

# **Antibakteriální aktivita vybraných antibakteriálních polymerních systémů pro medicínální aplikace**

Martina Puchálková

---

Bakalářská práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství polymerů  
akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martina PUCHÁLKOVÁ**  
Osobní číslo: **T10861**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Antibakteriální aktivita vybraných antibakteriálních polymerních systémů pro medicínální aplikace**

Zásady pro vypracování:

**Anotace:** Práce bude zaměřena na charakterizaci antibakteriálních účinků nano Ag, mikro ZnO a Ag-ZnO systémů plniv připravených pomocí MW syntézy, ať již v práškové formě, na mikronosiči nebo v kompozitním materiálu. Literární rešerše:

1. Popis bakterií jakožto velikost, tvar, struktura, složení, jejich členění na základě buněčné stěny.
2. Vnější vlivy působící na bakterie a specifikujte látky likvidující či omezující funkce bakterií.
3. Obecné vlastnosti oxidu zinečnatého a stříbra v nano, mikro formě.
4. Faktory ovlivňující antibakteriální aktivitu Ag a ZnO.
5. Způsoby či metody přípravy nanočástic stříbra a ZnO.
6. Metody charakterizace antibakteriální aktivity.

**Praktická část:**

1. Základní charakterizaci materiálů pomocí dostupné přístrojové techniky na FT.
2. Stanovení MIC a MBC u vybraných materiálů jak v práškové formě, tak na mikro nosičích.
3. Antibakteriální charakterizaci povrchů kompozitu obsahující nano Ag, mikro ZnO či jejich kombinace pomocí normy ISO 22196 (2007).

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. RŮŽIČKA, Jan. Mikrobiologie pro technology životního prostředí. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické, Technologická fakulta ve Zlíně, 1999, 124 s. ISBN 8021413743
2. VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie obecná. 2., přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 8086850005.
3. MARAMBIO-JONES, C., HOEK, E. M. V. A Review of the Antibacterial Effects of Silver Nanomaterials and Potential Implications for Human Health and the Environment. (Report). Journal of Nanoparticle Research: An Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology, June, 2010, vol. 12, no. 5, p. 1531-1551. ISSN: 1388-0764.

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Pavel Bažant**

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání bakalářské práce:

**11. února 2013**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**31. května 2013**

Ve Zlíně dne 11. února 2013

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: ..... PUCHALKOVA' MARTINA .....

Obor: ..... PMT-FM .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně ..... 23.5.2013 .....

..... Puchalkova' .....

---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se zabývá charakterizací antibakteriálních vlastností polymerních systémů. Teoretická část je zaměřena na popis a dělení bakterií, definuje vlivy vnějších faktorů působících na jejich životaschopnost. Dále popisuje látky s antibakteriálním účinkem. Poslední teoretická část je zaměřena na obecné vlastnosti, charakterizaci a přípravu nano-Ag a ZnO. Praktická část popisuje syntézu plniv, přípravu kompozitních materiálů a jejich následnou charakterizaci metodami SEM, EDX a XRD. Antibakteriální vlastnosti plniva jsou měřeny pomocí dilučního testu v agaru a antibakteriální aktivita kompozitu je testována v souladu s normou ISO 22196.

Klíčová slova: bakterie, antibakteriální aktivita, nano-Ag, ZnO, MW syntéza, ISO 22196, MIC

## **ABSTRACT**

This thesis deals with the characterization of antibacterial properties of polymer systems. The theoretical part is focused on the description and division of bacteria, defines the effects of external factors affecting their viability. It also describes the substance with an antibacterial effect. The last theoretical part is focused on general properties, preparation and characterization of nano-Ag and ZnO. The practical part describes the synthesis of fillers, preparation of composite materials and characterization by SEM, EDX and XRD. Antibacterial properties of fillers are measured by agar dilution test and antibacterial activity of the composite is tested in accordance with ISO 22196.

Keywords: bacteria, antibacterial activity, nano-Ag, ZnO, MW synthesis, ISO 22196, MIC



Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Pavlu Bažantovi za odborné vedení a poskytnutí užitečných materiálů a zkušeností při psaní této bakalářské práce.

Zároveň bych chtěla také poděkovat Ing. Daniele Veselé za její vřelý přístup, cenné rady a pomoc při antibakteriálním testování.

*„Žádné množství pokusů nikdy nemůže dokázat, že jsem měl pravdu. Jediný pokus však kdykoliv může dokázat, že jsem se mýlil.“*

Albert Einstein

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně 23.5.2013

*Frcka'ková*  
.....  
podpis

# OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 BAKTERIE.....	13
1.1 OBECNÉ VLASTNOSTI BAKTERIÍ.....	13
1.1.1 Tvar a uspořádání bakterií.....	13
1.1.2 Struktura bakteriálních buněk.....	14
1.1.3 Barvitelnost dle Grama.....	15
1.1.4 Životní nároky bakterií.....	16
1.1.5 Růst a množení bakterií.....	17
1.1.6 Metabolismus bakterií.....	18
1.2 BAKTERIE POUŽITÉ V PRAKTICKÉ ČÁSTI.....	19
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	19
1.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
2 VLIV VNĚJŠÍCH FAKTORŮ NA BAKTERIE.....	22
2.1 FYZIKÁLNÍ FAKTORY.....	22
2.1.1 Teplota.....	22
2.1.2 Sucho.....	23
2.1.3 Ultrazvuk.....	23
2.1.4 Záření.....	23
2.1.5 Hydrostatický tlak.....	23
2.1.6 Osmotický tlak.....	24
2.2 CHEMICKÉ FAKTORY.....	24
2.2.1 pH prostředí.....	24
2.2.2 Redoxní potenciál.....	24
2.2.3 Desinfekční látky.....	24
2.2.4 Chemoterapeutika.....	27
2.3 BIOLOGICKÉ FAKTORY.....	27
2.3.1 Antibiotika.....	27
3 LÁTKY S ANTIBAKTERIÁLNÍM ÚČINKEM.....	30
3.1 STRĚBRO.....	31
3.1.1 Obecné vlastnosti Ag.....	31
3.1.2 Antibakteriální aktivita nano-Ag.....	32
3.2 OXID ZINEČNATÝ.....	34
3.2.1 Obecné vlastnosti.....	34
3.2.2 Antibakteriální aktivita ZnO.....	35
3.3 NANOKOMOPOZITY AG-ZNO.....	36
3.4 ZPŮSOBY SYNTÉZY.....	37
3.4.1 Mikrovlnná syntéza nanočástic.....	37
3.5 METODY CHARAKTERIZACE VZORKŮ.....	38
3.5.1 SEM - Skenovací elektronová mikroskopie.....	38
3.5.2 EDX - Energiově disperzní rentgenová spektroskopie.....	38
3.5.3 XRD - Rentgenová difrakční prášková analýza.....	39



3.6	METODY CHARAKTERIZACE ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY.....	39
3.6.1	Disková difuzní metoda .....	39
3.6.2	Diluční metoda .....	40
3.6.3	E-test .....	42
3.6.4	Měření povrchové antibakteriální aktivity plastů .....	42
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>PŘÍPRAVA KOMPOZITŮ.....</b>	<b>45</b>
5.1	POUŽITÉ MATERIÁLY .....	45
5.2	PŘÍPRAVA PLNIVA .....	45
5.2.1	Příprava Ag-ZnO částic.....	45
5.2.2	Příprava strukturovaných Ag-ZnO částic na povrchu celulózy .....	46
5.2.3	Příprava strukturovaných Ag-ZnO částic na povrchu dřevní moučky.....	47
5.3	TERMOPLASTICKÁ PŘÍPRAVA .....	48
5.3.1	Míchání a lisování polymerní matrice s plnivem.....	48
<b>6</b>	<b>MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍCH VLASTNOSTÍ PLNIVA .....</b>	<b>49</b>
6.1	MATERIÁLY .....	49
6.2	POSTUP.....	49
6.3	METODA VYHODNOCENÍ .....	51
<b>7</b>	<b>MĚŘENÍ POVRCHOVÉ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY.....</b>	<b>52</b>
7.1	MATERIÁLY .....	52
7.2	POSTUP.....	52
7.3	METODA VYHODNOCENÍ .....	54
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>55</b>
8.1	CHARAKTERIZACE PLNIV .....	55
8.1.1	SEM.....	55
8.1.2	XRD .....	57
8.2	CHARAKTERIZACE KOMPOZITU .....	59
8.2.1	EDX.....	59
8.2.2	SEM.....	59
8.3	CHARAKTERIZACE ANTIBAKTERIÁLNÍCH VLASTNOSTÍ PLNIVA .....	60
8.4	CHARAKTERIZACE ANTIBAKTERIÁLNÍCH VLASTNOSTÍ KOMPOZITU.....	61
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>74</b>

## ÚVOD

Bakterie jsou nejrozšířenější skupinou organismů na celém světě. Je možno je nalézt v půdě, vodě, ovzduší i uvnitř a na povrchu mnohobuněčných organismů. Výskyt bakteriálních kmenů v lidském těle podmiňuje správnou funkci mnoha orgánů. Bakterie žijí v zažívacím ústrojí, tělních dutinách i na kůži člověka. Existují však také patogenní bakterie, které mohou vyvolávat různá onemocnění. Běžnou součástí léčby bakteriální infekce je využití antibiotik. V posledních letech však dochází ke zvýšenému výskytu bakterií, které jsou rezistentní vůči běžně používaným antibiotikům či dezinfekčním látkám. Velké riziko také představují nozokomiální infekce - přenosná infekční onemocnění vzniklá v souvislosti s pobytem osob ve zdravotnickém zařízení. Na významu tak získává výzkum a vývoj nových látek s antibakteriálními vlastnostmi.

Jako perspektivní se jeví nejrůznější nanokompozity s antibakteriálními vlastnostmi. Nanokompozitní materiály jsou složeny ze dvou nebo více různých složek, z nich alespoň jedna se v materiálu vyskytuje ve formě částic o velikostech jednotek až desítek nanometrů ( $10^{-9}$ ). Výzkumu a vývoji nanokompozitů oxidů kovů se věnují vědecké týmy, s cílem objasnit a využít antibakteriální aktivitu takto připravených látek.

Stříbro je známo pro své antibakteriální vlastnosti již od dob starověku. Nové technologie umožňují přípravu stříbra v nanorozměrech (velikost  $10^{-9}$ ). Nanočástice stříbra působí proti širokému spektru mikroorganismů, jako jsou bakterie, viry, kvasinky i plísně. V posledních letech tak dochází k jeho využití při aplikacích na povrch polymerních látek či textilií.

