

České vysoké učení technické v Praze

Fakulta elektrotechnická

Katedra teorie obvodů



Bakalářská práce

Ovlivňování růstu bakterií pomocí synergie chemických a fyzikálních faktorů

Influencing bacterial growth using a synergy of chemical and physical factors

Autor: Matěj Dynda

Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Jíra, CSc.

Studijní program: Lékařská elektronika a bioinformatika

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Dynda** Jméno: **Matěj** Osobní číslo: **507593**
Fakulta/ústav: **Fakulta elektrotechnická**
Zadávající katedra/ústav: **Katedra teorie obvodů**
Studijní program: **Lékařská elektronika a bioinformatika**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Ovlivňování růstu bakterií pomocí synergie chemických a fyzikálních faktorů

Název bakalářské práce anglicky:

Influencing bacterial growth using a synergy of chemical and physical factors

Pokyny pro vypracování:

V jedné z předchozích bakalářských prací na katedře fyziky bylo úkolem zkoumání vlivu oxidu zinečnatého (ZnO) na růst gram-pozitivních a gram-negativních bakterií. Úkolem této práce je rozšířit tento výzkum zejména s ohledem na různé druhy ZnO (různé tvary a velikosti zrn), a také prozkoumat synergii vlivu ZnO a dalších vlivů, jako je plazma aktivovaná voda (PAW), viditelné záření, a také různé druhy korpuskulárního záření.

1. Prostudujte doporučenou literaturu a vypracujte přehled stavu problematiky.
2. Prozkoumejte biocidní vlastnosti nejméně tří typů nanočástic oxidu zinečnatého (ZnO) v závislosti na jejich koncentraci. Růstové křivky zjišťujte pomocí měření absorpance roztoku se ZnO a bakteriemi při použití bakterií *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*.
3. Modifikujte tyto experimenty přidáním plazma aktivované vody, přítomností viditelného záření, případně přítomností vysokoenergetického korpuskulárního záření.
4. Zpracujte a analyzujte výsledky.

Seznam doporučené literatury:

1. A. Sirelkhatim, S. Mahmud et al.: Nano-Micro Lett. (2015) 7(3):219–242, doi: 10.1007/s40820-015-0040-x
2. Mendes, C.R., Dilari, G., Forsan, C.F. et al. Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens. Sci Rep 12, 2658 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06657-y>
3. H. Wang et. al., Evaluation of plasma-activated water: Efficacy, stability, physicochemical properties, and mechanism of inactivation against *Escherichia coli*, LWT, Volume 184, 2023, 114969, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114969>.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

Ing. Jaroslav Jíra, CSc. katedra fyziky FEL

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

Datum zadání bakalářské práce: **06.02.2024**

Termín odevzdání bakalářské práce: **24.05.2024**

Platnost zadání bakalářské práce: **21.09.2025**

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

Student bere na vědomí, že je povinen 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 studenta

Prohlášení

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

V Praze dne

.....

Podpis autora práce

Poděkování

Rád bych poděkoval panu Ing. Jaroslavu Jírovi CSc. za vedení a pomoc při tvorbě bakalářské práce.

Matěj Dynda

Abstrakt

Bakteriální rezistence vůči konvenčním antibakteriálním metodám je rostoucím problémem ve zdravotnictví. Tato práce se zaměřuje na zkoumání alternativních metod pro potlačení bakteriálního růstu. Středobodem pozornosti této práce jsou antibakteriální účinky kovových nanočástic, a to konkrétně oxidu zinečnatého, stříbra a zlata. Antibakteriální vlastnosti dalších fyzikálních vlivů jsou rozšiřujícím doplňkem této práce.

V teoretické části práce je kladen důraz na popis gram-negativních a gram-pozitivních bakterií, použitých nanočástic a jiných fyzikálních vlivů. Experimentální část práce zahrnuje přesný postup přípravy vzorků, použité metody a zaznamenané výsledky.

U kovových nanočástic lze pozorovat a prokázat antibakteriální účinky, které jsou spjaty s jejich určitou koncentrací. Dále bylo zjištěno, že různé faktory, jako je teplota nebo hliníková fólie, mohou rovněž ovlivnit bakteriální růst.

Klíčová slova: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, nanočástice, oxid zinečnatý, hedgehog nanočástice, neutrony

Abstract

Bacterial resistance to conventional antibacterial methods is a growing concern in healthcare. This study focuses on exploring alternative methods to suppress bacterial growth. The centerpiece of this research is the antibacterial effects of metal nanoparticles, specifically zinc oxide, silver, and gold. The antibacterial properties of other physical influences are complementary to this study.

The theoretical section emphasizes describing gram-negative and gram-positive bacteria, the nanoparticles used, and other physical influences. The experimental section outlines the precise procedure for sample preparation, methods used, and recorded results.

Metal nanoparticles exhibit antibacterial effects that correlate with their specific concentrations. Additionally, it has been demonstrated that other factors, such as temperature or aluminum foil, can also influence bacterial growth.

Keywords: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, nanoparticles, zinc oxide, hedgehog nanoparticles, neutrons

Obsah

| | |
|--------------------------------------------------------------------|--------------|
| Seznam zkratk | xviii |
| Seznam obrázků | xix |
| Úvod | 1 |
| Část I., Teoretická část | 2 |
| 1 Bakteriální analýza | 3 |
| 1.1 Dělení bakterií..... | 4 |
| 1.2 <i>Escherichia coli</i> | 6 |
| 1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> | 6 |
| 2 Nanočástice | 7 |
| 2.1 Oxid zinečnatý | 9 |
| 2.1.1 Antibakteriální mechanismy ZnO-NP | 9 |
| 2.2 <i>Hedgehog</i> nanočástice..... | 11 |
| 2.3 Stříbrné nanočástice | 13 |
| 2.3.1 Antibakteriální aktivita Ag-NP..... | 13 |
| 2.4 Zlaté nanočástice..... | 16 |
| 2.4.1 Antibakteriální účinky Au-NP..... | 16 |
| 3 Jiné fyzikální vlivy | 18 |
| 3.1 Neutrony generované vysokoenergetickým plazmovým výbojem | 18 |
| 3.2 Působení hliníkové folie na bakterie | 19 |
| 3.3 Působení tepla na bakterie..... | 19 |

| | |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| Část II., Experimentální část..... | 21 |
| 4 Příprava vzorků a postup experimentu | 22 |
| 4.1 Popis použitých bakterií a materiálů | 22 |
| 4.1.1 Bakterie | 22 |
| 4.1.2 Nanočástice | 22 |
| 4.1.3 Hliníková fólie | 22 |
| 4.2 Metody a příprava vzorků | 23 |
| 4.2.1 Růstové médium..... | 23 |
| 4.2.2 Nanočástice | 23 |
| 4.2.3 Hliníková fólie | 25 |
| 4.2.4 UV-VIS spektrofotometrie..... | 25 |
| 4.2.5 Bioreaktor..... | 27 |
| 4.2.6 Jiné fyzikální vlivy | 28 |
| 5 Výsledky | 31 |
| 5.1 Vyhodnocení výsledků..... | 31 |
| 5.2 UV-VIS spektrofotometrie..... | 32 |
| 5.2.1 <i>Escherichia coli</i> | 32 |
| 5.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> | 37 |
| 5.3 Bioreaktor | 43 |
| 5.3.1 <i>Escherichia coli</i> | 43 |
| 5.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> | 44 |
| 5.4 Jiné fyzikální vlivy..... | 45 |
| 6 Diskuse..... | 48 |
| 7 Závěr..... | 49 |
| 8 Reference..... | 50 |

Seznam zkratek

| Zkratka | Význam zkratky |
|------------------|-------------------------------|
| NP | Nanočástice |
| ZnO-NP | Nanočástice oxidu zinečnatého |
| Ag-NP | Stříbrné nanočástice |
| Au-NP | Zlaté nanočástice |
| HH-NP | Hedgehog nanočástice |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| G+ | Grampozitivní bakterie |
| G- | Gramnegativní bakterie |
| MHB | Muller-Hintonův bujón |
| MHA | Muller-Hintonův agar |
| CFU | Kolonie formující jednotky |
| OD | Optická hustota |

Seznam obrázků

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| OBRÁZEK 1: RŮZNÉ TVARY, KTERÝCH MOHOU BAKTERIE NABÝVAT [3] | 3 |
| OBRÁZEK 2: ZÁKLADNÍ USPOŘÁDÁNÍ BAKTERIÁLNÍ STRUKTURY [4] | 4 |
| OBRÁZEK 3: BUNĚČNÁ STĚNA G+ BAKTERIE [7] | 5 |
| OBRÁZEK 4: BUNĚČNÁ STĚNA G- BAKTERIE [7] | 5 |
| OBRÁZEK 5: OBARVENÝ SNÍMEK <i>ESCHERICHIA COLI</i> POD ELEKTRONOVÝM MIKROSKOPEM [11] | 6 |
| OBRÁZEK 6: OBARVENÝ SNÍMEK <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> POD ELEKTRONOVÝM MIKROSKOPEM [14] | 7 |
| OBRÁZEK 7: RŮZNÉ DRUHY APLIKACÍ NP V BIOMEDICÍNĚ [17] | 8 |
| OBRÁZEK 8: FOTKA ZNO-NP POD ELEKTRONOVÝM MIKROSKOPEM [22] | 9 |
| OBRÁZEK 9: PRINCIP ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU ZNO-NP: 1) GENEROVÁNÍ ROS, 2) ROZPOUŠTĚNÍ IONTŮ Zn^{2+} ; 3) ELEKTROSTATICKE INTERAKCE NA BUNĚČNÉ MEMBRÁNĚ [24] | 11 |
| OBRÁZEK 10: RŮZNÉ MOŽNOSTI KONFIGURACE STRUKTURY HH-NP [28] | 12 |
| OBRÁZEK 11: BĚŽNÝ TVAR HH-NP [29] | 12 |
| OBRÁZEK 12: AG-NP POD ELEKTRONOVÝM MIKROSKOPEM [32] | 13 |
| OBRÁZEK 13: ANTIBAKTERIÁLNÍ MECHANISMY AG-NP: 1) NARUŠENÍ BUNĚČNÉ STĚNY A MEMBRÁNY POMOCÍ Ag^+ , 2) DENATURACE RIBOZOMŮ, 3) NARUŠENÍ PRODUKCE ATP, 4) NARUŠENÍ MEMBRÁNY POMOCÍ ROS, 5) INTERFERENCE S DNA, 6) DENATURACE MEMBRÁNY POMOCÍ AG-NP, 7) PERFORACE MEMBRÁNY POMOCÍ AG-NP [34] | 15 |
| OBRÁZEK 14: AU-NP POD ELEKTRONOVÝM MIKROSKOPEM [36] | 16 |
| OBRÁZEK 15: MOŽNÉ ANTIBAKTERIÁLNÍ MECHANISMY AU-NP NA RŮZNÉ DRUHY BAKTERIÍ: A) INTERAKCE S BAKTERIÁLNÍ MEMBRÁNOU, B) INTERAKCE S MOLEKULAMI UVNITŘ BAKTERIE, C) FOTOTERMÁLNÍ JEVIŠTVO, D) TVORBA ROS [35] | 17 |
| OBRÁZEK 16: POHLED DO REAKČNÍ KOMORY NA VNĚJŠÍ A VNITŘNÍ ELEKTRODY V KRUHOVÉM USPOŘÁDÁNÍ. VLEVO DETAILNÍ FOTKA ELEKTROD, VPRAVO FOTKA CELÉ APARATURY | 19 |
| OBRÁZEK 17: VLEVO LAHVIČKA S OBSAHEM ZNO-NP 25 nm A VPRAVO LAHVIČKA S OBSAHEM ZNO-NP 20 μm | 23 |
| OBRÁZEK 18: VLEVO LAHVIČKA S AG-NP (ŽLUTÁ BARVA) A VPRAVO LAHVIČKA S AU-NP (ČERVENÁ BARVA) | 24 |
| OBRÁZEK 19: LAHVIČKA S HH-NP | 24 |
| OBRÁZEK 20: BIOTEK EPOCH 2 MICROPLATE SPECTROPHOTOMETER | 25 |
| OBRÁZEK 21: VLEVO BIOREAKTOR BIOSAN RTS-1C, VPRAVO VELKÁ ZKUMAVKA O OBJEMU 50 ml | 27 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| OBRÁZEK 22: PETRIHO MISKY Z MHA, PŘÍSLUŠNOU BAKTERIÁLNÍ KONCENTRACÍ A TERČEM PRO ROZLOŽENÍ TLOUŠŤKY HLINÍKOVÉ FÓLIE | 29 |
| OBRÁZEK 23: PETRIHO MISKA S MHA, BAKTERIEMI A HLINÍKOVÝMI TROJÚHELNÍČKY POLOŽENÝMI NA VÍČKO APARATURY | 30 |
| OBRÁZEK 24: PLASTOVÁ PETRIHO MISKA O PRŮMĚRU 6 cm S BAKTERIÁLNÍMI KOLONIEMI. HORNÍ NÁPIS ODPOVÍDÁ PŘÍSLUŠNÉMU VZORKU NANOČÁSTIC A DOLNÍ NÁPIS ODPOVÍDÁ STUPNI ŘEDĚNÍ | 32 |
| OBRÁZEK 25: VÝVOJ OD ROZTOKU <i>E. COLI</i> A ZNO-NP 25 nm..... | 33 |
| OBRÁZEK 26: VÝVOJ OD ROZTOKU <i>E. COLI</i> A ZNO-NP 20 μm..... | 34 |
| OBRÁZEK 27: VÝVOJ OD ROZTOKU <i>E. COLI</i> A AG-NP..... | 35 |
| OBRÁZEK 28: VÝVOJ OD ROZTOKU <i>E. COLI</i> A AU-NP..... | 36 |
| OBRÁZEK 29: VÝVOJ OD ROZTOKU <i>E. COLI</i> A HH-NP | 37 |
| OBRÁZEK 30: VÝVOJ OD ROZTOKU <i>S. AUREUS</i> A ZNO-NP 25 nm | 38 |
| OBRÁZEK 31: VÝVOJ OD ROZTOKU <i>S. AUREUS</i> A ZNO-NP 20 μm | 39 |
| OBRÁZEK 32: VÝVOJ OD ROZTOKU <i>S. AUREUS</i> A AG-NP | 40 |
| OBRÁZEK 33: VÝVOJ OD ROZTOKU <i>S. AUREUS</i> A AU-NP | 41 |
| OBRÁZEK 34: VÝVOJ OD ROZTOKU <i>S. AUREUS</i> A HH-NP..... | 42 |
| OBRÁZEK 35: VLIV RŮZNÝCH KONCENTRACÍ ZNO-NP 25 nm NA RŮST G- BAKTERIÍ V BIOREAKTORU | 43 |
| OBRÁZEK 36: VLIV RŮZNÝCH KONCENTRACÍ ZNO-NP 25 nm NA RŮST G+ BAKTERIÍ V BIOREAKTORU | 44 |
| OBRÁZEK 37: MHA S <i>E. COLI</i> V KONCENTRACI 10 ⁻² , KTERÝ SPADL DO REAKČNÍ KOMORY | 45 |
| OBRÁZEK 38: KONCENTRACE BAKTERIÍ 10 ⁻³ , SLOUŽÍCÍ JAKO REFERENCE..... | 46 |
| OBRÁZEK 39: VLEVO FOTKA KONCENTRACE 10 ⁰ A VPRAVO FOTKA KONCENTRACE 10 ⁻¹ , NA KTERÝCH BYLA HLINÍKOVÁ FÓLIE PŘILOŽENA 24 HODIN | 46 |
| OBRÁZEK 40: VZOREK PO ÚSPĚŠNÉM PROVEDENÍ „VÝSTŘELŮ“ V REAKČNÍ KOMOŘE | 47 |

Úvod

V oblasti biomedicínského výzkumu a lékařství stále vzrůstá zájem o inovativní přístupy k potlačení šíření bakteriálních infekcí. Bakteriální rezistivita se vůči konvenčním léčebným metodám zvyšuje. [1] Stává se tedy nezbytným hledání nových prostředků a metod, které by pomohly ovlivnit nebo zastavit bakteriální růst a jejich další šíření. Jedním z perspektivních směrů v této oblasti je využití nanotechnologií a nanočástic (NP), které prokazují výraznou antibakteriální aktivitu. Tato práce se zaměřuje na zkoumání vlastností a účinků kovových nanočástic, zejména pak nanočástic oxidu zinečnatého (ZnO-NP) a jejich prostorových modifikací, nanočástic stříbra (Ag-NP) a zlata (Au-NP). Dále se tato práce zabývá i účinky jiných fyzikálních vlivů na růst a likvidaci bakterií, kterými jsou *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*.

Teoretická část práce se zabývá vlastnostmi bakterií použitých při experimentu a předpokládanými mechanismy antibakteriální aktivity nanočástic. V této části práce je dále popsán způsob, jakým dochází k vyhodnocování vlivu nanočástic a dalších fyzikálních jevů na růst bakterií. V experimentální části práce je popsán postup přípravy a následné provedení experimentů.

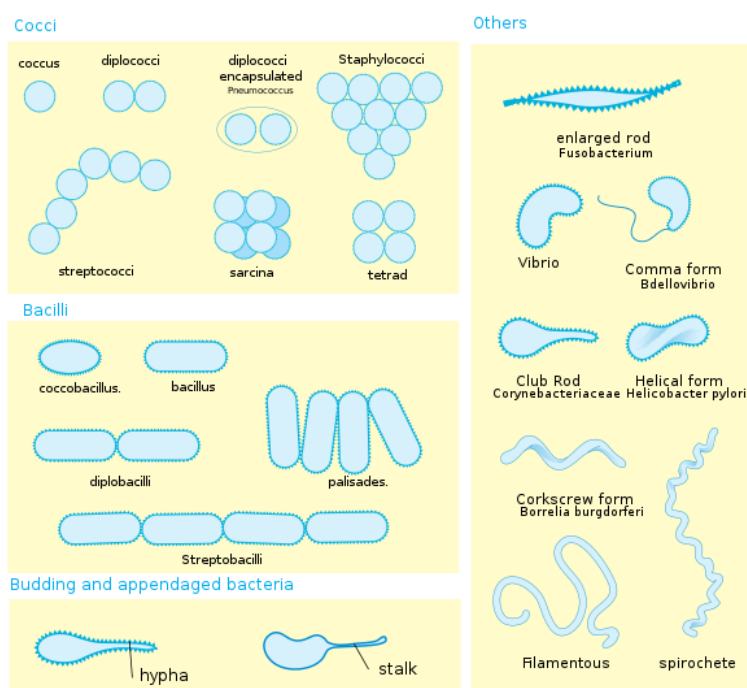
Cílem této bakalářské práce je přispět k rozvoji poznatků o antibakteriálních vlastnostech kovových nanočástic a jiných fyzikálních faktorů. Získané poznatky mohou vést ke zdokonalení boje proti bakteriálním infekcím.

**Část I.,
Teoretická část**

1 Bakteriální analýza

Velmi rozmanitou a pro život nepostradatelnou skupinou jsou bakterie, které představují fascinující oblast biologie bohatou na zkoumání. Věda studující vlastnosti těchto mikroorganismů se jmenuje mikrobiologie. Tyto jednobuněčné organismy, rozprostírající se všude kolem nás, jsou základními stavebními bloky života na Zemi. Jednoduché jednobuněčné organismy patřily k prvním formám života na Zemi a v současnosti se nacházejí na nejrůznějších místech naší planety. Můžeme je najít v půdě i ve vodě, ale i na těch nejvíc nehostinných místech jako jsou hydrotermální průduchy či zbytky radioaktivních odpadů. Bakterie tohoto druhu pak nazýváme extremofilní, jelikož mají schopnost přežít v těchto nehostinných podmínkách a dále se množit. [2]

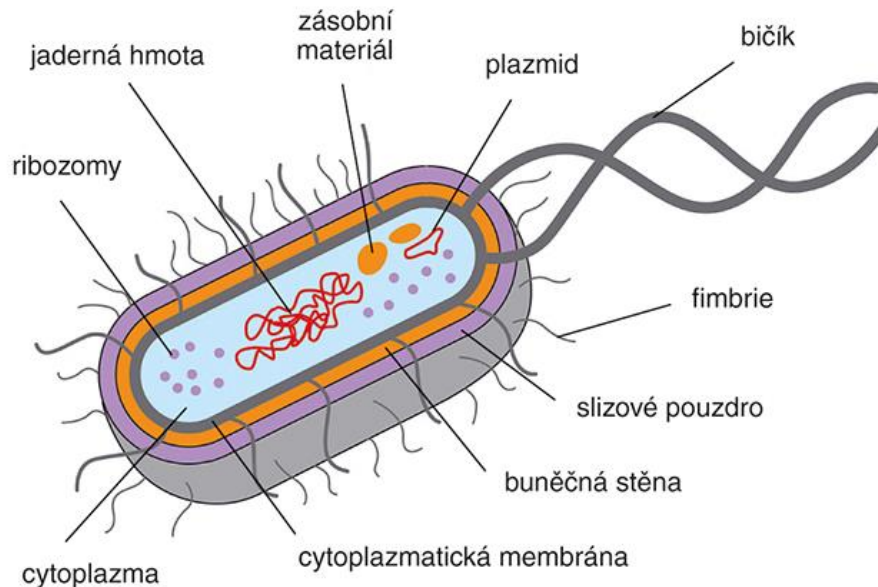
Hlavní faktor, který ovlivňuje bakterie, je právě jejich prostředí. Ovlivnění se projevuje primárně v bakteriálním tvaru, jenž odráží bakteriální funkcionalitu a schopnost bakterie interagovat s okolím.



