

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta elektrotechnická

Katedra teorie obvodů



Antibakteriální vlastnosti oxidu zinečnatého

Antibacterial properties of the zinc oxid

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vypracoval: Magdalena Schreierová
Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Jíra CSc.
Rok: 2022

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Schreierová** Jméno: **Magdalena** Osobní číslo: **491931**
Fakulta/ústav: **Fakulta elektrotechnická**
Zadávající katedra/ústav: **Katedra teorie obvodů**
Studijní program: **Lékařská elektronika a bioinformatika**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Antibakteriální vlastnosti oxidu zinečnatého

Název bakalářské práce anglicky:

Antibacterial properties of the zinc oxide

Pokyny pro vypracování:

Oxid zinečnatý a jeho nanočástice patří mezi materiály se širokou škálou uplatnění díky svým dobrým antibakteriálním vlastnostem a zároveň dobrou biokompatibilitou. Velikost a tvar těchto nanočástic mají významný vliv na antibakteriální vlastnosti. Prozkoumat tyto vlastnosti v závislosti na velikosti a koncentraci nanočástic bude úkolem této práce.

1. Prostudujte doporučenou literaturu a vypracujte přehled stavu problematiky.
2. Prozkoumejte biocidní vlastnosti různých typů nanočástic oxidu zinečnatého (ZnO) pomocí UV-VIS spektroskopie v reálném čase v absorbančním módu vůči bakteriím *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*.
3. Proveďte experimenty s proměnnými parametry jako je inkubace bakterií za tmy, za světla při různých vlnových délkách a pro různé koncentrace nanočástic.
4. Zpracujte a analyzujte výsledky.

Seznam doporučené literatury:

A. Sirelkhatim, S. Mahmud et al.: Nano-Micro Lett. (2015) 7(3):219–242, doi: 10.1007/s40820-015-0040-x
C. Wang, L. Liu et al.: African Journal of Biotech. Vol. 11(44), pp. 10248-10254,; doi: 10.5897/AJB11.3703
O. Zakharova, E. Kolesnikov et al.: Earth and Environmental Science 226 (2019) 012062, doi: 10.1088/1755-1315/226/1/012062

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

Ing. Jaroslav Jíra, CSc. katedra fyziky FEL

Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **24.01.2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **20.05.2022**

Platnost zadání bakalářské práce: **30.09.2023**

Ing. Jaroslav Jíra, CSc.
podpis vedoucí(ho) práce

doc. Ing. Radoslav Bortel, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

prof. Mgr. Petr Páta, Ph.D.
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Studentka bere na vědomí, že je povinna vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v bakalářské práci.

Datum převzetí zadání

Podpis studentky

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla veškeré použité informační zdroje v souladu s Metodickým pokynem o dodržování etických principů při přípravě vysokoškolských závěrečných prací.

V Praze dne

.....
Magdalena Schreierová

Poděkování

Děkuji vedoucímu práce Ing. Jaroslavu Jírovi Csc. za neocenitelné rady a pomoc při tvorbě bakalářské práce.

Magdalena Schreierová

Název práce:

Antibakteriální vlastnosti oxidu zinečnatého

Autor: Magdalena Schreierová

Studijní program: Lékařská elektronika a bioinformatika

Druh práce: Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Jíra CSc.

Abstrakt: Nanočástice oxidu zinečnatého (ZnO-NP) mají velký potenciál stát se novými antimikrobiálními produkty. Tato bakalářská práce zkoumá inaktivaci gram-pozitivních a gram-negativních bakterií v prostředí ZnO-NP za různých podmínek. V praktické části studuje vliv různých koncentrací ZnO-NP a vliv prostředí tma-světlo na antibakteriální aktivitu ZnO-NP. Práce zahrnuje základní informace o oxidu zinečnatém a vlastnostech daných mikroorganismů.

Klíčová slova: oxid zinečnatý, nanočástice, antibakteriální aktivita, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, optická hustota

Title:

Antibacterial properties of the zinc oxid

Author: Magdalena Schreierová

Abstract: Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) have great potential to become new antimicrobial products. This bachelor thesis deals with the inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria in ZnO-NPs under different conditions. In the practical part, the effect of different concentrations of ZnO-NPs and the effect of dark-light environment on the antibacterial activity of ZnO-NPs were investigated. The thesis includes background information on zinc oxide and the properties of the microorganisms in question.

Key words: zinc oxide, nanoparticles, antibacterial activity, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, optical density

Obsah

Seznam použitých zkratk	ix
Seznam obrázků	x
Úvod	1
I Teoretická část	3
1 Mikrobiologie	5
1.1 Bakterie	5
1.1.1 Struktura bakterií	5
1.1.2 Gramovo dělení bakterií	6
1.1.3 Růst bakterií	8
2 UV-VIS spektroskopie	9
2.1 Spektrofotometrie	9
2.1.1 Veličiny spektrofotometrie	10
2.2 UV-VIS spektrofotometr	11
3 Oxid zinečnatý	13
3.1 Velikost a tvar Oxidu Zinečnatého	13
3.2 Antibakteriální aktivita nanočástic ZnO	14
3.2.1 Morfologie ZnO	14
3.2.2 Velikost a koncentrace	14
3.2.3 Povrchové defekty	15
3.2.4 Fotokatalytické vlastnosti ZnO	15
3.3 Možné mechanismy antibakteriální aktivity	15
3.3.1 Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS)	15
3.3.2 Uvolňování Zinečnatých iontů ZnO ²⁺	16
3.3.3 Další možné mechanismy	17
3.4 Antibakteriální aktivita proti bakteriím <i>E. coli</i> a <i>S. aureus</i>	18
II Experimentální část	19
4 Metody a materiály	21
4.1 Materiály	21
4.2 Metody	21
4.2.1 Příprava vzorků	21
4.2.2 UV-VIS spektroskopie	22
4.3 Bioreaktor	25
4.3.1 Příprava vzorků	25

4.4	Kultivace bakterií v Petriho miskách	27
5	Výsledky	29
5.1	UV-VIS spektroskopie	29
5.1.1	<i>Escherichia coli</i>	29
5.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	31
5.1.3	Srovnání účinku na obě bakterie	32
5.2	Bioreaktor	33
5.2.1	<i>Escherichia coli</i> - koncentrace	33
5.2.2	Vliv viditelného světla	35
	Závěr	41
	Bibliografie	43

Seznam použitých zkratek

Zkratka	Význam
ROS	reaktivní formy kyslíku
OD	optická hustota
NP	nanočástice
ZnO-NP	nanočástice oxidu zinečnatého
MHB	Mueller Hintonův bujon
MHA	Mueller Hintonův agar
G+	gram-pozitivní
G-	gram-negativní
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
CFU	koncentrace kolonie formujících jednotek
<i>dH₂O</i>	demineralizovaná voda

Seznam obrázků

1.1	Struktura bakteriální buňky [2]	5
1.2	Buněčná stěna grampozitivních a gramnegativních bakterií [4]	6
1.3	<i>Staphylococcus aureus</i> [7]	7
1.4	Barevné skenování <i>Escherichie coli</i> , elektronový mikrofotografický snímek [8]	7
1.5	Růstová křivka bakterií [6]	8
2.1	Princip absorpčního spektrofotometru	9
2.2	Schéma spektrofotometru na bázi monochromátoru	11
3.1	a) internalizace NP do buňky, translokace. NP pronikají otvory, jamkami nebo výstupky v buněčné stěně. b) Schematické znázornění zhroubené buňky ukazující narušení buněčné stěny a vytlačení cytoplazmatického obsahu. c) Bakteriální buňka vykazující významné změny ve složení obalu (mírné invaginace a ztlustění buněčné stěny) a vytlačování cytoplazmy. d) Pravděpodobné mechanismy zahrnují následující: příjem kovových iontů do buněk; intracelulární vyčerpání a narušení replikace DNA; uvolnění kovových iontů a ROS; akumulace a rozpouštění NP v bakteriální membráně [1].	18
4.1	Epoch™ 2 Microplate Spectrophotometer	22
4.2	Matice vzorků mikrotitrační desky; -3 resp. -4 značí koncentraci bakterie 10^{-3} resp. 10^{-4} ; Písmena A-H značí daný typ vzorku (viz tabulka na obr. 4.3)	23
4.3	Tabulka koncentrací vzorků mikrotitrační desky	23
4.4	Ředění bakteriálních roztoků v poměru 1:10	24
4.5	Osobní reaktor RTS-1C, Biosan	25
4.6	Charakteristika spektra LED světla	26
4.7	Schéma ředění vzorku pomocí mikrozkušavek eppendorf	27
4.8	Počítačka kolonií	27
5.1	Ledenda ke grafům OD	29
5.2	Vývoj optické hustoty roztoků <i>E. coli</i> v koncentraci 10^{-3} v čase, vlnová délka 600 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD	29
5.3	Vývoj optické hustoty roztoků <i>E. coli</i> v koncentraci 10^{-3} v čase, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD	30
5.4	Vývoj optické hustoty roztoků <i>E. coli</i> v koncentraci 10^{-4} v čase, vlnová délka 600 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD	30

5.5	Vývoj optické hustoty roztoků <i>E. coli</i> v koncentraci 10^{-4} v čase, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD	30
5.6	Ledenda ke grafům OD	31
5.7	Vývoj optické hustoty roztoků bakterie <i>S. aureus</i> v koncentraci 10^{-3} v čase, vlnová délka 600 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD	31
5.8	Vývoj optické hustoty roztoků bakterie <i>S. aureus</i> v koncentraci 10^{-3} v čase, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD	31
5.9	Vývoj optické hustoty roztoků bakterie <i>S. aureus</i> v koncentraci 10^{-4} v čase, vlnová délka 600 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD	32
5.10	Vývoj optické hustoty roztoků bakterie <i>S. aureus</i> v koncentraci 10^{-4} v čase, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD	32
5.11	Vývoj optické hustoty roztoků bakterie <i>E. coli</i> v koncentraci 10^{-4} a ZnO-NP v čase, koncentrace ZnO-NP v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v legendě, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD	33
5.12	Kolonie bakterie <i>E. coli</i> po 24hodinové inkubaci; koncentrace ZnO-NP - 64 $\mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku	34
5.13	Kolonie bakterie <i>E. coli</i> po 24hodinové inkubaci; koncentrace ZnO-NP - 128 $\mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku	34
5.14	Kolonie bakterie <i>E. coli</i> po 24hodinové inkubaci; koncentrace ZnO-NP - 512 $\mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku	34
5.15	Kolonie bakterie <i>E. coli</i> po 24hodinové inkubaci; vzorek bez ZnO-NP; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku	34
5.16	Vývoj optické hustoty roztoků bakterie <i>E. coli</i> v koncentraci 10^{-4} v čase, Koncentrace ZnO ve vzorcích se ZnO je 512 $\mu\text{g/ml}$, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD	35
5.17	Kolonie bakterie <i>E. coli</i> po 24hodinové inkubaci; Reference pro tmou; bez ZnO-NP; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-7} vlevo a 10^{-8} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku	36
5.18	Kolonie bakterie <i>E. coli</i> po 24hodinové inkubaci; Tma; Koncentrace ZnO-NP 512 $\mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-7} vlevo a 10^{-8} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku	36
5.19	Kolonie bakterie <i>E. coli</i> po 24hodinové inkubaci; Reference pro světlo; bez ZnO-NP; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo, 10^{-7} uprostřed a 10^{-8} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku	36
5.20	Kolonie bakterie <i>E. coli</i> po 24hodinové inkubaci; Světlo; Koncentrace ZnO-NP 512 $\mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku	36

-
- 5.21 Vývoj optické hustoty roztoků bakterie *S. aureus* v koncentraci 10^{-4} v čase; Koncentrace ZnO ve vzorcích se ZnO je $512 \mu\text{g/ml}$, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD 37
- 5.22 Kolonie bakterie *S. aureus* po 24hodinové inkubaci; Reference pro světlo; bez ZnO-NP; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku 38
- 5.23 Kolonie bakterie *S. aureus* po 24hodinové inkubaci; Světlo; Koncentrace ZnO-NP $512 \mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-1} ; vlevo dole počet kolonií ve vzorku 38
- 5.24 Kolonie bakterie *S. aureus* po 24hodinové inkubaci; Reference pro tmou; bez ZnO-NP; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku 38
- 5.25 Kolonie bakterie *S. aureus* po 24hodinové inkubaci; Tma; Koncentrace ZnO-NP $512 \mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-1} vlevo a 10^{-2} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku 38

Úvod

Vlastnosti kovových nanočástic (dále jen NP), jako je oxid zinečnatý (ZnO), oxid titaničitý (TiO₂) a stříbro, jsou většinou charakterizovány jejich velikostí, složením, krystalinitou a morfologií. Zmenšení velikosti na nanorozměry může změnit jejich chemické, mechanické, elektrické, strukturní, morfologické a optické vlastnosti. Tyto modifikované vlastnosti umožňují NP jedinečným způsobem interagovat s buněčnými biomolekulami, a tím usnadňují fyzikální přenos NP do vnitřních buněčných struktur. Nanostrukturované materiály mají na svém povrchu větší procento atomů, což vede k vysoké povrchové reaktivitě. Nanomateriály tak v poslední době zaznamenávají značný význam v základních i aplikovaných vědách a také v bionanotechnologiích [1].

Tato práce zkoumá antibakteriální aktivitu ZnO-NP na bakteriích *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. V teoretické části jsou rozebrány vlastnosti daných bakterií, prozatím známé a předpokládané mechanismy antibakteriální aktivity ZnO-NP a co je ovlivňuje. Dále je zmíněn fyzikální princip metody, kterou je v experimentální části zkoumán vliv ZnO-NP na růst bakterií. Ve druhé části práce je tato metoda popsána prakticky. Na konci práce jsou rozebrány výsledky zmíněných experimentů a porovnány s dosavadními poznatky.