Oxid zinečnatý je amfoterní oxid, kterého se běžně využívá pro hojení ran či v kosmetice. Předmětem výzkumu je mikro-ZnO (velikost  $10^{-6}$ ) i jeho nanočástice. Oxid zinečnatý je pro člověka netoxický a je lidským tělem velmi dobře snášen. Antibakteriálních vlastností ZnO se využívá při přípravě nejrůznějších zdravotnických materiálů.

Je známo, že je oxid zinečnatý účinnějším antibakteriálním prostředkem proti gram pozitivním bakteriím ve srovnání s gramnegativními bakteriemi. Na druhé straně víme, že nanočástice Ag mají více baktericidní účinek na gramnegativní bakterie ve srovnání s gram pozitivními bakteriemi. Proto nanokompozity, které kombinují nano-Ag a ZnO představují jistý účinný hybridní systém, kde mohou částice působit synergicky a zvyšovat tak antibakteriální účinek.

Cílem bakalářské práce je stanovení antibakteriálních vlastností hybridních Ag-ZnO plniv nano-Ag a mikro-ZnO systémů na mikronosičích a kompozitních materiálů připravených pomocí MW syntézy.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BAKTERIE

Bakterie jsou buněčné živé organismy, které tvoří samostatnou říši (doménu). Z evolučního hlediska se všechny organismy rozčleňují do tří domén: bakterie, archea a eukarya. Bakterie jsou jednobuněčné organismy velmi malých rozměrů s prokaryotickým typem buňky. Prokaryotická buňka se vyznačuje menšími rozměry a primitivnější stavbou než buňka eukaryotická. Buněčné nepravé jádro (nukleoid) se sestává z jedné molekuly dvouřetězcové DNA, která není ohraničena jadernou membránou. Vnitřek prokaryotické buňky není rozdělen membránami a buněčný obal je mnohem složitější [1], [2].

Bakterie jsou velmi rozmanitou skupinou mikroorganismů mající společné základní charakteristiky, ale přesto odlišné tak, aby mohly obývat rozličná prostředí. Osidlují půdní a vodní prostředí, vzduch i lidské tělo [4]. Bakterie také mohou mít negativní účinky na potraviny a materiály, např. mikrobiální koroze plastových výrobků, nebo se jejich činnosti může průmyslově využívat pro výrobu antibiotik. Patogenní bakterie způsobují nemoci člověka, zvířat nebo rostlin [3].

### 1.1 Obecné vlastnosti bakterií

#### 1.1.1 Tvar a uspořádání bakterií

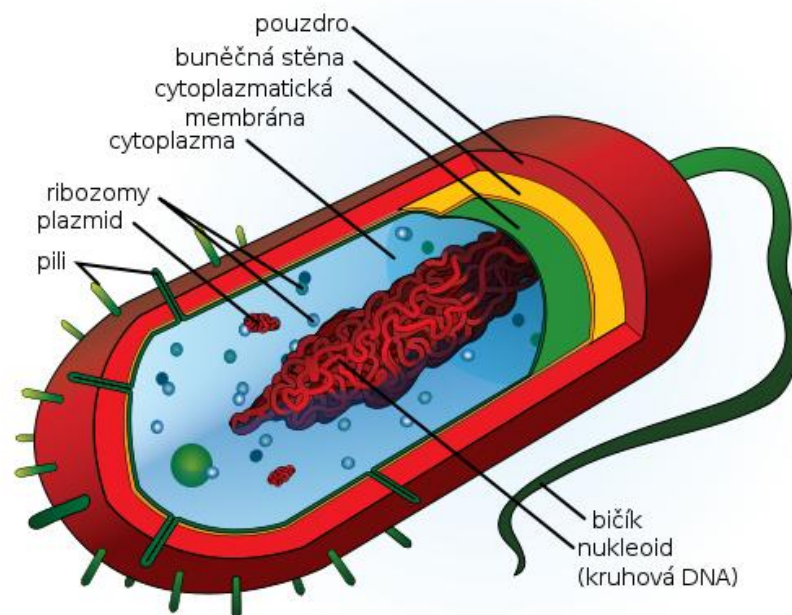
Tvar bakteriální buňky je charakteristickým znakem bakterií. Rozlišují se tvary:

- **kulovitý** - bakterie se nazývají koky (diplokoky, streptokoky, stafylokoky),
- **protáhlý** - bakteriím se říká tyčky nebo tyčinky (diplobakterie, streptobakterie), krátké tyčinky se označují jako kokobacily,
- **zakřivený** - jsou prohnuté nebo spirálovitě zahnuté (vibria, spirily, spirochéty),
- **vláknitý** - velmi protáhlé bakterie se nazývají vlákna,
- **větvený** - některé tyčinky mohou být s úplným větvením nebo jen náznaky [4].

Uspořádání bakterií závisí na rozdělení v průběhu buněčného dělení, někdy dochází ke spojení více bakterií. Streptokoky jsou řetízky 3 až 20 koků ve stejné rovině. Diplokoky tvoří vždy dvojice koků. Stafylokoky jsou utvořeny shluky koků ve tvaru hroznu. Diplobacily jsou dvojice tyčinek uspořádané kratšími konci u sebe a streptobacily tvoří krátké řetízky tyček [5].

### 1.1.2 Struktura bakteriálních buněk

Stavbu bakteriální buňky znázorňuje Obr. 1, každá bakteriální buňka obsahuje základní struktury - nukleoid, buněčnou stěnu, cytoplazmatickou membránu, cytoplazmu, ribozomy a plasmidy. Některé buňky mohou mít také další struktury - pouzdro, bičíky, fimbrie nebo inkluze [2].



Obr. 1 Stavba bakteriální buňky [6]

- **Nukleoid** - představuje molekulu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) uspořádané do kruhové dvoušroubovice, která reprezentuje chromozóm.
- **Buněčná stěna** - vytváří tuhý obal bakterie, složený především z peptidoglykanu (murein), ale může také obsahovat bílkoviny, lipopolysacharidy, fosfolipidy, kyselinu teikoovou atd..
- **Cytoplazmatická membrána** - je tvořena fosfolipidovou dvouvrstvou, do které jsou vnořeny bílkoviny, membrána je semipermeabilní (polopropustná) a zajišťuje výměnu a regulaci látek uvnitř buňky.
- **Cytoplazma** - je vodný roztok enzymů, meziproductů metabolismu, rezervních látek a anorganických iontů, který vyplňuje buňku.
- **Ribozomy** - jsou ribonukleotidové částice, jejichž hlavní funkcí je syntéza bílkovin. Ribozomy se nacházejí v buňce ve větším počtu a jsou tvořeny dvěma podjednotkami [2].

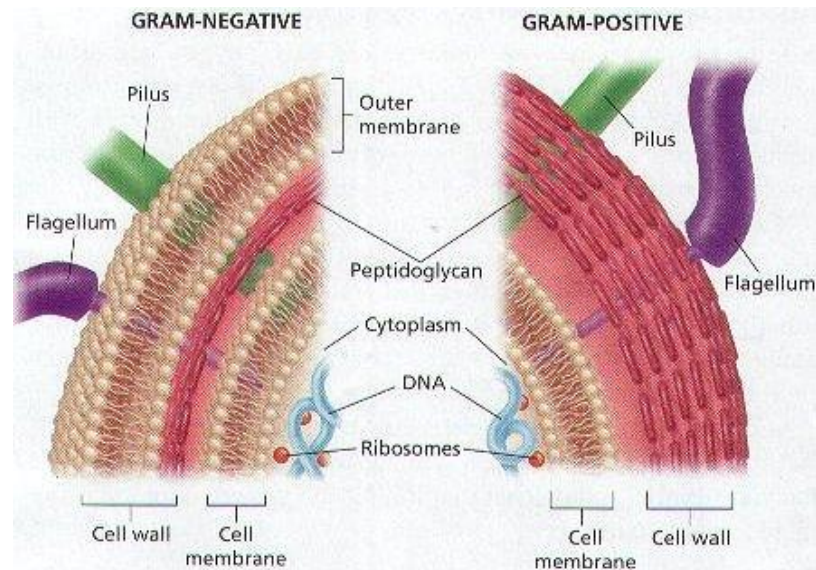
- **Plazmidy** - představují cirkulárně uzavřené molekuly DNA.
- **Pouzdro (kapsula)** - se vyskytuje u mnoha bakterií a je tvořeno silně hydratovanou polymerní vrstvou, která má pomoci bakterii zvýšit svou odolnost.
- **Inkluze** - jsou zrna, která představují zásobní látky pro bakterii (polysacharidy, látky apod.) a jsou uložena v cytoplazmě.
- **Bičíky** - jsou vláknité útvary, které bakteriím umožňují pohyb. Jsou tvořeny bílkovinnými podjednotkami flageliny.
- **Fimbrie (pili)** - vyrůstají z buněčné stěny a tvoří je proteinová vlákna, která umožňují adhezi na povrch epitelu v urogenitálním, střevním či respiračním traktu [4].

Některé bakteriální rody mohou vytvářet **spory**. Bakteriální spory jsou klidová stadia životního cyklu, do kterého přecházejí, zhoršují-li se jejich životní podmínky. Důležitou vlastností spor je jejich vysoká odolnost proti zevním vlivům - vysychání, účinek chemických látek nebo působení vysokých teplot [6].

### 1.1.3 Barvitelnost dle Grama

Gramovo barvení je jednoduchá diagnostická metoda barvení preparátu o několika krocích, která ve výsledku rozliší bakterie na dvě velké skupiny lišící se v uspořádání buněčné stěny. **Grampozitivní bakterie (G+)** mají silnou buněčnou stěnu, tvořenou vysokým obsahem peptidoglykanu, malým množstvím teikoové kyseliny a absencí vnější membrány a lipopolysacharidové vrstvy. **Gramnegativní bakterie (G-)** jsou složeny ze slabší buněčné stěny tvořené především lipopolysacharidy a slabé vrstvy peptidoglykanu. Rozdílnost ve složení buněčné stěny u bakterií je znázorněna na Obr. 2. V průběhu Gramova barvení se fixovaný preparát moří roztokem jódu, který se z některých druhů mikroorganismů vyplavuje etanolem a dojde k odbarvení buňky. Nakonec se vzorek dobarví roztokem safraninu nebo krystalovou violetí. Takto se ověřují gramnegativní bakterie a v mikroskopu se jeví červeně (např. *Escherichia*, *Salmonela*). Pokud se buňky etanolem neodbarví, získají po nabarvení safraninem (krystalovou violetí) modrou barvu a označují se jako grampozitivní (např. *Staphylococcus*, *Streptococcus*) [2], [8].





Obr. 2 Rozdíly ve stavbě buněčné stěny bakterií [35]

Existují i bakterie, které nereagují na Gramovo barvení. Zejména acidorezistentní bakterie (např. *Mykobakterie*) odolávají barvení dle Grama a proto se pro jejich určení používá jiných typů barvení (např. Ziehl-Neelsenovo barvení) [6].

