradiation. *Applied Surface Science* [online]. 2014, **309**(Supplement C), 119–127. ISSN 0169-4332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2014.04.198
- [29] KAMEGAWA, Takashi, Yuki SHIMIZU a Hiromi YAMASHITA. Superhydrophobic surfaces with photocatalytic self-cleaning properties by nanocomposite coating of TiO₂ and polytetrafluoroethylene. *Advanced Materials* [online]. 2012, **24**(27), 3697–3700. ISSN 1521-4095. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201201037
- [30] DEMLING, A., C. ELTER, T. HEIDENBLUT, Fr-W. BACH, A. HAHN, R. SCHWESTKA-POLLY, M. STIESCH a W. HEUER. Reduction of biofilm on orthodontic brackets with the use of a polytetrafluoroethylene coating. *European Journal of Orthodontics* [online]. 2010, **32**(4), 414–418. ISSN 0141-5387. Dostupné z: doi:10.1093/ejo/cjp142
- [31] BERG, Joel H. Glass ionomer cements. *Pediatric Dentistry*. 2002, **24**(5), 430–438. ISSN 0164-1263.
- [32] COUGHLAN, A., D. BOYD, C. W. I. DOUGLAS a M. R. TOWLER. Antibacterial coatings for medical devices based on glass polyalkenoate cement chemistry. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2008, **19**(12), 3555–3560. ISSN 0957-4530, 1573-4838. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-008-3519-x
- [33] OLIVEIRA, Adauê S., Marina R. KAIZER, Marina S. AZEVEDO, Fabrício A. OGLIARI, Maximiliano S. CENCI a Rafael R. MORAES. (Super)hydrophobic coating of orthodontic dental devices and reduction of early oral biofilm retention. *Biomedical Materials* [online]. 2015, **10**(6), 065004. ISSN 1748-605X. Dostupné z: doi:10.1088/1748-6041/10/6/065004
- [34] *Druhy nerezové oceli a příklady jejího užití* [online]. 30. leden 2015. Dostupné z: <http://www.fasteners-cz.cz/druhy-nerezove-oceli-priklady-jejeho-uziti>
- [35] OH, Keun-Taek, Sung-Uk CHOO, Kwang-Mahn KIM a Kyoung-Nam KIM. A stainless steel bracket for orthodontic application. *European Journal of Orthodontics* [online]. 2005, **27**(3), 237–244. ISSN 1460-2210, 0141-5387. Dostupné z: doi:10.1093/ejo/cji005
- [36] EXNAR, Petr, *Metoda sol-gel*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2006. ISBN 978-80-7372-063-6.