Část I
Teoretická část

Kapitola 1

Mikrobiologie

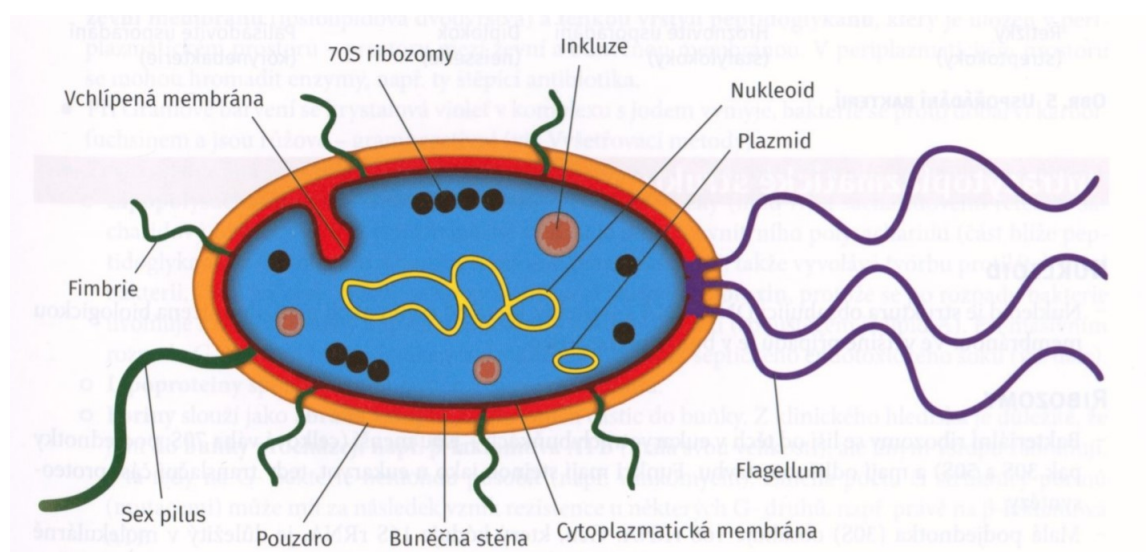
Ke studiu antibakteriálních vlastností oxidu zinečnatého, byly vybrány dvě bakterie. Každá reprezentuje jednu ze dvou skupin, do kterých se bakterie dělí podle struktury buněčné stěny (bude popsáno dále).

1.1 Bakterie

Termín bakterie označuje velkou skupinu prokaryotických organismů. Tyto organismy se vyznačují tím, že nemají buněčné jádro s membránou, ale pouze bakteriální chromozom (nukleoid). Velikost bakteriálních buněk se pohybuje v řádech mikrometrů a jejich tvary jsou koky, tyčinky a spirály [2].

Bakterie jsou všudypřítomné. Vyskytují se v přírodě, v jiných komplexních živých organismech a v jejich (tedy i naší) potravě. Jestliže mají vhodné podmínky (teplota, živiny, prostor...), rychle se množí. Některé patogenní bakterie se při určitém množství stávají nebezpečnými a mohou způsobovat nemoci, a proto je třeba bránit jejich přemnožení [3].

1.1.1 Struktura bakterií



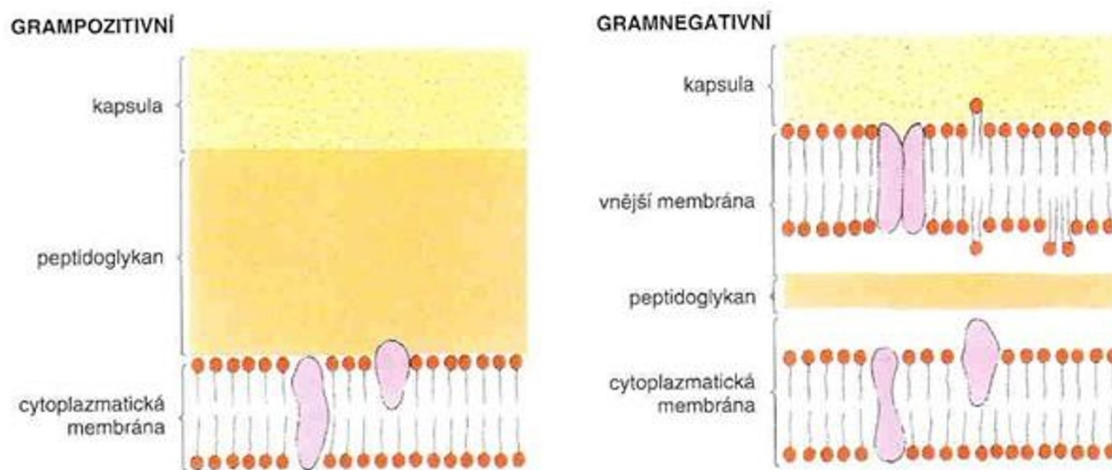
Obrázek 1.1: Struktura bakteriální buňky [2]

Od okolí je bakteriální buňka oddělena cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou, kterou tvoří převážně homogenní vrstva peptidoglykanu z aminokyselin a cukrů. Podle struktury buněčné stěny se bakterie rozlišují na gram-pozitivní (G+) a gram-negativní (G-). Díky buněčné stěně má buňka svůj tvar a stálý osmotický tlak. G- bakterie mají vnější membránu a cytoplazmatickou membránu mezi nimiž je tenká vrstva peptidoglykanu (7-8 nm). Na druhou stranu G+ bakterie mají vícevrstvou polymerní vrstvu peptidoglykanu silnou 20-80 nm a jen jednu vnitřní cytoplazmatickou membránu. Srovnání struktur buněčných stěn G+ a G- bakterií je na obrázku 1.2 [1].

Některé bakterie mají ještě navíc pouzdro (kapsula) tvořené extracelulárními polysacharidy.

Na povrchu mohou mít buňky různé struktury jako např. bičíky, sekreční systémy a fimbrie [2].

Vnitřek je vyplněn cytoplazmou, což je rosolovitá tekutina zahrnující všechny buněčné složky. Její funkcí je zajištění růstu, metabolismu a replikace buňky. Právě proto cytoplazma obsahuje bílkoviny, sacharidy nukleové kyseliny, soli, ionty a vodu (cca 80 %). To přispívá k elektrické vodivosti buňky. Celkový náboj bakteriální buňky je záporný. Obrázek 1.1 ukazuje typickou strukturu bakteriální buňky [1].



Obrázek 1.2: Buněčná stěna grampozitivních a gramnegativních bakterií [4]

1.1.2 Gramovo dělení bakterií

Bakterie mohou být rozdělené do dvou skupin - gram pozitivní (G+) a gram negativní (G-). Ke klasifikaci bakterií se v klasické mikrobiologii používá metoda navržená H. C. Gramem v roce 1884. Metoda je založena na rozdílné struktuře bakteriální stěny, což vede k rozdílné schopnosti zadržet barvivo krystalvioleť. Metoda má následující kroky:

1. Fixace sondy na skle mikroskopu
2. Primární barvení - krystalvioleť (modrá)
3. Fixace zabarvení Lungovým roztokem
4. Omytí alkoholem
5. Protibarvení safraninem (červená)

Silná vrstva peptidoglykanu u G+ bakterií nepropustí alkohol a proto po čtvrtém kroku zůstávají obarvené na modro. G- mají peptidoglykanovou vrstvu tenčí a tak je barva alkoholem odplavena. Proto na konci metody vyjdou bakterie modré až fialové ,jsou-li G+, a červené, jsou-li G- [5] [6].

Staphylococcus aureus

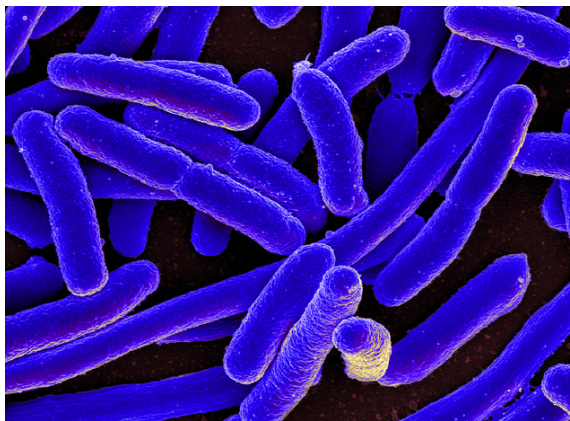
Zástupcem gram-pozitivních bakterií je *Staphylococcus aureus* (Zlatý stafylokok). Jedná se o nenáročnou, nepohyblivou, kokovou bakterii o průměru 1 μm . Tvoří nepravidelné hroznovité shluky, je ale možné někdy pozorovat i dvojice či krátké řetězce buněk. *S. aureus* způsobuje řadu mírných infekcí jako jsou záněty kůže a měkkých tkání až po různé sepse, které mohou být ohrožující na životě. Mluvíme o odolných mikroorganismech s běžným výskytem ve slizniční a kožní mikroflóře [2].



Obrázek 1.3: *Staphylococcus aureus* [7]

Escherichia coli

Z gram-negativních bakterií byla vybrána *Escherichia Coli*. Tato bakterie má tvar tyčinky a díky bičíkům na svém povrchu je schopna se pohybovat. Můžeme ji běžně nalézt ve střevní mikroflóře, kde se podílí na trávení a tvorbě vitaminů K. Jedná se o výlučně lidský patogen. Může způsobovat průjemy, močové infekce, potenciálně i novorozeneckou meningitidu. Kultivačně je nenáročná [2].

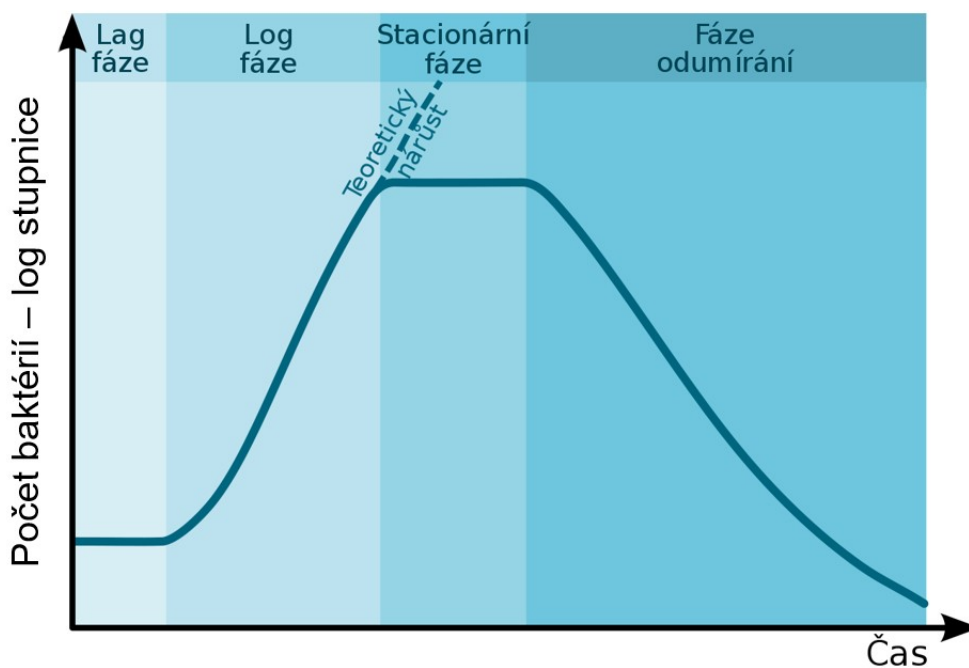


Obrázek 1.4: Barevné skenování *Escherichie coli*, elektronový mikrofotografický snímek [8]

1.1.3 Růst bakterií

Bakterie umístěné na médium s vhodnými podmínkami (živiny, pH, teplota) obvykle rostou a množí se pomocí dělení mateřské buňky na dvě dceřinné. Křivka růstu bakterií má 4 hlavní fáze (viz obrázek 1.5).

1. Lag fáze - Bakterie se adaptují na podmínky v kultivačním médiu. Počet buněk se nezvyšuje a buňky, které se nebyly schopny adaptovat, umírají.
2. Log fáze - Buňky jsou přivyklé prostředí a připravené na dělení. Jejich počet exponenciálně roste, dokud nejsou spotřebovány živiny.
3. Stacionární fáze - Kvůli vyčerpání živin se snižuje rychlost růstu buněk a množství nově vzniklých a odumírajících bakterií se vyrovnává. V prostředí se hromadí metabolity.
4. Fáze odumírání - Bakterie ztrácí schopnost se dělit. Počet mrtvých buněk převyšuje počet nově vzniklých. Celkové množství bakterií se snižuje.



Obrázek 1.5: Růstová křivka bakterií [6]

Když bakterie nejsou schopné reprodukce, odumírají. Počet buněčných kolonií lze určit spočítáním buněk v daném objemu kultivačního média nebo měřením jeho průsvitnosti [5] [6].

Kapitola 2

UV-VIS spektroskopie

Jednou z nejvyužívanějších a nejstarších fyzikálně-chemickou metodou je spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV-VIS). Tato metoda sleduje absorpci elektromagnetického záření v intervalu od 200 nm do 800 nm [3].