#### 1.1.4 Životní nároky bakterií

Bakterie obývají různá místa a liší se různými požadavky na prostředí, v němž žijí.

Podle teplotního optima se rozlišují bakterie:

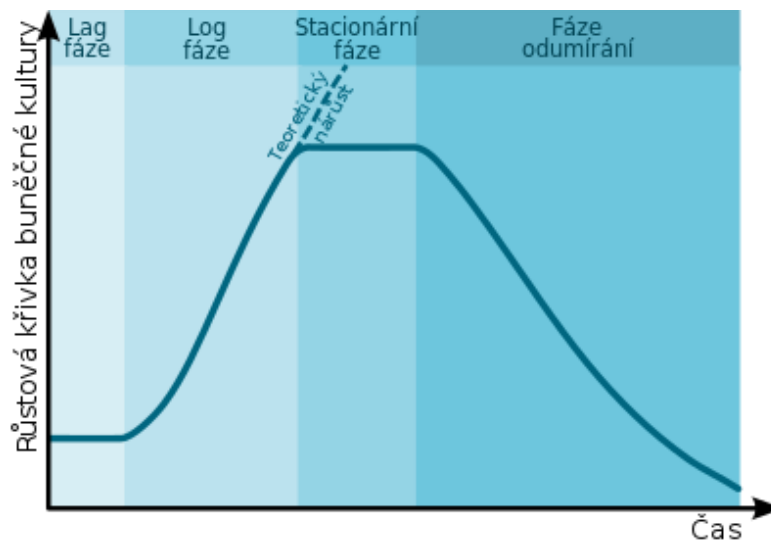
- **Psychofilní** - vyžadují teplotu od  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a nacházejí se ve vodních tocích (např. rody *Pseudomonas* a *Bacillus*).
- **Mezofilní** - rostou nejlépe při teplotách v rozmezí  $20 - 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a řadíme zde bakterie patogenní pro člověka a zvířata a další přírodní kmeny.
- **Termofilní** - mají optimum růstu v rozmezí  $40 - 85\text{ }^{\circ}\text{C}$  a vyskytují se v horkých pramenech a při rozkladu organických látek.
- **Hypertermofilní** - vyžadují teploty nad  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a dokážou přežít i v extrémním životním prostředí [2].

Bakterie podle vztahu ke kyslíku rozdělujeme na:

- **Striktně aerobní** - vyžadují pro svůj život kyslík v atmosférické koncentraci (např. zástupci *Vibrio* a *Pseudomonas*).
- **Striktně anaerobní** - žijí jen v prostředí bez kyslíku, kyslík je pro ně toxický (např. většina druhů rodu *Clostridium*).
- **Fakultativně anaerobní** - rostou lépe v přítomnosti kyslíku, ale dokážou se přizpůsobit a žít i bez něj (např. *Escherichia* a *Staphylococcus*) [4].

### 1.1.5 Růst a množení bakterií

Růstový cyklus bakterií zahrnuje růst buňky do určité velikosti a tím zvětšování jejího objemu a syntézu makromolekul. Fáze růstu je ukončena rozdělením bakterie na dvě rovnocenné buňky a cyklus se znovu opakuje. Růstová křivka na Obr. 3 graficky znázorňuje jednotlivé fáze množení v závislosti na čase. Na křivce je možno vypočítat úseky, které představují růstové fáze. V lag fázi dochází k adaptaci buňky a k množení prakticky nedochází. V log fázi narůstá počet buněk exponenciálně konstantní rychlostí. Rychlost množení se postupně snižuje a nastává stacionární fáze, kdy dělení vykazuje nulovou hodnotu a v kultuře je přítomen maximální počet buněk [9].



Obr. 3 Růstová křivka buněčné kultury [38]

Kultivace bakterií je proces růstu a množení bakterií v uměle vytvořených podmínkách *in vitro*. Rozlišují se dva druhy kultivace - statická a kontinuální. **Statická kultivace** probíhá na povrchu pevné nebo tekuté živé půdy. **Kontinuální kultivace** je druh kultivace, při níž jsou k rostoucí kultuře kontinuálně přiváděny živiny a současně je vypouštěn stejný objem kultury [2], [9].

### 1.1.6 Metabolismus bakterií

Metabolické reakce bakterií jsou základem pro identifikaci bakteriálních druhů. Většina bakterií produkuje celou řadu enzymů. Enzymy mohou být např. oxidační, které štěpí peroxid vodíku (peroxidáza) nebo napomáhají při oxidačních procesech (oxidáza). Proteolytické enzymy mohou např. porušovat membrány červených krvinek (hemolyziny), vyvolávat přeměnu fibrinogenu na fibrin (koaguláza) nebo štěpit proteiny (proteáza). Toxické enzymy mohou např. vyvolávat poruchy nervové tkáně a funkce nervové soustavy (neurotoxiny), centrálním účinkem vyvolávat křeče (tetanospazmin), nebo působit na nervová zakončení ve střevě (enterotoxin) [7].

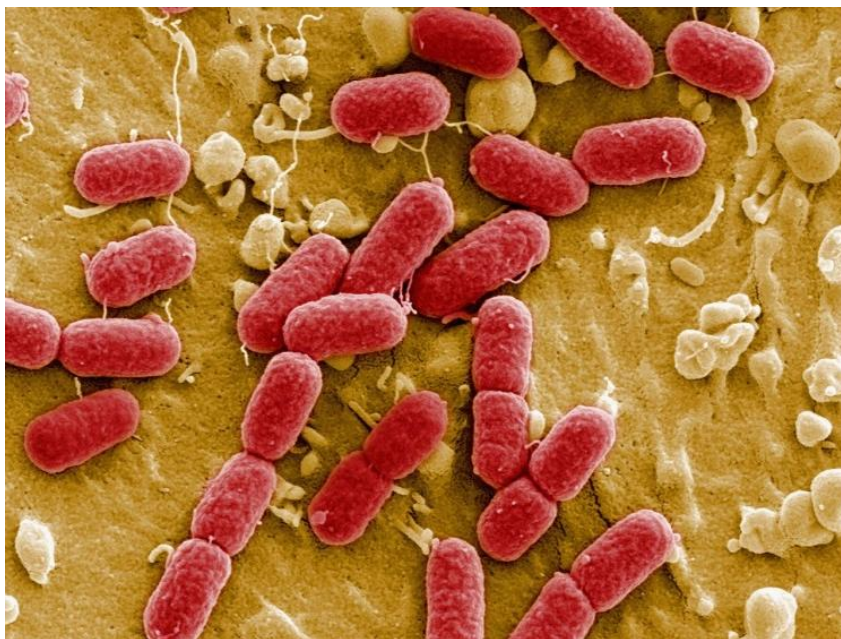
Bakterie získávají energii potřebnou pro život při katabolickém metabolismu, který může být fermentativní, respirační nebo autotrofní. Fermentační metabolismus užívaný bakteriemi je glykolýza. Při glykolýze dochází k přeměně glukózy na pyruvát a tím k získání energie v podobě adenosintrifosfátu (ATP). Sekundární fermentační proces využívá mnoho bakterií a řadí se zde mléčné a alkoholové kvašení. Při respiračním metabolismu získává bakteriální buňka energii v oxidačním procesu za pomoci respiračních enzymů. Autotrofní metabolismus se vyznačuje získáváním energie z anorganických zdrojů, např. využitím světelné energie pro přeměnu  $\text{CO}_2$  (fotosyntéza) nebo využitím anorganické látky místo kyslíku (anaerobní respirace) [7], [13].

Anabolický metabolismus neboli biosyntéza zahrnuje zvětšování hmoty nebo zvyšování počtu buněčných složek, kde je hlavním zdrojem energie ATP. Dochází k syntéze makromolekul tvořených z jednotek, např. proteiny z aminokyselin nebo nukleové kyseliny z nukleotidů. DNA řídí vlastní syntézu a syntézu různých typů RNA. RNA zajišťuje syntézu bílkovin [7].

## 1.2 Bakterie použité v praktické části

### 1.2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* je nejznámější mikroorganismus z rodu *Escherichia*, který se řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*. *E. coli* je gramnegativní, fakultativně anaerobní a nesporulující bakterie. Vzhled bakterie *E. coli* pod mikroskopem lze vidět na Obr. 4. Bakteriální buňky *E. coli* dosahují délky až 2  $\mu\text{m}$  a tloušťky 0,5  $\mu\text{m}$  [12].



Obr. 4 Bakterie *Escherichia coli* [19]

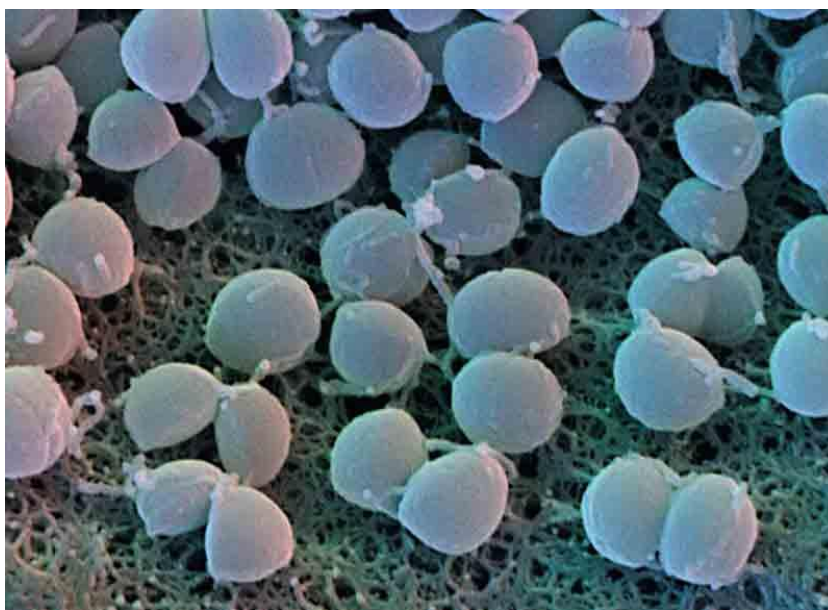
*E. coli* je běžnou součástí střevní mikroflóry a v lidském organismu působí jako komenzál, částečně saprofyt a také symbiont. Většina kmenů těchto bakterií ve střevě je prospěšná svému hostiteli, protože zabraňuje vniknutí patogenů a také se podílí na tvorbě vitamínu K. Některé bakteriální kmeny mohou způsobovat onemocnění, protože bakterie *E. coli* mají podmíněnou patogenitu a onemocnění způsobují, jen pokud je kmen vybaven specifickými faktory virulence nebo pokud se nachází mimo střevo. Bakterie *E. coli* přežívá i mimo tělo člověka a toho se využívá jako indikátoru k prokázání fekálního znečištění, převážně vody. U *E. coli* se zvyšuje rezistence proti ampicilinu, při terapii se využívá cefalosporinů, chráněných penicilinů, fluorovaných chinolinů či kotrimoxazolu [9], [12].