- [37] SARAVANAPAVAN, Priya a Larry L HENCH. Mesoporous calcium silicate glasses. I. Synthesis. *Journal of Non-Crystalline Solids* [online]. 2003, **318**(1), 1–13. ISSN 0022-3093. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-3093(02)01864-1
- [38] SCHMIDT, H. a M. MENNIG. The Sol-Gel Gateway :Tutorial on wet coating technologies [online]. [vid. 2018-03-08]. Dostupné z: <http://www.solgel.com/articles/Nov00/coating.htm>
- [39] TYRIONL. *English: Schematic drawing „Dip Coating of Sols”* [online]. 12. listopad 2008. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SolGel_DipCoating1.jpg
- [40] BUSSCHER, H. J., M. RINASTITI, W. SISWOMIHARDJO a H. C. VAN DER MEI. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *Journal of Dental Research* [online]. 2010, **89**(7), 657–665. ISSN 1544-0591. Dostupné z: doi:10.1177/0022034510368644
- [41] WAN, Y. Z., S. RAMAN, F. HE a Y. HUANG. Surface modification of medical metals by ion implantation of silver and copper. *Vacuum* [online]. 2007, **81**(9), 1114–1118. ISSN 0042-207X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vacuum.2006.12.011
- [42] KSTUDIO. ANALYSES ET SURFACE dispose maintenant d'un analyseur de tension de surface. *KEO6 - Fiabilité des Systèmes* [online]. 4. srpen 2016 [vid. 2018-04-12]. Dostupné z: <http://keo6.com/analyses-surface-dispose-dun-analyseur-de-tension-de-surface/>
- [43] ČTVRTLÍK, R., J. TOMÁŠTÍK a P. SCHOVÁNEK. *Testování mechanických vlastností hybridních tenkých vrstev na ocelových substrátech [Zpráva č. 561/SLO/2018]*. Olomouc: Společná laboratoř optiky UP a FZÚ AV ČR Olomouc. 2018.
- [44] ČESKÁ SBÍRKA MIKROORGANISMŮ. *Otevírání a oživování lyofilizovaných kultur* [online]. Brno.: Masarykova univerzita Přírodovědecká fakulta Ústav experimentální biologie. Dostupné z: http://www.sci.muni.cz/ccm/download/IP-79_oziv_LYO.pdf
- [45] DATCHEVA, Maria, Sabina CHERNEVA, Maria STOYCHEVA, Roumen IANKOV a Dimitar STOYCHEV. Determination of anodized aluminum material characteristics by means of nano-indentation measurements. *Materials Sciences and Applications* [online]. 2011, **02**(10), 1452–1464. ISSN 2153-117X, 2153-1188. Dostupné z: doi:10.4236/msa.2011.210196

PŘÍLOHY

A Obsah přiloženého CD

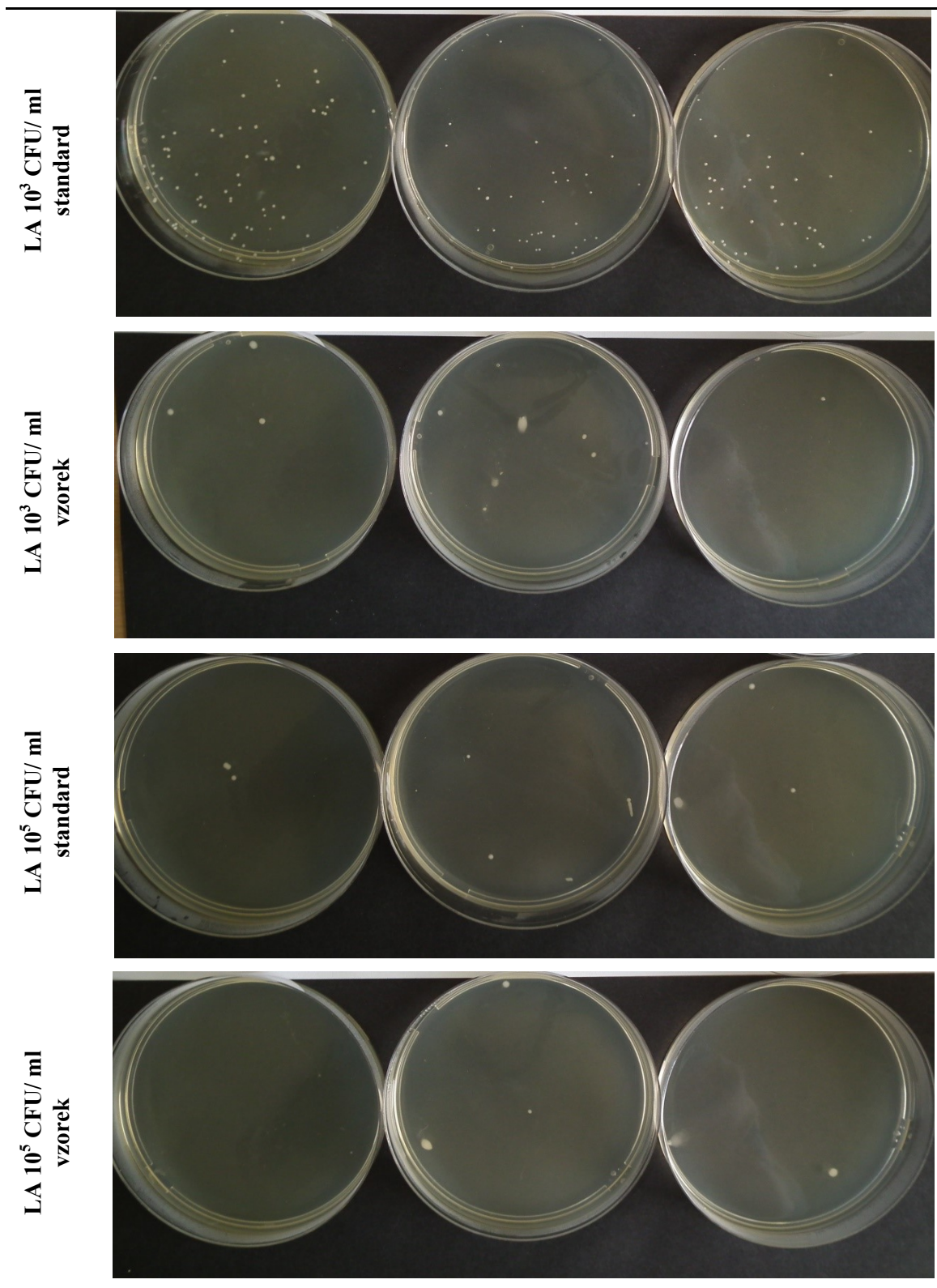
Text bakalářské práce:

BP_2018_Eva_Roikova.pdf

B Fotodokumentace

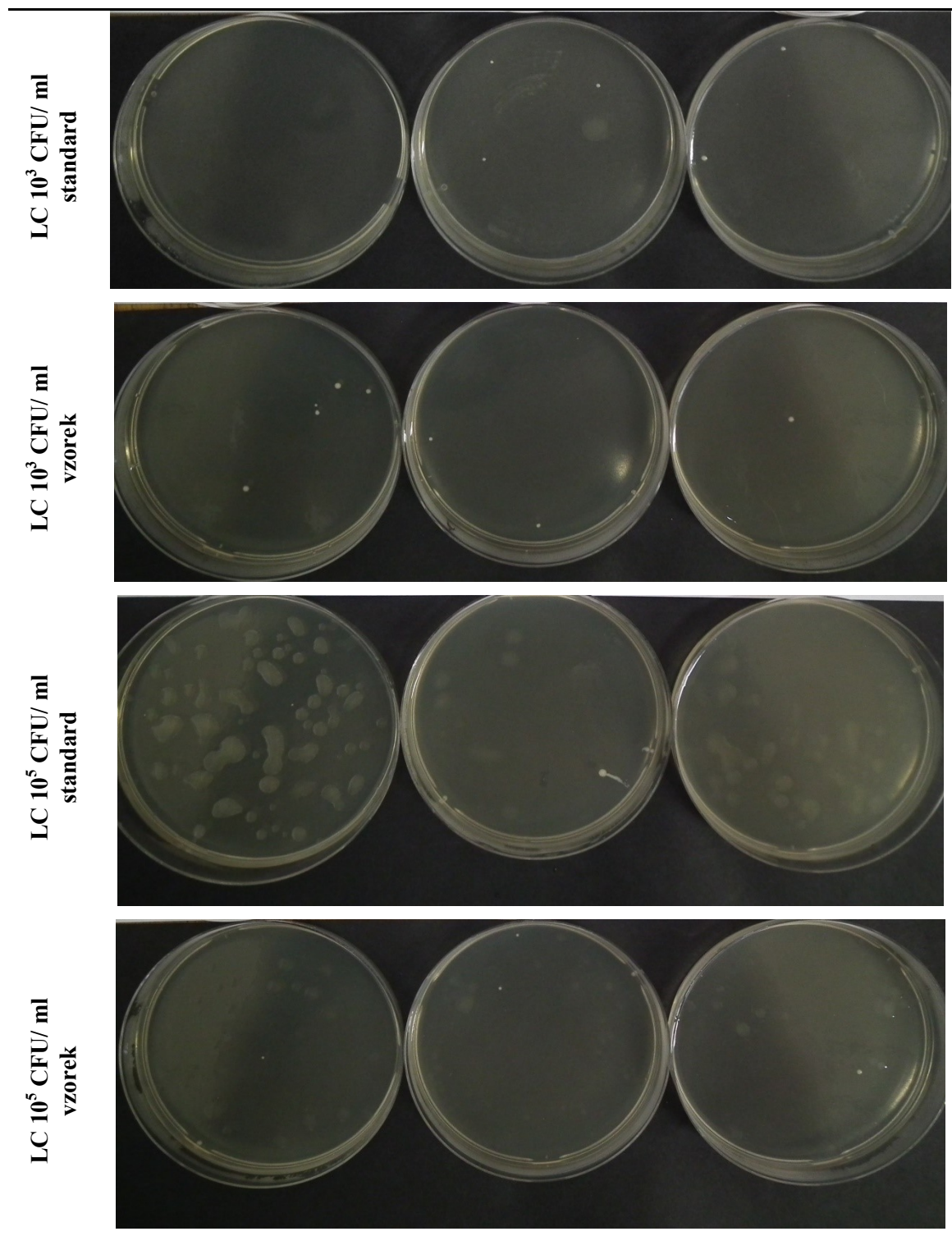
tab. B - 1: Metoda AATCC 100; fotografie kmene *Lactobacillus acidophilus* koncentrace aplikovaného inokula 10^3 a 10^5 CFU/ml