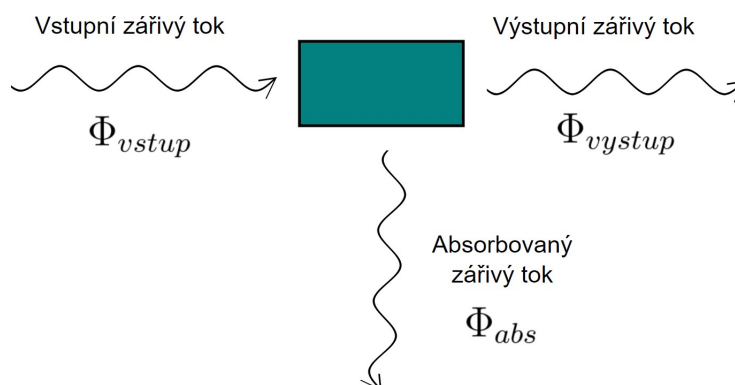
2.1 Spektrofotometrie

Schopnost molekul pohlcovat elektromagnetické záření se využívá k měření koncentrace zředěných roztoků. Molekula může existovat pouze v určitých kvantových stavech lišících se obsahem energie. Přejde-li molekula ze stavu s nižší energií do stavu s vyšší energií, musela absorbovat záření o frekvenci, která odpovídá rozdílu energií mezi jednotlivými stavy. Tomu odpovídá Planckova podmínka:

$$\Delta E = E_p - E_q = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (2.1)$$

kde ΔE je rozdíl energií dvou stavů, p značí excitovaný stav, q značí základní stav. h je Planckova konstanta, ν frekvence záření, c rychlost světla a λ je vlnová délka [9].

K měření absorbovaného záření se používají tzv. absorpční spektrofotometry. Na látku se vyzáří vstupní zářivý tok Φ_{vstup} , jehož část je absorbována vzorkem (Φ_{abs}). Zbýlý zářivý tok Φ_{vystup} je pak zaznamenán na detektoru.



Obrázek 2.1: Princip absorpčního spektrofotometru

2.1.1 Veličiny spektrofotometrie

Pro analýzu vlastností zkoumaného materiálu se pak používají veličiny transmittance, absorbance a optická hustota.

Transmittance a absorbance

Transmittance neboli propustnost je podíl výstupního a vstupního zářivého toku:

$$\tau = \frac{\Phi_{vystup}}{\Phi_{vstup}} \quad (2.2)$$

Absorbance je pak záporný logaritmus tohoto podílu:

$$A = -\log \tau = -\log \frac{\Phi_{vystup}}{\Phi_{vstup}} = \log \frac{\Phi_{vstup}}{\Phi_{vystup}} \quad (2.3)$$

Optická hustota

Absorbanci je nadřazen pojem optická hustota značený OD z anglického optical density. Je definována stejně jako absorbance

$$OD = \log \frac{\Phi_{vstup}}{\Phi_{vystup}} \quad (2.4)$$

ale její význam je odlišný. Pokud zkoumaným vzorkem prochází paprsek, jeho intenzita může být snižována i dalšími jevy kromě absorpce, například rozptylem záření na velkých částicích. Tedy OD nemá přímou souvislost s absorpcí a zahrnuje i další vlivy [10].

Lambert-Beerův zákon

Podle Lambert-Beerova zákona je hodnota absorbance při určité vlnové délce přímo úměrná látkové koncentraci.

$$A = \log \frac{\Phi_{vstup}}{\Phi_{vystup}} = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (2.5)$$

ϵ je absorpční koeficient charakteristický pro danou látku, l délka absorbujícího prostředí [cm] a c látková koncentrace vzorku [$mol \cdot dm^{-3}$].

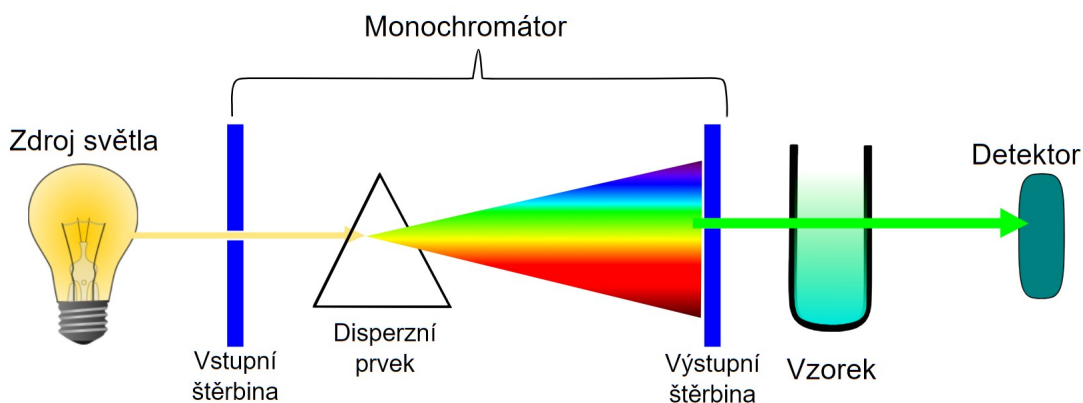
Jedná se o zákon, který je omezen určitými podmínkami:

- dopadající záření je monochromatické,
- měřený roztok je velmi zředěný $c < 10^{-2} mol \cdot l^{-1}$,
- absorbující prostředí se během měření nemění [3].

2.2 UV-VIS spektrofotometr

Můžeme najít mnoho typů spektrofotometrů, základní uspořádání je však stejné (Obrázek 2.2). Každý spektrofotometr se musí skládat ze

- zdroje záření emitujícího elektromagnetické záření v rozsahu 190 až 900 nm. Většinou jde o dva zdroje záření, jeden pro viditelnou oblast, druhý pro ultrafialovou oblast,
- monochromátoru, což je zařízení sloužící k získání záření o jedné vlnové délce. Skládá se ze vstupní štěrbin, disperzního prvku (hranol nebo mřížka), výstupní štěrbin a případně z pomocné optiky (čočka či zrcadlo). Poloha štěrbin je fixní. K dosažení dané vlnové délky se používá disperzní prvek a pomocná optika,
- absorbujícího prostředí (měřený vzorek),
- detektoru záření, který pracuje na principu přeměny energie světelného záření na elektrický signál. Bývají to fotodiody, fotočlánky, fotonásobiče či soustavy fotodiód,
- řídicího zařízení (počítač) [11].



Obrázek 2.2: Schéma spektrofotometru na bázi monochromátoru

Při použití této metody, je důležité používat nádoby, které nezkreslí výsledek. Pro měření v UV oblasti se proto používají kyvety z křemenného skla a pro měření v oblasti VIS skleněné či plastové kyvety. Metoda je dále použitelná pouze pro analyty schopné absorpce elektromagnetického záření a pouze pro zředěné roztoky. Malá koncentrace je důležitá, protože při vyšších koncentracích přestává být absorbance lineárně závislá na množství látky v roztoku [12].

Kapitola 3

Oxid zinečnatý

Oxid zinečnatý je důležitý anorganický materiál s mnoha vlastnostmi. Je znám jako polovodič II-VI, jelikož zinek je v periodické tabulce zařazen do druhé skupiny a kyslík do skupiny šesté. Vykazuje antibakteriální aktivitu a používá se jako růstový stimulant. Má široké uplatnění v oblasti optoelektroniky, farmacie, kosmetiky, potravinářství a zemědělství. Antibakteriální aktivita oxidu zinečnatého byla předmětem mnoha výzkumů. Bylo zjištěno, že koncentrace, velikost a teplota prostředí ji mohou ovlivňovat [13].

Syntéza ZnO v nanorozměrech vedla ke zkoumání jeho využití jako nového antibakteriálního činidla. Nanočástice oxidu zinečnatého mají kromě antibakteriálních a antimykotických vlastností i vysokou katalytickou a fotochemickou aktivitu. Absorbují elektromagnetické záření v oblasti UVA ($\lambda = 315\text{--}400\text{ nm}$) a UVB ($\lambda = 280\text{--}315\text{ nm}$), což je výhodné při antibakteriální reakci a používá se jako UV ochrana v kosmetice [1]. Díky této vlastnosti je vhodný i pro zkoumání antibakteriální aktivity UV-VIS spektroskopii, jelikož svou vlastní absorpcí neovlivní výsledky.

3.1 Velikost a tvar Oxidu Zinečnatého

Pomocí nanotechnologií lze připravit ZnO-NP. Tyto nanočástice jsou malé a přitom mají velký povrch a díky tomu mohou vykazovat vyšší antibakteriální aktivitu než samotný oxid zinečnatý. Kvůli tomu se v poslední době věnuje větší pozornost výzkumu interakcí NP s mikroorganismy, které zaznamenaly mnohé antibakteriální účinky.

Důležitou a výhodnou vlastností ZnO-NP je tzv. selektivní toxicita, tedy že se považují za bezpečné antibakteriální činidlo pro lidi a zvířata. Díky tomu mají potenciál nahradit některá antibiotika [13].

ZnO-NP lze syntetizovat různými metodami a tak přizpůsobit jejich vlastnosti pomocí velikosti a tvaru. Každá nanostruktura má specifické strukturní, optické, elektrické a fyzikálně-chemické vlastnosti, což umožňuje zajímavé aplikace. Je možné získat tvary jako jsou nanopruty, nanosféry, nanotrubičky, nanodrátky, spirály, bubny, květy, hvězdy, mnohostěny a jiné. Vysokou antibakteriální aktivitu vykazovaly např. struktury se sférickým povrchem [1].

3.2 Antibakteriální aktivita nanočástic ZnO

Antibakteriální aktivita je známá jako činnost, kterou se ničí nebo potlačuje růst bakterií. Je také popisována jako funkce plochy povrchu, která je v kontaktu s mikroorganismy. Na druhou stranu antibakteriální látky jsou se selektivní koncentrací schopné poškodit nebo inhibovat růst bakterií a nejsou škodlivé pro hostitele. Tyto sloučeniny působí jako chemoterapeutika pro léčbu nebo prevenci bakteriálních infekcí. Antibakteriální látka je považována za baktericidní, pokud bakterie zabíjí, nebo za bakteriostatickou, pokud inhibuje jejich růst [1].

Antibakteriální aktivita ZnO-NP je sice spojena s řadou otázek, ale její přesný mechanismus není zcela objasněn. V rámci spektra antibakteriální aktivity totiž existují otázky, které vyžadují hlubší vysvětlení. V literatuře jsou uváděny tyto charakteristické mechanismy:

- přímý kontakt nanočástic s buněčnými stěnami, což vede k destrukci integrity bakteriální buňky,
- uvolňování antimikrobiálních iontů, především ZnO^{2+} iontů,
- tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS).

Mechanismus toxicity se však liší v různých médiích, jelikož kromě fyzikálně-chemických vlastností ZnO-NP se může měnit i druh rozpouštěného Zn v závislosti na složkách média [1] [13].

3.2.1 Morfologie ZnO

Mnohé studie zabývající se toxicitou ZnO uvádí, že jeho antibakteriální aktivita je ovlivněna různými morfologiemi ZnO-NP.

Morfologie ZnO-NP je dána různými podmínkami syntézy. Požadované struktury ZnO-NP je možné dosáhnout řízením parametrů, např. rozpouštědla, fyzikálně-chemická nastavení (teplota, pH) nebo tvarově usměrňující látky.

Závislost toxicity na tvaru se vysvětluje procentem aktivních faset nanočástic. Díky syntéze a technice růstu se na NP nachází mnoho aktivních faset. Například sférické ZnO-NP mají převážně (100) fasety a tyčinkové struktury (111) i (110) fasety. Fasety (111) vykazují vyšší antibakteriální aktivitu. Tímto faktorem antibakteriální aktivity se ale zabývalo jen několik studií. Navíc různé ZnO-NP s různou morfologií mají různé typy aktivních faset. Tento princip si proto vyžaduje další zkoumání. Tvar nanostruktur také ovlivňuje proces internalizace, kdy například sférické nanočástice ZnO pronikají do buněčné stěny hůře, než tyčinky a drátky. Dále se předpokládá, že podíl polárních povrchů (faset) vede k většímu množství kyslíkových vakancí, které zvyšují tvorbu ROS [1].

3.2.2 Velikost a koncentrace

Za antibakteriální aktivitu ZnO-NP odpovídá vyšší koncentrace a větší povrch struktury. Několik studií uvádí, že antibakteriální aktivita ZnO-NP je závislá na velikosti NP a zároveň tato závislost, že je ovlivněna koncentrací NP. Menší rozměry NP umožňují snadný průnik do bakteriálních membrán a tím zvyšují jejich účinnost. Mnoho studií se také shodlo na tom, že kontrola velikosti ZnO-NP je klíčová pro dosažení nejlepších baktericidních účinků a zároveň, že menší struktury, tedy

struktury s vyšším specifickým povrchem, dosahují nejlepších výsledků. Několik studií popisuje, že rozpouštění iontů ZnO^{2+} je zodpovědné za toxicitu ZnO-NP. Toto rozpouštění je závislé na velikosti NP. Dále bylo popsáno, že i vznik H_2O_2 , též pravděpodobně zodpovědného za toxicitu ZnO-NP, je závislý na velikosti povrchu ZnO-NP. Práce Padmavathyho a Vijayghavana popsala, že čím větší je plocha povrchu a vyšší počet kyslíkových forem, tím NP získávají větší toxicitu, což ale bylo v rozporu s jinou prací, která nezjistila žádný vliv velikosti. Proto se zdá, že je nutná jistá shoda mezi velikostí NP, bakteriemi a koncentrací. Mnoho prací se shodlo na faktu, že aktivita ZnO-NP je nepřímo úměrná velikosti částic ale přímo úměrná jejich koncentraci. Zvýšením koncentrace se dosahuje vyšší buněčné smrti, jelikož ZnO-NP narušuje funkci mitochondrií, stimuluje únik laktátdehydrogenázy a mění morfolologii buňky [14] [1].

3.2.3 Povrchové defekty

Přestože má ZnO jednoduchý chemický vzorec disponuje bohatou chemií defektů, která oblivňuje jeho antibakteriální aktivitu. Povrchy ZnO-NP obsahují řadu hran a rohů, které jsou potenciálními reaktivními povrchovými místy. Tyto defekty silně ovlivňují antibakteriální aktivitu ZnO [1]. Studie Padmavathyho a Vijayaraghavana předpokládá, že toxicita ZnO-NP je způsobena právě tím, že defekty jako jsou hrany a rohy, které jsou důsledkem abrazivního povrchu ZnO, poškozují buněčné membrány [15].