Obrázek 1: Různé tvary, kterých mohou bakterie nabývat [3]

Kromě tvaru je i struktura bakteriální buňky zajímavou oblastí, kudy se může ubírat pozornost mikrobiologie. Obecně jsou bakterie obklopeny vnější buněčnou stěnou a vnitřní buněčnou membránou, které poskytují ochranu a stabilitu. Buněčná stěna dále slouží k transportu živin do buňky a odpadních látek pryč z buňky. Existují však i bakterie, které nemají buněčnou stěnu, které se nazývají mycoplasma. Povrchové struktury, jako jsou bičíky a fimbrie, umožňují bakteriím pohyb a přichycení k hostiteli nebo k povrchu. Vnitřek bakteriální buňky je vyplněn cytoplazmou,

která obsahuje složky nezbytné pro život a růst bakterie. Mezi tyto složky patří bílkoviny, sacharidy, nukleové kyseliny, soli a ionty.



Obrázek 2: Základní uspořádání bakteriální struktury [4]

Existují však i bakterie pro lidské zdraví prospěšné. Tyto bakterie žijí v symbióze s lidským tělem a podílejí se na udržení rovnováhy ve vnitřním mikrobiomu, který má zásadní vliv na lidské zdraví a imunitní systém. Nicméně některé bakterie mohou být patogenní a způsobovat různá onemocnění. Při propuknutí takového onemocnění je důležité zahájit léčbu, aby nedošlo k vážnému ohrožení zdraví vlivem bakteriální infekce. Aby bylo možné úspěšně provést léčbu, tak je třeba znát o jaký typ bakterie se jedná.

1.1 Dělení bakterií

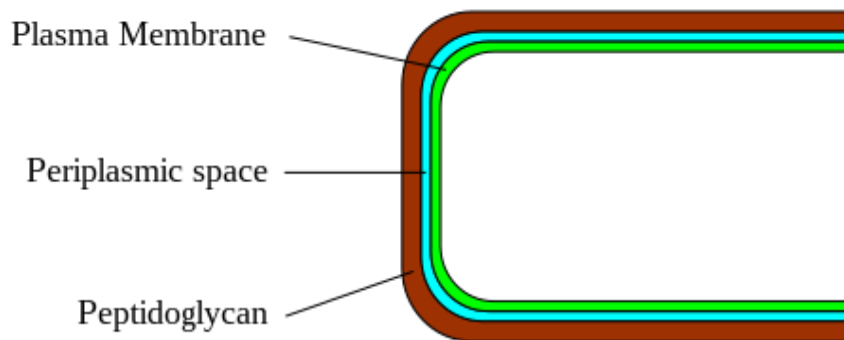
Ke stanovení, o jaký typ bakterií se jedná, bylo důležité vytvořit determinační techniky. Nejzákladnější a nejpoužívanější technikou v mikrobiologii je tzv. Gramovo barvení.

Tuto techniku vytvořil dánský vědec H. C. Gram v roce 1884 a její princip je rozlišení bakterií podle uspořádání jejich buněčné stěny na grampozitivní (G+) a gramnegativní bakterie (G-). Základními kroky barvení jsou:

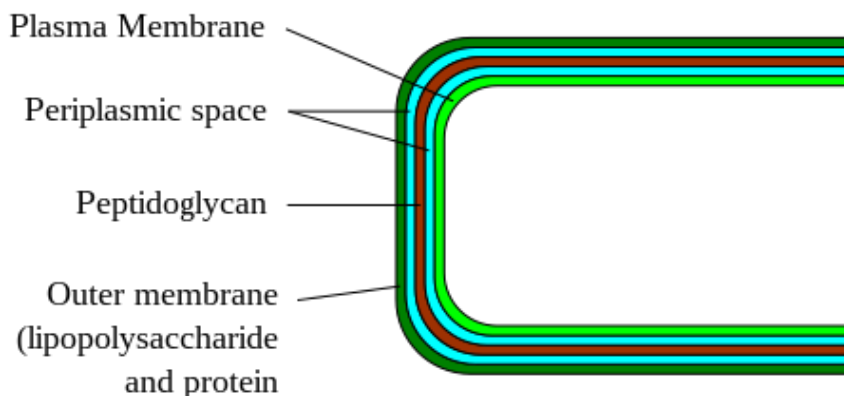
1. Fixace vzorku
2. Primární obarvení krystalovou violetí – modrá barva
3. Fixace obarvení Lugolovým jodovým roztokem
4. Odbarvení acetonem nebo ethanolem
5. Barvení safraninovým roztokem – červená barva

Fixace vzorku slouží ke stabilizaci preparátu a k usmrcení buněk, neboť barvení mrtvých buněk dává lepší výsledek. [5]

Grampozitivní bakterie (G+) mají velmi silnou vnější peptidoglykanovou vrstvu a oproti gramnegativním (G-) bakteriím nemají vnější buněčnou membránu. Tato silná vnější vrstva nepropustí ve čtvrtém kroku aceton nebo ethanol, tudíž na konci barvení jsou tyto bakterie modré až fialové. Strukturu buněčné stěny můžeme vidět na Obrázku 3. V boji proti infekcím G+ bakterií se používají antibiotika, která by se měla nasadit až v krajních situacích, jinak si bakterie vytvářejí rezistivitu vůči antibiotikům. [1], [6]



Obrázek 3: Buněčná stěna G+ bakterie [7]



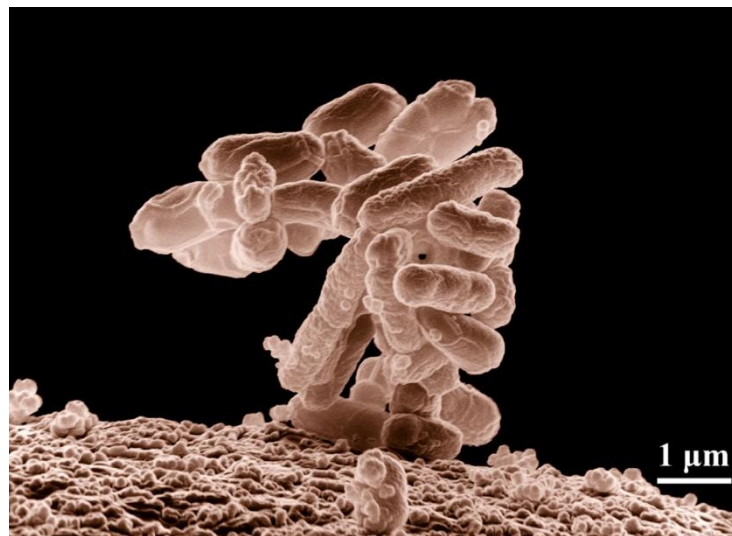
Obrázek 4: Buněčná stěna G- bakterie [7]

Gramnegativní bakterie (G-) mají peptidoglykanovou vrstvu tenčí a mají vnější ochrannou membránu. Touto vnější membránou však ve čtvrtém kroku alkohol projde, tudíž na konci barvení mají bakterie červenou až narůžověle červenou barvu. Strukturu buněčné stěny můžeme vidět na Obrázku 4.

G- bakterie mají vysokou rezistivitu na konvenční metody léčby a mají schopnost tuto odolnost předávat dalším bakteriím. [8]

1.2 *Escherichia coli*

Zástupce G- bakterií použitých v experimentální části této práce jsou bakterie *Escherichia coli*. Tyto bakterie mají tyčinkovitý tvar a na jejich povrchu se nacházejí bičíky, které slouží k pohybu. *E. coli* se přirozeně nachází v zažívacím ústrojí u lidí a zvířat a podílí se při zpracování živin v trávicí soustavě. Optimální teplota růstu *E. coli* je 37 °C, avšak dokáží přežít i ve vyšších teplotách. [9], [10]



Obrázek 5: Obarvený snímek *Escherichia coli* pod elektronovým mikroskopem [11]

Tyto 1 až 2 μm veliké bakterie jsou vesměs neškodné, ale existují druhy, které mohou pro lidský organismus představovat patogen. Jakožto aerobní a fakultativně anaerobní bakterie dokážou žít jak za přítomnosti kyslíku, tak bez něj. Dokáží nějaký čas přežít v půdě nebo ve vodě, kde jsou hlavní indikací znečištění [9]. Pokud tedy dojde k nákaze, mohou *E. coli* způsobit zvracení, průjemy nebo zánět močového traktu. Některé druhy *E. coli* produkují velmi jedovatý toxin Shiga, který způsobuje zvracení, žaludeční křeče a průjem. [10]

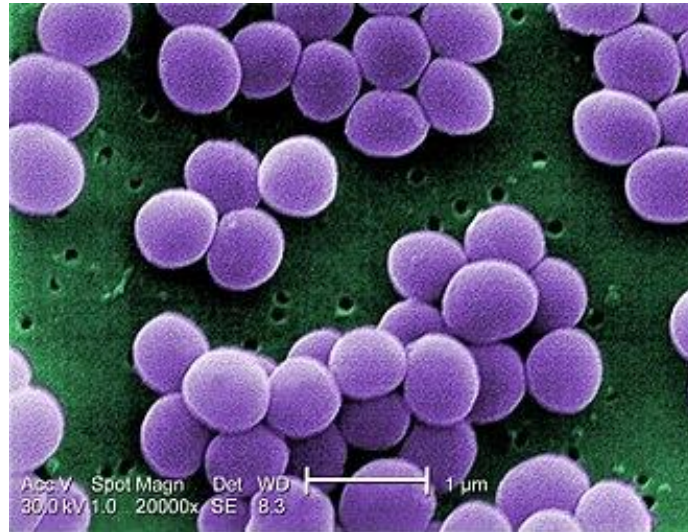
1.3 *Staphylococcus aureus*

Zástupce G+ bakterií použitých v experimentální části této práce jsou bakterie *Staphylococcus aureus*. Tyto bakterie mají kuličkovitý tvar a samotný název pochází z řeckého *staphyle* = hrozno a *kokkos* = bobule. Dosahují velikostí od 0.5 do 1 μm a prokazují se velmi tlustou buněčnou stěnou [12].

S. aureus jsou aerobní a fakultativně anaerobní bakterie, tudíž dokáží přežít v prostředí s kyslíkem i bez kyslíku. V tomto sdílejí podobnost s bakteriemi *E. coli*. Při kolonizaci tvoří *S.*

aureus karotenoidy, které dávají koloniím žlutou barvu a z toho odvozen název *aureus* jako zlatý. Při napadení organismu jsou bakterie v latentním stavu až několik týdnů a následně se projeví jako kožní infekce, která se do těla přenáší pomocí krevního řečiště. [12]

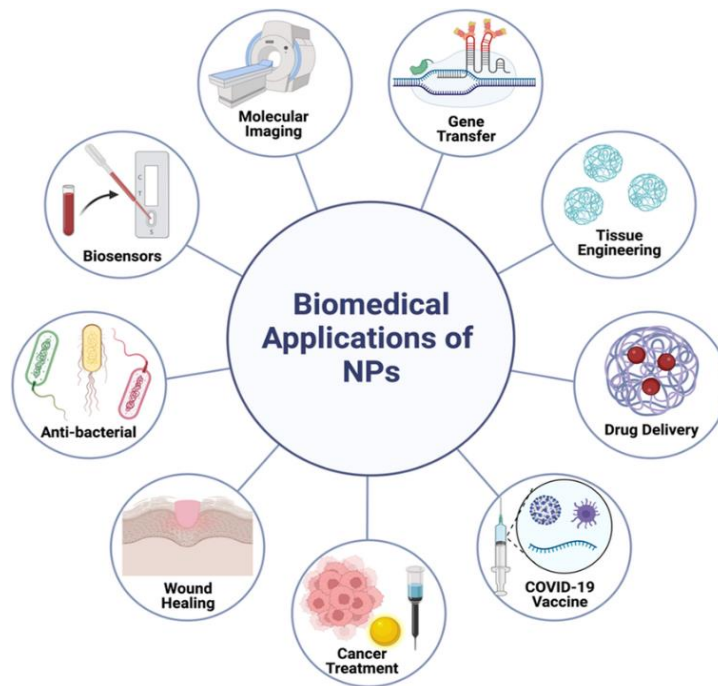
S. aureus krásně demonstruje adaptivní schopnosti odolávat antibiotické léčbě, a to díky spontánním mutacím a pozitivní selektivitě (tendence prospěšných vlastností zvyšovat jejich četnost v populaci). Mechanismy antibiotické rezistence zahrnují např. enzymatickou inaktivaci antibiotika. [13]



Obrázek 6: Obarvený snímek *Staphylococcus aureus* pod elektronovým mikroskopem [14]

2 Nanočástice

Pokroky v oblasti nanotechnologie umožnily širší využití této technologie v různých odvětvích, včetně energetiky, průmyslu a zejména biomedicíny. Díky modifikaci nanočástic (NP) je možné vytvářet částice s unikátními vlastnostmi a funkcemi. Tím se otevírají nové možnosti pro vývoj nástrojů a technologií, které lze aplikovat v biomedicínském výzkumu. Jednou z možností je vizualizace biologických procesů na úrovni buněk. Velikost NP odpovídá velikosti proteinů hrající hlavní roli při buněčných procesech a díky optickým vlastnostem NP jsme schopni tyto procesy pozorovat. [15], [16]



Obrázek 7: Různé druhy aplikací NP v biomedicině [17]

Se zvyšující se bakteriální rezistivitou vůči antibiotikům se zvyšuje i zájem o antibakteriální účinky NP. Tyto částice mohou sloužit jako alternativní způsob, jak zabránit bakteriálnímu bujení a růstu. Většina mechanismů antibakteriální odolnosti je proti NP neúčinná, jelikož interagují přímo s buněčnou stěnou. Antibakteriálních účinků mohou NP dosáhnout i bez penetrace bakteriální stěny. Toto dává naději, že by NP mohly být méně náchylné na vyvolání bakteriální rezistivity. [18]

Běžným jevem jsou bakteriální biofilmy, ve kterých převládají bakteriální kolonie. Biofilmy jsou tedy mikrobiální shluky, které jsou závislé na pevném povrchu a extracelulárních produktech. Jakmile se bakterie usadí, je inhibována syntéza bakteriálního bičiku a bakterie se začnou rychle množit. Množení dále napomáhá k vytvoření zralého biofilmu. V této fázi jsou bakterie přilepeny k sobě a tvoří silnou bariéru, která může odolávat antibiotikům. Biofilmy tak představují vážné zdravotní riziko. Bakterie v biofilmech mohou navíc produkovat superantigeny, které matou imunitní systém hostitele, a tudíž nejsou bakterie napadeny obrannými prostředky. [18]

Aby NP dosáhly svého antibakteriálního účinku, tak musí být v kontaktu s bakteriální stěnou. Kontakt s bakterií dosahují NP pomocí různých forem, jako je elektrostatická atrakce, van der Waalsova síla, receptor–ligandová nebo hydrofobní interakce. [18]

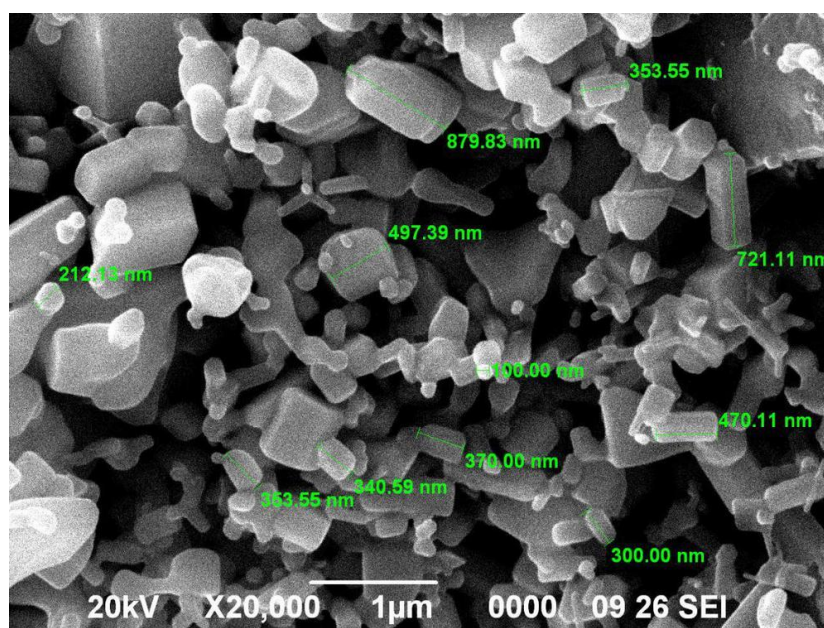
Buněčné stěny a membrány jsou důležitými obrannými bariérami bakterií proti vnějšímu prostředí. Komponenty buněčné membrány G+ a G- bakterií poskytují různé adsorpční cesty pro NP. Pro překonání bakteriální membrány se NP shromažďují podél metabolické dráhy buňky a tím ovlivňují tvar a funkci buněčné membrány. Následně interagují se základními složkami

bakteriální buňky, jako jsou DNA, lysozomy, ribozomy a enzymy. To vede k oxidačnímu stresu, změnám permeability buněčné membrány, inhibici enzymů, deaktivaci proteinů a změnám v expresi genů. Takovéto změny mají za následek bakteriální smrt. [18]

Mnoho studií prokázalo, že NP mají větší aktivitu proti G+ bakteriím než proti G- bakteriím. Je to z toho důvodu, že buněčná stěna G- bakterií je složena z LPS (lipoproteinů a fosfolipidů), které tvoří penetrační bariéru a ta neumožňuje vstup makromolekul. Naopak, buněčná stěna G+ bakterií obsahuje póry a kyselinu teichoovou, což umožňuje pronikání cizích molekul a také větší antibakteriální účinnost NP proti G+ bakteriím, jelikož vnik NP do buňky vede k poškození membrány a smrti bakterie. [18], [19]

2.1 Oxid zinečnatý

Oxid zinečnatý (ZnO) je bílá práškovitá látka nerozpustná ve vodě. V přírodě se vyskytuje jako nerost zinkit. Jeho hlavní využití je v kosmetice nebo při výrobě opalovacích krémů, a to díky jeho schopnosti nedráždit pokožku a dobře pohlcovat UV-A a UV-B záření. Tím, že jsou nanočástice oxidu zinečnatého (ZnO-NP) pro lidské buňky netoxické, tak si tento aspekt vyžádal jejich použití jako antibakteriálních látek. [20], [21]



Obrázek 8: Fotka ZnO-NP pod elektronovým mikroskopem [22]

2.1.1 Antibakteriální mechanismy ZnO-NP

Ačkoli byla antibakteriální aktivita ZnO-NP laboratorně prokázána, přesný mechanismus toxicity není zcela objasněn a je předmětem dalších zkoumání. V odborné literatuře jsou uváděny tyto charakteristické mechanismy: (1) přímý kontakt ZnO-NP s buněčnými stěnami, což vede k

narušení integrity bakteriální membrány, (2) uvolňování antimikrobiálních iontů, především iontů Zn^{2+} a (3) tvorba reaktivních forem kyslíku neboli ROS. [23]

2.1.1.1 Přímý kontakt ZnO-NP s buněčnou stěnou

Usmrcení bakterie při přímém kontaktu ZnO-NP s buněčnou stěnou může být způsobeno povrchovými defekty částic. Tyto defekty tvoří četné hrany a rohy, které mohou destruktivně reagovat s buněčnou stěnou. Navzdory svému jednoduchému chemickému vzorci má ZnO velmi bohatou chemii defektů, která souvisí s jeho antimikrobiální aktivitou. Povrchové defekty silně ovlivňují toxicitu ZnO. Dle odborných předpokladů je antibakteriální účinek ZnO-NP způsoben poškozením bakteriální membrány pomocí výše zmíněných defektů, které jsou důsledkem abrazivního povrchu ZnO. Zároveň tyto defekty zvětšují aktivní plochu částic a tím umožňují projev dalších předpokládaných antibakteriálních účinků. [23]