Některých kmeny *E. coli* působí patogenně a způsobují onemocnění.

- Enteropatogenní (*EPEC*) - mají faktory virulence, které vedou k novorozeneckým a kojeneckým průjmům.
- Enterotoxigenní (*ETEC*) - jsou nejčastější příčinou průjmů u cestovatelů v rozvojových zemích.
- Enteroinvazivní (*EIEC*) - infekce těmito kmeny vede ke krvavým průjmům zejména u dětí a seniorů v ústavní péči.
- Shiga-like toxigenní (*STEC*) - vyvolávají těžké průjmy s hemoragií.
- Enteroagregativní (*EAggEC*) - se podílejí na cestovatelských průjmech převážně v asijských zemích.
- Uropatogenní (*UPEC*) - mají specifické faktory virulence a jsou příčinou močových infekcí [9], [11].

### 1.2.2 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* se řadí do rodu *Staphylococcus* a čeledi *Staphylococcaceae*. Stafylokoky jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, nepohyblivé a nesporující koky o průměru 0,7 - 0,9  $\mu\text{m}$ . Vzhled bakterie *Staphylococcus aureus* je patrný na Obr. 5. Buňky stafylokoků jsou nejčastěji uspořádány v nepravidelných shlucích tvaru hroznů [9], [14].



Obr. 5 Bakterie *Staphylococcus aureus* [20]

Bakteriální kmen *S. aureus* se vyskytuje asi u třetiny lidí jako kožní mikroflóra či na sliznicích, kde nezpůsobuje žádné obtíže. Při snížení imunity však může dojít k projevu patogenity způsobujícím řadu různých onemocnění. Infekce se může projevit onemocněním kůže anebo může vyvolat záněty vnitřních orgánů, vedoucí až ke smrtelným sepsím.

Mezi kožní projevy onemocnění způsobené *S. aureus* řadíme např.:

- impetigo - tvořené puchýři plnými hnisu na povrchové vrstvě kůže,
- karbunkl (nežit) a furunkl - vředy,
- abscesy - dutiny plné hnisu, které vznikly zánětem,
- syndrom opařené kůže - vyskytuje se převážně u dětí [9], [12].

Velkým problémem stafylokokových infekcí je rezistence bakterií. Většina kmenů stafylokoků je odolná vůči penicilinu. U bakterií *S. aureus* dochází k výskytu multirezistence a bakterie rezistentní vůči oxacilinu (*ORSA*) nebo meticilinu (*MRSA*) jsou zároveň rezistentní i vůči dalším rozdílným antimikrobiálním látkám. K léčbě se většinou využívá polysyntetických penicilinů, makrolidů, linkosamidů aj. [9], [11].

## 2 VLIV VNĚJŠÍCH FAKTORŮ NA BAKTERIE

Na mikroorganismy působí celá řada fyzikálních, chemických i biologických vlivů vnějšího prostředí. Tyto faktory mohou být příznivé i nepříznivé. Nepříznivé antibakteriální působení vede ke snížení počtu buněk, zastavení dělení či úplnému odumření buněk. Mezi negativní faktory patří především vysoká či nízká teplota, záření, nedostatek vody nebo živin, nevhodné pH, působení chemických látek a další [4].

**Antimikrobiální účinek** zahrnuje jakékoliv nepříznivé působení na mikroorganismy. Antibakteriální účinky ovlivňuje společné působení těchto faktorů - povaha a intenzita působení daného faktoru, stav mikroorganismu, délka působení faktoru a povaha prostředí.

- **Bakteriostatický účinek** - znamená reverzibilní (vratnou) blokaci funkcí buněčných makromolekul (proteiny, nukleové kyseliny), čímž způsobuje inhibici (potlačení) růstu bakterií.
- **Baktericidní účinek** - označuje ireverzibilní (nevratné) poškození buněčných složek, které vede k usmrcení bakterií [5], [6].

### 2.1 Fyzikální faktory

Mezi fyzikální faktory, které nepříznivě působí na bakterie, se řadí sucho, teplota, ultrazvuk, záření, osmotický a zvýšený hydrostatický tlak.

#### 2.1.1 Teplota

Bakterie všech druhů mohou růst pouze v určitém rozsahu teplot. Teplota může ovlivnit vývoj bakterie tak, že může stimulovat či inhibovat růst, měnit morfologii, metabolismus či patologii. Snižováním teploty dochází k odumření části bakterií a zvláště pomalým snižováním teploty pod 0 °C, dochází ke vzniku ledových krystalů a poškození buněk [5]. Zvýšení teploty nad běžnou mez vede k odumření buňky. Smrtící účinek je závislý na výšce teploty, době působení a podmínkách prostředí. Zvýšení teploty se v praxi využívá ke sterilaci či konzervaci. **Sterilace** je soubor činností směřujících k usmrcení všech mikroorganismů. Sterilace se provádí suchým teplem, vlhkým teplem za zvýšeného tlaku nebo teplotním šokem. Při sterilaci za zvýšené teploty se v praxi využívá vyžihání v plameni, horkovzdušné sterilace, autoklávování, proudící páry nebo varu [2], [15].



### 2.1.2 Sucho

Většina bakterií je hydrofilních, potřebují ke svému životu vodu přítomnou i v zevním prostředí. Voda tvoří důležitou součást buněk bakterií. Vodní aktivita vyjadřuje stupeň dostupnosti pro mikroorganismus a vyjadřuje se jako podíl tlaku vodní páry nad příslušným roztokem vůči tlaku páry nad příslušným roztokem. Snížením vodní aktivity lze zabránit činnosti většiny bakterií, a proto se sušení využívá k uchování některých potravin. Některé bakterie či bakteriální spory mohou vysušení přežít a při opětovné vyšší vlhkosti podléhat hnilobě [2], [5].

### 2.1.3 Ultrazvuk

Na bakterie působí letálně zvukové vlny vyšší než 20 kHz. Působení ultrazvuku se projeví kmitáním a pulsováním uvnitř buněčných struktur a následným poškozením buňky. Ultrazvukové vlny musí na bakterie dopadat při nízkém kmitočtu a silné intenzitě. Některé tyčinkovité a vláknité bakterie jsou vůči ultrazvuku citlivější než některé kokovité bakterie a některé spory mohou být vůči ultrazvuku zcela rezistentní [15].

### 2.1.4 Záření

K poškození bakterií může docházet působením ultrafialového (UV) nebo ionizačního záření. UV záření o vlnové délce 260 nm je nejúčinnější, protože při této hodnotě absorbuje buněčná DNA a dochází k rozkladu buňky. Ionizační záření (gama paprsky) porušuje buněčnou DNA přímo i prostřednictvím volných radikálů. Nejcitlivější na působení gama paprsků jsou gramnegativní bakterie. K poškození bakteriální buňky může docházet i účinkem viditelného světla. Některé bakteriální složky mohou absorbovat světelnou energii za vzniku singletového kyslíku, který způsobí oxidaci a tím zničení buňky [5].

### 2.1.5 Hydrostatický tlak

Zvýšený hydrostatický tlak nepříznivě působí na syntézu buněčné stěny, dochází ke zpomalení růstu nebo pohybu buňky. Letální účinky má tlak o velikosti 600 až 700 MPa, který působí několik minut až hodin. Existují však i barofilní bakterie, které žijí v hloubkách moří a oceánů za vysokého hydrostatického tlaku [15].

### 2.1.6 Osmotický tlak

Většina bakterií vyžaduje ke svému růstu prostředí obsahující do 2 % solí a vyšší koncentrace jsou pro ně ničivé. Existují bakterie, které se přizpůsobily vyšším koncentracím a označují se jako halotolerantní nebo halofilní. Halotolerantní bakterie snášejí koncentrace 15 - 20 % NaCl a halofilní bakterie striktně vyžadují koncentraci solí 3-35 % NaCl [2].

## 2.2 Chemické faktory

Mezi chemické faktory, které působí antibakteriálně, se řadí pH prostředí, redoxní potenciál a z chemických prostředků jsou to desinfekční látky a chemoterapeutika.

### 2.2.1 pH prostředí

pH prostředí má velký vliv na množení bakterií, příliš nízké či vysoké pH působí na bakterie letálně. Příčinou úmrtí buňky je přímé poškození cytoplazmy nebo inhibice enzymů a transportních bílkovin. Většina bakterií má optimum růstu při hodnotách pH od 6 do 8. Některé střevní bakterie se adaptovaly a jsou tolerantní k extrémním hodnotám pH. Pro prostředí s kyselým pH je pro bakterie obecně nebezpečnější a u sporulujících bakterií zabraňuje vzniku spor a vegetativních forem [2], [5].

### 2.2.2 Redoxní potenciál

Růst a množení bakterií je značně ovlivněn hodnotou oxidoredukčního potenciálu. Redoxní potenciál ( $E_h$ ) je vyjádření míry schopnosti redoxního systému převést jednoho z reakčních partnerů do oxidovaného stavu. Aerobní bakterie vyžadují prostředí s hodnotou  $E_h$  +0,2 až +0,4 V a anaerobní bakterie prostředí s hodnotou  $E_h$  pod -0,2 V [2].

### 2.2.3 Desinfekční látky

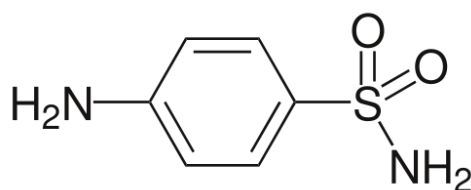
Desinfekční látky jsou antimikrobiální látky, které slouží k likvidaci potenciálně patogeních mikroorganismů, desinfekci neživých objektů a vzduchu, aniž však dochází k usmrcení absolutně všech zárodků včetně spor. Úkolem desinfekčních látek je zabránění šíření nákazy od zdroje k vnímavému jedinci [16].