3.2.4 Fotokatalytické vlastnosti ZnO

Jelikož je ZnO polovodič, vykazuje fotokatalytické vlastnosti. ZnO pohlcuje elektromagnetické záření (zejména pak UV záření) a zvyšuje tak svou vodivost, čímž výrazně aktivuje interakce mezi ZnO a bakterií. Jakožto polovodič se ZnO skládá z vodivostního pásu, zakázaného pásu a valenčního pásu. Dopadne-li na ZnO foton s vyšší energií než 3,3 eV, je absorbován a elektrony se přesouvají z valenčního do vodivostního pásu. Ve valenčním pásu se tak vytvoří kladné díry, zatímco ve vodivostním pásu vzniknou volné elektrony. To vede k řadě fotoreakcí. Kladné díry jsou hlavním oxidantem ve fotokatalytickém procesu, protože díky nim vznikají reaktivní hydroxylové radikály OH^\cdot . Elektrony z vodivostního pásu naopak reagují s kyslíkem, který se dále redukuje na superoxidový radikál $\cdot O_2^-$ [16]. Oba vzniklé radikály hrají důležitou roli v antibakteriální aktivitě ZnO-NP.

3.3 Možné mechanismy antibakteriální aktivity

Jak bylo zmíněno výše, antibakteriální aktivitě nanočástic oxidu zinečnatého se připisuje několik mechanismů, které budou popsány dále.

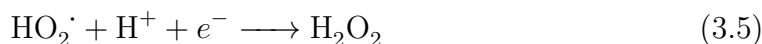
3.3.1 Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS)

Mnoho studií uvádí jako hlavní mechanismus zodpovědný za antibakteriální aktivitu ZnO-NP tvorbu ROS a to pro jejich vysokou reaktivitu a oxidační vlastnostem. Zjistilo se, že vodní suspenze ZnO-NP produkují jejich zvýšené množství, a pokud je ZnO exponováno UV zářením, je toto množství ještě větší. Vznikajícími formami kyslíku jsou:

- superoxidový aniont $\cdot\text{O}_2^-$,
- peroxid vodíku H_2O_2 ,
- a hydroxid OH^- .

Jejich toxicita je založena na destrukci buněčných složek (lipidy, DNA, proteiny) v důsledku jejich internalizace do buněčné membrány bakterií.

[1] Vznik vyjmenovaných ROS je vysvětlován následujícím způsobem. UV záření a viditelné světlo může aktivovat ZnO s defekty a tak mohou vznikat páry elektron-díra (e^-h^+). Díry dále štěpí molekuly H_2O (ze suspenze ZnO) na OH^- a H^+ (Rovnice 3.1 a 3.2). Rozpuštěné molekuly kyslíku se mění na superoxidové radikálové anionty $\cdot\text{O}_2^-$ dále reagující s H^+ za vzniku radikálů $\text{HO}_2\cdot$ (Rovnice 3.3 a 3.4). Ty při následné srážce s elektrony vytvoří anionty peroxidu vodíku HO_2^- , které potom reagují s vodíkovými ionty za vzniku molekul H_2O_2 (Rovnice 3.5). Ty mohou pronikat buněčnou stěnou a zabíjet bakterie.



Hydroxylové radikály a superoxydy jsou záporně nabitě a tak nemohou proniknout do buněčné membrány a zůstávají v přímém kontaktu s vnějším povrchem bakterií. Naopak molekuly H_2O_2 mohou proniknout skrz buněčnou stěnu a to vede k jejímu poškození až zničení, a tak je započata buněčná smrt [15].

Při interakci ZnO-NP s buněčnou membránou s velkou pravděpodobností zůstávají částice pevně adsorbovány na povrchu zabitých/zbylých bakterií a blokují další antibakteriální aktivitu. Jakmile se však ZnO-NP dostanou do růstového média dále uvolňují peroxidy a to vede k vyšší baktericidní účinnosti.

3.3.2 Uvolňování Zinečnatých iontů ZnO^{2+}

Dalším z hlavních navrhovaných mechanismů toxicity ZnO-NP je uvolňování zinečnatých iontů v prostředí obsahujícím ZnO-NP a bakterie. ZnO^{2+} má vliv na inhibiči aktivního transportu i na narušení metabolismu aminokyselin a enzymového systému. Několik studií zjistilo, že rozpouštění ZnO-NP na ZnO^{2+} je závislé na velikosti nanostruktur. Proto by bylo možné upravovat toxicitu NP manipulací s rychlostí rozpouštění. Některé studie popisují, že toxicita se vztahuje i k rozpustnosti ZnO^{2+} v médiu, proto mohou i nízké, dobře rozpustné koncentrace ZnO^{2+} vyvolat u bakterií vysokou odezvu. Na druhou stranu však byl příspěvek ZnO^{2+} k antimikrobiální činnosti některými vědci označen za malý, kvůli nízkým koncentracím solubilních forem Zn uvolněných při rozpouštění ZnO. Navíc je tento mechanismus omezen přirozenou vlastností ZnO a to stabilitou ve vodě. Nerozpustnost tak brání distribuci

ZnO^{2+} do prostředí a tím omezuje toxicitu. Jelikož k uvolňování ZnO^{2+} dochází právě na povrchu nanočástic, mohl by být i tento mechanismus toxicity ovlivněn jejich velikostí a tvarem. Bylo zjištěno, že mechanismus uvolňování zinečnatých iontů závisí na dvou hlavních parametrech:

1. fyzikálně-chemické vlastnosti částic, včetně pórovitosti, koncentrace, velikosti částic a morfologie,
2. chemické složení média: pH, UV osvětlení, doba expozice, existence dalších prvků.

Jejich vliv však není zcela objasněn a vyžaduje další studie.

3.3.3 Další možné mechanismy

Jakmile jsou NP uvnitř bakterií, je třeba pro dosažení bakteriocidního účinku inhibovat energetický metabolismus. ZnO -NP jsou bakteriocidní, narušují membránu a způsobují její dysfunkci, v důsledku čehož se internalizují do bakterií. Velikost částic, chemické složení povrchu a defekty mají významný vliv na internalizaci ZnO -NP. Podle velké části vědců jsou základem interakce NP s bakteriemi dva mechanismy:

1. nadměrná tvorba ROS,
2. srážení NP na vnějším povrchu bakterií; nebo shromažďování v cytoplazmatické oblasti či v periplazmatickém prostoru, což vede k narušení buněčné aktivity a následnému narušení a poruše membrán.

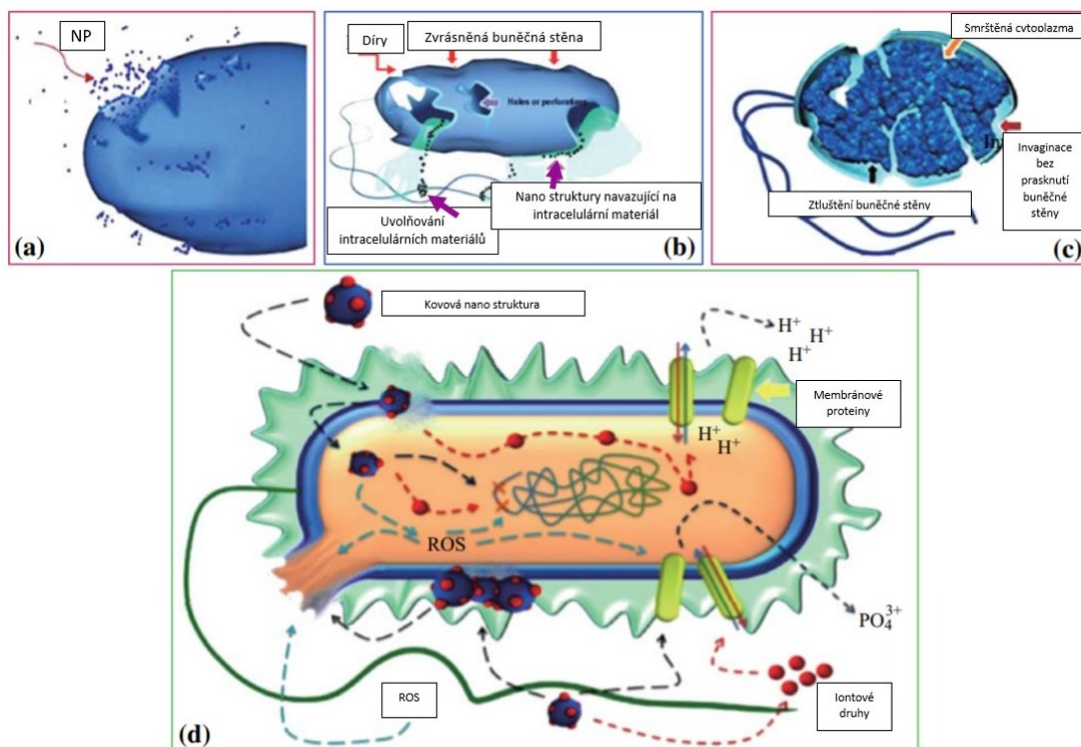
ZnO -NP obsahují ve vodní suspenzi kladný náboj, což je příhodné, jelikož celkový náboj bakterií je záporný. Mezi NP a bakteriálním povrchem tak vzniká silná vazba díky elektrostatickým silám [1]. Díky interakci mezi ZnO -NP a bakterií dochází k dezorganizaci buněčné stěny a internalizaci NP do buněk. Změněná morfologie buňky pak vede k úniku intracelulárního obsahu. Zároveň díky narušení membrány a tím její zvýšené propustnosti se mohou ZnO -NP shromažďovat uvnitř membrány a dále pronikat do cytoplazmy [17].

Dalším faktorem ovlivňujícím mechanismy antibakteriální aktivity ZnO -NP je jejich abrazivní povrchová struktura. Tato vlastnost je připisována povrchovým defektům NP, jako jsou rohy, hrany a chemické defekty. Abrazivní vlastnost ZnO -NP má zásadní vliv na aktivitu při mechanickém poškození buněčné stěny.

O podrobných mechanismech antibakteriální aktivity nanočástic ZnO se sice vedou diskuze, ale je třeba je dále zkoumat. Literatura však uvádí tři nejčastější přijímané mechanismy:

1. Vychytávání kovových iontů (translokace a internalizace částic) do buněk s následným vyčerpáním buněčné produkce ATP a narušením replikace DNA,
2. tvorba ROS z oxidů a iontů kovů v NP s následným oxidačním poškozením buněčných struktur,
3. Změny propustnosti bakteriální membrány (postupné uvolňování lipopolysacharidů, membránových proteinů a intracelulárních faktorů) a rozptýlení protonové hybné síly v důsledku akumulace a rozpouštění NP v membráně.

Veškeré uvedené mechanismy jsou znázorněny na obrázku 3.1 [1].



Obrázek 3.1: a) internalizace NP do buňky, translokace. NP pronikají otvory, jamkami nebo výstupky v buněčné stěně. b) Schematické znázornění zhroutilé buňky ukazující narušení buněčné stěny a vytlačení cytoplazmatického obsahu. c) Bakteriální buňka vykazující významné změny ve složení obalu (mírné invaginace a ztlustění buněčné stěny) a vytlačování cytoplazmy. d) Pravděpodobné mechanismy zahrnují následující: příjem kovových iontů do buněk; intracelulární vyčerpání a narušení replikace DNA; uvolnění kovových iontů a ROS; akumulace a rozpouštění NP v bakteriální membráně [1].

3.4 Antibakteriální aktivita proti bakteriím *E. coli* a *S. aureus*

Mnohé studie ukazují, že při kontaktu ZnO-NP s *E. coli*, NP interagují s její buněčnou stěnou a dochází k jejímu značnému poškození a tím i ke kolapsu buněčné stěny, což vede ke smrti buňky [1]. Různé studie také uvádí, že i proti bakterii *S. aureus* mají ZnO a jeho nanočástice dobré antibakteriální účinky. Soderberg et al. (1990) ukázali, že 179 a 1790 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ZnO má jasný antibakteriální účinek. Dále Liu et al. (2009) ukázali, že koncentrace 3 mmol/l ZnO-NP mohou inhibovat růst *E. coli* a koncentrace 12 mmol/l už růst zcela inhibuje [13]. Zejména pak u bakterie *E. coli* bylo zjištěno, že při větších velikostech NP účinek není tak veliký jako u částic menších [14].

Část II
Experimentální část

Kapitola 4

Metody a materiály

Ke studiu antibakteriálních účinků oxidu zinečnatého byly použity dvě metody. Nejprve UV-VIS spektroskopie, k obecnému zjištění vlivu koncentrací ZnO-NP na růstovou křivku bakterií a dále za pomoci bioreaktorů byly zkoumány další vlivy prostředí.

4.1 Materiály

Použité bakterie

Jak bylo zmíněno výše, byly použity dvě bakterie každá jako zástupce jedné bakteriální skupiny. Z gram-negativních bakterií byla vybrána *Escherichia coli*, bakteriální kmen číslo CCM 3954. Zástupcem gram-negativních bakterií byla bakterie *Staphylococcus aureus*, bakteriální kmen číslo CCM 3953.

Nanočástice

Ke zkoumání antibakteriální aktivity oxidu zinečnatého byl využit práškový ZnO od společnosti US Research Nanomaterials, Houston, USA s čistotou vzorku 99,9 % a velikostí částic 10 μm .

4.2 Metody

4.2.1 Příprava vzorků

Kultivační média

Jako kultivační médium byl použit Mueller-Hintonův bujón (MHB) a Mueller-Hintonův agar (MHA). Jeden litr MHB obsahuje:

- 2 g hovězího extraktu,
- 17,5 g hydrolyzátu kaseinu (mléčný protein),
- 1,5 g škrobu.