2.1.1.2 Tvorba zinečnatých iontů

Jedním z hlavních možných antibakteriálních mechanismů ZnO-NP je uvolňování zinečnatých iontů v prostředí obsahujícím ZnO-NP a bakterie. Uvolněný Zn^{2+} má významný vliv na inhibici metabolismu, pozitivně ovlivňuje disruptivní systém enzymů a narušuje tvorbu aminokyselin. Vliv tohoto charakteru je kritický pro životaschopnost mikroorganismů a může způsobit jejich smrt. [23]

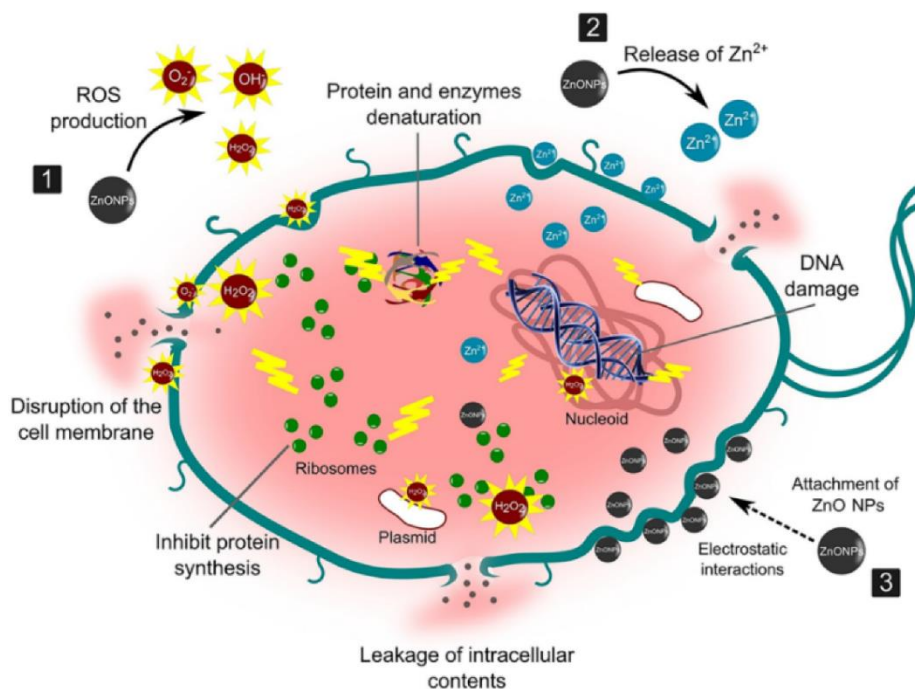
Disociace zinečnatých iontů do média s bakteriemi je ovlivněna tvarem a velikostí ZnO-NP, jelikož některé tvary mají lepší reaktivnost s buněčnou stěnou a následně lépe uvolňují ionty Zn^{2+} . Velikou roli v rozpustnosti zinečnatých iontů do média s bakteriemi hraje i hlavní vlastnost ZnO-NP, a to nerozpustnost ve vodě. Díky této vlastnosti nemusí docházet k tak aktivní disociaci a reakci iontů, a tudíž nemusí docházet k takovému antibakteriálnímu účinku, jako u jiných navrhovaných mechanismů. [23]

2.1.1.3 Tvorba ROS

Pod vlivem UV záření mají ZnO-NP tendenci vytvářet reaktivní druhy kyslíku neboli ROS (reactive oxygen species). Bakteriální toxicita ROS je přičítána jejich vysoké reaktivitě a oxidujícím vlastnostem. Bylo zjištěno, že suspenze ZnO-NP ve vodním prostředí produkují zvýšenou úroveň ROS. Mnoho studií považuje tvorbu ROS za hlavní příčinu nanotoxicity. Fotokatalytická tvorba ROS přispívá k antibakteriální aktivitě různých kovových oxidů. Několik studií naznačilo tvorbu ROS jako hlavní mechanismus odpovědný za antibakteriální aktivitu ZnO-NP. Mezi hlavní reaktivní druhy ROS patří superoxidový anion (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxid (OH^-). [23]

Nicméně role ROS v antimikrobiálních účincích se stala předmětem diskuse mezi výzkumníky v tomto oboru.

Vznik ROS se zdá být protichůdný, protože řada studií tento mechanismus prokázala za světelné expozice a řada alternativní studií zaznamenala aktivitu i v prostředí tmavém. Podrobné fungování antibakteriálních mechanismů je tedy předmětem dalšího zkoumání. [23]

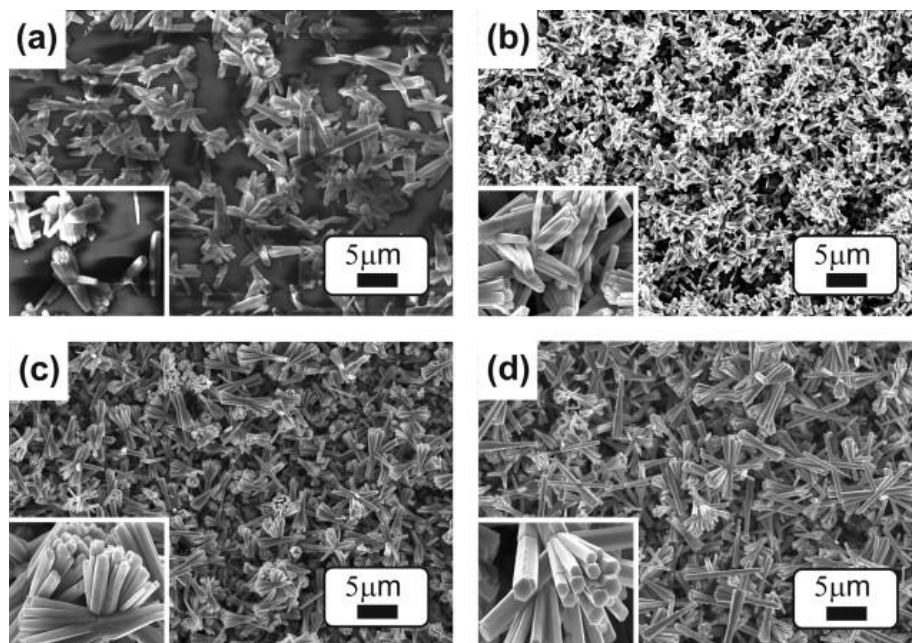


Obrázek 9: Princip antibakteriálního účinku ZnO-NP: 1) Generování ROS, 2) Rozpuštění iontů Zn²⁺; 3) Elektrostatické interakce na buněčné membráně [24]

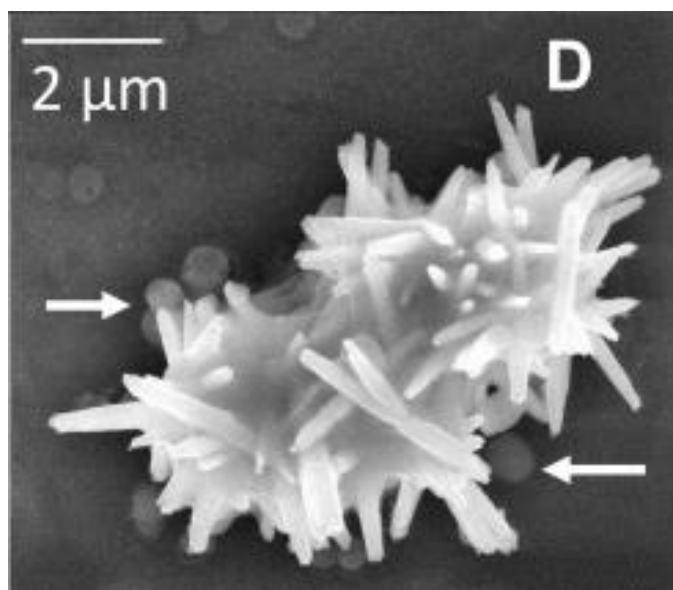
2.2 Hedgehog nanočástice

Nanočástice ZnO, které tvarem připomínají ježka (anglicky hedgehog), jsou typ nanostruktury, jež mají trnité výběžky, které určují jejich podobnost s ježkem a dávají jim tak i jejich odvozené označení. Částice budou dále označovány jako HH-NP. Syntézy HH-NP je docíleno metodami jako je chemická depozice z par nebo pomocí dvoustupňového mikrofluidního systému. Tyto částice se skládají z centrálního jádra a mnoha bočně rostoucích výběžků, které se dají označit jako nanodráty. Velikost trnů ZnO vyrostlých na polymerních sférických jádrech je asi 10 μm o průměru 100 nm . [25], [26]

HH-NP a ZnO-NP mají velmi podobné mechanismy antibakteriálního účinku, jelikož jde jenom o jiný tvar nanostruktury. Jedná se tedy o speciální tvarovou formaci ZnO-NP, jež rozšiřuje řadu tvarů a uskupení, které můžou zinečnaté nanočástice nabývat. Je důležité poznamenat, že antibakteriální aktivita částic ZnO může být ovlivněna různými faktory, jako je velikost částic, povrchová plocha, krystalinita a morfologie. Nanočástice s větším počtem výběžků, jako jsou právě HH-NP, prokázaly silnější antibakteriální aktivitu ve srovnání s jinými nanočásticemi, a to díky jejich mnohem větší specifické ploše, která je schopna reagovat k buněčnou stěnou. [27]



Obrázek 10: Různé možnosti konfigurace struktury HH-NP [28]



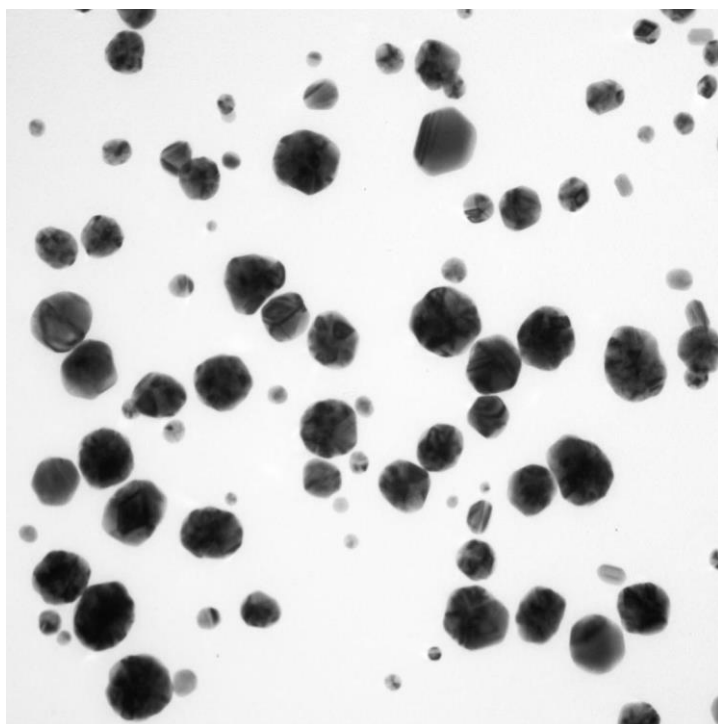
Obrázek 11: Běžný tvar HH-NP [29]

Na Obrázku 10 a 11 můžeme vidět různé uskupení výběžků, objevujících se na povrchu HH-NP. Speciálně na Obrázku 10 lze vidět pilonovité struktury, vybiňující ze středové části nanočástic. Na Obrázku 11 lze vidět nahodilejší uskupení výběžků rostoucích z těla částice. V obou případech mohou tyto výběžky destruktivně reagovat s bakteriální stěnou a tím způsobit její narašení do takové úrovně, že dojde k úniku intrabakteriálního obsahu a následné smrti bakteriální buňky.

2.3 Stříbrné nanočástice

Stříbrné nanočástice (Ag-NP) se díky svým jedinečným fyzikálním a chemickým vlastnostem stále častěji používají v různých oblastech, a to včetně lékařství, potravinářství, zdravotnictví, spotřebitelství a průmyslu. Vlastnosti těchto nanočástic mají využití v řadě aplikací, zejména pak jako antibakteriální látky ve výrobcích pro domácnost a ve zdravotnictví, v optických senzorech a v konečném důsledku se používají ke zvýšení účinnosti protinádorových léčiv cílených k zabíjení nádorů. [30]

Biologická aktivita Ag-NP závisí na faktorech, mezi které patří chemie povrchu, velikost částic, morfologie částic a rychlost rozpouštění. Tyto fyzikálně chemické vlastnosti ovlivňují jak průnik nanočástic do biologických bariér, tak výsledné antibakteriální účinky. Proto je vývoj Ag-NP s řízenou strukturou, které mají jednotnou velikost, morfologii a funkčnost, nezbytný pro různé biomedicínské aplikace. K hodnocení syntetizovaných nanomateriálů se používá mnoho analytických technik, včetně ultrafialové viditelné spektroskopie (UV-VIS spektroskopie), rentgenové difraktometrie (XRD), infračervené spektroskopie a dalších [30]. Tyto techniky slouží i k nahlédnutí do fungování mechanismů antimikrobiálního účinku Ag-NP. [31]



Obrázek 12: Ag-NP pod elektronovým mikroskopem [32]

2.3.1 Antibakteriální aktivita Ag-NP

Zdá se, že Ag-NP jsou alternativními antibakteriálními látkami k antibiotikům a mají schopnost překonat bakteriální antibiotickou rezistenci. Mezi spektrem slibných nanomateriálů se Ag-NP zdají být potenciálními antibakteriálními látkami díky svému velkému poměru povrchu k objemu

a povrchové krystalografické struktury. Buňky ošetřené Ag-NP vykazovaly akumulaci nanočástic a tvorbu "jamek" v buněčných stěnách, což nakonec vedlo k buněčné smrti. Menší částice s větším poměrem povrchu k objemu prokazovaly účinnější antibakteriální aktivitu než částice větší. Zároveň je antibakteriální aktivita Ag-NP závislá na tvaru nanočástice. [33]

Přestože byla prokázána účinnost Ag-NP proti více než 650 mikroorganismům včetně bakterií (grampozitivních i negativních), plísní a virů, přesný mechanismus jejich antimikrobiálního účinku není dosud zcela objasněn. Dokážeme však rozpoznat některé základní způsoby antimikrobiálního působení Ag-NP. Antimikrobiální účinek je spojen se čtyřmi dobře definovanými mechanismy: (1) adheze Ag-NP k povrch buněčné stěny a membrány, (2) průnik Ag-NP dovnitř buňky a poškození intracelulárních struktur (mitochondrie, vakuoly, ribozomy) a biomolekul (proteiny, lipidy a DNA), (3) buněčná toxicita a oxidační stres vyvolaný Ag-NP způsobený tvorbou ROS a volných radikálů a (4) modulace signálních přenosových cest. Kromě těchto čtyř dobře známých mechanismů Ag-NP také stimulují imunitní systém lidských buněk tím, že organizují zánětlivou reakci, která dále napomáhá inhibici mikroorganismů. [31]

2.3.1.1 Adheze Ag-NP k buněčné membráně

Expozice mikroorganismů vůči Ag-NP způsobuje přilnutí nanočástic k buněčné stěně a membráně díky kladnému povrchovému náboji nanočástic, což umožňuje elektrostatickou přitažlivost mezi Ag-NP a negativně nabitou buněčnou membránou. Tato interakce vede k morfologickým změnám, jako je zmenšení cytoplazmy nebo odtržení membrány, což nakonec může vyústit v prasknutí buněčné stěny a následnou smrt buňky. Dále Ag-NP narušují integritu buněčné stěny a permeabilitu membrány, což ovlivňuje transportní aktivity buňky a může vést k její nekróze. [31]

Tyto změny jsou pozorovatelné na úrovni molekulárního mechanismu, kde interakce Ag-NP s proteiny obsahujícími síru v buněčné stěně způsobují nevratné změny v její struktuře. [31]

2.3.1.2 Průnik Ag-NP do bakteriální buňky

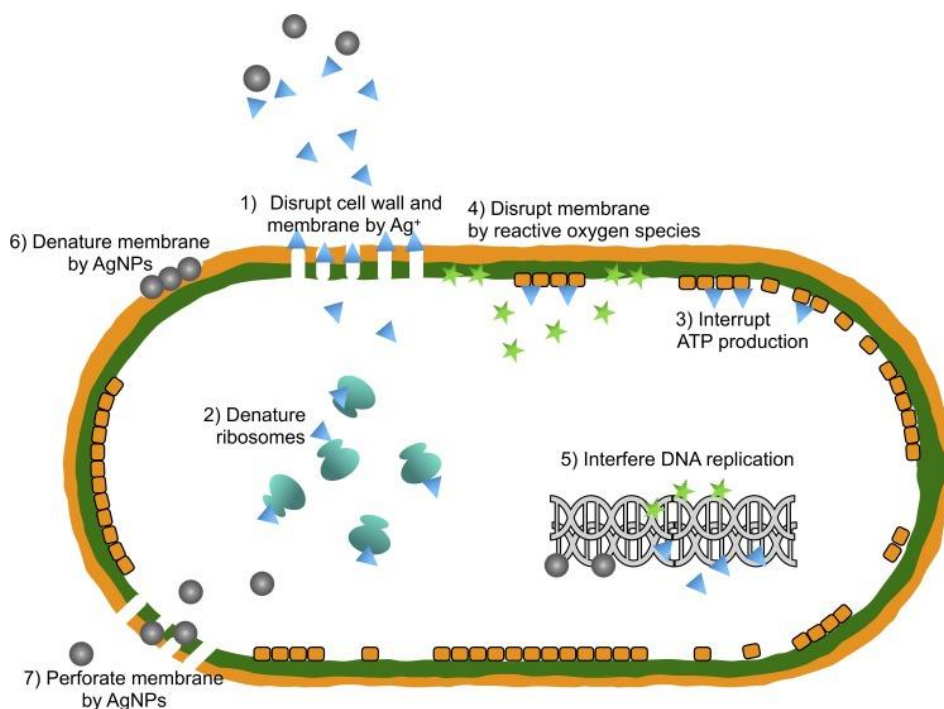
Interakce Ag-NP s mikrobiální membránou způsobuje několik buněčných dysfunkcí. V určitém případě se Ag-NP mohou dostat i dovnitř buněk a ovlivnit tak vitální buněčné funkce. Poriny, kanály naplněné vodou přítomné ve vnější membráně G- bakterií, jsou zapojeny do vstřebání Ag-NP do buněk. Vstřebávání Ag-NP mění strukturu a permeabilitu membrán, což ovlivňuje transport látek dovnitř a ven z buněk. Vstřebané Ag-NP interagují uvnitř buněk s různými buněčnými strukturami a molekulami, jako jsou proteiny, lipidy a DNA. Tyto interakce způsobují rozmanité škodlivé účinky, včetně denaturace ribozomů, deaktivace proteinů a poškození DNA. Tato poškození zabraňují buněčnému růstu, reprodukci, a nakonec vedou k buněčné smrti. [31]

2.3.1.3 Tvorba ROS

Zvýšená hladina oxidativního stresu v mikroorganismech je indikátorem toxických účinků způsobených ionty kovů, jako je Ag^+ . Silná antibakteriální, antimykotická a antivirová aktivita Ag-NP je způsobena jejich schopností produkovat reaktivní kyslíkové druhy a volné radikály, jako je peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový anion (O_2^-) a hydroxylový radikál (OH^\bullet). Tyto ROS ovlivňují vnitřní fungování buněčných organel a inhibují enzymy respiračního řetězce, což má za následek buněčnou smrt. [31]

2.3.1.4 Modulace signálních přenosových cest

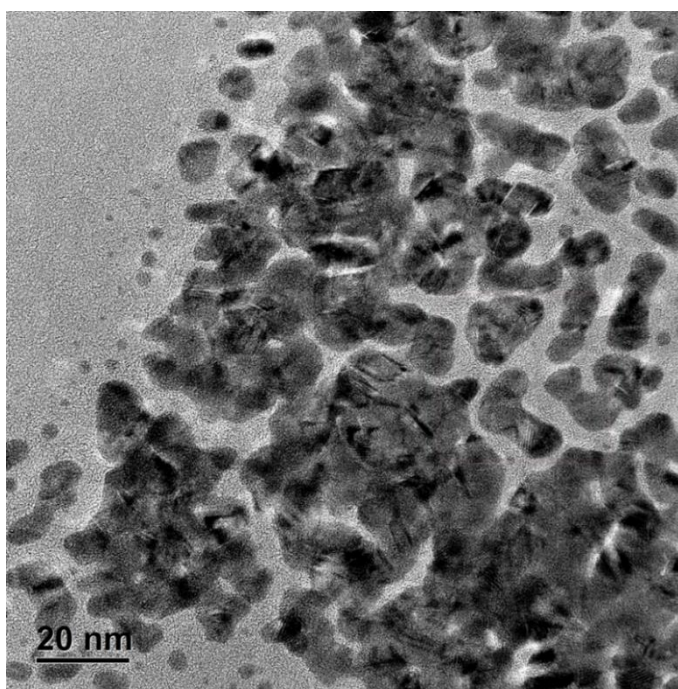
Fosforylace různých proteinových substrátů u bakterií je široce uznávaným jevem. Cyklus fosforylace a defosforylace představuje mechanismus přenosu signálu u mikroorganismů, který je nezbytný pro jejich růst a buněčnou aktivitu. Studium profilu fosfotyrosinu, bakteriálních proteinů z obou gramových skupin, je vhodným způsobem, jak pozorovat účinek Ag-NP na bakteriální signální dráhy, které ovlivňují jejich růst a další buněčné aktivity. Tyto fosforylované proteiny hrají klíčovou roli v replikaci DNA, rekombinaci, metabolismu a buněčném cyklu bakterií. Inhibice fosforylace proteinů by tak zamezila jejich enzymatické aktivitě, což by vedlo k inhibici růstu bakterií. [31]