AATCC 100 – *Lactobacillus acidophilus*



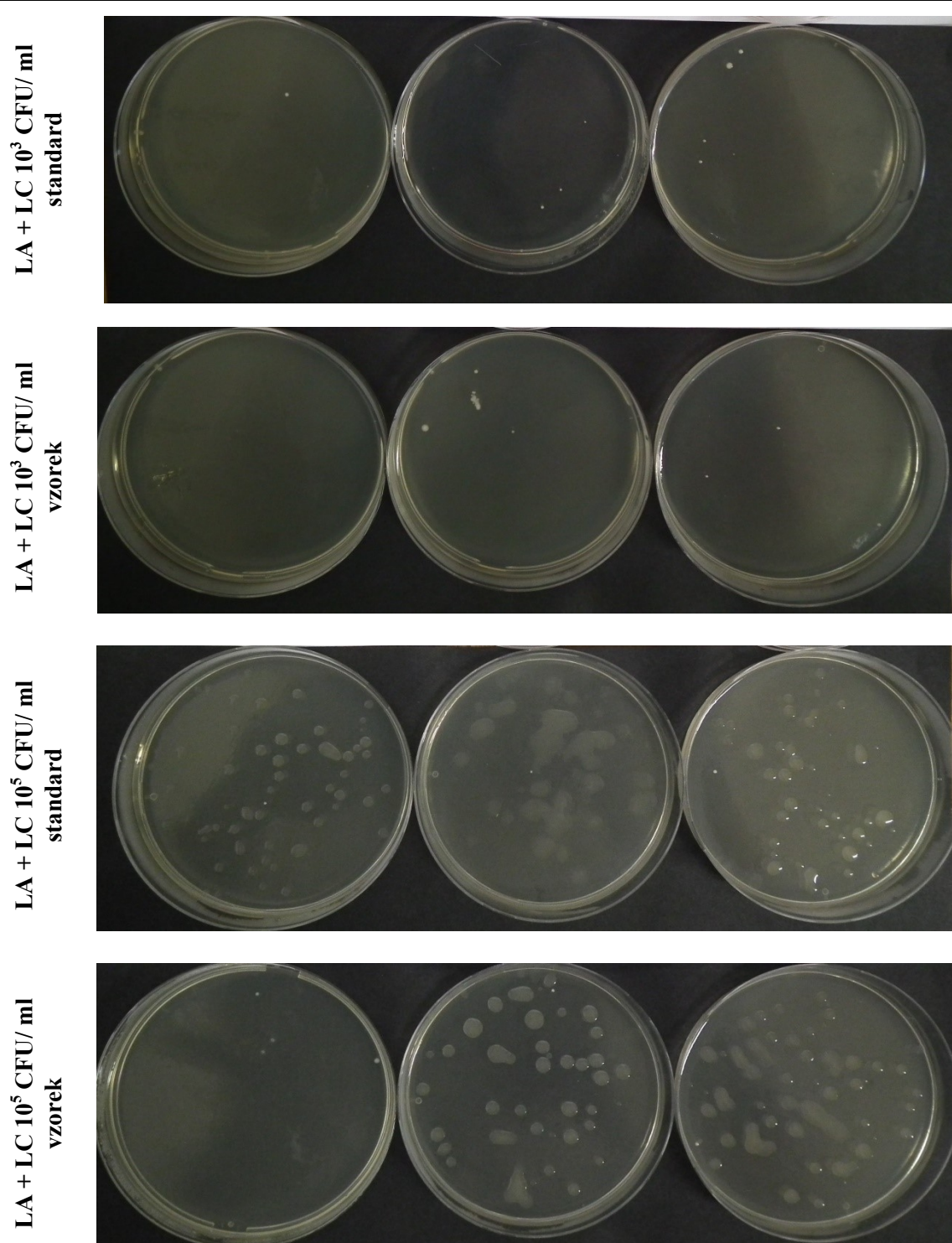
tab. B - 2: Metoda AATCC 100; fotografie kmene *Lactobacillus casei* koncentrace aplikovaného inokula 10^3 a 10^5 CFU/ml