- **Aldehydy** - mají výrazné antibakteriální účinky tím, že způsobují inaktivaci enzymů bakteriálních buněk. Kromě antibakteriálního účinku působí také sporicidně a fungicidně. Často se aldehydy používají v kombinaci s povrchově aktivními látkami. Mezi nejúčinnější aldehydy patří formaldehyd a glutaraldehyd [18].
- **Alkoholy** - z řady alkoholů je etanol nejvýznamnější antiseptickou a desinfekční látkou. Etanol se většinou ředí vodou na 70 % roztok a v této koncentraci má i nejlepší baktericidní účinky. Alkoholy mají široké spektrum antimikrobiálního účinku a nejsou korozivní ani žíravé. Nevýhodou alkoholů jejich neúčinnost vůči některým rezistentním sporám. Mezi další alkoholy využívané k desinfekci se řadí např. isopropanol, butanol nebo propanol [16], [18].
- **Halogeny** - mezi nejdůležitější halogeny z řad desinficiencí se řadí chlór a jód. Chlór a jeho sloučeniny působí jako oxidační činidlo a způsobují oxidaci enzymů a tím zničení buněk. Plynný chlór se využívá k desinfekci vody. Sloučeniny chloru jako chlornany či chloraminy se využívají k bělení či desinfekci vody i povrchů. Jód je obvykle používán rozpuštěný v alkoholu nebo ve vodě společně s jodidem draselným (jodová tinktura). Nedráždivých účinků těchto sloučenin se využívá jako antiseptik na kůži [2].
- **Barviva** - některá barviva se využívají k desinfekci kůže a sliznic, protože mají schopnost, vázat se do buňky a tím vyvolat antimikrobiální aktivitu. Barviva mají pouze bakteriostatický účinek. V různých koncentracích se využívá akridinových či trifenylmetanových barviv (např. krystalová a genciánová violet) [14].
- **Fenol a fenolické látky** - fenol (kyselina karbolová) se využívá jako antiseptikum a ke konzervaci farmaceutických preparátů. Působení fenolu vyvolává inaktivaci enzymů a srážení proteinů, proto je pro buňky toxický. Mezi další fenolické látky se řadí např. kresol určený k hrubé desinfekci a chlorhexidin používaný především k desinfekci rukou [14], [17].

- **Oxidační látky** - způsobují oxidaci buněčné membrány bakterií, která vede k rozložení buňky a její smrti. Silnými oxidačními činidly jsou chlor, kyslík a jejich sloučeniny. Kyselina peroxooctová a peroxomravenčí se využívají k desinfekci rukou i předmětů. Ozon se používá především k desinfekci vody. Peroxid vodíku převážně v koncentraci 3 % je účinné antiseptikum a hodí se i k čištění hnisajících ran. Manganistan draselný (hypermangan) ve formě roztoku je vhodný k výplachům a koupelím [5], [17].
- **Silné kyseliny a zásady** - jsou anorganické nebo organické sloučeniny s bakteriostatickým až baktericidním účinkem, které poškozují cytoplazmu i buněčnou stěnu bakterií. Velkou účinnost vykazují kyseliny a zásady zahřáté nad 50 °C. Anorganické kyseliny (např. HCl, HNO<sub>3</sub>) se používají k desinfekci skla a porcelánu. Anorganické zásady (např. NaOH, KOH) se používají k hrubé desinfekci velkých ploch, staveb nebo skla. Organické kyseliny (např. kyselina octová, benzoová) mají slabé antibakteriální účinky a využívají se spíše jako konzervační prostředky [3], [13].
- **Těžké kovy a jejich sloučeniny** - téměř všechny těžké kovy a jejich sloučeniny působí na bakterie toxicky. Největší antibakteriální účinek vykazují sloučeniny rtuti, stříbra, mědi a cínu. Sloučeniny těžkých kovů ve vysoké koncentraci způsobují koagulaci bílkovin a v nižších koncentracích vyvolávají inaktivaci enzymů. Sloučeniny rtuti nejčastěji používané k desinfekci jsou organického původu, např. fenylboritan rtuťnatý používaný k výplachům dutin a rtuťnatá sůl (thiomersal) určená především ke konzervaci. Sloučeniny stříbra jsou poměrně málo jedovaté a v praxi se využívá např. 2 % dusičnanu stříbrného a chloridu sodnostříbrného (Sagen), kterým se desinfikují studny a mycí vody. Sloučeniny mědi se uplatňují v průmyslu a zemědělství jako fungicidní látky. Síran měďnatý ve formě vodného roztoku se využívá jako postřik rostlin. Organické sloučeniny cínu velmi dobře působí na spory a plísně, ale jsou toxické a používají se hlavně v zemědělství [5], [14], [16].

## 2.2.4 Chemoterapeutika

Chemoterapeutika jsou látky chemického původu, které mají antibakteriální účinky a využívají se k léčbě infekčních onemocnění. Chemoterapeutika inhibují růst bakterií nebo způsobují smrt bakteriálních buněk, ale pro lidský organismus jsou jen mírně toxické nebo je vůbec nepoškozují. Chemickou strukturou se podobají sloučeninám potřebným pro život bakterie a působí tak, že se za sloučeninu vymění a tím blokuje přirozené pochody v buňce. Mezi nejznámější chemoterapeutika se řadí např. sulfonamidy, sulfony a chinolony [2], [6]. Na Obr. 6 lze vidět chemickou strukturu Sulfanilamidu, který je základní sloučeninou, od které jsou odvozeny různé sulfonamidy.



Obr. 6 Sulfanilamid [34]

## 2.3 Biologické faktory

### 2.3.1 Antibiotika

Antibiotika jsou látky mikrobiálního původu, které mají schopnost inhibovat růst nebo usmrtit jiný mikroorganismus. V dnešní době existuje mnoho tzv. polosyntetických antibiotik, jejichž složení je změněno chemicky. Podle působení antibiotik na bakterie se antibiotika dělí na baktericidní a bakteriostatická. Rozdíly mezi baktericidními a bakteriostatickými antibiotiky nejsou absolutní, mnoho bakteriostatických antibiotik působí ve vyšších koncentracích rovněž baktericidně, závisí na druhu bakterie, druhu a koncentraci působící látky [5], [16].

Účinnost antibiotika na příslušný mikroorganismus ověřuje stanovení dvou laboratorních hodnot - minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace.

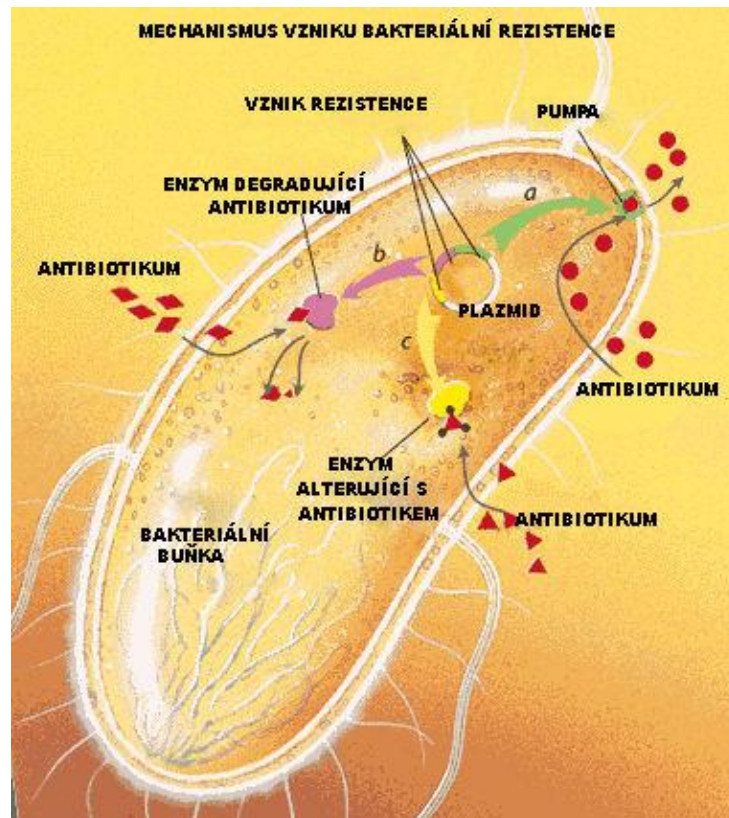
- **Minimální inhibiční koncentrace (MIC)** - je nejnižší koncentrace látky, která zabrání růstu příslušných mikrobů (v mg/ml nebo mg/l).
- **Minimální baktericidní koncentrace (MBC)** - je koncentrace látky, která bakterie během 24 hodin usmrtí (v mg/ml nebo mg/l).

V odebraném vzorku musí být usmrceno minimálně 99,9 % bakterií. U baktericidních látek jsou hodnoty MBC několikrát vyšší než hodnoty MIC. Antimikrobiální látka je obvykle považována za baktericidní, pokud není MBC více než čtyřikrát větší než MIC [5].

Antibiotika působí různými způsoby a v různých místech bakteriální buňky. Podle cíle antibakteriálního účinku se rozlišují:

- **β-laktámová antibiotika** - mají baktericidní účinek, velmi účinně narušují syntézu buněčné stěny a jsou velmi málo toxické (např. peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy).
- **Aminoglykosidy** - působí baktericidně, vážou se na bakteriální ribozomy a tím potlačují proteosyntézu (např. streptomycin, gentamycin, amikacin).
- **Makrolidy** - vyvolávají bakteriostatické účinky, působí jako inhibitory tvorby bílkovin (např. erytromycin, roxitromycin a azitromycin).
- **Tetracykliny** - působí bakteriostaticky, zabraňují syntéze bílkovin a jsou poměrně širokospektré (např. doxycyklin, chlortetracyklin).
- **Chloramfenikoly** - bakteriostatická antibiotika, která účinkují inhibicí bakteriální syntézy (např. chloramfenikol a tiamfenikol).
- **Linkosamidy** - mají bakteriostatický účinek, způsobují inhibici translace (např. linkomycin a klindamycin).
- **Polypeptidy** - mají úzké spektrum účinku a jsou značně toxické (např. bacitracin, polymyxin B).
- **Glykopeptidy** - jsou úzkospektrální (např. vankomycin, teikoplanin) [2], [5], [16].

Při užívání antibiotik se mohou vyskytnout nežádoucí účinky toxické, alergické nebo biologické. Na antibiotika i chemoterapeutika může vzniknout **rezistence**, která se může týkat jednotlivých kmenů nebo celých skupin bakterií. Důvodem vzniku rezistence je genetická či jiná změna, která bakteriím umožní přežít a odolávat vůči působení látek. Rezistence může být buď **primární** (přirozená) nebo **sekundární** (získaná). Mechanismus vzniku bakteriální rezistence je vidět na Obr. 7. Mechanismy rezistence jsou změna místa působení antibiotika, zabránění průniku antibiotika do buňky nebo inaktivace antibiotika [5].