Obrázek 13: Antibakteriální mechanismy Ag-NP: 1) Narušení buněčné stěny a membrány pomocí Ag^+ , 2) Denaturace ribozomů, 3) Narušení produkce ATP, 4) Narušení membrány pomocí ROS, 5) Interference s DNA, 6) Denaturace membrány pomocí Ag-NP, 7) Perforace membrány pomocí Ag-NP [34]

2.4 Zlaté nanočástice

Zlaté nanočástice Au-NP se v posledních letech staly nově zkoumaným materiálem s velkým potenciálem v oblasti biomedicíny. Možnost syntézy Au-NP pomocí různých metod, jak právě konvenčním chemickým postupem, tak i ekologicky šetrným přístupem využívající mikroorganismy a rostlinné deriváty, umožňuje snadnou kontrolu jejich velikosti, morfologie a vlastností. V biomedicině se Au-NP stávají stále atraktivnějšími díky jejich biokompatibilitě a schopnosti modifikace povrchu, což umožňuje jejich využití v různých oblastech, jako je například protinádorová terapie nebo biosenzory. V poslední době se stává stále důležitějším tématem antibakteriální potenciál Au-NP. Různé studie prokázaly schopnost Au-NP inhibovat růst mikroorganismů a poškozovat bakteriální buňky. Jejich antimikrobiální mechanismy jsou předmětem intenzivního výzkumu, který se zaměřuje na pochopení jejich účinků na různé typy bakterií a na identifikaci potenciálních cest k využití těchto vlastností v praxi. Jejich schopnost konjugace s různými látkami, jako jsou aptamery, antibiotika a antimikrobiální peptidy, poskytuje širokou škálu možností pro jejich využití v antibakteriální terapii. [35]



Obrázek 14: Au-NP pod elektronovým mikroskopem [36]

2.4.1 Antibakteriální účinky Au-NP

2.4.1.1 Membránová interakce

Bakteriální buněčná bariéra hraje důležitou roli v rezistenci vůči léčivům, avšak složení a vlastnosti G+ bakterií a G- bakterií se mírně liší.

Bylo však zaznamenáno, že Au-NP mohou narušit bakteriální buněčnou membránu nebo buněčnou stěnu, čímž způsobují poškození bakterií. [35]

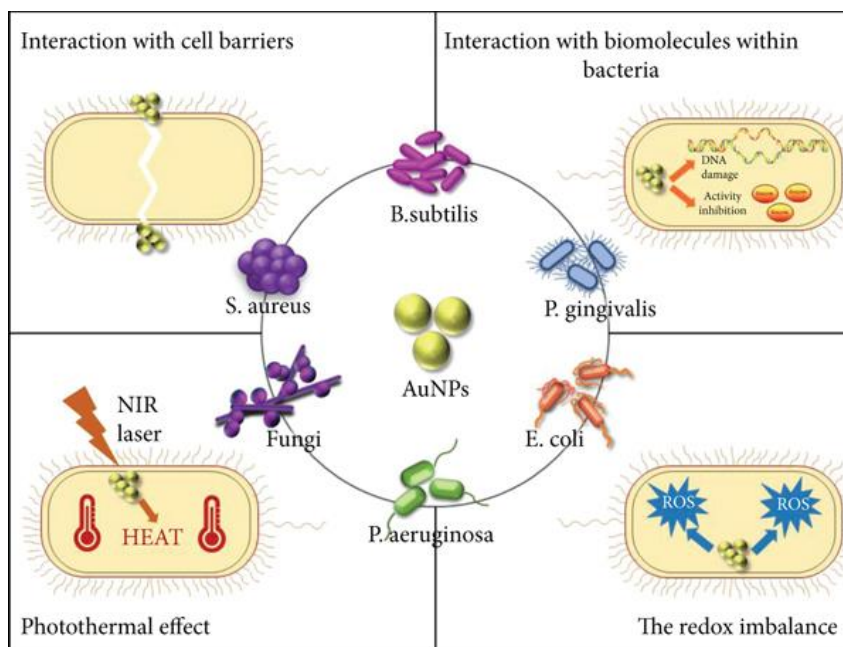
Au-NP zvyšují permeabilitu buněčné membrány, což může vést nejen k vlastním antibakteriálním účinkům, ale také k zesílení antibakteriálních účinků antibiotik tím, že se s nimi spojují. Zvýšením permeability dochází k úniku nukleových kyselin z bakterií. Tyto částice také snižují stabilitu membrány a indukují tvorbu vnějších membránových vezikul. Au-NP tvoří různé agregace na povrchu buněčné membrány, což může vést k významnému rozkladu buněk. [35]

2.4.1.2 Interakce Au-NP uvnitř buňky

Au-NP mohou zabít bakterie tím, že inhibují enzymatickou aktivitu, vážou se na DNA nebo přerušují syntézu proteinů. Při hmotnostním poměru Au-NP k plazmidům 15:1 mohou být plazmidy úplně vázány na Au-NP. S takto významně sníženým počtem plazmidů může dojít k buněčné smrti. Au-NP mohou způsobit depolarizaci bakteriální buněčné membrány a kontinuálně podporují zvyšování koncentrace vápníkových iontů v cytoplazmě. [35]

2.4.1.3 Fototermální jev

Au-NP mají vynikající vlastnosti přeměny světla na teplo a mohou tedy zabít bakterie konverzí blízkého infračerveného světla na lokální teplo. Zvláště zlaté nanotyčinky vykazují vysokou míru přeměny světla na teplo. I když je vzestup teploty způsobený zlatými nanotyčkami závislý na množství Au-NP, i při nízkých koncentracích Au-NP lze generovat dostatečné teplo k zabití bakterií.



Obrázek 15: Možné antibakteriální mechanismy Au-NP na různé druhy bakterií: a) Interakce s bakteriální membránou, b) Interakce s molekulami uvnitř bakterie, c) Fototermální jev, d) Tvorba ROS [35]

Výsledky pozorované pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) ukázaly, že lokální teplo generované laserovým ozářením způsobilo lýzi a rozpad bakterií. Specifické mechanismy mohou zahrnovat denaturaci proteinů, odpařování buněčného obsahu a rozpad buněčné struktury. Kromě toho Zharov a spol. [37] pozorovali, že kolem seskupených Au-NP vznikají bubliny, které poškozují bakterie. Během laserového ozářením se kvůli přehřívání okolní kapalné vrstvy vytvářely bubliny kolem Au-NP a rychle praskaly. Vznik těchto bublin poškozoval buněčnou stěnu bakterií a podporoval pronikání nanočásticí stěnou buňky. Spolu s účinkem lokálního tepla byly bakterie úplně rozloženy. [35]

3 Jiné fyzikální vlivy

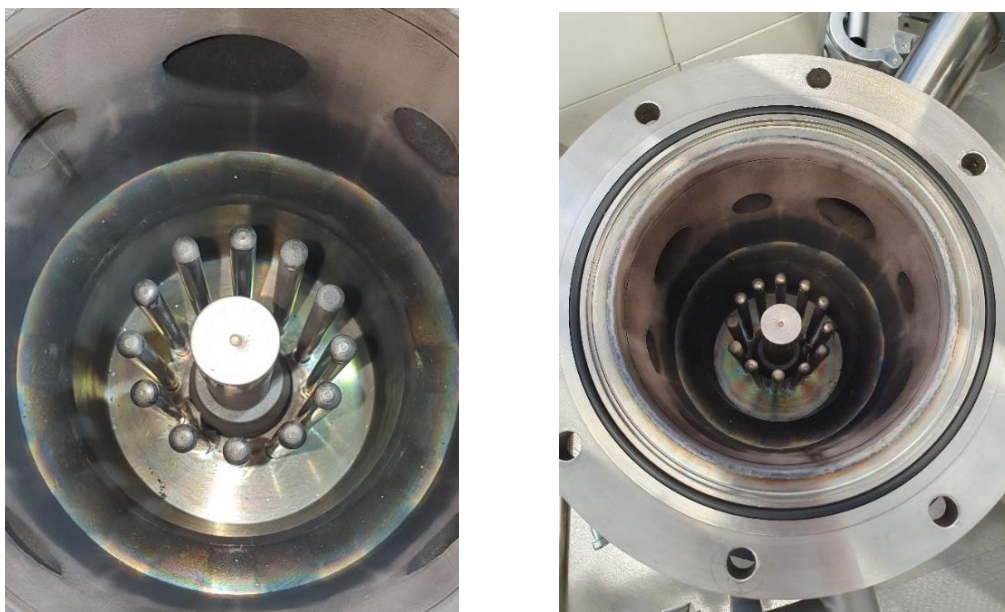
V rámci studie antibakteriálních účinků alternativních způsobů boje proti bakteriálním infekcím byly do této práce zahrnuty i jiné fyzikální vlivy. Hlavním experimentem je ozářením bakterií pomocí neutronů, generovaných vysokoenergetickým plazmovým výbojem. Přidružené fyzikální jevy, doprovázející tento experiment, jsou doplňkem znalostí dalších antibakteriálních činitelů.

3.1 Neutrony generované vysokoenergetickým plazmovým výbojem

Hlavním fyzikálním vlivem, korelujícím s bakteriálním růstem, bylo otestování vlivu neutronů, které byly vytvořeny pomocí vysokoenergetického plazmového výboje. Tyto neutrony byly vytvořeny pomocí Z-pinchového výboje neboli směr toku plazmatu při výboji byl ve vertikálním směru vzhůru podél osy z .

Aby bylo možné generovat neutrony, musí být z reakční komory vypuštěn veškerý plyn až na hodnotu tlaku menší než 10^{-2} Pa. Poté je do komory napuštěno deuterium, což je izotop vodíku, speciální tím, že obsahuje v jádře neutrony. Následně je na elektrody v komoře přivedeno napětí o hodnotě 18 kV, které způsobí plazmový výboj. Při tomto výboji dochází k fúzi deuteriových atomů (D+D) za vzniku neutronu a tří atomů helia. Takto vzniklý neutron je vržen ve směru osy z na terčík, kde se nachází ozařovaný vzorek. Při D+D fúzi vznikají kromě požadovaných neutronů i atomy tritia, což jsou radioaktivní izotopy vodíku, které je třeba po experimentu bezpečně odčerpat. [38]

Celý proces je opakován několikrát, tudíž je třeba vždy obsah komory odčerpat a opět napustit atomy deuteria. Zároveň dochází v komoře k vytvoření nežádoucích produktů, které mohou ovlivnit měření. Odčerpáním obsahu komory se proto zajistí vhodné experimentální prostředí. Je nezbytné, aby vzorky byly během experimentu přizpůsobeny pro delší pobyt v prostředí se sníženým tlakem a současně odstíněny od nežádoucích prvků a látek vznikajících při výboji.



Obrázek 16: Pohled do reakční komory na vnější a vnitřní elektrody v kruhovém uspořádání. Vlevo detailní fotka elektrod, vpravo fotka celé aparatury

Tato experimentální konfigurace navíc otevírá nové možnosti pro zkoumání dalších fyzikálních vlivů na růst bakterií.

3.2 Působení hliníkové fólie na bakterie

Pro ozáření bakterií pomocí neutronů je nezbytné překrýt agar s bakteriemi tenkou vrstvou hliníkové fólie, která poskytuje ochranu proti nežádoucím nečistotám vznikajícím při výboji. Tato fólie je položena přímo na bakterie, se kterými je v přímém kontaktu. Během této interakce může docházet k antibakteriálním účinkům, které jsou výsledkem jak uspořádání experimentu, tak chemických vlastností hliníku. Důležitost hliníkové fólie spočívá v její funkci ochranné bariéry proti dopadajícím nečistotám, aniž by bránila neutronům v deponování jejich energie na povrch agaru, kde se nacházejí bakterie.

3.3 Působení tepla na bakterie

Živé organismy obecně preferují určité teplotní rozmezí prostředí, které jim umožňuje optimálně vykonávat základní biologické funkce, jako je růst a rozmnožování. Teplota hraje hlavní roli i v morfologii, velikosti a metabolismu bakterie, a tedy tepelné změny mohou značně ovlivnit bakteriální fungování. Extrémní teploty pak mohou mít negativní dopad na mikroorganismy a případně kompletně inhibovat další fungování mikroorganismů.

Bakterie ke svému životu nezbytně potřebují vodu, která nejen podporuje jejich vnitřní procesy, ale také slouží jako médium pro jejich růst a rozvoj. Vhodným způsobem uchovávání bakterií je zmrazení, při němž dochází k pozastavení metabolických procesů, růstu a

rozmnožování. Problémem však může být, že při vytváření ledových krystalů dochází k poškození bakteriální stěny a zároveň zvyšování koncentrace solí dehydratuje bakterie. Ke zmírnění těchto negativních účinků se do roztoku přidává glycerol, který snižuje bod mrazu buněk a chrání je před ledovými krystaly. [39]

Na druhou stranu tepelná sterilizace je proces využívající vysoké teploty ke zničení buněčných struktur a enzymů. Existují různé druhy tepelné sterilizace včetně suchého a vlhkého tepla. Pro úspěšnou sterilizaci pomocí autoklávu musí být dosaženo teploty alespoň 120 °C po určitý čas. Tím se zajistí, že dojde k anihilaci nežádoucích mikroorganismů. [40], [41]

Část II.,
Experimentální část

4 Příprava vzorků a postup experimentu

Středobodem zájmu bylo zjištění antibakteriální účinnosti kovových nanočástic, přičemž jako doplňkový cíl bylo zkoumáno antibakteriální působení různých fyzikálních vlivů. Ke studiu účinků kovových nanočástic byla použita UV-VIS spektrofotometrie a konkrétně pro ZnO-NP byly použity i bioreaktory. Pro rozšíření znalostí o možných alternativních způsobech mikrobiální inhibice byly použity neutrony, vzniklé za pomoci plazmových výbojů. Na tento experiment byly navázány další vlivy, které se staly předmětem studia.

4.1 Popis použitých bakterií a materiálů

4.1.1 Bakterie

V experimentální části byly použity dva druhy bakterií, které byly již zmíněny v teoretickém úvodu této práce. Zástupcem G- bakterií je *Escherichia coli*, jež patří pod bakteriální kmen číslo CCM 3954 (Czech Collection of Microorganisms). Zástupcem G+ bakterií je *Staphylococcus aureus*, jež patří pod bakteriální kmen číslo CCM 3953. Oba druhy těchto bakterií patří mezi hlavní zástupce těchto skupin.

4.1.2 Nanočástice

4.1.2.1 ZnO-NP

Pro zkoumání antibakteriální aktivity oxidu zinečnatého byly použity dva druhy práškového ZnO. Hlavním rozdílem byla velikost nanočástic, kde první nanočástice měly velikost 25 nm (dále jako ZnO-NP 25 nm) a druhé nanočástice měly velikost 20 μm (dále jako ZnO-NP 20 μm).

4.1.2.2 Stříbro a zlato

Dalšími kovovými nanočásticemi jejichž antibakteriální účinky byly zkoumány jsou stříbrné nanočástice (Ag-NP) a zlaté nanočástice (Au-NP). O těchto druzích nanočástic je obecně předpokládáno, že mají dobré antibakteriální účinky.

4.1.2.3 Hedgehog nanočástice

Tyto částice patří mezi speciální prostorovou konfiguraci ZnO-NP a dále budou označeny jako HH-NP. Jejich speciální ježkovitý tvar zvětšuje aktivní plochu HH-NP a tím zlepšuje jejich antibakteriální účinky.

4.1.3 Hliníková fólie

Pro experiment zaměřený na zkoumání vlivu neutronů generovaných vysokoenergetickým plazmovým výbojem byly použity čtyři varianty hliníkových fólií. Tyto varianty zahrnovaly různé tloušťky a to konkrétně 10 μm , 20 μm , 30 μm a 50 μm . Fólie neměly žádnou povrchovou úpravu, jenom došlo před aplikací na povrch bakterií ke sterilizaci fólií pomocí alkoholu.

4.2 Metody a příprava vzorků

4.2.1 Růstové médium

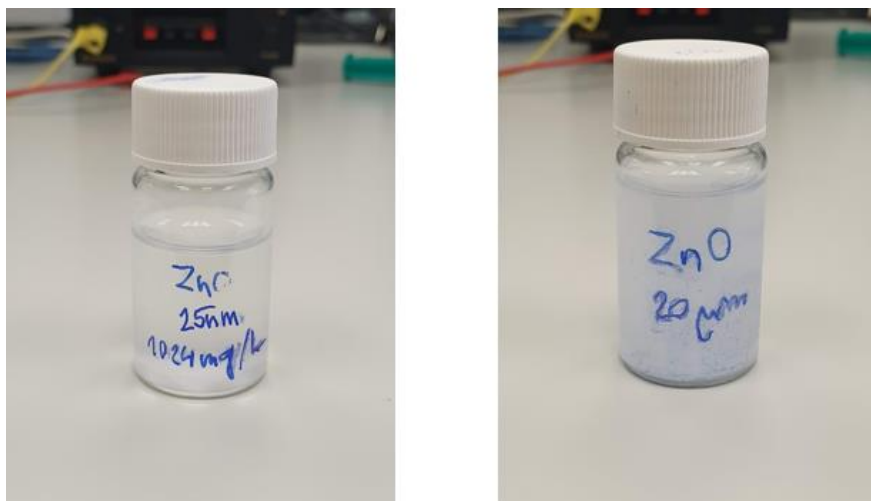
Pro vyhodnocení výsledků je třeba kultivovat bakterie na růstovém médiu, které zajistí potřebné živiny a vhodné prostředí pro růst bakterií. Jako růstové médium byl použit Mueller-Hintonův bujón (MHB) a Muller-Hintonův agar (MHA), který vzniknul úpravou MHB. Jeden litr MHB obsahuje 2 g hovězího extraktu, 17,5 g hydrolyzovaného kaseinu (mléčný protein) a 1,5 g škrobu.

MHA má stejné složení jako MHB, akorát se v průběhu výrobního procesu přidá 17 g agarové substance do 1 l vody. Tím vzniká MHA, který má konzistenci želé. Pro kultivaci bakterií se pak nanese příslušné množství MHA na Petriho misku. V experimentální části této práce byly použity dva typy Petriho misek. První typ (plastová miska) měl vnitřní průměr 6 cm, na který se nanášelo 10 ml MHA a druhý typ (skleněná miska) měl vnitřní průměr 3 cm, na který se nanášelo 5 ml a v pozdější fázi 1 ml MHA.

4.2.2 Nanočástice

4.2.2.1 ZnO-NP

Výchozí koncentrace nanočástic oxidu zinečnatého pro následné ředění byla 1024 mg/l. Té bylo dosaženo smícháním 20,5 mg práškového ZnO a 20 ml demineralizované vody. Následně byl roztok homogenizován po dobu 30 minut v ultrazvukovém homogenizátoru a poté sterilizován v autoklávu. Tento postup je stejný jak pro ZnO-NP 25 nm, tak pro ZnO-NP 20 nm. Požadovaných nižších koncentrací bylo dosaženo ředěním výchozí koncentrace ZnO-NP.