MHA má stejné složení jako MHB s tím rozdílem, že navíc do 1 l vody přidáme 17 g agarové substance, která způsobí, že MHA má konzistenci želé [6]. Pro následné použití MHA ke kultivaci bakterií byly využity šesticentimetrové Petriho misky, každá s 10 ml MHA.

Příprava ZnO

Prvotní roztok ZnO byl připraven smícháním 20 mg práškového ZnO a 20 ml vody, čímž vznikla koncentrace 1 mg/ml. Tento roztok byl dále homogenizován pomocí ultrazvuku po dobu 30 minut a sterilizován pomocí autoklávu. Potřebná koncentrace byla vždy dosažena ředěním.

4.2.2 UV-VIS spektroskopie

Ke čtení optické hustoty vzorků byla použita kompaktní absorpční čtečka na bázi monochromátoru: EpochTM 2 Microplate Spectrophotometer (obrázek 4.1).



Obrázek 4.1: EpochTM 2 Microplate Spectrophotometer

Vzorky (vždy v triplikátech) byly sledovány po dobu 20 hodin s následujícím nastavením :

- teplota prostředí 37 °C,
- promíchání double orbital vždy před měřením,
- interval měření 30 minut,
- $\lambda = 600 \text{ nm}$,
- $\lambda = 850 \text{ nm}$,
- tma

Příprava vzorků na mikrotitrační desku

Jako výchozí koncentrace bakterií pro zkoumání vlivu koncentrace ZnO přítomného v roztoku s bakteriemi, byla vždy připravena zkumavka se 4,5 ml MHB, do které byla postupně přidávána daná bakterie z rozmraženého koncentrátu, dokud vzorek neměl turbiditu 1,0 měřenou podle McFarlandova standardu. Konkrétně pro *E. coli* bylo potřeba přidat 910 μl a pro bakterii *S. aureus* 770 μl . Tato výchozí koncentrace byla označena jako 10^0 . Dále byly podle matice vzorků na obrázku 4.2 připraveny všechny vzorky pro mikrotitrační destičku formátu 12x8 jamek.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	S. aureus -3			S. aureus -4			E. coli -3			E. coli -4		

Obrázek 4.2: Matice vzorků mikrotitrační desky; -3 resp. -4 značí koncentraci bakterie 10^{-3} resp. 10^{-4} ; Písmena A-H značí daný typ vzorku (viz tabulka na obr. 4.3)

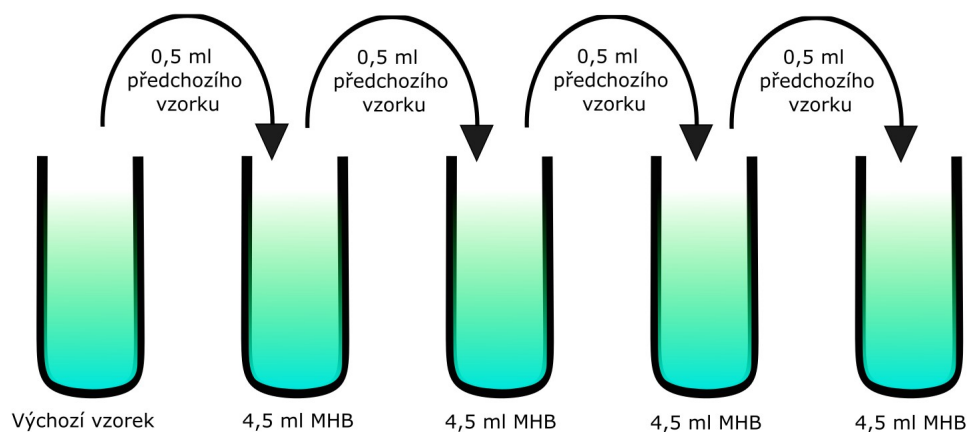
	Roztok ZnO v koncentraci ($\mu\text{g/ml}$):		Bakteriální roztok v příslušné koncentraci/MHB		Výsledná koncentrace ZnO v roztoku ($\mu\text{g/ml}$)
A	1024	+	bakterie	->	512
B	512	+	bakterie	->	256
C	256	+	bakterie	->	128
D	128	+	bakterie	->	64
E	64	+	bakterie	->	32
F	32	+	bakterie	->	16
G	0	+	bakterie	->	0
H	0	+	MHB	->	0
	50 μl	+	50 μl	->	100 μl

Obrázek 4.3: Tabulka koncentrací vzorků mikrotitrační desky

Nejprve byly pomocí ředění připraveny požadované koncentrace bakterií v koncentračním spádu $10^0 - > 10^{-1} - > 10^{-2} - > 10^{-3} - > 10^{-4}$, podle obrázku 4.4.

Dále byly připraveny požadované koncentrace prostředí se ZnO. Jelikož bylo třeba připravit vždy poloviční koncentraci než byla koncentrace předchozí, ředilo se v poměru 1 : 1, předchozí roztok : dH_2O .

Nakonec se do mikrotitrační desky dalo do každé jamky 50 μl roztoku ZnO v koncentraci podle daného řádku a 50 μl roztoku bakterie v koncentraci podle dané oblasti. Podle tabulky na obrázku 4.3 můžeme vidět, že v řádku A byly vzorky s koncentrací ZnO 512 $\mu\text{g/ml}$, v řádku B koncentrace poloviční a tak až do řádku F. V řádku G a H byl místo ZnO pouze MHB. Bakterie pak byly přidány vždy do požadované oblasti s výjimkou řádku H, kde byl pouze samotný MHB (viz obr. 4.3).



Obrázek 4.4: Ředění bakteriálních roztoků v poměru 1:10

Konkrétně tedy *S. aureus* byl v koncentraci 10^{-3} ve sloupcích 1-3, v koncentraci 10^{-4} ve sloupcích 4-6 a *E. coli* byla v koncentraci 10^{-3} ve sloupcích 7-9 a v koncentraci 10^{-4} ve sloupcích 10-12 (viz obr. 4.2). Každý typ vzorku byl tedy připraven jako triplikát.

4.3 Bioreaktor

Pro studium vlivu prostředí na antibakteriální aktivitu ZnO-NP byl použit osobní bioreaktor RTS-1C společnosti BioSan (obrázek 4.5).



Obrázek 4.5: Osobní reaktor RTS-1C, Biosan

Pomocí bioreaktoru byla čtena optická hustota vzorků po dobu 20 hodin s následným nastavením:

- interval měření 10 minut,
- 2000 otáček za minutu (1 s vpravo, 1 s vlevo),
- teplota 37 °C,
- $\lambda = 850 \text{ nm}$.

4.3.1 Příprava vzorků

Za pomoci bioreaktorů byly provedeny čtyři různé experimenty. Byl blíže prozkoumán vliv koncentrace ZnO-NP na antibakteriální aktivitu vůči *E. coli*, dále byl zkoumán vliv světla a vliv UV záření na toxicitu ZnO-NP vůči oběma bakteriím (*E. coli*, *S. aureus*). Výchozí koncentrace bakterií byla připravena stejným způsobem jako u předchozího experimentu, tedy tak, že koncentrace bakterií 10^0 byla taková koncentrace ve 4,5 ml MHB, že roztok měl turbiditu 1,0 měřenou podle McFarlandova standardu. Ředění roztoku bakterií probíhalo stejným způsobem, jako v minulém experimentu. Do bioreaktorů byl vždy připraven vzorek o objemu 21 ml. Koncentrace bakterií 10^{-4} ve vzorku bylo dosaženo tak, že byly do 18 ml MHB přidány 2 ml roztoku bakterie v koncentraci 10^{-3} , čímž vznikla požadovaná koncentrace 10^{-4} . Dále byl vždy do roztoku přidán 1 ml dH_2O v případě reference nebo roztoku ZnO-NP v případě zkoumaného vzorku.

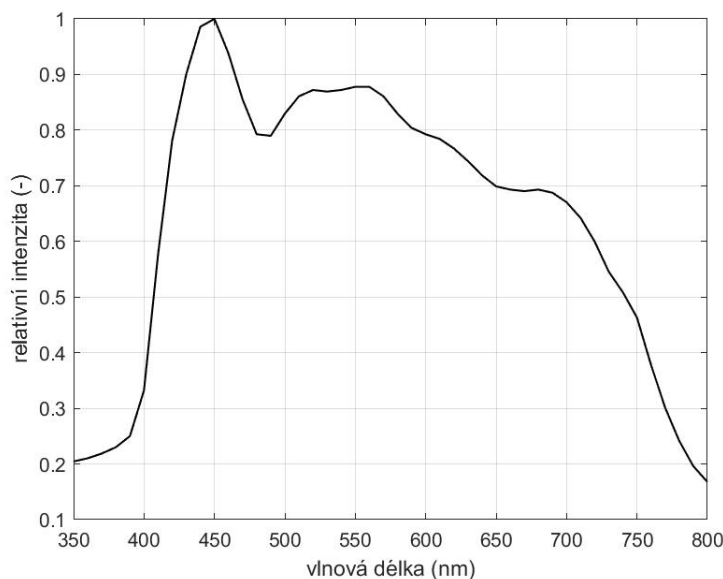
Různé koncentrace *E.coli*

V tomto experimentu byly připraveny čtyři zkumavky pro čtyři bioreaktory. V jedné byl referenční roztok s bakterií a v ostatních vždy různá koncentrace ZnO-NP. Konkrétně:

- Do první zkumavky (20 ml roztoku bakterie v koncentraci 10^{-4}) byl přidán 1 ml prvotního roztoku ZnO-NP (1 mg/ml), čímž vznikla koncentrace 512 $\mu\text{g/ml}$
- do druhé zkumavky bylo přidáno 250 μl prvotního roztoku ZnO-NP a 750 μl $d\text{H}_2\text{O}$, čímž vznikla koncentrace 128 $\mu\text{g/ml}$
- do třetí zkumavky bylo přidáno 125 μl prvotního roztoku ZnO-NP a 875 μl $d\text{H}_2\text{O}$, čímž vznikla koncentrace 64 $\mu\text{g/ml}$.
- do čtvrté zkumavky byla přidána pouze $d\text{H}_2\text{O}$, a byla označena jako referenční.

Vliv světla

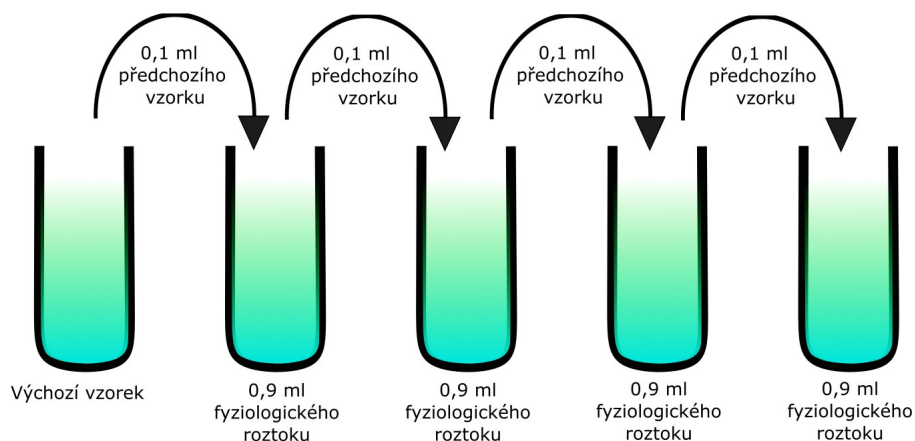
Vliv světla na antibakteriální aktivitu byl zkoumán nejprve s bakterií *E. coli* a poté i s bakterií *S. aureus*. Byly tedy připraveny dva shodné experimenty, každý s jinou bakterií. V tomto experimentu byly připraveny čtyři zkumavky pro čtyři bioreaktory. Dvě referenční zkumavky, jedna pro tmu, jedna pro světlo, a dvě se ZnO-NP v koncentraci 512 $\mu\text{g/ml}$., opět jedna pro tmu a jedna pro světlo. Všechny vzorky byly připraveny obdobným způsobem jako u předchozího experimentu. Bakterie byly osvětlovány bílým LED světlem, které mělo spektrum zobrazené na obrázku 4.6. Charakteristika byla naměřena přístrojem Spekol.



Obrázek 4.6: Charakteristika spektra LED světla

4.4 Kultivace bakterií v Petriho miskách

Součástí sledování antibakteriální aktivity ZnO-NP v rámci experimentu za použití bioreaktoru bylo konkrétní zjištění koncentrace kolonie formujících jednotek (CFU) ve vzorku. CFU bylo zjištěno kultivací bakterií v šesticentimetrových Petriho miskách na MHA. Podle potřeby byl vzorek ředěn v koncentračním spádu $10^0 - > 10^{-1} - > 10^{-2} - > \dots - > 10^{-8}$ a to za pomoci mikrozkušavek eppendorf podle schématu na obrázku 4.7.



Obrázek 4.7: Schéma ředění vzorku pomocí mikrozkušavek eppendorf

Nakonec bylo z každého vzorku dáno na samostatnou Petriho misku 0,5 ml roztoku, který byl rovnoměrně roztřepán po misce, chvíli ponechán v laminárním boxu, aby uschnul, a přesunut do inkubátoru. Tam byl při teplotě 37 °C ponechán po 24 h. Po této době byly bakterie spočítány ručně (*E. coli* i *S. aureus*) nebo za pomoci počítačky (*S. aureus*) (obr. 4.8). U *E. coli* přesnost počítačky není vysoká jelikož její kolonie nemají jasnou hranici na rozdíl od *Staphylococca*, jehož kolonie jsou jasně ohraničené kruhy.