AATCC 100 – *Lactobacillus casei*



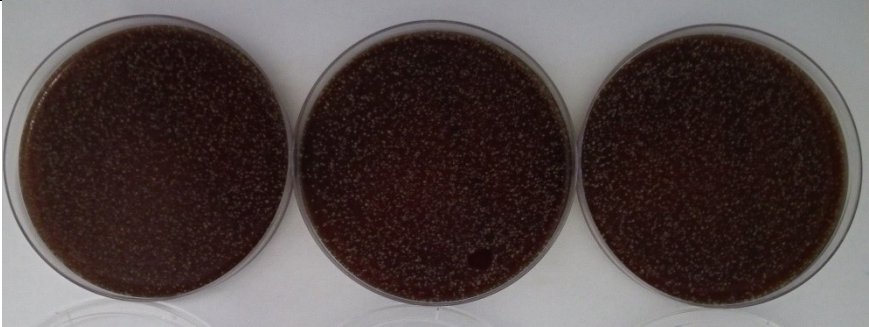
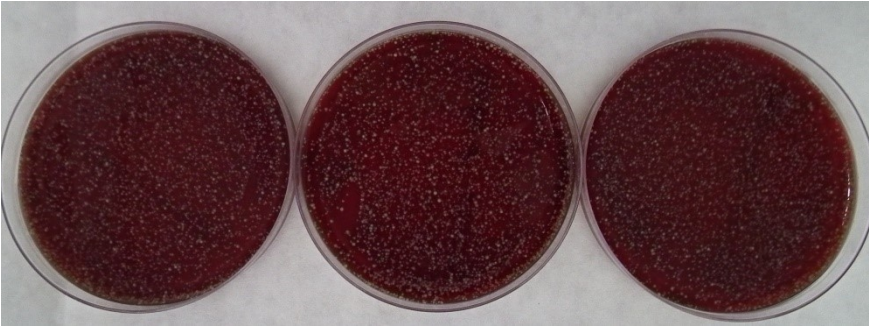
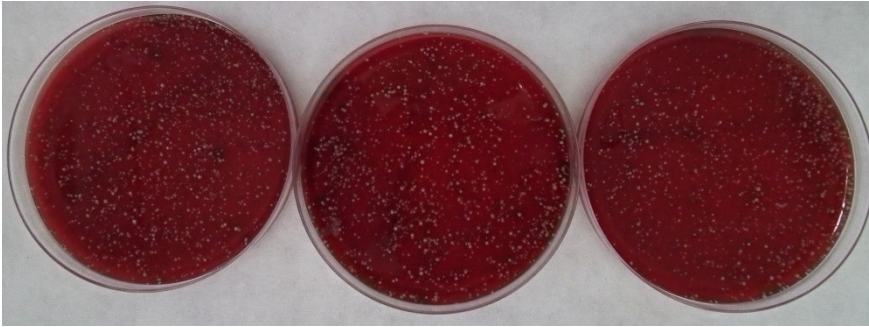
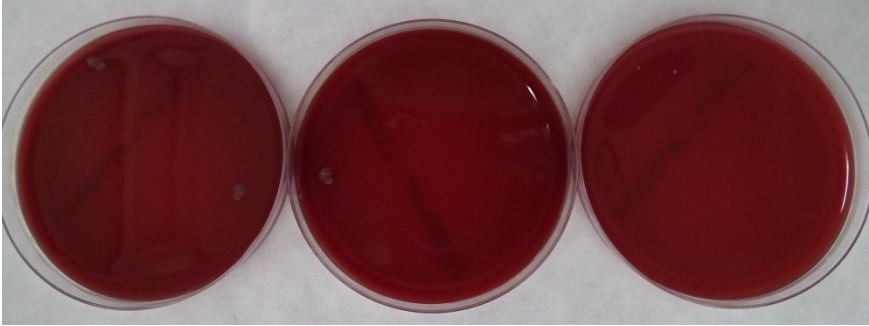
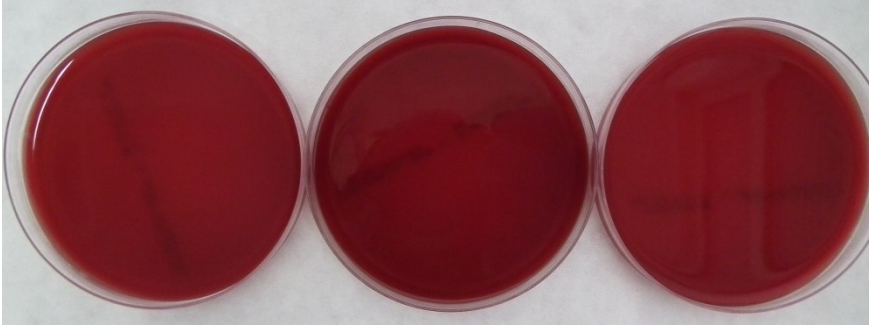
tab. B - 3: Metoda AATCC 100; fotografie směsi *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* koncentrace aplikovaného inokula 10^3 a 10^5 CFU/ml