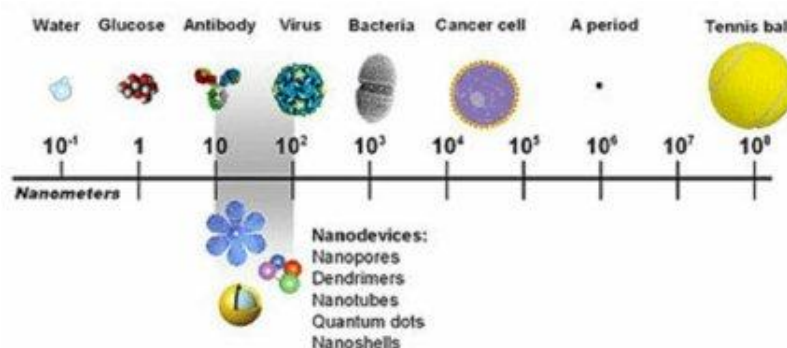
Obr. 7 Mechanismus vzniku bakteriální rezistence [25]



### 3 LÁTKY S ANTIBAKTERIÁLNÍM ÚČINKEM

Antimikrobiální materiály a systémy nabývají na významu nejen v nemocnicích a zdravotnickém prostředí, ale také v laboratořích, domovech a také v mnoha průmyslových aplikacích. Materiály a systémy jsou vyvíjeny tak, aby se zabránilo růstu, šíření a přenosu škodlivých bakterií a jiných mikroorganismů [28].

Potřeba nových materiálů se zlepšenými vlastnostmi urychlila výzkum a výrobu nanostrukturních materiálů, zejména nanokompozitů. Nanotechnologie představují obecně vědní obor, zabývající se záměrným vytvářením a využíváním částic a struktur v měřítku 1 nm až 100 nm, tato oblast je na Obr. 8 zvýrazněna šedě. Polymerní nanokompozitní materiály s anorganickými nanočásticemi, jsou zajímavé svými mechanickými vlastnostmi, jednoduchým zpracováním a relativně nízkými náklady. Nově vyvinuté nanokompozity s baktericidními vlastnostmi získávají na pozornosti a to nejen z důvodu jejich dopadu na lidské zdraví a bezpečnost, ale také z důvodu možnosti prodloužení životnosti materiálů používaných v každodenním životě. Aplikace těchto materiálů jsou velmi široké [22].



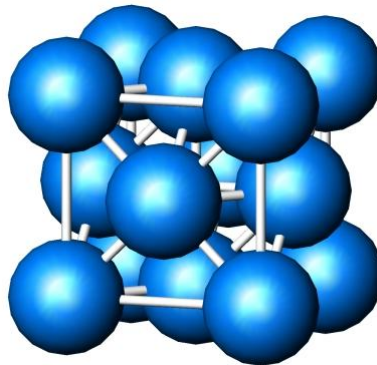
Obr. 8 Nanorozměry [35]

Nanotechnologie nabízí jedinečné přístupy ke kontrole široké škály biologických a lékařských procesů, které se odehrávají na úrovni nanometrů, což má úspěšný dopad na odvětví biologie a lékařství. Řízením struktury v nanorozměrech lze kontrolovat a zlepšovat její povrchovou vrstvu, vedoucí k lepší rozpustnosti ve vodě nebo biokompatibilitě. Nanočástice vykazují atraktivní vlastnosti, jako je vysoká stabilita a schopnost snadno měnit své povrchové vlastnosti [23].

## 3.1 Stříbro

### 3.1.1 Obecné vlastnosti Ag

Čisté stříbro je téměř bílý, lesklý, měkký, velmi tažný a poddajný kov. Je to vynikající vodič tepla a elektřiny. Stříbro se obecně vyznačuje značnou chemickou stabilitou, ale je dobře rozpustné v koncentrované kyselině sírové a kyselině dusičné. Vykazuje nejvyšší elektrickou vodivost ze všech kovů, ale jeho větší cena brání tomu, aby bylo široce používáno pro elektrotechnické účely. Stříbro je ve svých sloučeninách téměř vždy monovalentní, ale je znám i oxid, fluorid, a sulfid dvojmocného stříbra. Základní strukturou stříbra je kubická, plošně centrovaná mřížka viz Obr. 9. Stříbro na vzduchu neoxiduje a ve vodě je velmi stabilní [32].



Obr. 9 Struktura stříbra [42]

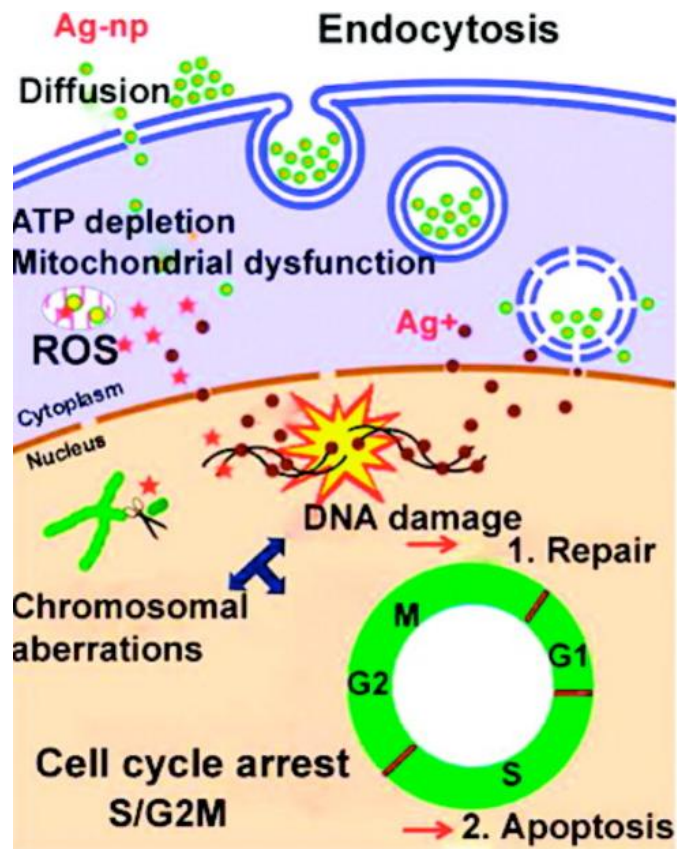
Stříbro je účinné proti širokému rozmezí bakteriálních kmenů a také proti některým patogenům podléhajícím mutacím. Stříbrné částice také účinně brání růstu hub a kvasinek, které mohou vyvolávat různá onemocnění. Stříbro je z velké části netoxické a pro tělo neškodné na úrovni, která je účinná proti bakteriím. Další těžké kovy, jako je například rtuť a olovo, se mohou chemicky vázat a hromadit v těle, kde mohou inhibovat metabolismus. Naopak výzkum ukazuje, že 99 % stříbra je z těla snadno vyloučeno. V případě extrémní expozice stříbrem dochází k podráždění horních cest dýchacích nebo očí, nebo onemocnění zvané *argyria* (stav způsobený nadměrnou expozicí stříbrem, stříbrným prachem, nebo sloučeninami stříbra). Nicméně, oxidy stříbra jsou účinné na antimikrobiální úrovni menší než 1 ppm (částic na jeden milion), takže obavy z toxicity jsou většinou irelevantní [24].

Širokospektré antimikrobiální vlastnosti stříbra umožňují jeho použití v biomedicínských aplikacích, čištění vody a vzduchu, produkci kosmetiky, oblečení a výrobků pro domácnost. Rychlý rozvoj nanotechnologií umožnil rozšíření výroby nanovýrobků a stříbro se stalo nejvíce běžně používaným umělým nanomateriálem ve spotřebním zboží. Oblečení, respirátory, filtry na vodu pro domácnost, antibakteriální spreje, kosmetika, detergenty, dietní doplňky, krájecí desky, boty, mobilní telefony, notebooky, klávesnice a dětské hračky patří mezi maloobchodní produkty, které využívají antimikrobiálních vlastností stříbrných nanomateriálů [21].

### 3.1.2 Antibakteriální aktivita nano-Ag

Přes obrovské množství vědeckých prací, které prokazují antimikrobiální účinky nanomateriálů obsahujících částice stříbra, stále nejsou zcela objasněny mechanismy tohoto působení. Existují však různé teorie vysvětlující tyto účinky. Nanočástice stříbra mají schopnost se ukotvit na bakteriální buněčné stěně a následně proniknout dovnitř, což způsobuje strukturální změny v buněčné membráně, jako je propustnost buněčné membrány, které vedou až k buněčné smrti. Na povrchu buňky se vytvářejí jamky, ve kterých poté kumulují nanočástice. Tvorba volných radikálů nanočásticemi stříbra může být považována za další mechanismus, způsobující antibakteriální aktivitu. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou přírodní vedlejší produkty metabolismu organismů. Nadměrná produkce ROS může vyvolat oxidační stres a další generace volných radikálů mohou zaútočit na membránové lipidy a vést až ke zničení membrány a mitochondriální funkce nebo způsobit DNA poškození [21], [43].

Dalším navrhovaným mechanismem je, že může docházet k uvolňování iontů Ag z nanočástic a tyto ionty mohou interagovat s thiolovými skupinami mnoha důležitých enzymů a tím je inaktivovat. Kontakt bakteriální buňky se stříbrnými ionty způsobuje inhibici několika funkcí v buňce a poškozuje je. Stříbro se chová jako slabá kyselina a v buňce dochází k přirozené tendenci kyseliny reagovat se zásadou. Buňky jsou z většiny tvořeny sírou a fosforem, které se chovají jako slabé zásady. Působení nanočástic na buňky může způsobit tuto reakci a následně vést k buněčné smrti. Síra a fosfor jsou hlavní složkou DNA a nanočástice mohou působit tak, že dochází k problémům s replikací DNA a zničení DNA [43]. Zjednodušené schéma antibakteriálního účinku nano-Ag je možno vidět na Obr. 10.



Obr. 10 Antibakteriální aktivita nano-Ag [44]

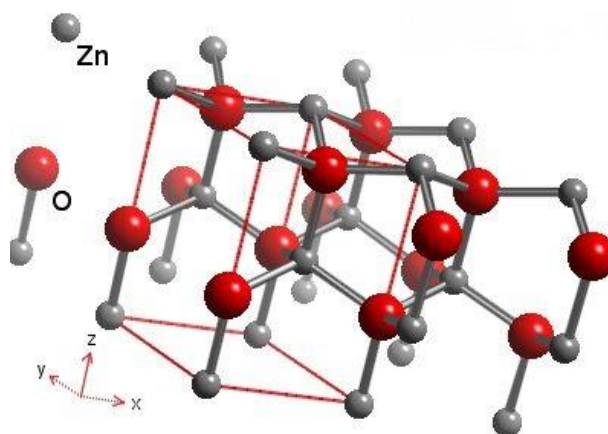
V porovnání s různými typy nanočástic kovů a oxidů kovů se ukazuje, že nanočástice stříbra jsou nejvíce účinné proti bakteriím, virům a jiným eukaryotickým mikroorganismům. Antimikrobiální aktivita nanočástic stříbra je nepřímou závislá na velikosti a tvaru. Kombinované použití stříbrných nanočástic s antibiotiky, jako je penicilin-G, amoxicilin, erythromycin, a vankomycin, vedlo k rozšíření antimikrobiálních účinků a synergickému působení proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím [30].