Obrázek 4.8: Počítačka kolonií

Kapitola 5

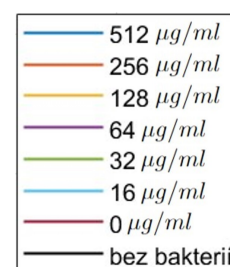
Výsledky

5.1 UV-VIS spektroskopie

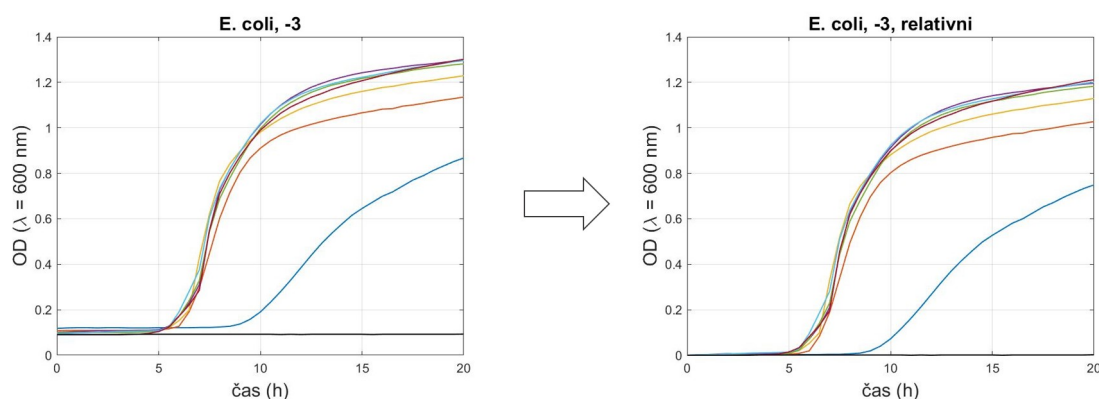
5.1.1 *Escherichia coli*

Obrázky 5.2 až 5.5 zobrazují grafy OD bakterie *E. coli* v čase. Vlevo je reálná optická hustota a vpravo relativní optická hustota, kde jsou všechny počáteční OD sjednoceny tak, aby byl odstraněn vliv koncentrace ZnO-NP na výsledek. Obrázek 5.1 ukazuje legendu ke zmíněným grafům.

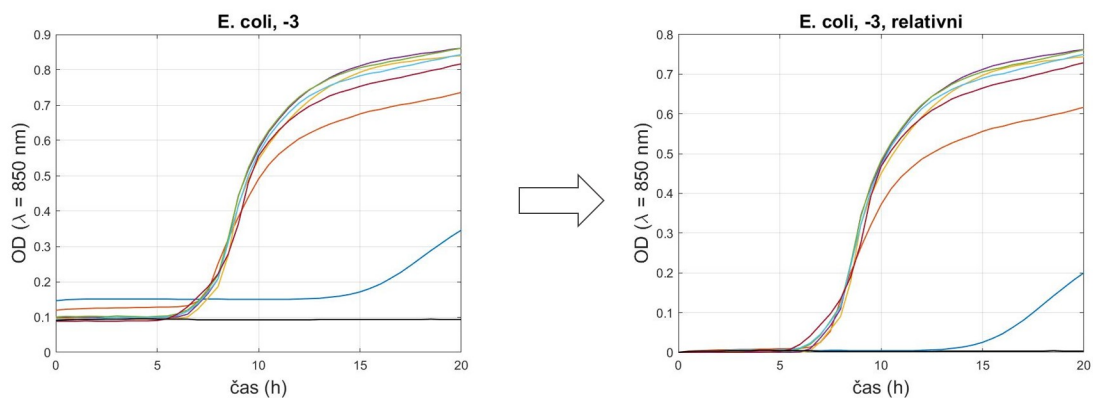
Můžeme vidět, že podle očekávání se zvyšuje antibakteriální účinek ZnO-NP se zvyšující se koncentrací jeho NP. Koncentrace nižší než $64 \mu\text{g/ml}$ však nemají už žádný účinek a u koncentrace $128 \mu\text{g/ml}$ je toxicita ZnO-NP tak malá, že je až zanedbatelná. Oproti tomu koncentrace $512 \mu\text{g/ml}$ vykazuje dobré antibakteriální účinky.



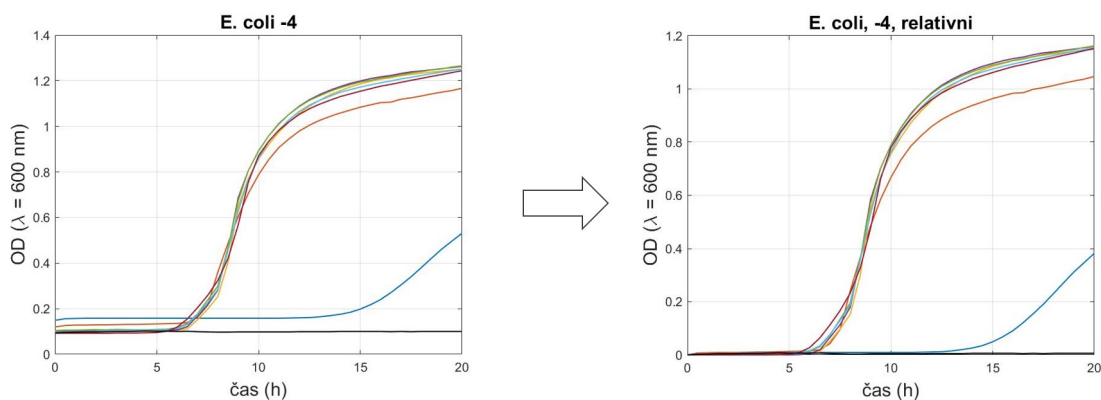
Obrázek 5.1: Legenda ke grafům OD



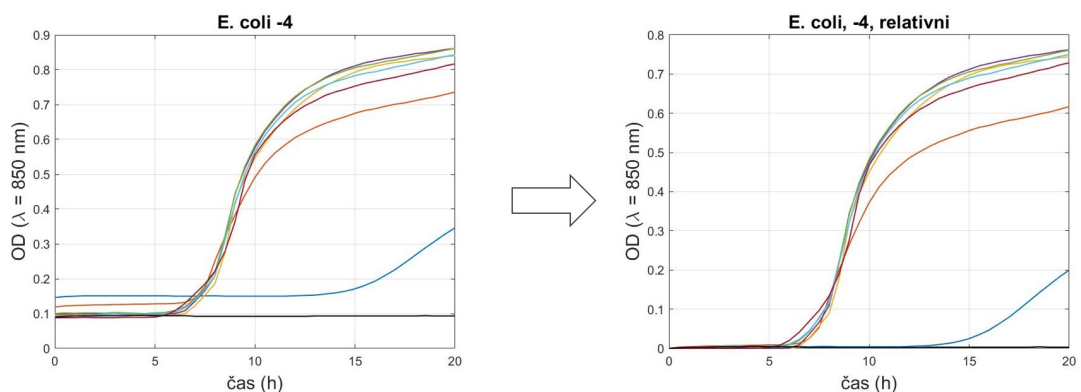
Obrázek 5.2: Vývoj optické hustoty roztoků *E. coli* v koncentraci 10^{-3} v čase, vlnová délka 600 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD



Obrázek 5.3: Vývoj optické hustoty roztoků *E. coli* v koncentraci 10^{-3} v čase, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD



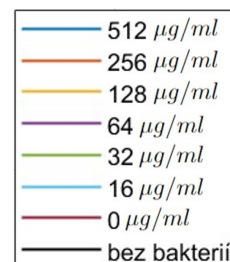
Obrázek 5.4: Vývoj optické hustoty roztoků *E. coli* v koncentraci 10^{-4} v čase, vlnová délka 600 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD



Obrázek 5.5: Vývoj optické hustoty roztoků *E. coli* v koncentraci 10^{-4} v čase, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD

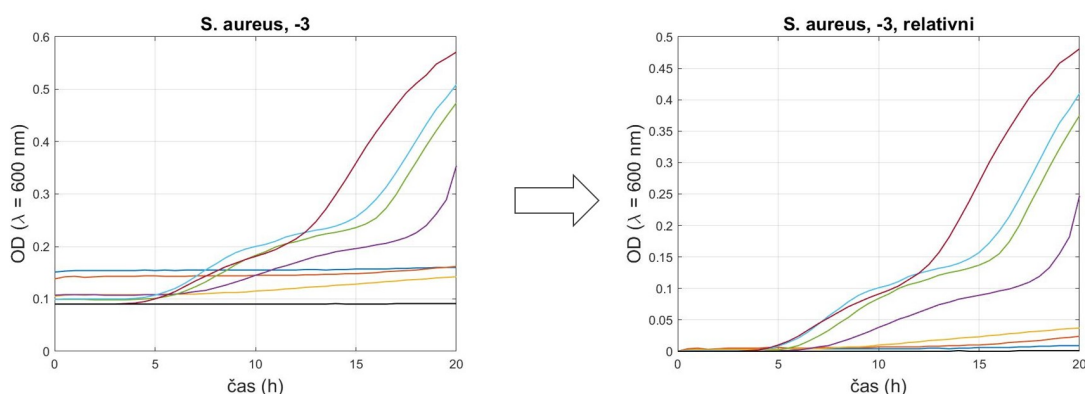
5.1.2 *Staphylococcus aureus*

Obrázky 5.7 až 5.10 zobrazují grafy OD bakterie *S. aureus* v čase. Vlevo je reálná optická hustota a vpravo relativní optická hustota, kde jsou všechny počáteční OD nastaveny na nulu tak, aby byl odstraněn vliv koncentrace ZnO-NP na výsledek. Obrázek 5.6 ukazuje legendu ke zmíněným grafům.

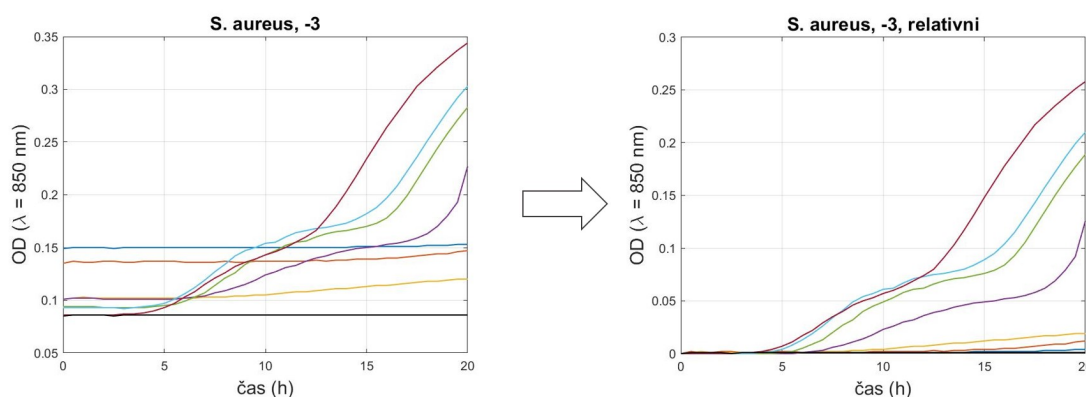


Obrázek 5.6: Ledenda ke grafům OD

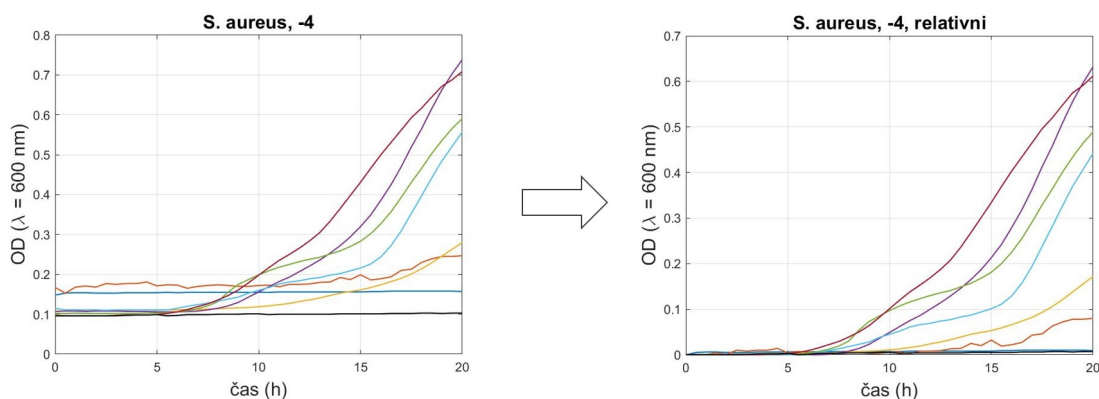
Z grafů je na první pohled jasné, že ZnO-NP mají na bakterii *S. aureus* lepší antibakteriální účinek než na bakterii *E. coli*. Již nižší koncentrace vykazují toxicitu vůči této bakterii. Těž podle očekávání se antibakteriální účinek zvyšuje s koncentrací. Nižší koncentrace ZnO-NP, tedy $16 \mu\text{g/ml}$, $32 \mu\text{g/ml}$ a $64 \mu\text{g/ml}$, růst bakterií pouze zpomalují, ale vyšší koncentrace, konkrétně $128 \mu\text{g/ml}$, $256 \mu\text{g/ml}$ a $512 \mu\text{g/ml}$ růst bakterií v podstatě zastavují.