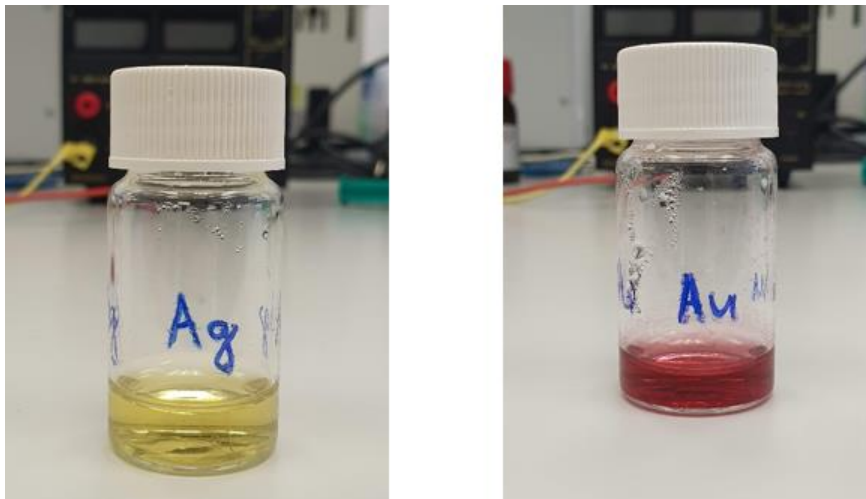
Obrázek 17: Vlevo lahvička s obsahem ZnO-NP 25 nm a vpravo lahvička s obsahem ZnO-NP 20 nm

4.2.2.2 Stříbro a zlato

Stříbrné nanočástice byly zakoupeny jako roztok od výrobce SIGMA-ALDRICH, Co. s kódem 730793-25ML a velikostí nanočástic 20 nm. Výchozí koncentrace roztoku Ag-NP byla 20 mg/l.

Zlaté nanočástice byly zakoupeny u stejného výrobce s kódem 741965-25ML a velikostí nanočástic 20 nm. Výchozí koncentrace roztoku Au-NP byla 50 mg/l.

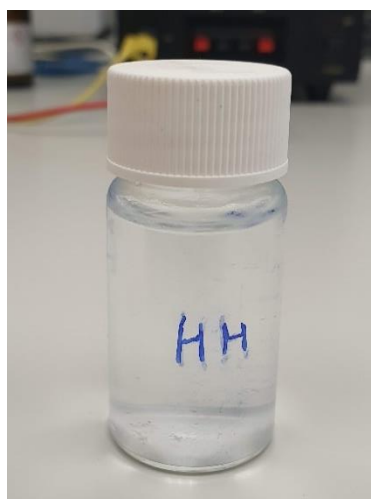
Roztoky neprošly před použitím žádnou speciální úpravou, jenom byl roztok nanočástic sterilizován v autoklávu pro zabránění případné kontaminaci vzorků.



Obrázek 18: Vlevo lahvička s Ag-NP (žlutá barva) a vpravo lahvička s Au-NP (červená barva)

4.2.2.3 Hedgehog

Příprava HH-NP byla totožná s přípravou ZnO-NP, jenom došlo k vynechání ultrazvukové homogenizace kvůli zachování trnovitých výběžků na povrchu nanočástic. Výchozí koncentrace HH-NP byla 1024 mg/l.



Obrázek 19: Lahvička s HH-NP

4.2.3 Hliníková fólie

Pro všechny tloušťky fólií došlo k nastříhání trojúhelníčků, které byly pak pokládány na MHA s bakteriemi. Takto nastříhané trojúhelníčky musely být před položením na bakterie vydezinfikovány pomocí alkoholu, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku.

4.2.4 UV-VIS spektrofotometrie

Pro hodnocení velkého množství různých koncentrací všech použitých nanočástic byl použit spektrofotometr. Konkrétně se pak jednalo o BioTek Epoch 2 Microplate Spectrophotometer.



Obrázek 20: BioTek Epoch 2 Microplate Spectrophotometer

Měření spektrofotometrem probíhalo po dobu 24 hodin s následujícími parametry měření vzorků:

- Odečtení hodnoty každých 15 minut
- Teplota prostředí 37 °C
- Double orbital promíchání vzorků před měřením
- Vlnová délka světla pro absorpci $\lambda = 600 \text{ nm}$

4.2.4.1 Mikrotitrační deska

Aby mohly být vzorky umístěny do spektrofotometru a správně odečteny, tak bylo třeba je připravit na mikrotitrační desku. První krok byla příprava bakterií, kde se začínalo rozmražením bakteriálního roztoku. Poté bylo do první zkumavky pipetou injektováno 4,5 ml MHB a příslušný

objem bakteriálního roztoku v mikrolitrech, aby výsledná turbidita tohoto nově vzniklého roztoku byla 1.00, měřená podle McFarlandova standardu. Koncentrace v této první zkumavce byla označena jako koncentrace 10^0 . Do druhé zkumavky bylo injektováno 4,5 ml MHB a 0,5 ml roztoku z první zkumavky. Koncentrace v této zkumavce byla označena jako 10^{-1} . Tento postup se opakoval až do vzniklé koncentrace 10^{-3} , jež byla výchozí koncentrací pro oba bakteriální druhy a všechny experimenty. Hodnota této výchozí koncentrace pro *E. coli* byla 10^4 CFU/ml a pro *S. aureus* byla $1,2 \cdot 10^5$ CFU/ml. Relativní koncentrace 10^{-3} byla zvolena z toho důvodu, aby měly bakterie prostor pro růst. Zvolením příliš vysoké koncentrace jako výchozí by mohlo brzy dojít ke stagnaci růstu bakterií, přičemž by nešlo stanovit, zda za zastavení růstu mohly přidané NP nebo dosažení maximální možné koncentrace.

Pro studium antibakteriálních účinků nanočástice bylo třeba namíchat požadované koncentrace. Pro ZnO-NP 25 nm, ZnO-NP 20 μ m a HH-NP byla koncentrační řada stejná. Výchozí koncentrace všech zinečnatých nanočástic byla 1024 mg/l. První krok bylo přidání 500 μ l demineralizované vody do mikrozkušavky (typu Eppendorf) a 500 μ l výchozí koncentrace nanočástic. Takto vzniklý roztok měl koncentraci 512 mg/l a tím se stal výchozí koncentrací pro další ředění, které pokračovalo až do vzniku koncentrace 16 mg/l. Pro Ag-NP byla výchozí koncentrace 20 mg/l a konečná byla 2,5 mg/l. Pro Au-NP byla výchozí koncentrace 50 mg/l a konečná byla 6,25 mg/l.

Tabulka 1: Obsah jamek mikrotitrační destičky

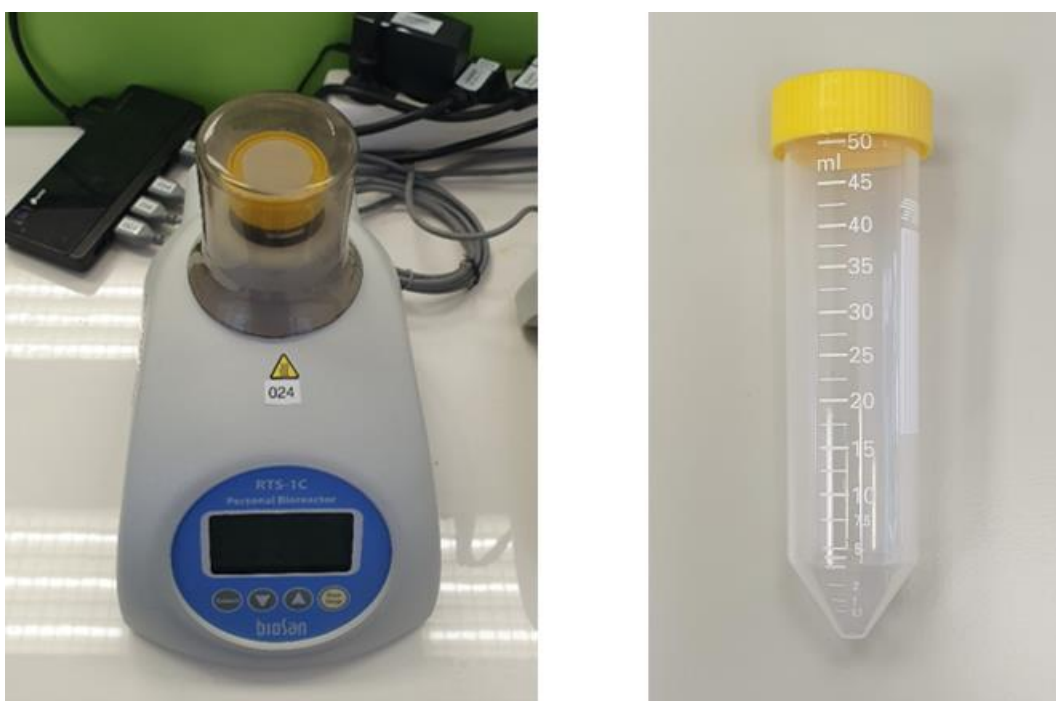
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|--------------|-------------------|----------|-----------|----------|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 512 mg/l | 512 mg/l | 10 mg/l | 25 mg/l | 512 mg/l | - | | | | | | |
| B | 256 mg/l | 256 mg/l | 5 mg/l | 12,5 mg/l | 256 mg/l | - | | | | | | |
| C | 128 mg/l | 128 mg/l | 2,5 mg/l | 6,25 mg/l | 128 mg/l | - | | | | | | |
| D | 64 mg/l | 64 mg/l | - | - | 64 mg/l | - | | | | | | |
| E | 32 mg/l | 32 mg/l | - | - | 32 mg/l | - | | | | | | |
| F | 16 mg/l | 16 mg/l | - | - | 16 mg/l | - | | | | | | |
| G | REF | REF | - | - | - | - | | | | | | |
| H | MHB | MHB | - | - | - | - | | | | | | |
| | ZnO-NP 25 nm | ZnO-NP 20 μ m | Ag-NP | Au-NP | HH | | | | | | | |

V Tabulce 1 můžeme vidět jaké je rozložení koncentrací nanočástic v jednotlivých jamkách. Do každé z jamek, kde se nachází nanočástice jsou pak přidány příslušné bakterie. Pro jednotlivé nanočástice jsou bakterie umísťovány v duplikátech. V buňkách, kde je MHB, se bakterie nepřidávají (kontrola, že je bujón nekontaminovaný), a naopak v buňkách, kde je napsáno REF

(referenční růst bakterií) nejsou přidány nanočástice. Objemově se v příslušných jamkách nachází 100 μl bakteriálního roztoku s koncentrací 10^{-3} a 100 μl příslušných NP. V REF buňkách je pak místo NP 100 μl demineralizované vody. V buňkách s MHB je 200 μl bujónu. Tedy ve využitých jamkách se vždy nachází 200 μl roztoku a celá mikrotitrační deska se přelepí tenkou průhlednou fólií pro zamezení vysychání vzorků.

4.2.5 Bioreaktor

Pomocí bioreaktorů je možné studovat antibakteriální účinky ve větším objemu roztoku, a to v řádu desítek ml . Pro nejslibnější antibakteriální výsledky na mikrotitrační destičce byl pro tyto experimenty vybrán ZnO-NP 25 nm . Dochází zde k vlivům prostředí, jelikož v bioreaktorech dochází k neustálému otáčení a intenzivnímu promíchávání kapaliny. Pro tento experiment byly použity 4 bioreaktory BioSan RTS-1C.



Obrázek 21: Vlevo bioreaktor BioSan RTS-1C, vpravo velká zkumavka o objemu 50 ml

V tomto reaktoru docházelo k odečítání optické hustoty po dobu 24 hodin s následujícími parametry:

- Odečtení hodnot každých 15 minut
- Otáčky 1 s vlevo a 1 s vpravo + 2000 otáček za minutu
- Teplota prostředí 37 $^{\circ}\text{C}$
- Vlnová délka světla $\lambda = 850 \text{ nm}$

4.2.5.1 Příprava zkumavek

V bioreaktorech byl z časových důvodů zkoumán vliv pouze ZnO-NP 25 nm na bakteriální růst. Objemově bylo ve zkumavkách 20 ml roztoku, používaly se plastové uzavíratelné zkumavky o objemu 50 ml, kterou je možné vidět v pravé části Obrázku 21. Bakteriální koncentrace pro *E. coli* a *S. aureus* bylo dosaženo stejně, jako u předchozího experimentu. Nejdříve se do 4,5 ml MHB přidal příslušný objem rozmraženého bakteriálního roztoku, aby změřená turbidita této směsi byla 1.00 podle McFarlandova kritéria. Hodnota této koncentrace byla 10^0 . Z takto vzniklé koncentrace bylo přidáno 0,5 ml do dalších 4,5 ml MHB, kde vznikla koncentrace 10^{-1} . Tento postup se opakoval do vzniku bakteriální koncentrace 10^{-3} a zároveň byl tento postup stejný pro oba druhy bakterií. Koncentrace ZnO-NP 25 nm byla od 512 mg/l do 16 mg/l.

Obsah zkumavek byl následující:

Tabulka 2: Obsah a koncentrace nanočástic ve zkumavkách pro bioreaktory

| Číslo zkumavky | ZnO-NP 25 nm | Fyziologický roztok | Bakteriální roztok | Výsledná koncentrace nanočástic |
|----------------|--------------|---------------------|--------------------|---------------------------------|
| 1 | 10 ml | - | 10 ml | 512 mg/l |
| 2 | 5 ml | 5 ml | 10 ml | 256 mg/l |
| 3 | 2,5 ml | 7,5 ml | 10 ml | 128 mg/l |
| 4 | - | 10 ml | 10 ml | REF |
| 5 | 1,25 ml | 8,75 ml | 10 ml | 64 mg/l |
| 6 | 0,63 ml | 9,37 ml | 10 ml | 32 mg/l |
| 7 | 0,32 ml | 9,68 ml | 10 ml | 16 mg/l |
| 8 | - | 10 ml | 10 ml | REF |

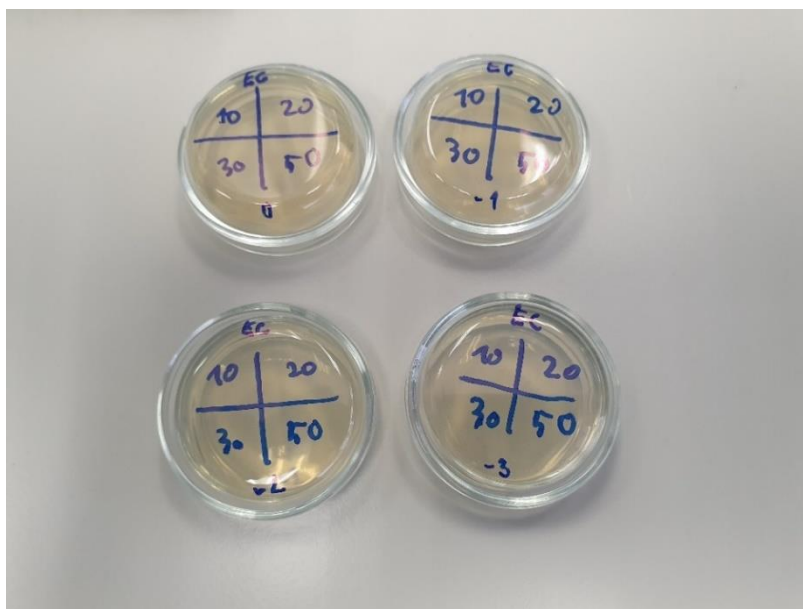
Tím, že se experiment dělal dvakrát (z důvodu omezeného počtu reaktorů), tak žlutě označená pole v Tabulce 2 vyjadřují referenční roztok, který neobsahuje NP. Následně je možné v této tabulce vidět, jakým ředěním bylo dosaženo potřebných koncentrací ve zkumavkách.

4.2.6 Jiné fyzikální vlivy

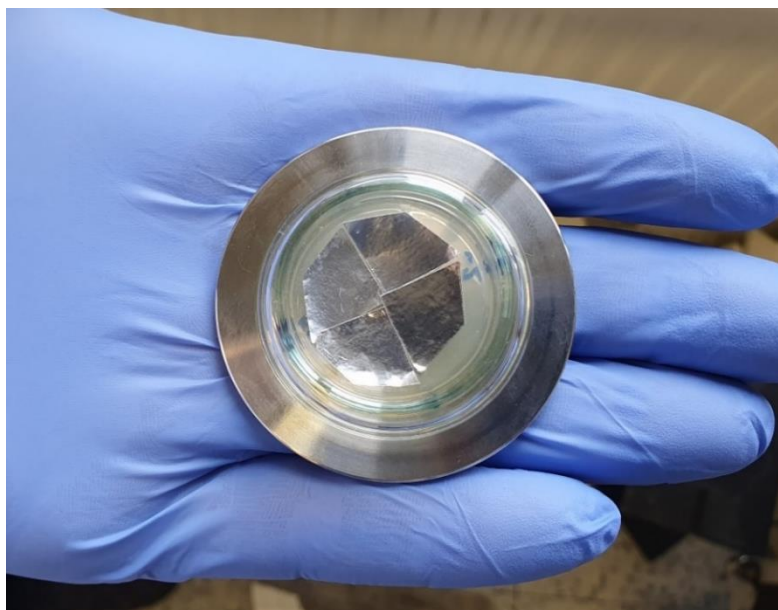
Pro zahájení experimentu zkoumání vlivu neutronů na růst bakterií bylo důležité přejít na skleněné Petriho misky s vnitřním průměrem 3 cm. Takto široké misky se spolehlivě vešly na víčko reakční komory. Celkem bylo ozařování provedeno dvakrát a pokaždé jenom pro bakterie *E. coli* v koncentracích 10^0 až 10^{-3} . Těchto koncentrací bylo dosaženo stejným způsobem, jako v předchozích experimentech, tedy do první zkumavky byl přidáno 4,5 ml MHB a příslušný objem rozmražených bakterií, aby byla výsledná turbidita standardu 1.00 a tím vznikla

koncentrace 10^0 . Do druhé zkumavky (typu Eppendorf) bylo přidáno $900 \mu\text{l}$ fyziologického roztoku a $100 \mu\text{l}$ předešlé koncentrace a tím vznikla koncentrace 10^{-1} . Tento postup se opakoval do vzniku koncentrace 10^{-3} . Každá z připravených koncentrací pak byla v množství $250 \mu\text{l}$ nanesena na malou Petriho misku, na které se nacházelo 5 ml MHA. Poslední krok přípravy pro první experiment zahrnoval položení trojúhelníčku z hliníkových fólií o příslušných tloušťkách na MHA s bakteriemi. Rozložení trojúhelníčků bylo $10 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$, $30 \mu\text{m}$ a $50 \mu\text{m}$.

V druhém experimentu byly aplikovány jisté změny, které zahrnovaly zdrsnění dna skleněné Petriho misky pro lepší uchycení MHA, objem naneseného MHA byl snížen na 1 ml , a poslední změna bylo položení fólie do dvou vrstev, kde spodní vrstva byly 3 trojúhelníky s tloušťkou $10 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$ a $30 \mu\text{m}$, které byly překryty jednou velkou kruhovou vrstvou o tloušťce $10 \mu\text{m}$. Zároveň tato vrchní vrstva byla přilepena pomocí dvou tenkých proužků k Petriho misce. Opět byly připraveny čtyři koncentrace bakterií, od 10^0 do 10^{-3} , a v objemu $250 \mu\text{l}$ byly naneseny na upravené Petriho misky.



Obrázek 22: Petriho misky z MHA, příslušnou bakteriální koncentrací a terčem pro rozložení tloušťky hliníkové fólie



Obrázek 23: Petriho miska s MHA, bakteriemi a hliníkovými trojúhelníčky položenými na víčko aparatury

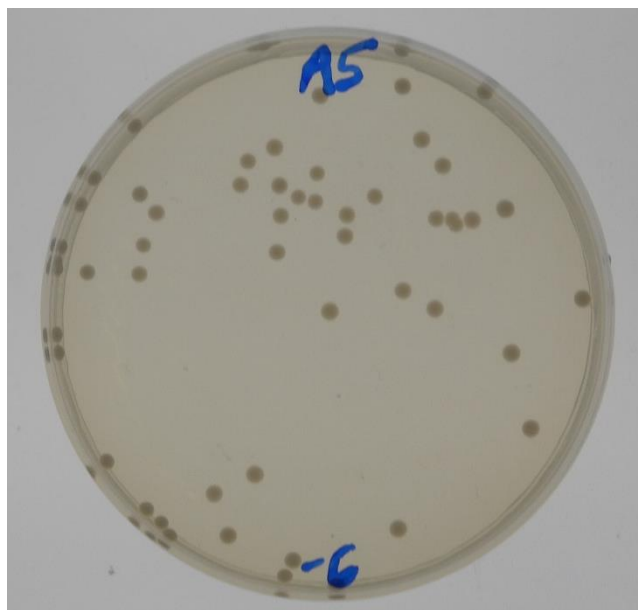
Na Obrázku 22 je zobrazeno, jaké bude rozložení různých druhů fólie a Obrázek 23 pak ukazuje skutečné rozložení fólie na bakteriích. Jednotlivé trojúhelníčky představují různé tloušťky podle předlohy na Obrázku 22. Zároveň je na Obrázku 23 možné pozorovat, že je Petriho miska přilepená na víčko reakční komory, jelikož celý vzorek bude viset kolmo na osu z neboli ve směru výboje a toku neutronů.