Fyzikálně-chemické vlastnosti hrají důležitou roli v antimikrobiální aktivitě nanočástic stříbra. Částice menší než 10 nm jsou toxické pro bakterie jako *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Nanočástice stříbra v rozmezí 1 až 10 nm zabraňují některým virům vázat se na hostitelskou buňku. Obecně platí, že malé částice vykazují vyšší antimikrobiální aktivitu než velké částice [29].

## 3.2 Oxid zinečnatý

### 3.2.1 Obecné vlastnosti

Oxid zinečnatý (ZnO) je anorganická sloučenina, která se řadí mezi amfoterní oxidy. Jedná se o bílou práškovitou látku, která se nerozpouští ve vodě, ale rozpouští se v kyselinách za tvorby zinečnatých solí a v hydroxidech za tvorby zinečnanů. V přírodě se vyskytuje jako hrubozrnný nerost zinkit. Chemická struktura ZnO je vidět na Obr. 11. Oxid zinečnatý se používá v lakařském, gumárenském a plastikařském průmyslu, v průmyslu výroby skla a keramiky a při výrobě nátěrových hmot [26].



Obr. 11 Struktura ZnO [27]

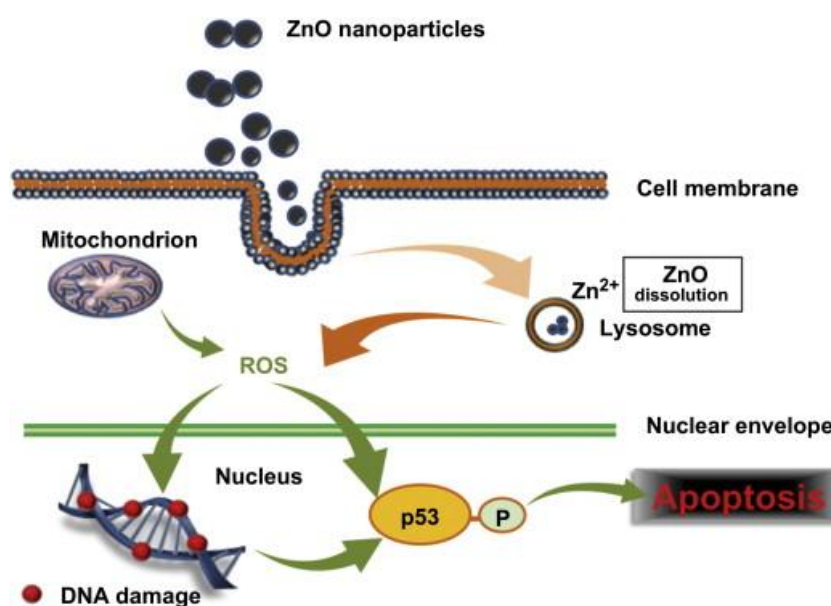
Oxid zinečnatý získal zvláštní pozornost díky svým jedinečným optickým, elektrickým a chemickým vlastnostem. Výzkum se zaměřuje na výrobu antibakteriálních materiálů obsahujících různé přírodní a anorganické látky. Mezi tyto látky se řadí ZnO a nano-ZnO díky svým silným inhibičním a antibakteriálním účinkům. Dostupnost široké škály nanostruktur činí ZnO ideálním materiálem pro biotechnologie [23].

Nanočástice ZnO jsou pro člověka netoxické a biokompatibilní. Byly použity jako nosiče léčiv, kosmetické přísady či výplně zdravotnických materiálů. Bylo zjištěno, že nanočástice ZnO vykazují antibakteriální aktivitu proti důležitým potravinovým patogenům, jako je např. *E. coli*. Studie naznačují, že aplikace těchto částic může být efektivní pro uchování zemědělských produktů a potravin. Nanočástice ZnO mají oproti nanočásticím stříbra výhody jako jsou např. nízké výrobní náklady, bílý vzhled a UV-ochranné vlastnosti [30].

### 3.2.2 Antibakteriální aktivita ZnO

Antibakteriální mechanismus ZnO je stále předmětem výzkumu a není ještě zcela objasněn. Několik studií ukázalo, že hlavní příčinou antibakteriální funkce může být narušení činnosti buněčné membrány. Penetrace a následná dezorganizace bakteriální buněčné membrány při kontaktu s nanočásticemi ZnO vede k inhibici růstu bakterií. Nicméně, role  $Zn^{2+}$  iontu uvolněného z rozpuštění ZnO není zcela jasná. Předpokládá se, že  $Zn^{2+}$  ion navázaný na membránu mikroorganismu může prodloužit lag fázi cyklu mikrobiálního růstu [40].

Další možností antibakteriálního mechanismu je, že mají nanočástice ZnO baktericidní vlastnosti především díky své fotokatalytické aktivitě. ZnO absorbuje světlo (UV nebo viditelné), které navozuje oddělení náboje, vytvoření  $h^+$  v pásmu valence a  $e^-$  v pásmu vodivosti. Na povrchu excitované částice ZnO vznikají, z vody nebo hydroxylových iontů, hydroxylové radikály  $OH \cdot$ . Elektrony také mohou redukovat  $O_2$  na superoxidový anion  $O_2^- \cdot$ . Získané radikály  $OH \cdot$  a  $O_2^- \cdot$  mohou vyvolat peroxidaci lipidů v membránách, poškodit DNA v důsledku rozbití řetězce nebo oxidace nukleotidů nebo způsobit oxidaci katalytických center aminokyselin a bílkovin. Další možností je zničení organického materiálu přímou reakcí s kladně nabitými částicemi ZnO. Bylo zjištěno, že ZnO vykazuje baktericidní vlastnosti i v případě úplné absence světla [22]. Zjednodušené schéma antibakteriálního účinku nanočástic ZnO je možno vidět na Obr. 12.



Obr. 12 Antibakteriální aktivita nanočástic ZnO [41]

Výhodou použití oxidu zinečnatého jako antibakteriální látky je to, že vykazuje silnou aktivitu i při podávání v malém množství. Obecně je výhodou anorganických antibakteriálních materiálů oproti organickým to, že vykazují menší toxicitu, vyšší trvanlivost, větší selektivitu a odolnost proti teplu. Antibakteriální aktivita je značně ovlivněna velikostí částic, která je určována při přípravě a zpracování materiálu [23].

Nanočástice ZnO mají výrazně vyšší antimikrobiální aktivitu než velké částice ZnO, protože malá velikost (menší než 100 nm) a velké povrchové napětí nanočástic umožňuje lepší interakci s bakteriemi. Studie ukázaly, že tyto nanočástice vykazují selektivní toxicitu pro bakterie, ale vykazují minimální účinky na lidské buňky. U nanočástic ZnO bylo prokázáno, že mají širokou škálu antibakteriálních aktivit proti oběma grampozitivním i gramnegativním bakteriím, včetně hlavních alimentárních patogenů, jako je *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* [33].

### 3.3 Nanokompozity Ag-ZnO

Nanomateriály, jako nanočástice Ag a ZnO, prokázaly dobrou antimikrobiální aktivitu. ZnO nanočástice jsou účinnějším antibakteriálním prostředkem proti grampozitivním bakteriím, jako je např. *Staphylococcus aureus* ve srovnání s gramnegativními bakteriemi. Na druhé straně je známo, že nanočástice Ag mají více baktericidní účinek na gramnegativní bakterie jako je např. *Escherichia coli* ve srovnání s grampozitivními bakteriemi. Kombinací těchto druhů nanočástic může dojít k vytvoření synergického efektu, což znamená společné působení více prvků, které je obvykle větší nebo kvalitativně lepší než prostý součet efektů ze samostatného působení jednotlivých prvků na oba druhy bakterií [31].

Kombinace nanočástic kovových oxidů vede k více kompletnímu baktericidnímu účinku proti smíšené bakteriální populaci a studie ukázaly, že nanočástice Ag-ZnO mají synergický účinek proti celé řadě bakterií. K dosažení stejné úrovně antibakteriální aktivity je však potřeba mnohem méně nanočástic Ag-ZnO než čistého nano-Ag nebo ZnO. Baktericidní účinek nanočástic je závislý na koncentraci nanočástic a počáteční bakteriální koncentraci [45].



### 3.4 Způsoby syntézy

Existuje mnoho způsobů, kterými lze syntetizovat nanočástice Ag a ZnO pro různé aplikace a v široké škále oblastí. Mezi fyzikálně-chemické způsoby se řadí např. chemická redukce, tepelný rozklad, elektrochemické, sonochemické, fotochemické a mikrovlnné procesy [39]. Tyto uvedené metody však mají nevýhody nízké produktivity nebo závažných nečistot vznikajících z katalyzátorů nebo prekurzorů. Dalším omezením jsou vysoké výrobní náklady kvůli složitosti zařízení a dlouhému času zpracování. V tomto ohledu je mikrovlnná syntéza, jako relativně nová technika, výhodná pro rozsáhlé zpracování nanočástic [47].

#### 3.4.1 Mikrovlnná syntéza nanočástic

Mikrovlnné záření je elektromagnetické záření v rozmezí frekvencí od 0,3 do 300 GHz, což odpovídá vlnovým délkám od 1 mm do 1 m. Mikrovlnná syntéza je rychlým procesem používaným při výrobě kovových nanočástic. Tento způsob ohřevu je velmi přínosný, protože reakce, které jindy trvají hodiny, dny, či týdny jsou pomocí mikrovln uskutečněny během pár minut. Při ohřevu dochází k interakci mikrovln s látkami, které mikrovlny absorbují, např. látky polární. V normálním stavu jsou polární molekuly v neuspořádaném stavu. Působením elektrického pole dojde k jejich orientaci podle polarizace. Polarizace vysokofrekvenčního elektromagnetického pole se mění více než  $10^9$ krát za sekundu. Polární molekula je nucena se těmito rychlými změnami přizpůsobit. To vyvolá oscilační vibrace, až rotace, kdy dochází ke tření a srážkám molekul. To se projeví jako teplo, kdy dojde k přeměně energie mikrovlnné na tepelnou [48].

Homogenní ohřev zlepšuje reakční rychlost, urychluje rychlost nukleace a růst krystalů nanočástic. Mikrovlnná syntéza vyžaduje nižší spotřebu energie ve srovnání s konvenčními tepelnými metodami [46]. Mikrovlnná syntéza nanočástic stříbra ve srovnání s konvenčním způsobem tepelné výroby přináší rychlejší reakci a poskytuje vyšší koncentraci nanočástic stříbra při stejné teplotě a expoziční době. Bylo také zjištěno, že čím vyšší je koncentrace použitého dusičnanu stříbrného, tím je delší reakční doba a čím vyšší je teplota, tím větší je velikost částic [43].