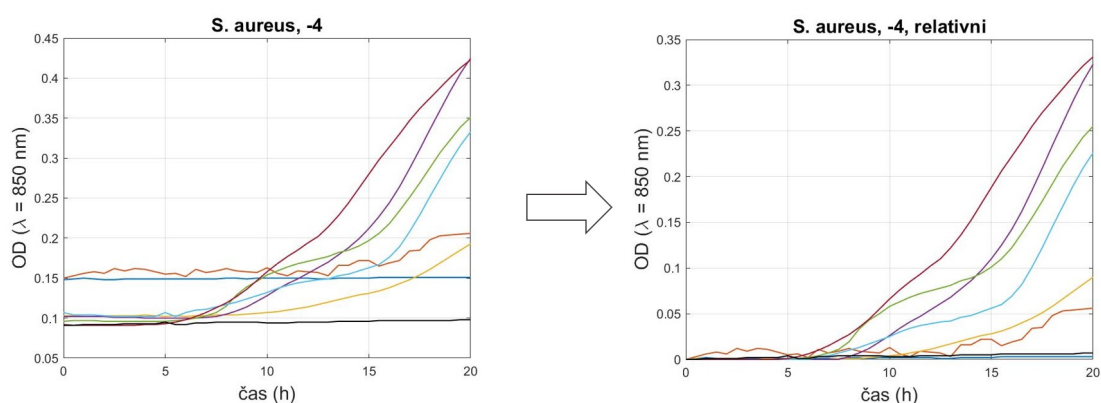
Obrázek 5.7: Vývoj optické hustoty roztoků bakterie *S. aureus* v koncentraci 10^{-3} v čase, vlnová délka 600 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD



Obrázek 5.8: Vývoj optické hustoty roztoků bakterie *S. aureus* v koncentraci 10^{-3} v čase, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD



Obrázek 5.9: Vývoj optické hustoty roztoků bakterie *S. aureus* v koncentraci 10^{-4} v čase, vlnová délka 600 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD



Obrázek 5.10: Vývoj optické hustoty roztoků bakterie *S. aureus* v koncentraci 10^{-4} v čase, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD

5.1.3 Srovnání účinku na obě bakterie

U obou bakterií se antibakteriální účinek ZnO-NP se zvyšující koncentrací zvyšuje. U *E. coli* je ale toxicita zásadně menší. Můžeme vidět, že ani nejvyšší koncentrace růst bakterií nezastavila zcela a naopak nejnižší koncentrace neměly na růst bakterie žádný vliv. Může to být způsobeno tím, že velikost ZnO-NP je pro bakterii *E. coli* ještě příliš velká. Podle studie Chao Wang a spol. [13] by měly mít ZnO-NP na *E. coli* zničující účinek již po několika hodinách, což je v rozporu s výsledky této práce. Rozdíl je v tom, že ve zmíněné studii byly nanočástice 140x menší než v této práci. Konkrétně tato práce používala NP o rozměrech $10 \mu\text{m}$, zatímco NP ve zmíněné studii měly velikost 70 nm , tedy o více než dva řády méně. Toto zjištění souhlasí s tvrzením, že čím menší velikost NP, tím lepší antibakteriální účinek [14].

Rozdílný účinek ZnO-NP o stejné velikosti na bakterie *E. coli* a *S. aureus* můžeme připisovat rozdílnému složení buněčných stěn bakterií (viz. kapitola 1).

5.2 Bioreaktor

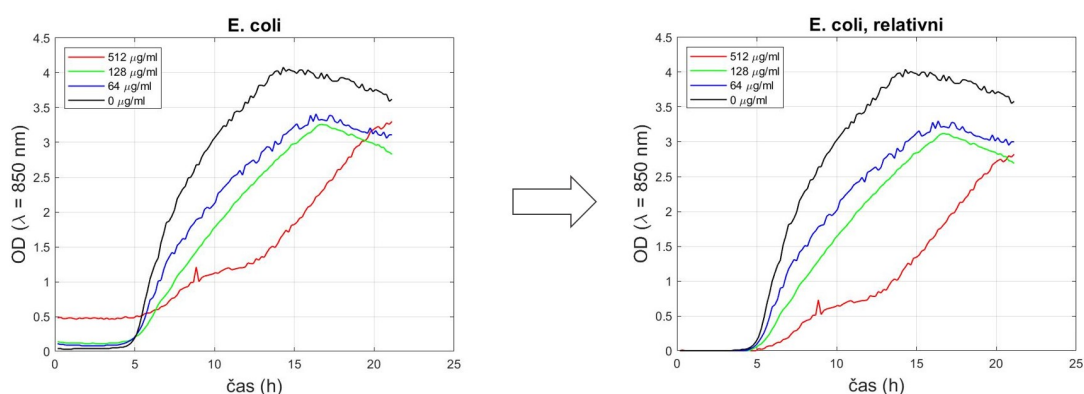
5.2.1 *Escherichia coli* - koncentrace

Již podle výsledků z experimentu provedeného za pomoci UV-VIS spektrofotometru bylo zjištěno, že ZnO-NP v mikro rozměrech nemají na *E. coli* příliš velký účinek. Za pomoci bioreaktorů byly zkoumány koncentrace ZnO-NP s nejzajímavějším účinkem za účelem bližšího prozkoumání za pomoci stanovení konkrétní hodnoty CFU v daném vzorku po 24hodinové inkubaci v Petriho miskách. Tyto koncentrace byly: 512 $\mu\text{g/ml}$, 128 $\mu\text{g/ml}$ a 64 $\mu\text{g/ml}$.

Na obrázku 5.11 můžeme vidět vlevo reálnou OD vzorků a na pravo relativní hodnotu OD po sjednocení počáteční OD vzorku. Obrázky 5.12 až 5.15 pak ukazují Petriho misky po 24hodinové inkubaci vzorků.

Můžeme vidět, že grafy korespondují s výsledky experimentu za pomoci UV-VIS spektroskopie, tedy že se zvyšující se koncentrací ZnO-NP roste i jejich účinek, avšak ani nejvyšší koncentrace nezastavuje růst bakterií zcela.

Tabulka 5.1 ukazuje konkrétní počty kolonií jednotlivých vzorků po 24hodinové inkubaci a účinek ZnO-NP v procentech vůči referenčnímu vzorku bez ZnO-NP. Jak již bylo zmíněno výše, antibakteriální účinek není veliký. Nedošlo ke snížení počtu bakterií ani o jeden řád a ani nejvyšší koncentrace ZnO-NP nesnížila počet kolonií o více jak polovinu. Jak bylo diskutováno výše, příčinou je pravděpodobně velikost nanočástic.

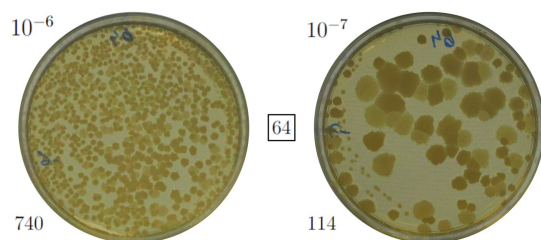


Obrázek 5.11: Vývoj optické hustoty roztoků bakterie *E. coli* v koncentraci 10^{-4} a ZnO-NP v čase, koncentrace ZnO-NP v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v legendě, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD

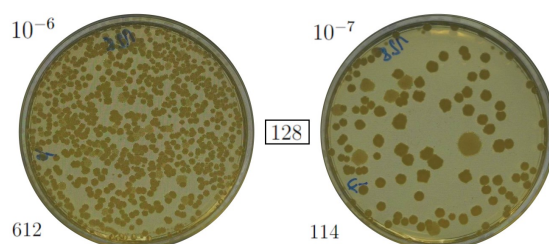
Počty kolonií

Koncentrace ZnO ($\mu\text{g/ml}$)	Koncentrace (CFU/ml)	Procent z reference
64	$1,88 \cdot 10^9$	76,11
128	$1,75 \cdot 10^9$	70,85
512	$1,62 \cdot 10^9$	65,59
0	$2,47 \cdot 10^9$	100

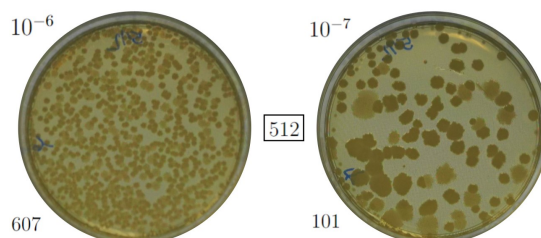
Tabulka 5.1: tabulka koncentrací bakterií v jednotlivých vzorcích a procentuálního snížení oproti referenci



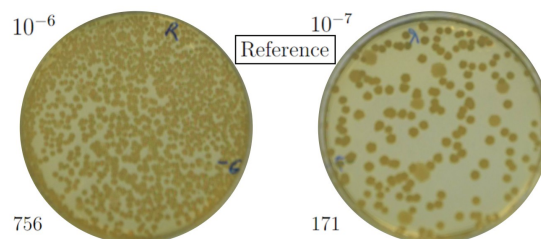
Obrázek 5.12: Kolonie bakterie *E. coli* po 24hodinové inkubaci; koncentrace ZnO-NP - 64 $\mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku



Obrázek 5.13: Kolonie bakterie *E. coli* po 24hodinové inkubaci; koncentrace ZnO-NP - 128 $\mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku



Obrázek 5.14: Kolonie bakterie *E. coli* po 24hodinové inkubaci; koncentrace ZnO-NP - 512 $\mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku



Obrázek 5.15: Kolonie bakterie *E. coli* po 24hodinové inkubaci; vzorek bez ZnO-NP; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku

5.2.2 Vliv viditelného světla

Vliv viditelného bílého světla na antibakteriální aktivitu ZnO-NP byl zkoumán na obou bakteriích (tj. *E. coli* a *S. aureus*). Byl vždy jeden vzorek referenční, tedy bez ZnO-NP, a jeden se ZnO-NP o koncentraci 512 $\mu\text{g/ml}$.

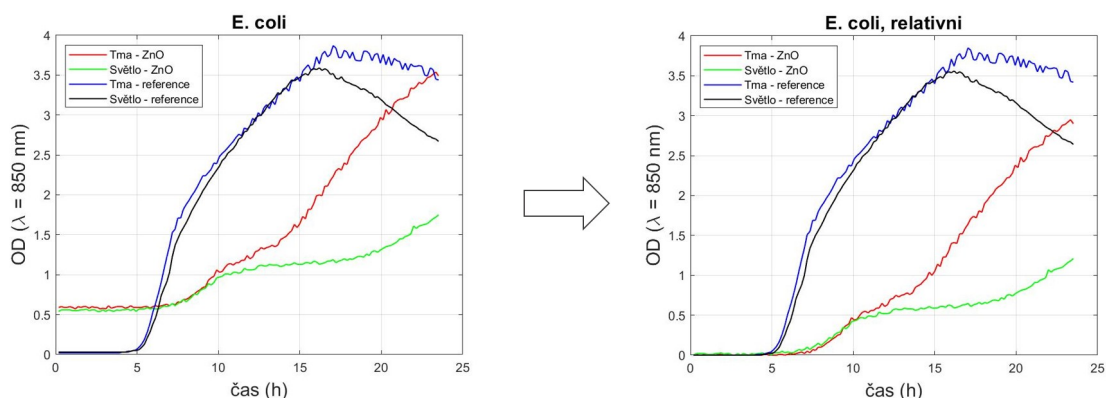
Escherichia coli

Obrázek 5.16 ukazuje hodnotu OD všech čtyř vzorků v čase. Můžeme vidět, že hodnota OD vzorku se ZnO-NP je v obou případech menší než OD vzorku referenčního, což souhlasí s předchozím zjištěním. V obou případech (světlo, tma) ZnO-NP zpomalují růst bakterií, avšak u vzorku ve tmě tento účinek slábne s časem mnohem více, než u vzorku, který je osvětlován.

Obrázky 5.17 až 5.20 ukazují stav vzorku po 24hodinové inkubaci, v obrázcích jsou uvedeny konkrétní počty kolonií na misce. Z těchto výsledků je dále vypočtena koncentrace bakterií v celém vzorku, která je zobrazena v tabulce 5.2.

Je obecně známo, že většině mikroorganismů se lépe daří ve tmě, proto není překvapující, že koncentrace bakterií u referencí se liší, avšak podle OD můžeme také říci, že je to způsobeno tím, že bakterie ve vzorku již přešly ze stacionární fáze do fáze odumírání.

Z tabulky 5.2 i z grafů na obrázku 5.16 je zřejmé, že světlo podporuje antibakteriální aktivitu ZnO-NP. Sice stále nejde o snížení počtu bakterií v rámci řádů, ale na světle byla koncentrace bakterií ve vzorku se ZnO-NP snížena na 32,14 % koncentrace vzorku referenčního. U vzorku ve tmě to bylo pouze 88,71 %.