5 Výsledky

5.1 Vyhodnocení výsledků

UV-VIS spektrofotometr a bioreaktory umí odečítat optickou hustotu (dále jen OD) měřených vzorků a zároveň poskytují elektronický záznam hodnot OD, které je možné použít k vyhodnocení antibakteriálního vlivu NP. Vzhledem k tomu, že průběh OD podává pouze informaci o tom, zda bakterie v čase rostly či nerostly, je dobré pro komplexní přehled určit také konečnou koncentraci bakterií ve vzorku a porovnat ji s referencí. To se provede pomocí postupného ředění daného vzorku (což je koncentrace 10^0) v krocích 1:10 až do relativní koncentrace 10^{-8} , přičemž každá koncentrace se následně kultivuje na 6 cm plastové Petriho misce na MHA po dobu 24 hodin při teplotě 37°C . Následně na Petriho misce spočítáme narostlé bakteriální kolonie, čímž při známém stupni ředění určíme počet kolonie formujících jednotek (dále jen CFU) v jednom *ml* odebraného vzorku. Z celé koncentrační řady vybereme ty misky, kde je počet kolonií v desítkách až nižších stovkách. Nižší počet je statisticky nespolehlivý, vyšší počty se obtížněji počítají nebo to vůbec nelze.

Po proběhnutí experimentu tedy provedeme odběr z každé velké zkumavky v bioreaktoru a provedeme zmíněné ředění pomocí mikrozkuavek Eppendorf. U UV-VIS spektrofotometru dojde k odebrání $100\ \mu\text{l}$ z těch jamek, ve kterých vykazovaly NP totální nebo alespoň mírnou bakteriální inhibici. Mikrozkuavek je potřeba 8 pro každý z odebraných vzorků (pro ředění až do relativní koncentrace 10^{-8}). Do každé z mikrozkuavek je injektováno $900\ \mu\text{l}$ fyziologického roztoku. Do první mikrozkuavky je pak následně přidáno $100\ \mu\text{l}$ roztoku z velké zkumavky z bioreaktoru nebo z jamky v mikrotitrační desce. Dojde k promíchání a tím vznikne relativní koncentrace 10^{-1} vůči vzorku, ze kterého bylo odebráno. Do druhé mikrozkuavky je přidáno $100\ \mu\text{l}$ obsahu první mikrozkuavky a tím dojde ke vzniku koncentrace 10^{-2} . Tento postup se opakuje do vzniku koncentrace 10^{-8} v poslední mikrozkuavce.



Obrázek 24: Plastová Petriho miska o průměru 6 cm s bakteriálními koloniemi. Horní nápis odpovídá příslušnému vzorku nanočástic a dolní nápis odpovídá stupni ředění

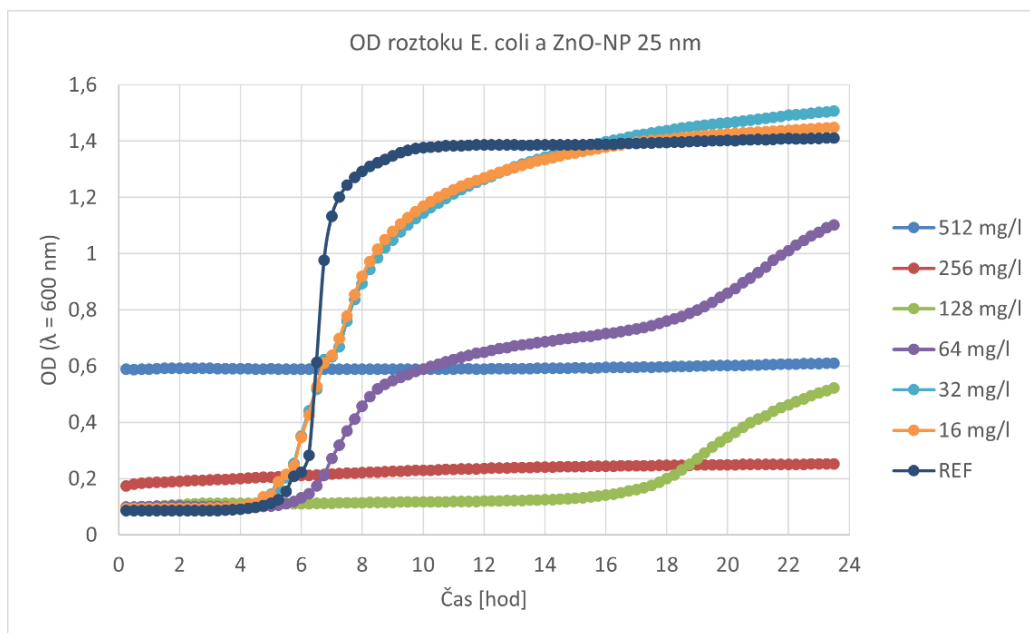
Následně bylo 500 μl obsahu každé mikrozkušavky inokulováno na 6 cm Petriho misku s MHA a po zaschnutí obsahu byla miska vložena na 24 hodin do inkubátoru s vnitřní teplotou 37 °C. Na těchto miskách jsou kultivovány CFU (anglicky Colony Forming Units), jež jsou vidět na Obrázku 24 jako drobné tečky. Počet CFU v jednom ml je důležitým dalším faktorem určujícím antibakteriální efektivitu zkoumaných NP a fyzikálních faktorů. Pro lepší přehlednost výsledků je dobré spočítat procentuální poměr CFU vzorku ku CFU reference a toto číslo poté udává účinnost použitých NP.

5.2 UV-VIS spektrofotometrie

5.2.1 *Escherichia coli*

Na následujících grafech je vyobrazena změna OD v čase. Pokud tedy dojde k nárůstu bakterií, hodnota OD se zvětší a zaznamenání této změny proběhne každých 15 minut, přičemž celé měření trvalo 24 hodin. Tímto způsobem jsme schopni získat informace o růstu bakterií v čase.

5.2.1.1 ZnO-NP 25 nm



Obrázek 25: Vývoj OD roztoku *E. coli* a ZnO-NP 25 nm

Z Obrázku 25 je patrné, že koncentrace ZnO 512 mg/l a 256 mg/l mají silné antibakteriální účinky, a tudíž při těchto koncentracích dochází k celkové bakteriální inhibici. Zároveň lze pozorovat, že ne všechny křivky mají nulovou OD či blízkou nule, což je způsobeno absorpcí světla částicemi ZnO u těch roztoků, kde má ZnO vyšší koncentraci.

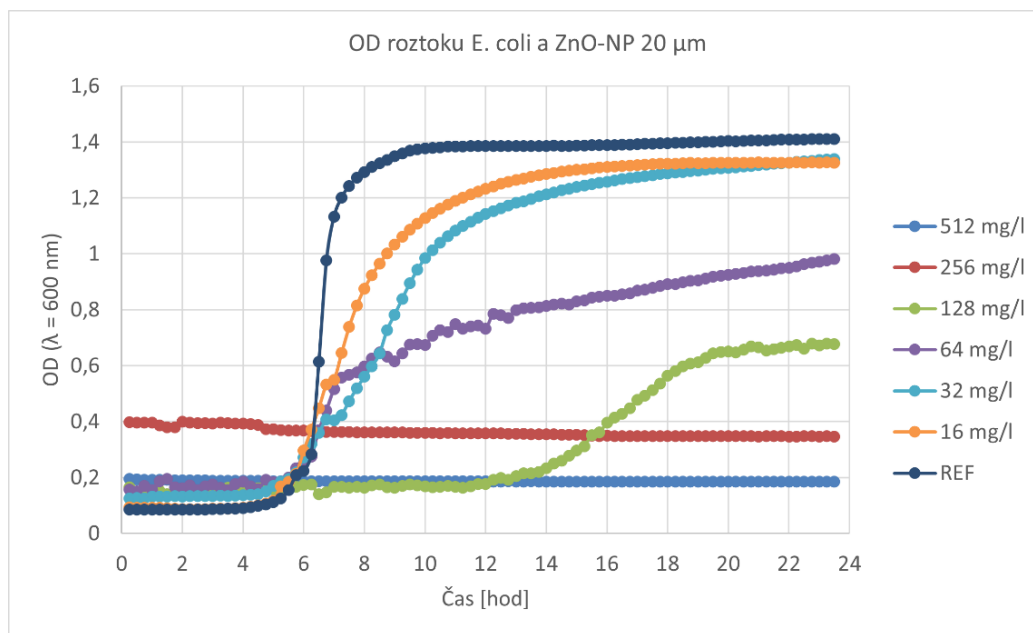
Koncentrace 128 mg/l také vykazuje antibakteriální účinky, avšak na konci experimentu dochází k mírné změně OD a lehkému nárůstu bakterií. Koncentrace 64 mg/l nevykazuje tak značné antibakteriální účinky a jenom tlumí rychlost růstu bakterií. Koncentrace 32 mg/l a 16 mg/l mají velmi podobný průběh jako referenční křivka, tudíž antibakteriální účinek těchto koncentrací bude zanedbatelný.

Tabulka 3: Hodnoty CFU pro vybrané koncentrace ZnO-NP 25 nm a referenci

| NP | ZnO-NP 25 nm | | REF |
|-------------|--------------|-------------------|------------------|
| Koncentrace | 512 mg/l | 128 mg/l | - |
| CFU | 20 | $6,81 \cdot 10^7$ | $8,2 \cdot 10^8$ |
| CFU [%] | 0 | 8 | 100 |

Výpočet CFU a procentuálních poměrů CFU v Tabulce 3 pro vybrané koncentrace potvrzuje, že nejvyšší koncentrace má silné antibakteriální účinky. Na druhé straně, nižší koncentrace, začínající od hodnoty 128 mg/l, již nedisponují tak silnými účinky.

5.2.1.2 ZnO-NO 20 μm



Obrázek 26: Vývoj OD roztoku *E. coli* a ZnO-NP 20 μm

Na Obrázku 26 je opět vidět, že koncentrace ZnO 512 mg/l a 256 mg/l mají silný antibakteriální účinek. Také na tomto obrázku lze vidět posunutí křivek mimo nulovou hodnotu OD, což je opět způsobenou absorpcí světla částicemi ZnO.

U koncentrace 128 mg/l dochází k mírnějšímu útlumu růstu bakterií než u menších částic. Koncentrace 64 mg/l má také vliv na růst bakterií, ale na obrázku nelze pozorovat vysoké antibakteriální účinky.

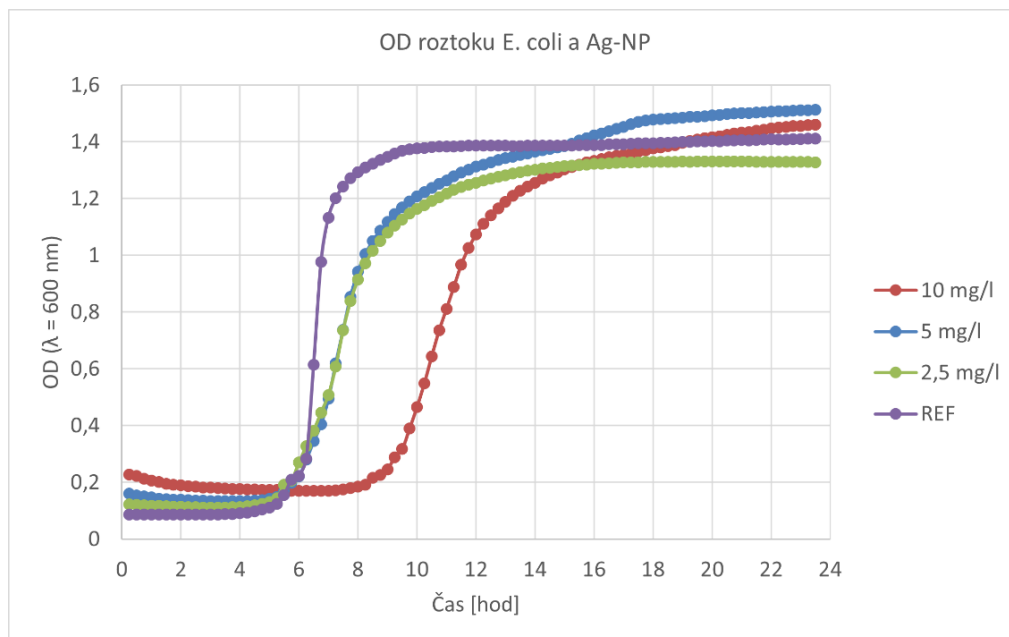
Koncentrace 32 mg/l a 16 mg/l mají zanedbatelné antibakteriální účinky, jelikož je vývoj OD pro tyto koncentrace velmi podobný, jako je vývoj OD pro referenci.

Tabulka 4: Hodnoty CFU pro vybrané koncentrace ZnO-NP 20 μm a referenci

| NP | ZnO-NP 20 μm | REF |
|-------------|-------------------------|------------------|
| Koncentrace | 128 mg/l | - |
| CFU | $2,48 \cdot 10^8$ | $8,2 \cdot 10^8$ |
| CFU [%] | 30 | 100 |

I přes řádovou podobnost vypočtených CFU v Tabulce 4 je možné pozorovat mírný antibakteriální účinek ZnO v koncentraci 128 mg/l . Tento účinek je zřejmý na základě procentuálního poměru koncentrace vůči referenci. U nižších koncentrací lze předpokládat, že antibakteriální účinky nebudou vykazovány.

5.2.1.3 Ag-NP



Obrázek 27: Vývoj OD roztoku *E. coli* a Ag-NP

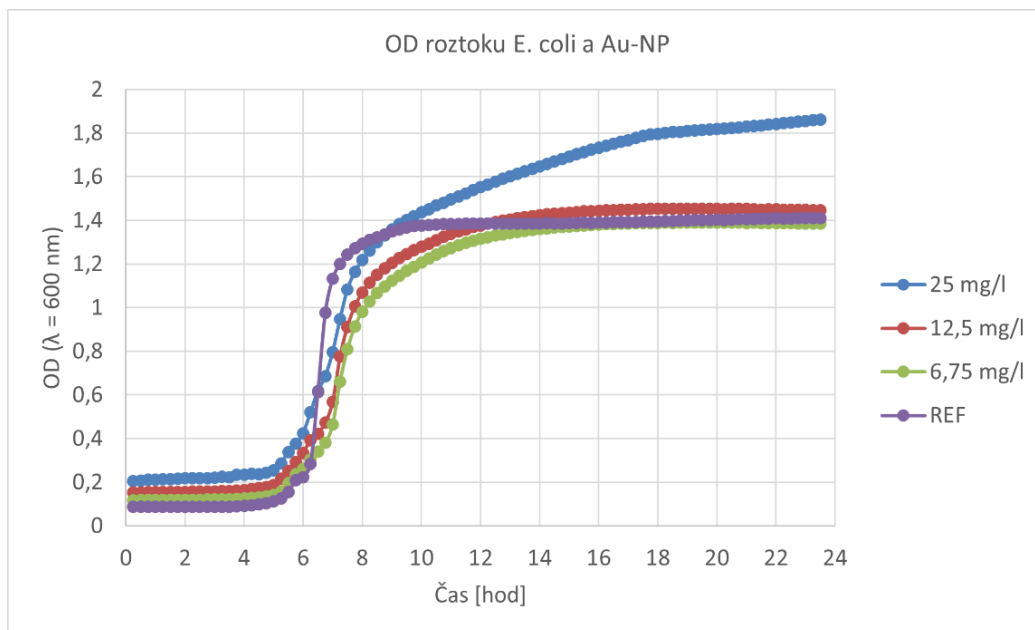
Z Obrázku 27 lze vidět, že vliv stříbrných nanočástic na růst bakterií je malý až zanedbatelný. Pro koncentraci Ag-NP 10 mg/l dochází ke zpožděnému zahájení růstu, zatímco pro zbylé koncentrace jsou křivky OD velmi podobné referenci.

Tabulka 5: Hodnoty CFU pro vybrané koncentrace Ag-NP a referenci

| NP | Ag-NP | REF |
|-------------|-------------------|------------------|
| Koncentrace | 10 mg/l | - |
| CFU | $7,35 \cdot 10^8$ | $8,2 \cdot 10^8$ |
| CFU [%] | 89 | 100 |

Výpočet CFU v Tabulce 5 pro nejvyšší koncentraci Ag-NP potvrzuje neúčinnost těchto NP, jelikož je hodnota procentuálního poměru CFU pro koncentraci Ag-NP 10 mg/l a referenci velmi vysoká. Lze tedy usoudit, že ani nižší koncentrace nebudou ovlivňovat bakteriální růst.

5.2.1.4 Au-NP



Obrázek 28: Vývoj OD roztoku *E. coli* a Au-NP

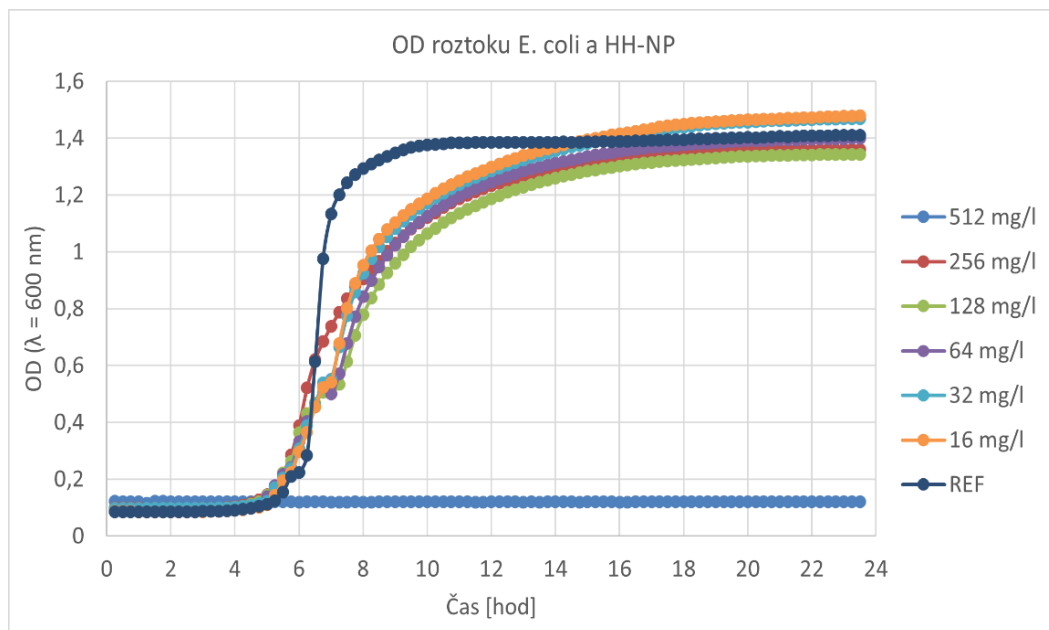
Na Obrázku 28 je patrné, že inhibice růstu bakterií pomocí Au-NP je zcela zanedbatelná. Vysoká hodnota OD pro koncentraci Au-NP 25 mg/l může být důsledkem zvýšené absorpce světla pomocí NP. Zároveň s nárůstem bakteriální populace docházelo paralelně ke zvýšení světelné absorpce. Tyto dvě související skutečnosti by mohly vysvětlit vyšší hodnotu OD pro danou koncentraci během celého měření.

Tabulka 6: Hodnoty CFU pro vybrané koncentrace Au-NP a referenci

| NP | Au-NP | REF |
|-------------|------------------|------------------|
| Koncentrace | 25mg/l | - |
| CFU | $8,7 \cdot 10^8$ | $8,2 \cdot 10^8$ |
| CFU [%] | 106 | 100 |

Po porovnání křivek OD pro koncentraci 25 mg/l a referenční křivky a zároveň po provedení korelace s hodnotami procentuálních poměrů CFU v Tabulce 6 lze pozorovat, že hodnoty pro Au-NP 25 mg/l jsou vyšší než pro referenci. Rozdíl procentuálního poměru CFU pro Au-NP a referenci je tak malý, že je v rámci měřicí chyby. Nelze tedy prokázat žádné účinky Au-NP na bakteriální růst.

5.2.1.5 HH-NP



Obrázek 29: Vývoj OD roztoku *E. coli* a HH-NP

Antibakteriální účinky HH-NP je možné na Obrázku 29 pozorovat jenom pro koncentraci 512 mg/l. Pro zbylé koncentrace je z tohoto obrázku patrné lehké zpoždění růstu, avšak výsledná hodnota OD je stejná, jako pro referenci.