AATCC 100 – směs *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei*

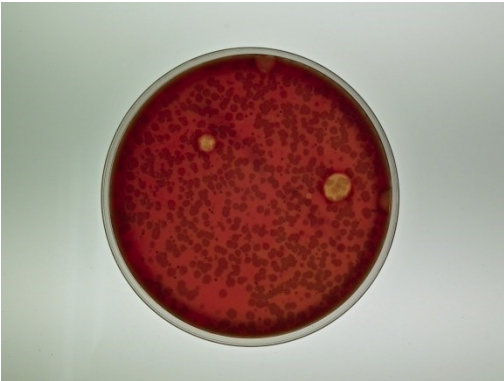
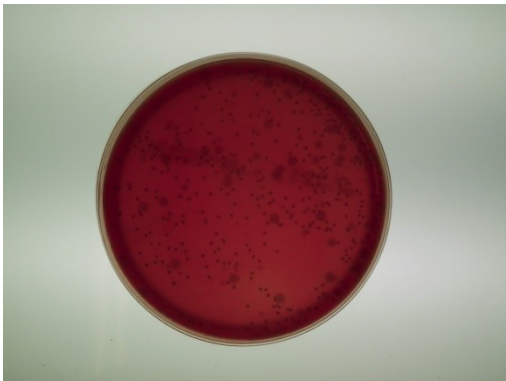
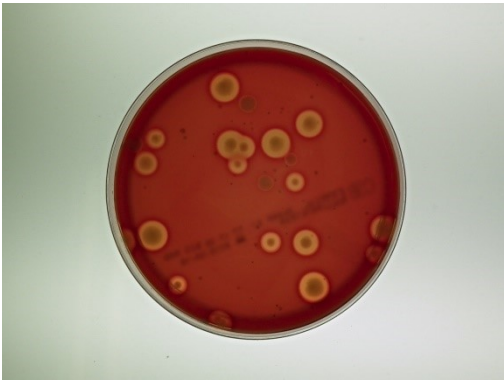
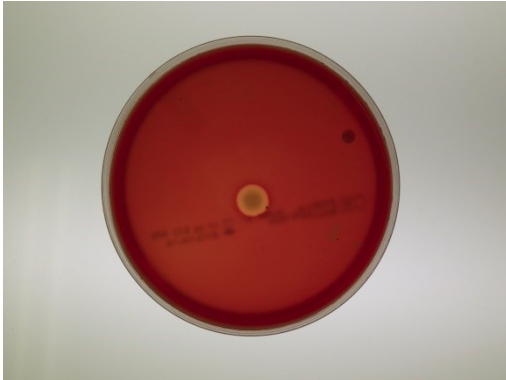
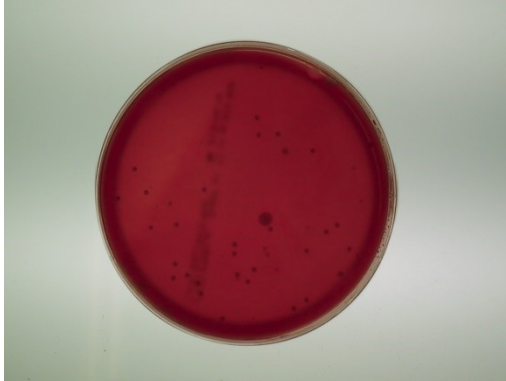


tab. B - 4: Metoda AATCC 100; fotografie bakterií fyziologické zubní mikroflóry koncentrace aplikovaného inokula 10^5 a 10^8 CFU/ml