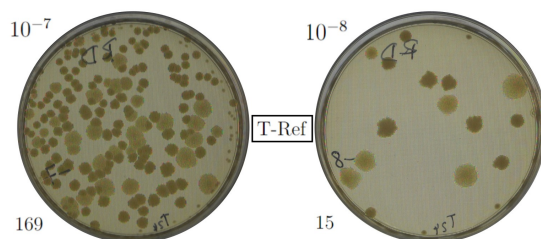


Obrázek 5.16: Vývoj optické hustoty roztoků bakterie *E. coli* v koncentraci 10^{-4} v čase, Koncentrace ZnO ve vzorcích se ZnO je 512 $\mu\text{g/ml}$, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD

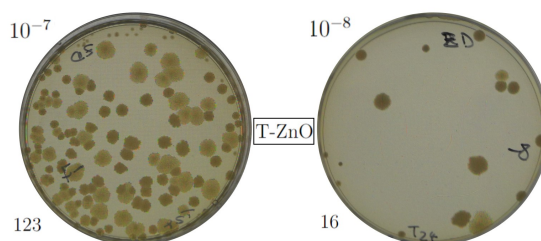
Vzorek	Koncentrace (CFU/ml)	%
Světlo - ZnO-NP	$0,814 \cdot 10^9$	25,52
Světlo - reference	$2,533 \cdot 10^9$	79,40
Tma - ZnO-NP	$2,83 \cdot 10^9$	88,71
Tma - reference	$3,19 \cdot 10^9$	100

Tabulka 5.2: tabulka koncentrací bakterií v jednotlivých vzorcích; % vzhledem ke vzorku tma - reference;

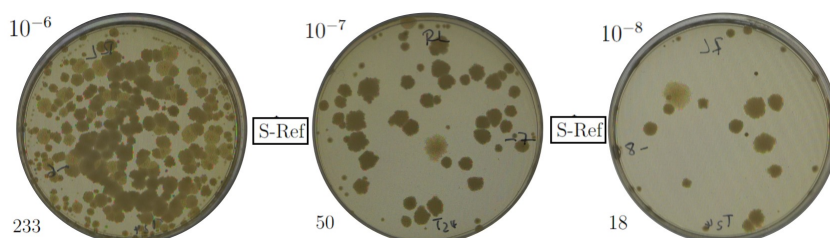
Počty kolonií



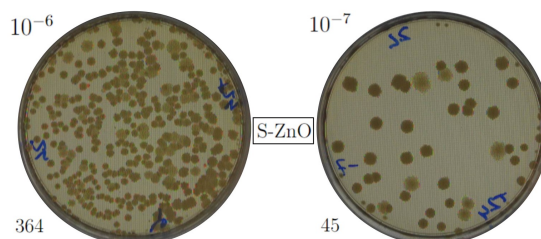
Obrázek 5.17: Kolonie bakterie *E. coli* po 24hodinové inkubaci; Reference pro tm; bez ZnO-NP; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-7} vlevo a 10^{-8} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku



Obrázek 5.18: Kolonie bakterie *E. coli* po 24hodinové inkubaci; Tma; Koncentrace ZnO-NP $512 \mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-7} vlevo a 10^{-8} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku



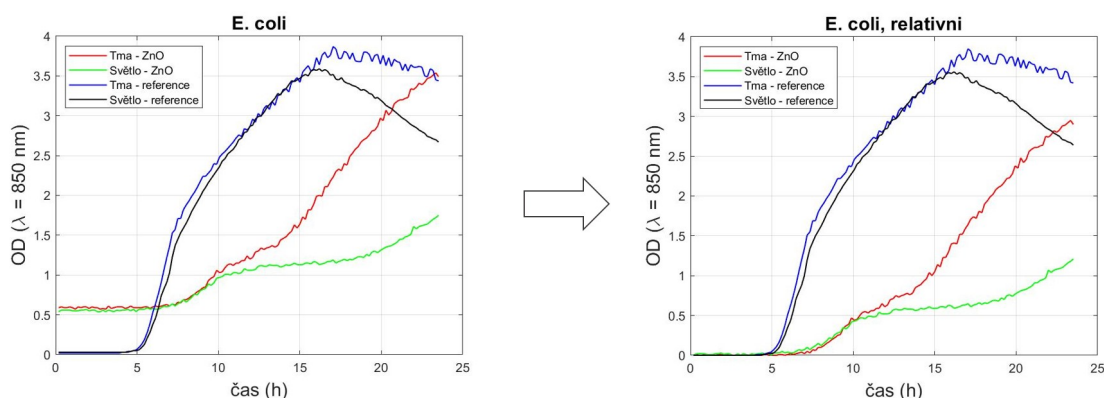
Obrázek 5.19: Kolonie bakterie *E. coli* po 24hodinové inkubaci; Reference pro světlo; bez ZnO-NP; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo, 10^{-7} uprostřed a 10^{-8} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku



Obrázek 5.20: Kolonie bakterie *E. coli* po 24hodinové inkubaci; Světlo; Koncentrace ZnO-NP $512 \mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku

Staphylococcus aureus

Obrázek 5.21 ukazuje OD všech čtyř vzorků v čase. Stojí za povšimnutí, že růst bakterie *S. aureus* je více ovlivněn změnou prostředí, co se týče světla, než *E. coli*. Graf též potvrzuje předchozí zjištění, že ZnO-NP o koncentraci $512 \mu\text{g/ml}$ mají zásadní vliv na růst této bakterie. Obrázky 5.22 až 5.25 ukazují kolonie po 24hodinové inkubaci. V obrázcích jsou uvedeny konkrétní počty kolonií v daném vzorku. Z těchto počtů je odvozena koncentrace bakterií ve vzorku, která je zapsána v tabulce 5.3. Jak již bylo zmíněno i v tomto případě se projevila závislost růstu bakterií na světle. Koncentrace kolonií ve vzorku, který byl vystaven záření je téměř poloviční. Antibakteriální aktivita ZnO-NP v závislosti na elektromagnetickém záření je ale v případě *Staphylococca* zajímavější. Ve vzorku, který byl ve tmě byl počet bakterií díky přítomnosti ZnO-NP snížen o 6 řádů. To je samo o sobě už dobrý výsledek. Ve vzorku vystaveném záření však za přítomnosti ZnO-NP nebyla jediná kolonie.

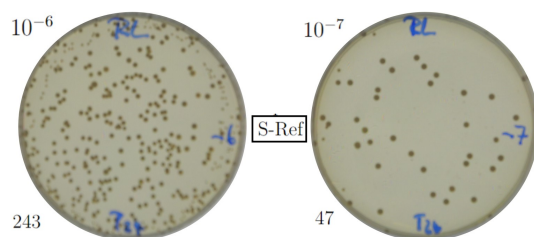


Obrázek 5.21: Vývoj optické hustoty roztoků bakterie *S. aureus* v koncentraci 10^{-4} v čase; Koncentrace ZnO ve vzorcích se ZnO je $512 \mu\text{g/ml}$, vlnová délka 850 nm, vlevo graf skutečných hodnot OD, vpravo relativní OD

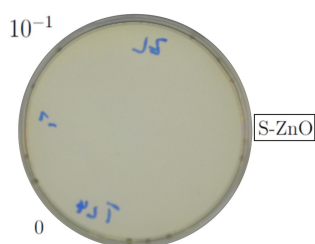
Počty kolonií

Vzorek	Koncentrace (CFU/ml)	%	R-value
Světlo - ZnO-NP	0	0	—
Světlo - reference	$0,713 \cdot 10^9$	53,21	-0,274
Tma - ZnO-NP	$1,66 \cdot 10^3$	0,000123	-5,91
Tma - reference	$1,34 \cdot 10^9$	100	0

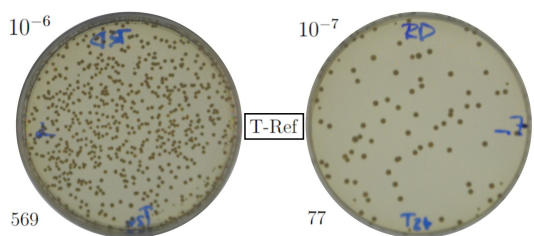
Tabulka 5.3: tabulka koncentrací bakterií v jednotlivých vzorcích; % vzhledem ke vzorku tma - reference; R-value = $\log(\frac{C}{C_0})$, C - zkoumaná koncentrace, C_0 - referenční koncentrace



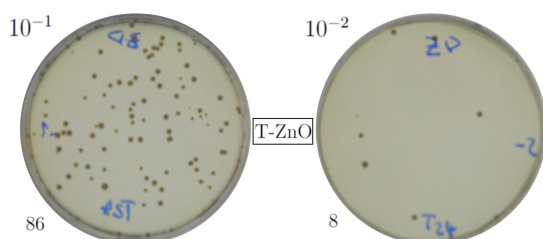
Obrázek 5.22: Kolonie bakterie *S.aureus* po 24hodinové inkubaci; Reference pro světlo; bez ZnO-NP; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku



Obrázek 5.23: Kolonie bakterie *S.aureus* po 24hodinové inkubaci; Světlo; Koncentrace ZnO-NP $512 \mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-1} ; vlevo dole počet kolonií ve vzorku



Obrázek 5.24: Kolonie bakterie *S.aureus* po 24hodinové inkubaci; Reference pro tmu; bez ZnO-NP; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-6} vlevo a 10^{-7} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku



Obrázek 5.25: Kolonie bakterie *S.aureus* po 24hodinové inkubaci; Tma; Koncentrace ZnO-NP $512 \mu\text{g/ml}$; použité ředění původního vzorku z bioreaktoru je 10^{-1} vlevo a 10^{-2} vpravo; vlevo dole počet kolonií ve vzorku

Srovnání účinku na obě bakterie

V obou případech světlo zvýšilo antibakteriální aktivitu ZnO-NP. Tento jev je přisuzován fotokatalytickým vlastnostem ZnO, které má díky tomu, že se jedná o polovodič. U *E. coli* došlo ke zlepšení antibakteriálního účinku ze snížení CFU o 11,29 % na 67,86 %, tedy účinek ZnO-NP se zlepšil šestkrát. Pro bakterii *S. aureus* byl účinek ZnO-NP za přítomnosti světla smrtící.

Závěr

Mnoho prací se v dnešní době zabývá antibakteriálními účinky kovových nanočástic a především jak dosáhnout nejlepších výsledků u patogenních bakterií. ZnO-NP se dají využít k ošetření potravinových obalů či jako součást fotokatalyticky aktivního transparentního nátěru aplikovatelného především na barevné fasády bytových domů. Nejenže díky své toxicitě může zabránit množení mikroorganismů, ale též díky fotokatalytickým vlastnostem může sloužit jako ochrana před UV zářením (již využíváno v kosmetice). Z provedených výzkumů vyplývá, že nanočástice oxidu zinečnatého mají potenciál nahradit u lidí i zvířat běžná antibiotika. Avšak je ještě třeba dále studovat antibakteriální účinky, bezpečnost a podrobné mechanismy antibakteriálního působení ZnO-NP různých velikostí a tvarů než, se tak stane.

Práce potvrzuje, že fotokatalytické vlastnosti ZnO-NP mají významný vliv na jejich antibakteriální aktivitu. Zároveň ukazuje, že musí být nalezena jistá shoda mezi velikostí NP a bakterií, jejíž růst je třeba inhibovat, jelikož ZnO-NP nemají stejný účinek na různé druhy bakterií. Dalo by se říci, že bakterie G-, které mají silnější buněčnou stěnu jsou vůči ZnO-NP odolnější a je pro ně třeba zmenšit rozměry NP až do nanorozměrů, zatímco u G+ bakterií by mohly být postačující mikrorozměry. Konkrétní nastavení nanočástic pro jednotlivé bakterie bude však třeba ještě najít.

Bibliografie

1. AMNA SIRELKHATIM, a spol. Review on Zinc Oxide Nanoparticles. 2015.
2. HURYCH Jakub; Štícha, Roman et al.; ve spolupráci s Ústavem lékařské mikrobiologie 2. LF UK. Lékařská mikrobiologie - repetitorium. 2020.
3. MICHALČÁKOVÁ, Iveta. Spektroskopické metody charakterizace materiálů (UV/VIS, FTIR). 2008. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/769>.
4. VÍTKOVÁ, Ivana. Gram pozitivní aerobní a fakultativně anaerobní bakterie. [B.r.]. Dostupné také z: <https://docplayer.cz/136459724-Gram-pozitivni-aerobni-a-fakultativne-anaerobni-bakterie-ivana-vitkova-okm-fn-brno.html>.
5. BAKOVSKÝ, Bc. Pavel. Inaktivace bakterií fyziologicky významnými roztoky ošetřenými netermálním plazmatem za atmosférického tlaku. 2018.
6. CSC, Ing Jaroslav Jíra. Přednáška - Netermální plazma a jeho antibakteriální účinky. 2020.
7. Staphylococcus Bacteria; Examples, Classification and Characteristics. [B.r.]. Dostupné také z: [https://www.microscopemaster.com/staphylococcus-bacteria.html#gallery\[pagegallery\]/0/](https://www.microscopemaster.com/staphylococcus-bacteria.html#gallery[pagegallery]/0/).
8. E. Coli under the Microscope. [B.r.]. Dostupné také z: [https://www.microscopemaster.com/e-coli-under-microscope.html#gallery\[pagegallery\]/0/](https://www.microscopemaster.com/e-coli-under-microscope.html#gallery[pagegallery]/0/).
9. Návod k úloze - Spektrofotometrie. [B.r.]. Dostupné také z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2016/C7640/um/6_IA_spektrofotometrie_navod.pdf.
10. KOLEKTIV, autorů. Skripta - Laboratorní technika. 2021. Dostupné také z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/LABT_skripta.pdf.
11. HEJSKOVÁ, Bc. Veronika. UV/VIS spektrofotometrie a možnosti jejího využití v rámci vzdělávání učitelů chemie. 2016. Dostupné také z: https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/75582/DPTX_2014_1_11410_0_455802_0_161449.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
12. PAZNOCHT, Luboš. Spektrofotometrie (UV/VIS). [B.r.]. Dostupné také z: https://home.czu.cz/storage/1177/121996_Spektrofotometrie.pdf.
13. CHAO WANG, a spol. Antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles on Escherichia coli K88. 2012.
14. ZKHAROVA O, a spol. Antibacterial activity of ZnO nanoparticles: dependence on particle size, dispersion media and storage time. 2018.

15. Zvýšená bioaktivita nanočástic ZnO - antimikrobiální studie. 2008. Dostupné z DOI: 10.1088/1468-6996/9/3/035004.
16. PETRŽÍLKOVÁ, Bc. Michaela. Vliv aditivace na fotokatalytické a antimikrobiální vlastnosti nanočásticových suspenzí. 2020. Dostupné také z: https://dspace.tul.cz/bitstream/handle/15240/157706/DiplomovaPrace_completed.pdf?sequence=1.
17. ROBERTA BRAYNER, a spol. Toxicological Impact Studies Based on Escherichia coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. 2006. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/nl052326h>.