Tabulka 7: Hodnoty CFU pro vybrané koncentrace HH-NP a referenci

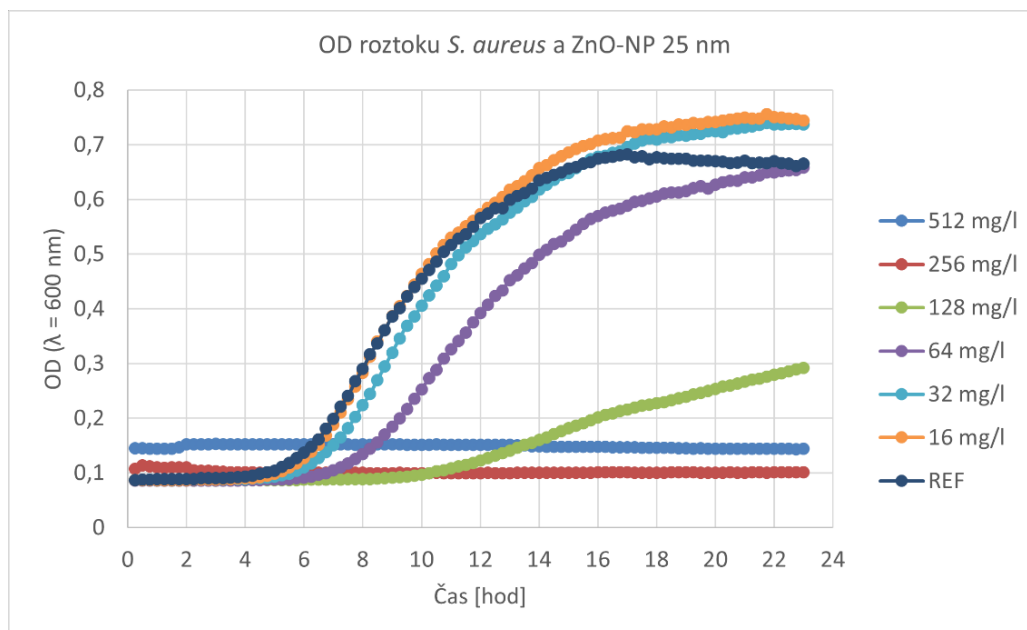
| NP | HH-NP | REF |
|-------------|----------|--------------|
| Koncentrace | 512 mg/l | - |
| CFU | 20 | $8,2 * 10^8$ |
| CFU [%] | 0 | 100 |

Rozdíl CFU v Tabulce 7 pro koncentraci HH-NP 512 mg/l je v porovnání s referenční hodnotou tak markantní, že nelze zpochybnit antibakteriální účinky této koncentrace.

5.2.2 *Staphylococcus aureus*

Měření na mikrotitrační desce a vyhodnocení OD probíhalo stejně, jako při měření předchozího druhu bakterií. Doba běhu experimentu pro *S. aureus* byla 24 hodin a odečítání hodnot OD probíhalo každých 15 minut.

5.2.2.1 ZnO-NP 25 nm



Obrázek 30: Vývoj OD roztoku *S. aureus* a ZnO-NP 25 nm

Na Obrázku 30 lze vidět, že pro *S. aureus* mají koncentrace ZnO 512 mg/l a 256 mg/l dobré antibakteriální účinky. Koncentrace ZnO 25 nm 128 mg/l vykazuje antibakteriální účinky o něco slabší, ale velice aktivně brzdí růst bakterií.

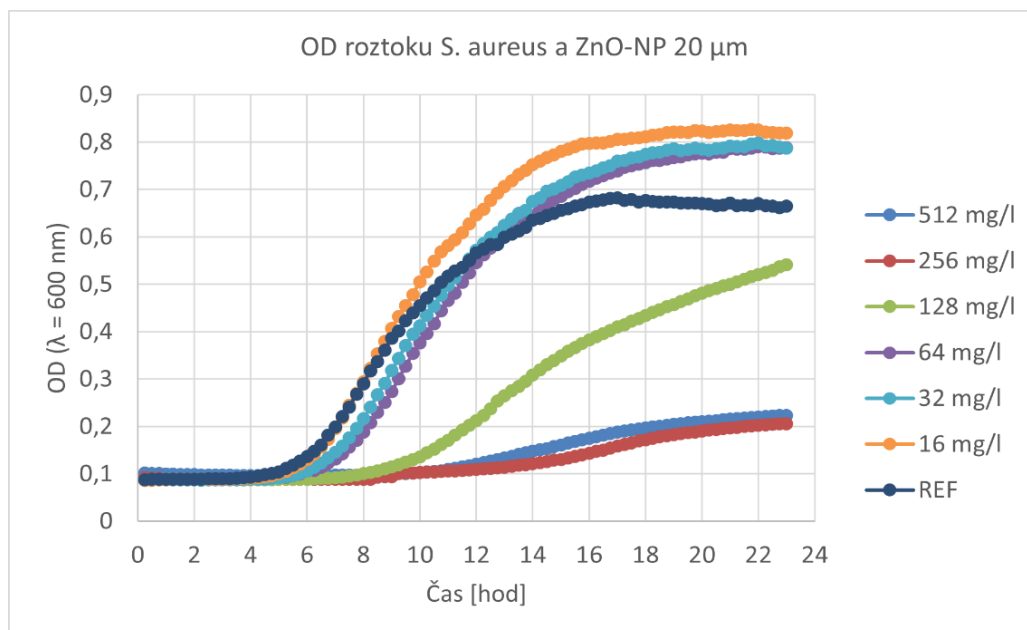
Koncentrace ZnO 64 mg/l až 16 mg/l mají křivky velmi podobné referenční křivce, tudíž jejich antibakteriální účinek není prokazatelný.

Tabulka 8: Hodnoty CFU pro vybrané koncentrace ZnO-NP 25 nm a referenci

| NP | ZnO-NP 25 nm | | REF |
|-------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Koncentrace | 256 mg/l | 128 mg/l | - |
| CFU | $4,4 \cdot 10^3$ | $2,01 \cdot 10^7$ | $1,47 \cdot 10^8$ |
| CFU [%] | 0 | 3 | 100 |

Z Tabulky 8 tedy vyplývá, že koncentrace ZnO 256 mg/l a 128 mg/l nemají antibakteriální účinky. Lze tedy usoudit, že nižší koncentrace také nebudou vykazovat biocidní účinky.

5.2.2.2 ZnO-NP 20 μm



Obrázek 31: Vývoj OD roztoku *S. aureus* a ZnO-NP 20 μm

Z Obrázku 31 je patrné, že antibakteriální účinky koncentrací ZnO 512 mg/l a 256 mg/l jsou prokazatelné, byť jsou menší než 25 nm částic ZnO. To samé platí pro koncentraci ZnO 128 mg/l jež růst bakterií lehce zpomalí, ale nezastaví.

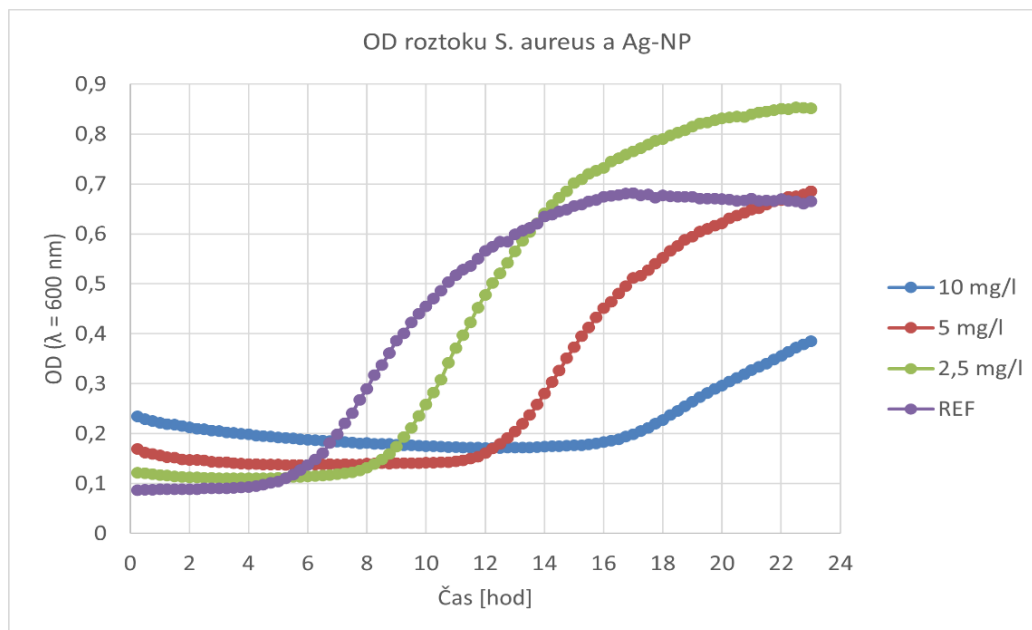
Pro koncentrace ZnO 64 mg/l až 16 mg/l je jasné, že nelze potvrdit jejich antibakteriální účinek, jelikož mají OD křivky velmi podobné referenční křivce.

Tabulka 9: Hodnoty CFU pro vybrané koncentrace ZnO-NP 20 μm a referenci

| NP | ZnO-NP 20 μm | | REF |
|-------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| Koncentrace | 256 mg/l | 128 mg/l | - |
| CFU | $7,08 \cdot 10^5$ | $8,14 \cdot 10^7$ | $1,47 \cdot 10^8$ |
| CFU [%] | 1 | 55 | 100 |

Z Tabulky 9 je patrné, že oproti koncentraci ZnO 256 mg/l má koncentrace 128 mg/l jen mírné antibakteriální účinky. Dále lze usoudit, že koncentrace ZnO nižší než 128 mg/l budou vykazovat podobně mírné nebo žádné antibakteriální účinky.

5.2.2.3 Ag-NP



Obrázek 32: Vývoj OD roztoku *S. aureus* a Ag-NP

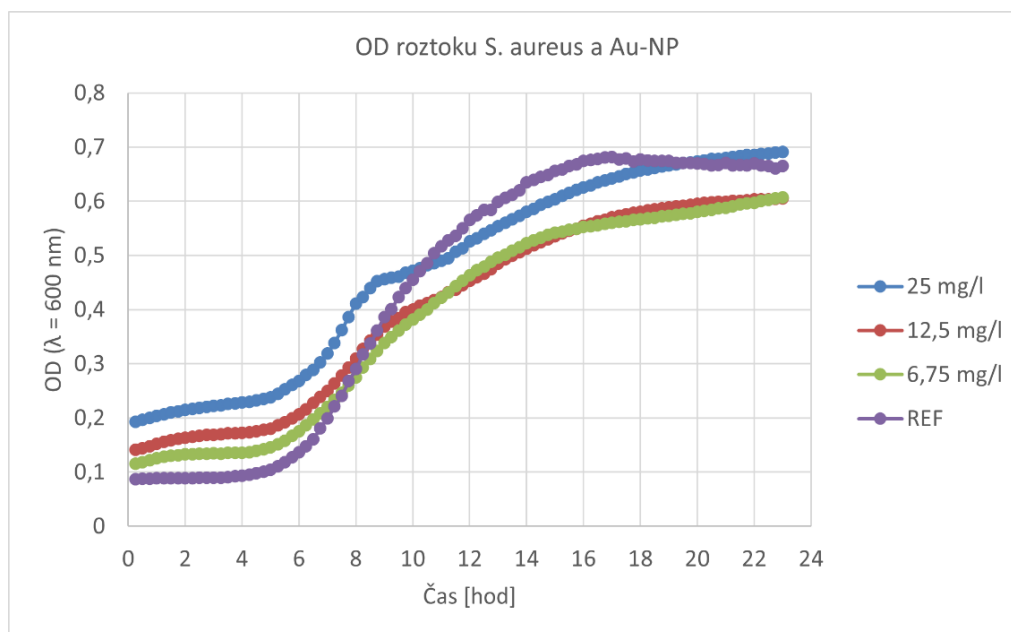
Na Obrázku 32 lze vidět, že hlavní účinek Ag-NP je zpomalení růstu bakterií. Pro koncentraci Ag-NP 10 mg/l dochází k výraznému zpomalení růstu a lehké bakteriální inhibici. Pro koncentrace Ag-NP 5 mg/l a 2,5 mg/l nedochází k bakteriální inhibici, nýbrž k mírnému zpomalení růstu.

Tabulka 10: Hodnoty CFU pro vybrané koncentrace Ag-NP a referenci

| NP | Ag-NP | REF |
|-------------|-------------------|-------------------|
| Koncentrace | 10 mg/l | - |
| CFU | $8,45 \cdot 10^7$ | $1,47 \cdot 10^8$ |
| CFU [%] | 57 | 100 |

V Tabulce 10 je hodnota CFU pro koncentraci Ag-NP 10 mg/l o 43% menší než referenční hodnota, z čehož lze usoudit, že i tato nejvyšší koncentrace má jen mírné antibakteriální účinky. Pro nižší koncentrace Au-NP lze předpokládat, že nebudou ovlivňovat bakteriální růst.

5.2.2.4 Au-NP



Obrázek 33: Vývoj OD roztoku *S. aureus* a Au-NP

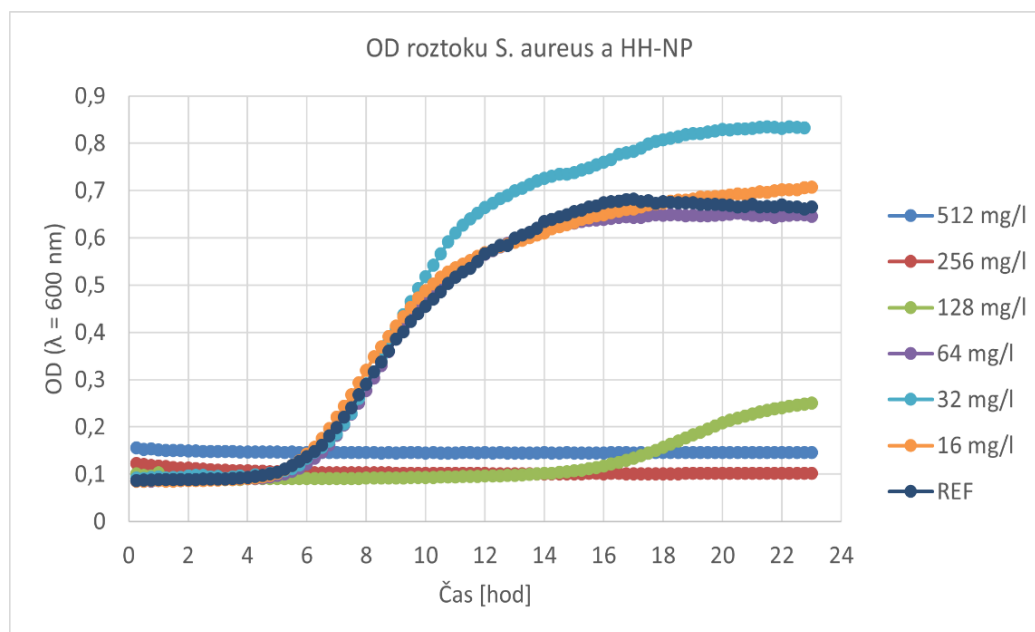
Antibakteriální účinky Au-NP na *S. aureus* nelze na základě Obrázku 33 potvrdit. Křivky pro všechny koncentrace mají zanedbatelně rozdílné deviace od OD referenční křivky.

Tabulka 11: Hodnoty CFU pro vybrané koncentrace Au-NP a referenci

| NP | Au-NP | REF |
|-------------|-------------------|-------------------|
| Koncentrace | 25mg/l | - |
| CFU | $1,12 \cdot 10^8$ | $1,47 \cdot 10^8$ |
| CFU [%] | 76 | 100 |

Z Tabulky 11 je patrné, že vliv Au-NP v koncentraci 25 mg/l nemá silné antibakteriální účinky a biocidní schopnost této koncentrace je zanedbatelná. Pro nižší koncentrace Au-NP lze usoudit, že nebudou vykazovat antibakteriální účinky.

5.2.2.5 HH-NP



Obrázek 34: Vývoj OD roztoku *S. aureus* a HH-NP

Na Obrázku 34 lze vidět, že se antibakteriální účinky projevují hlavně u koncentrací HH-NP 512 mg/l, 256 mg/l a 128 mg/l. Koncentrace HH-NP 64 mg/l, 32 mg/l a 16 mg/l kopírují tvar referenční křivky a neprojevují antibakteriální aktivitu.

Tabulka 12: Hodnoty CFU pro vybrané koncentrace Au-NP a referenci

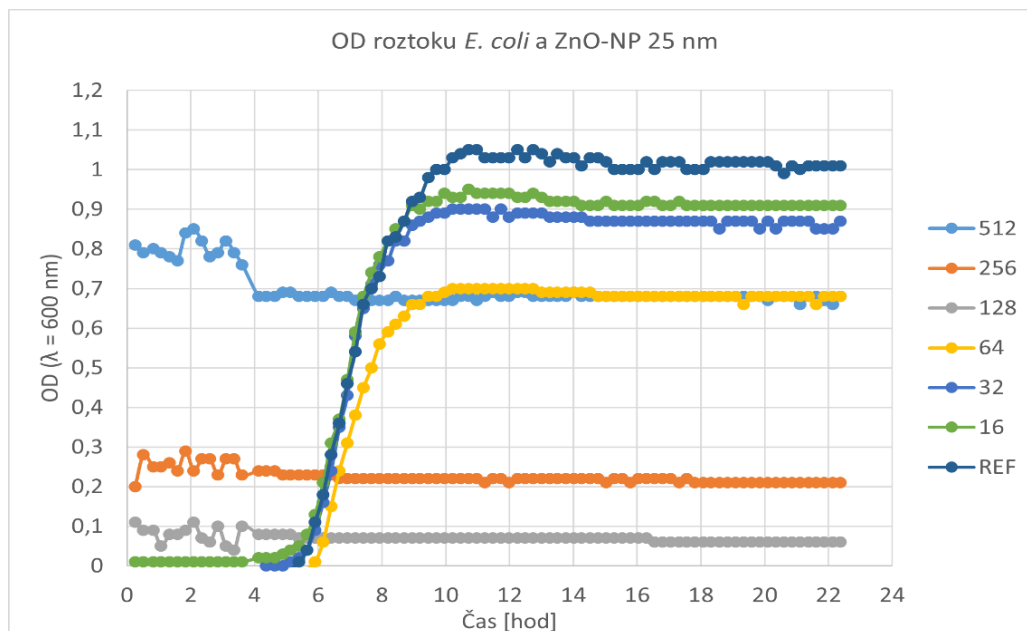
| NP | HH-NP | REF |
|-------------|-------------------|-------------------|
| Koncentrace | 128 mg/l | - |
| CFU | $1,02 \cdot 10^7$ | $1,47 \cdot 10^8$ |
| CFU [%] | 6,9 | 100 |

Hodnota procentuálního poměru CFU v Tabulce 12 pro koncentraci HH-NP 128 mg/l vůči referenci naznačuje, že tato koncentrace vykazuje vysoký antibakteriální účinek. Pro nižší koncentrace HH-NP lze usuzovat, že se biocidní vliv bude snižovat.

5.3 Bioreaktor

Průběh měření OD v bioreaktorech probíhalo po dobu 24 hodin a odečtení hodnoty OD nastalo každých 15 minut.

5.3.1 *Escherichia coli*



Obrázek 35: Vliv různých koncentrací ZnO-NP 25 nm na růst G- bakterií v bioreaktoru

Z Obrázku 35 je patrné, že koncentrace ZnO od 512 mg/l až po koncentraci 128 mg/l vykazují silný antibakteriální účinek, kterému může napomáhat konfigurace experimentu. Tím, že se zkumavky s obsahem bakterií a ZnO neustále otáčely, mohly i částice v nižších koncentracích způsobit inhibici růstu bakterií.

Na druhou stranu koncentrace ZnO od 64 mg/l až po koncentraci 16 mg/l vykazují zanedbatelný vliv na růst bakterií.