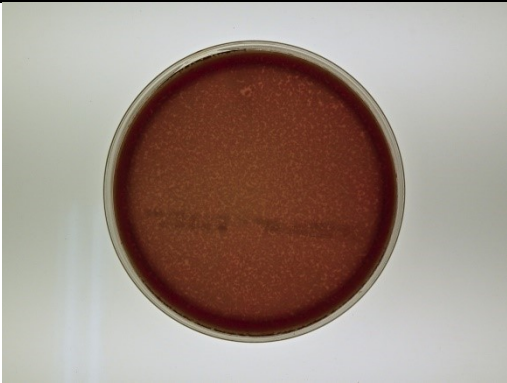
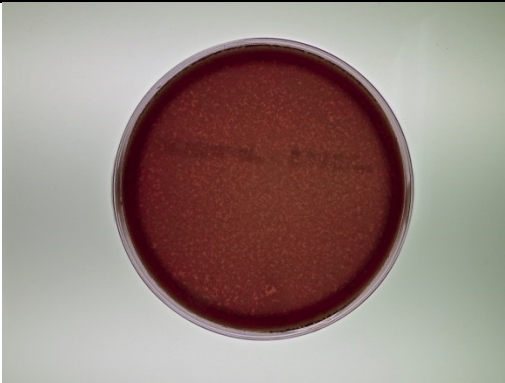
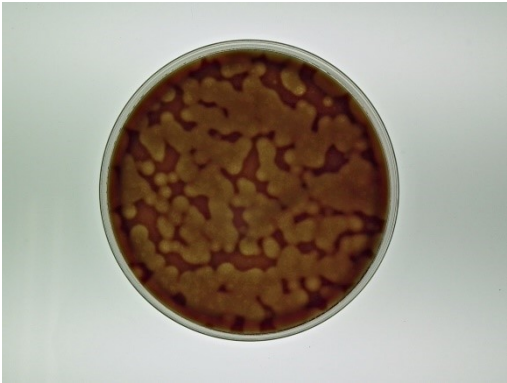
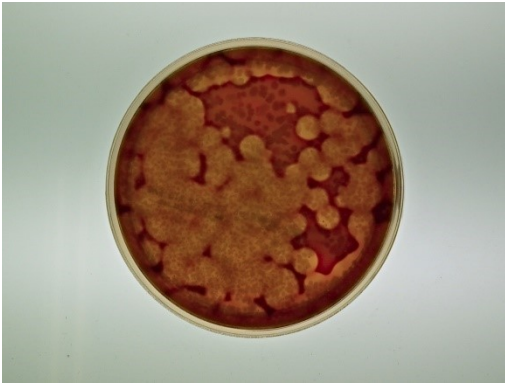
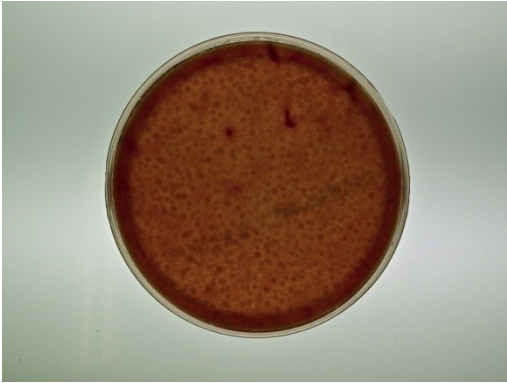
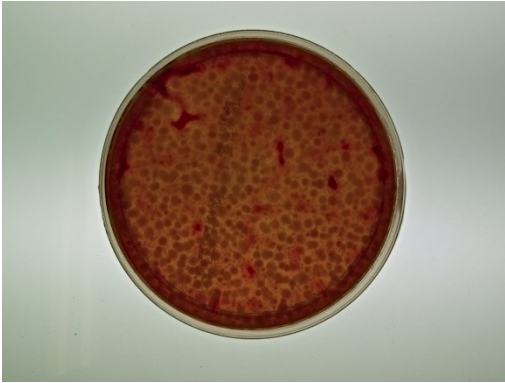
AATCC 100 – Fyziologická zubní mikroflóra

Výtěr povrchu zubů	
10^8 CFU/ml standard	
10^8 CFU/ml vzorek	
10^5 CFU/ml standard	
10^5 CFU/ml vzorek	

tab. B - 5: Biofilm, metoda testování stěry; fotografie bakteriálních kmenů *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* a *Actinomyces odontolyticus*

	Standard	Vzorek
<i>Streptococcus salivarius</i>		
<i>Streptococcus mutans</i>		
<i>Actinomyces odontolyticus</i>		
<i>Actinomyces odontolyticus</i> – leštěný vzorek		

tab. B - 6: Biofilm, metoda testování planktonických buněk; fotografie bakteriálních kmenů *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* a *Actinomyces odontolyticus*

	Standard	Vzorek
<i>Streptococcus salivarius</i>		
<i>Streptococcus mutans</i>		
<i>Actinomyces odontolyticus</i>		
<i>Actinomyces odontolyticus</i> – leštěný vzorek		