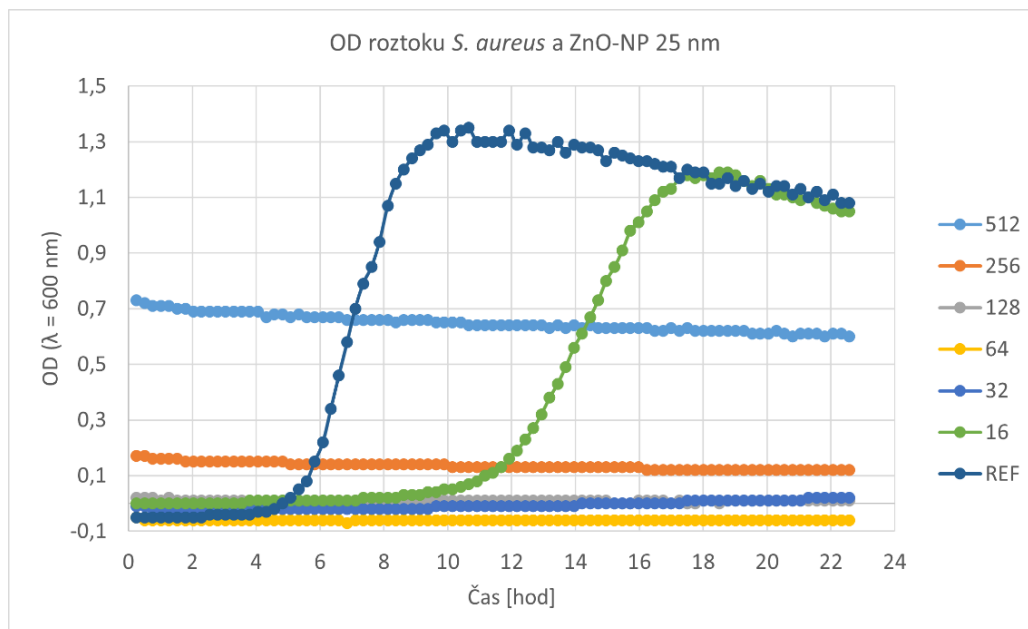
Tabulka 13: Hodnoty CFU pro koncentrace s pozitivním bakteriálním růstem pro bioreaktor s bakteriemi *E. coli*

| NP | ZnO-NP 25 nm | | | REF |
|-------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Koncentrace | 64 mg/l | 32 mg/l | 16 mg/l | - |
| CFU | $1,05 \cdot 10^9$ | $1,33 \cdot 10^9$ | $1,2 \cdot 10^9$ | $1,49 \cdot 10^9$ |
| CFU [%] | 70 | 89 | 81 | 100 |

Skutečnost, že tyto koncentrace neprokazují bakteriální inhibici lze podpořit i výsledky výpočtu CFU v Tabulce 13.

Hodnoty CFU pro vybrané koncentrace ZnO jsou řádově stejné, jako hodnota pro referenci. Zároveň hodnoty procentuálních poměrů CFU pro vybrané koncentrace indikují antibakteriální aktivitu ZnO částic.

5.3.2 *Staphylococcus aureus*



Obrázek 36: Vliv různých koncentrací ZnO-NP 25 nm na růst G+ bakterií v bioreaktoru

Na Obrázku 36 lze pozorovat velmi dobrou antibakteriální účinnost všech koncentrací ZnO, kromě koncentrace 16 mg/l, která sice zpozdila růst bakterií, ale nezpůsobila kompletní inhibici bakterií.

Tabulka 14: Hodnoty CFU pro koncentrace s pozitivním bakteriálním růstem pro bioreaktor s bakteriemi *S. aureus*

| NP | ZnO-NP 25 nm | REF |
|-------------|-------------------|-------------------|
| Koncentrace | 16 mg/l | - |
| CFU | $4,07 \cdot 10^8$ | $8,48 \cdot 10^8$ |
| CFU [%] | 47 | 100 |

Po výpočtu CFU v Tabulce 14 pro koncentraci ZnO 16 mg/l a referenci vychází, že mají řádově stejnou hodnotu. Avšak hodnota procentuálního poměru CFU koncentrace ZnO 16 mg/l a reference naznačuje mírný antibakteriální účinek. Lze tedy říci, že tato koncentrace ovlivňuje rychlost růstu a mírně i konečný počet kolonií, avšak její antibakteriální účinky jsou nevýznamné.

5.4 Jiné fyzikální vlivy

Hlavní experimenty s ozařováním bakterií pomocí neutronů, které vznikaly plazmovým výbojem, byly provedeny dvakrát, a to jenom pro zástupce G- bakterií *E. coli*. Nedokonalost uchycení MHA s bakteriemi a skutečnost, že testovací aparatura nebyla navržena pro tento druh experimentování způsobila, že nedošlo k úspěšnému a plnému ozáření bakterií plánovaným způsobem. Tudíž nelze určit, jestli má bombardování bakterií pomocí neutronů antibakteriální potenciál. Avšak tím, že se projevíly přidružené fyzikální jevy, pro bylo možné vyhodnotit jejich antibakteriální působení.

Pro první experiment byla použita skleněná Petriho miska s bakteriemi *E. coli* v relativní koncentraci 10^{-2} s 5 ml MHA. Nedošlo k žádné úpravě misky a fóliové trojúhelníčky byly umístěny na MHA bez žádných předchozích úprav. Tento experiment musel být však předčasně ukončen, jelikož nebylo možné odčerpat veškerý plyn z komory. Následně bylo zjištěno, že celý obsah Petriho misky spadl do reakční komory. Tím, že je MHA konzistence želé, nedošlo k jeho rozpadu a bylo možné ho z aparatury vyndat, vrátit na misku a umístit do inkubátoru, aby bylo možné pozorovat, zda tato šoková situace měla vliv na růst bakterií.



Obrázek 37: MHA s *E. coli* v koncentraci 10^{-2} , který spadl do reakční komory

Jak je z Obrázku 37 patrné, tak šok způsobený pádem do komory a dočasné přiložení hliníkové fólie nemělo zásadní vliv na růst bakterií. Aktivní růst bakterií potvrzují viditelně narostlé bakteriální kolonie. Pokus o vytvoření vakua měl však vliv na velikost MHA, u kterého došlo k lehkému zmenšení v důsledku úniku plynů z MHA.



Obrázek 38: Koncentrace bakterií 10^{-3} , sloužící jako reference

Miska s bakteriální koncentrací 10^{-3} sloužila jako reference, jelikož nebyla ovlivněna žádnými vlivy. Na Obrázku 38 je vidět, že bakterie bez problému narostly, jelikož jsou zde patrné bakteriální kolonie.



Obrázek 39: Vlevo fotka koncentrace 10^0 a vpravo fotka koncentrace 10^{-1} , na kterých byla hliníková fólie přiložena 24 hodin

Na Obrázku 39 lze pozorovat, že ponechání fólie na MHA s bakteriemi způsobí zastavení bakteriálního růstu. Pokud dojde k porovnání s koncentrací 10^{-3} , tak lze říci, že fólie přiložené na bakterie po dobu 24 hodin má velmi dobré antibakteriální účinky.

Při druhém experimentu se díky úpravám vzorku povedlo dostat na požadovanou úroveň tlaku a provést několik „výstřelů“ (plazmových výbojů). Bohužel po ukončení experimentu a

otevření komory došlo ke zjištění, že ani provedené úpravy nestačily na kvalitní udržení vzorku, který opět spadl do komory.



Obrázek 40: Vzorek po úspěšném provedení „výstřelů“ v reakční komoře

Z Obrázku 40 lze vidět, že došlo k roztrhání fólie a velké decimaci MHA s bakteriemi. Tím, že vzorek zapadl mezi elektrody, tak byl přímo vystaven plazmovým výbojům, které mohly zásadním způsobem poničit celý vzorek a hlavně fólii. Zároveň při odčerpávání plynů z komory došlo k uvolňování vzduchu z agaru, který se díky velikému snižování tlaku začal vařit a odpařovat. Tudíž nelze konstatovat, zda mohl vliv neutronů mít antibakteriální účinky, jelikož nedošlo k přímému ozáření. Lze však usoudit, že vysoká teplota, která způsobila zničení agaru v důsledku úniku plynů, mohla mít negativní účinky na životaschopnost bakterií.

6 Diskuse

Cílem prvního experimentu bylo ověření antibakteriálních účinků kovových nanočástic v různých koncentracích. Pro tento experiment byl použit UV-VIS spektrofotometr, ve kterém byly vzorky 24 hodin postupně měřeny. Výsledky ukázaly, že ZnO-NP 25 nm má ve vyšších koncentracích silné antibakteriální účinky, a to hlavně na G+ bakterie. Větší částice, ZnO-NP 20 μm , mají ve vyšších koncentracích také silné antibakteriální účinky, ale z výsledků je patrné, že mají větší vliv na G- bakterie. Dále je z výsledků jasné, že použité Ag-NP a Au-NP nemají žádný významný antibakteriální účinek. Tento výsledek může být způsoben relativně nízkou maximální koncentrací těchto nanočástic, kterou jsme měli k dispozici v porovnání s koncentracemi ZnO. Dalším faktorem může být stáří nanočástic, kdy mohlo dojít k narušení jejich povrchu a tím pádem i ke ztrátě jejich antibakteriální účinnosti. U HH-NP byl zaznamenán silný antibakteriální účinek proti G+ bakteriím pro tři nejvyšší koncentrace a pro G- byl antibakteriální účinek zaznamenán jenom u první nejvyšší koncentrace. Předpokladem byla vyšší antibakteriální účinnost HH-NP díky trnovitým výběžkům, avšak je možné, že vnější ochranná membrána u G- bakterií má dostatečnou tloušťku, aby zabránila penetraci nanočásticemi.

Pro umocnění baktericidního vlivu ZnO-NP 25 nm byly použity bioreaktory, ve kterých docházelo k neustálému míchání bakteriálního roztoku s NP. Z výsledků lze stanovit, že bioreaktory měly pozitivní vliv na antibakteriální účinek i u nižších koncentrací ZnO-NP 25 nm. Umocnění antibakteriálního vlivu pomocí bioreaktoru lze vidět hlavně u G+ bakterií, kde jsou zvýšené baktericidní účinky více patrné. Při neustálém míchání dochází k častějším interakcím mezi ZnO-NP 25 nm a bakteriemi, což má za následek intenzivnější účinky.

Při třetím experimentu bylo cílem prozkoumat vliv plazmou generovaných neutronů na růst bakterií, avšak pro neúspěšnost experimentu nelze stanovit, že zda bombardování bakterií pomocí neutronů vykazovalo jejich inhibici. Jelikož bylo pro tento experiment důležité v reakční komoře vytvořit velmi nízký tlak, musel být veškerý plyn z komory odsán. To mělo za následek právě snižování tlaku a rapidní uvolňování vzduchu z MHA, čímž mohlo dojít k „uvaření“ MHA, a tudíž i k zabití bakterií. Pro ověření vlivu hliníkové fólie na bakterie bylo zjištěno, že její ponechání v přímém kontaktu s bakteriemi zabraňuje jejich růstu. Tato skutečnost může být způsobena abrazním povrchem fólie, který destruktivně interaguje k bakteriální stěnou. Účinky takto položené fólie byly testovány jenom pro G- bakterie a není tedy možné říci, zdali se antibakteriální účinky projeví i u G+ bakterií.

7 Závěr

S rozšiřujícím se používáním antibiotik a klasických antibakteriálních přípravků vzniká v bakteriální populaci odolnost vůči těmto konvenčním léčivům. Je tedy více než důležité hledání alternativních a při nejhorším stejně efektivních způsobů a materiálů, kterými by bylo možné potlačit jakoukoliv bakteriální infekci. Tyto materiály by měly mít dezinfekční účinky a takovou antibakteriální účinnost, aby pravděpodobnost vzniku antibakteriální rezistence byla co nejnižší. Těmto požadavkům vyhovují kovové nanočástice, které jsou předmětem velkého zkoumání. Cílem této práce je ověření biocidních účinků nanočástic, a to zejména ZnO-NP, Au-NP, Ag-NP. Doplňkem této práce je studium vlivu plazmou generovaných neutronů na růst bakterií a s tím přidružených fyzikálních vlivů. Pro studium antibakteriálních účinků nanočástic a jiných vlivů byli použiti zástupci G- bakterií *E. coli* a zástupci G+ bakterií *S. aureus*.

Bylo ověřeno, že částice ZnO-NP i jejich modifikace HH-NP mají při určitých koncentracích velmi dobré antibakteriální účinky. Z výsledků lze říci, že ZnO-NP mají větší vliv na inhibici G+ bakterií, ale ve vyšších koncentracích spolehlivě inhibují růst obou bakteriálních druhů. Antibakteriální účinky Ag-NP a Au-NP byly nevýznamné či žádné, a dále nebyl prokázán ani negativní vliv na bakteriální růst u plazmou generovaných neutronů. U procesů spojených s tvorbou neutronů, jako je teplo nebo přímý kontakt hliníkové fólie s bakteriemi, prokázán antibakteriální účinek byl.

Správná kombinace velikosti a koncentrace nanočástic jsou důležité parametry pro maximalizaci jejich antibakteriální účinnosti. Je tedy důležité se nadále věnovat jejich výzkumu a rozšiřovat poznatky o nanočásticích.

8 Reference

- [1] R. Urban-Chmiel *et al.*, “Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review,” *Antibiotics*, vol. 11, no. 8, Aug. 2022, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS11081079/S1.
- [2] S. J. Butterworth, F. Barton, and J. R. Lloyd, “Extremophilic microbial metabolism and radioactive waste disposal,” pp. 27–27, Oct. 2023, doi: 10.1007/s00792-023-01312-4.
- [3] K. DeAngelis and C. Prado, “Microbiology 562: D. Batch Fermentation Module,” *Microbiology Educational Materials*, Jan. 2017, doi: 10.7275/R5VM49G1.
- [4] “Živa – Živá půda 2. Půdní prokaryota – v jednoduchosti je síla (Dana Elhottová, Alica Chroňáková, Miloslav Šimek).” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://ziva.avcr.cz/2020-2/ziva-puda-2-pudni-prokaryota-v-jednoduchosti-je-sila.html>
- [5] “Gramovo barvení – Wikipedie.” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: https://cs.wikipedia.org/wiki/Gramovo_barven%C3%AD
- [6] O. ; W. L. S. G. U. C. Sizar, “Gram-Positive Bacteria,” *StatPearls*, May 2023.
- [7] “Gram-positive bacteria - Wikipedia.” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Gram-positive_bacteria
- [8] J. Oliveira and W. C. Reygaert, “Gram-Negative Bacteria,” *Infection Management for Geriatrics in Long-Term Care Facilities, Second Edition*, pp. 427–443, Aug. 2023, doi: 10.1385/1-59259-036-5:43.
- [9] M. Basavaraju, B. S. Gunashree, M. Basavaraju, and B. S. Gunashree, “Escherichia coli: An Overview of Main Characteristics,” *Escherichia coli - Old and New Insights*, Nov. 2022, doi: 10.5772/INTECHOPEN.105508.
- [10] “Questions and Answers | E. coli | CDC.” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>
- [11] “Escherichia coli – Wikipedie.” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: https://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli
- [12] A. Gnanamani, P. Hariharan, M. Paul- Satyaseela, A. Gnanamani, P. Hariharan, and M. Paul- Satyaseela, “Staphylococcus aureus: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach,” *Frontiers in Staphylococcus aureus*, Mar. 2017, doi: 10.5772/67338.

- [13] A. Pantosti, A. Sanchini, and M. Monaco, "Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*," <http://dx.doi.org/10.2217/17460913.2.3.323>, vol. 2, no. 3, pp. 323–334, May 2007, doi: 10.2217/17460913.2.3.323.
- [14] "Staphylococcus aureus - Wikipedia." Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus
- [15] O. V. Salata, "Applications of nanoparticles in biology and medicine," *J Nanobiotechnology*, vol. 2, no. 1, pp. 1–6, Apr. 2004, doi: 10.1186/1477-3155-2-3/TABLES/1.
- [16] E. C. Wang and A. Z. Wang, "NANOPARTICLES AND THEIR APPLICATIONS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY," *Integr Biol (Camb)*, vol. 6, no. 1, p. 9, Jan. 2014, doi: 10.1039/C3IB40165K.
- [17] R. Abbasi, G. Shineh, M. Mobaraki, S. Doughty, and L. Tayebi, "Structural parameters of nanoparticles affecting their toxicity for biomedical applications: a review," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 25, no. 3, Mar. 2023, doi: 10.1007/S11051-023-05690-W.
- [18] L. Wang, C. Hu, and L. Shao, "The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future," *Int J Nanomedicine*, pp. 12–1227, 2017, doi: 10.2147/IJN.S121956.
- [19] A. Sarwar *et al.*, "Regioselective Sequential Modification of Chitosan via Azide-Alkyne Click Reaction: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Chitosan Derivatives and Nanoparticles," 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0123084.
- [20] B. Gulson *et al.*, "Small Amounts of Zinc from Zinc Oxide Particles in Sunscreens Applied Outdoors Are Absorbed through Human Skin," *Toxicological Sciences*, vol. 118, no. 1, pp. 140–149, Nov. 2010, doi: 10.1093/TOXSCI/KFQ243.
- [21] "Oxid zinečnatý – Wikipedie." Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: https://cs.wikipedia.org/wiki/Oxid_zine%C4%8Dnat%C3%BD
- [22] "Zinc Oxide(ZnO) Nanoparticles/ Nanopowder | Skyspring Nanomaterials." Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://ssnano.com/inc/sdetail/zinc-oxide-nanoparticles--nanopowder-zno--99-8---200-nm-/232>
- [23] A. Sirelkhatim *et al.*, "Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism," *Nano-Micro Lett*, vol. 7, no. 3, pp. 219–242, 2015, doi: 10.1007/s40820-015-0040-x.

- [24] A. K. Mandal *et al.*, “Current Research on Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications,” *Nanomaterials (Basel)*, vol. 12, no. 17, Sep. 2022, doi: 10.3390/NANO12173066.
- [25] “Hedgehog Particles – Kotov Lab.” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://kotov.engin.umich.edu/hedgehog-particles/>
- [26] H. Liu, S. Chu, R. Peng, S. Chu, and B. Jin, “ZnO three-dimensional hedgehog-like nanostructure: Synthesis, growth mechanism and optical enhancement,” *Appl Phys A Mater Sci Process*, vol. 116, no. 1, pp. 39–44, 2014, doi: 10.1007/S00339-014-8476-2.
- [27] N. Babayevska *et al.*, “ZnO size and shape effect on antibacterial activity and cytotoxicity profile,” *123AD*, doi: 10.1038/s41598-022-12134-3.
- [28] N. Neykova *et al.*, “ZnO hedgehog-like structures for control cell cultivation,” *Appl Surf Sci*, vol. 258, no. 8, pp. 3485–3489, Feb. 2012, doi: 10.1016/J.APSUSC.2011.11.101.
- [29] D. Rutherford *et al.*, “Growth Inhibition of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria by Zinc Oxide Hedgehog Particles,” *Int J Nanomedicine*, vol. 16, pp. 3541–3554, 2021, doi: 10.2147/IJN.S300428.
- [30] X. F. Zhang, Z. G. Liu, W. Shen, and S. Gurunathan, “Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches,” *Int J Mol Sci*, vol. 17, no. 9, Sep. 2016, doi: 10.3390/IJMS17091534.
- [31] T. C. Dakal, A. Kumar, R. S. Majumdar, and V. Yadav, “Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles,” *Front Microbiol*, vol. 7, no. NOV, p. 1831, Nov. 2016, doi: 10.3389/FMICB.2016.01831.
- [32] “Scientific Image - Silver Nanoparticles | NISE Network.” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.nisenet.org/catalog/scientific-image-silver-nanoparticles>
- [33] X. F. Zhang, Z. G. Liu, W. Shen, and S. Gurunathan, “Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches,” *Int J Mol Sci*, vol. 17, no. 9, Sep. 2016, doi: 10.3390/IJMS17091534.
- [34] I. X. Yin, J. Zhang, I. S. Zhao, M. L. Mei, Q. Li, and C. H. Chu, “The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry,” *Int J Nanomedicine*, vol. 15, pp. 2555–2562, 2020, doi: 10.2147/IJN.S246764.

- [35] “Gold Nanoparticle: Recent Progress on Its Antibacterial Applications and Mechanisms.” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2021/2501345/>
- [36] “High resolution image of Au nanoparticles, drift correction on (image 3) | Gatan, Inc.” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.gatan.com/resources/media-library/high-resolution-image-au-nanoparticles-drift-correction-image-3?modal=1>
- [37] V. P. Zharov, K. E. Mercer, E. N. Galitovskaya, and M. S. Smeltzer, “Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles,” *Biophys J*, vol. 90, no. 2, pp. 619–627, 2006, doi: 10.1529/BIOPHYSJ.105.061895.
- [38] Y. Lu, J. Wu, D. Zhang, V. V. Vikhrev, and A. Y. Frolov, “Mechanisms for neutron generation in Z-pinches,” *J Phys Conf Ser*, vol. 2055, p. 12008, 2021, doi: 10.1088/1742-6596/2055/1/012008.
- [39] “A Guide to Bacteria Preservation.” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/aguidetobacteriapreservation.htm>
- [40] “Sterilization | Disinfection & Sterilization Guidelines | Guidelines Library | Infection Control | CDC.” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/sterilization/index.html>
- [41] “Three Common Methods of Incubator Sterilization Explained | Blog | LabIncubators.net.” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://labincubators.net/blogs/blog/methods-of-incubator-sterilization>