### 3.5 Metody charakterizace vzorků

Připravené vzorky v této bakalářské práci byly charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), rentgenové difrakční práškové analýzy (XRD) a energiově disperzní rentgenové spektroskopie (EDX).

#### 3.5.1 SEM - Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronový mikroskop je přístroj určený k pozorování povrchů nejrůznějších objektů. Výsledný obraz je tvořen pomocí sekundárního signálu, odražených nebo sekundárních elektronů. Zobrazení snímků pomocí SEM je díky tomu považováno za nepřímou metodu. Velkou předností SEM v porovnání se světelným mikroskopem je jeho velká hloubka ostrosti, v důsledku které lze z dvojrozměrných fotografií ze SEM nalézt trojrozměrný aspekt. Kromě názvu skenovací používá i označení rastrovací nebo český název řádkovací elektronový mikroskop. Slovo rastrovací v názvu je odvozeno z toho, že elektronový svazek se pohybuje po vzorku řádek po řádku v jakémsi neviditelném rastru a výsledný obraz se vytváří postupným skenováním [35].

#### 3.5.2 EDX - Energiově disperzní rentgenová spektroskopie

EDX se používá jako přídavné zařízení k řádkovacímu mikroskopu. Při bombardování vzorku primárními elektrony vzniká rentgenové záření, jehož detekce je zajištěna energiově disperzním spektrometrem. Výstupem analýzy EDX je spektrum četnosti rentgenového signálu v jednotlivých energetických oknech, což jsou charakteristické píky, které odpovídají jednotlivým prvkům a jejichž výška je úměrná koncentraci daného prvku ve vzorku. Smysl kvalitativní bodové mikroanalýzy je buď v mikroobjemu o velikosti několika málo  $\mu\text{m}^3$  prokázat přítomnost určitého prvku, nebo provést spektrální analýzu. EDX slouží k rychlému určení kvalitativního složení vzorku a s využitím standardů i semikvantitativního složení vzorku. Přednosti energiově disperzní rentgenové spektroskopie jsou především jednoduchá obsluha, rychlé přehledné zpracování naměřených dat a možnost přesně srovnávat získané spektrum [55].

### 3.5.3 XRD - Rentgenová difrakční prášková analýza

Rentgenová difrakční analýza je základní metodou k určování struktury pevných látek. Každá krystalická látka má jedinečný difraktogram, podle kterého ji lze identifikovat. Tato metoda je založená na interakci rentgenového záření s elektrony atomů spočívající v pružném bezfotonovém rozptylu. Díky pravidelnému periodickému uspořádání atomů v krystalické fázi dochází po rozptylu a následné interferenci rentgenového záření ke vzniku difrakčních maxim. Studium tohoto difrakčního obrazce pak umožňuje zpětně studovat krystalické složení vzorku a jeho mikrostrukturu. Tato metoda je experimentálně poměrně jednoduchá a především informačně bohatá. Na rozdíl od elektronové mikroskopie poskytuje parametry globální, hodí se tedy lépe ke kvantitativním charakteristikám [54].

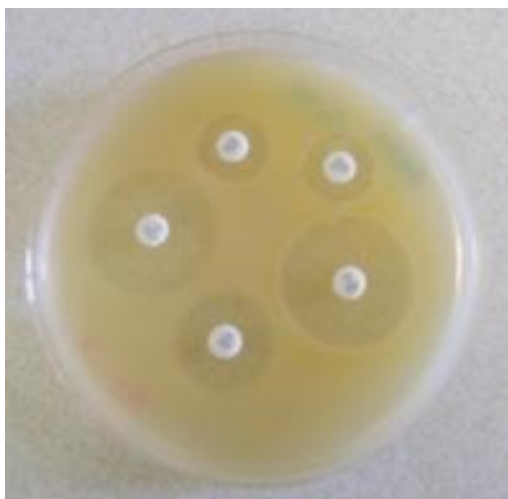
## 3.6 Metody charakterizace antibakteriální aktivity

Existuje několik metod testování antimikrobiální citlivosti, které jsou k dispozici a mají své výhody a nevýhody. Všechny mají stejný cíl, kterým je zajištění spolehlivé předpovědi, zda bude infekce způsobená bakteriemi reagovat na konkrétní antibakteriální látku. Výběr vhodné metody závisí na zamýšleném stupni přesnosti, dostupnosti zdrojů, odborných znalostí a nákladů [49].

### 3.6.1 Disková difuzní metoda

Diskový test (Kirby-Bauerův) je standardní kvalitativní metoda pro stanovení citlivosti kmene k antibiotiku. Bakteriální kmen je citlivý, nebo naopak rezistentní podle velikosti inhibiční zóny kolem disku na tuhé půdě. Zjišťuje se, zda citlivost kmene odpovídá alespoň hraniční koncentraci. Průměry inhibičních zón odpovídajících hraničním koncentracím jednotlivých skupin antibiotik a bakterií jsou standardizovány. Metoda se provádí tak, že antibiotikum difunduje z disku položeného na povrchu naočkované agarové půdy. Přítomné bakterie se množí, poblíž disku se časem v důsledku přílivu antibiotika a podle stupně své citlivosti množít přestávají. V určitém okamžiku a v určité vzdálenosti od disku však antibiotikum již nedokáže množení bakterií zastavit a ani pokračující příliv antibiotika mezitím narostlou bakteriální populaci již neohrozí. Zakládá se okraj inhibiční zóny, který se později ozřejmí dalším růstem bakterií. Tato metoda je nevhodná pro látky, které díky své povaze nedifundují, jako jsou anorganické materiály (např. různé oxidy kovů), nebo difun-

dování aktivní látky brání vnější prostředí (např. typ polymerní matrice, přes kterou nemůže aktivní látka difundovat do okolí [50]). Na Obr. 13 je znázorněno vyšetření antibiotické rezistence diskovou difuzní metodou.



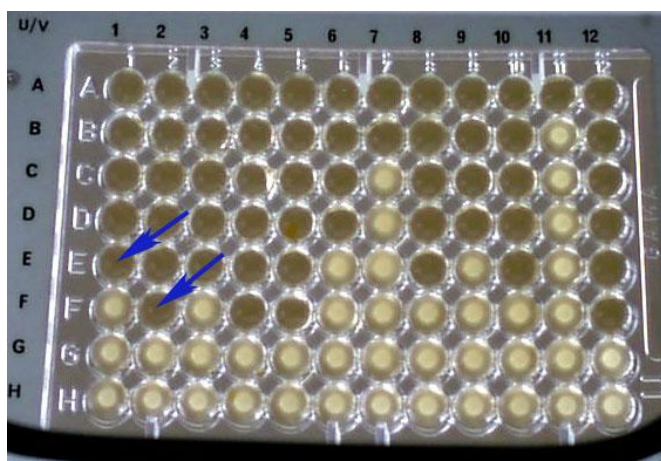
Obr. 13 Disková difuzní metoda [51]

### 3.6.2 Diluční metoda

Ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) nebo minimální baktericidní koncentrace (MBC) se používá diluční metoda. Metoda je kvantitativní a lze ji plně automatizovat a standardizovat [50].

- **Diluční metoda v agaru** - testování vybraných kmenů se provádí na Mueller-Hintonově agaru s definovanou koncentrací iontů. Každá plotna osahuje příslušnou koncentraci testovaného antibiotika. Jednotlivé plotny jsou naočkovány speciálním inokulátorem, na jedné plotně může být otestováno až 36 různých kmenů. Po naočkování se plotny inkubují při doporučené teplotě stanovenou dobu (nejčastěji 18 - 20 hod při 35 °C). Současně s testovanými kmeny je nutné provést test citlivosti i pro daný referenční kmen, jehož hodnota MIC je známá. Výhodou této metody je, že lze otestovat najednou větší počet kmenů k dané antibakteriální látce a metoda je referenční pro ostatní systémy. Nevýhodou je náročnější provedení, které je nepraktické pro rutinní provoz [50].

- **Diluční metoda v bujonu** - metodu lze provést dvěma způsoby. Makrodiluční metoda se provádí ve zkumavkách s testovaným objemem větším než 1 ml. Mikrodiluční metoda je prováděna v mikrotitračních destičkách s objemem 0,1 ml. Pro snadnější přípravu a provedení je široce rozšířená metoda mikrodiluční. Destička se naočkuje jehlovým inokulátorem a inkubuje se za standardních podmínek. Za citlivý se považuje kmen, jehož MIC je 2 - 4krát menší než koncentrace dosahované terapeuticky v krvi. Za rezistentní se považuje kmen, jestliže se množí při koncentraci antibiotika výrazně vyšší, než je průměrná hodnota MIC u kmenů téhož druhu. Výhodou této metody je možnost otestování jednoho kmene současně k více antibiotikům či antibakteriálním látkám. Dle uspořádání až ke 12 různým antibiotikům na jedné destičce. Nevýhodou metody je, že lze špatně hodnotit případnou bakteriální kontaminaci [50]. Mikrotitrační destičky s roztoky antibiotik jsou vidět na Obr. 14 šipky ukazují hodnoty MIC.



Obr. 14 Diluční stanovení MIC [52]

Velkým přínosem této metody je možnost měřit minimální baktericidní koncentraci (MBC). Stanovení MBC se provádí tak, že se zkumavky/mikrotitrační jamky s čirým bujonem vyočkují na pevné půdy bez přídavku antibiotika a inkubují se. Ze zkumavek s bakteriostatickou koncentrací vyrůstají kolonie přežívajícího inokula. Poslední zkumavka/jamka bez nárůstu kolonií na agaru udává MBC [50].

### 3.6.3 E-test

Metodou E-testu (epsilometer test) se zjišťují hodnoty MIC antibiotika či antibakteriální látky. Jedná se o diagnostický proužek, ve kterém se po položení na povrch půdy vytvoří logaritmičsky klesající gradient antibiotika. Kolem proužku se po inkubaci vytvoří kapkovitá inhibiční zóna. Hledá se místo, kde okraj zóny protne okraj proužku. Metoda v sobě kombinuje výhody diskového difuzního testu, kterou je jednoduchá manipulace s možností určení MIC. Nevýhodou je poměrně vysoká cena [49].

### 3.6.4 Měření povrchové antibakteriální aktivity plastů

Měření povrchové antibakteriální aktivity antibakteriálně ošetřených plastů a jiných neporézních ploch výrobků (včetně jejich meziproduktů) se provádí pomocí mezinárodní normy ISO 22196:2007 (E). Zkušební mikroorganismy jsou *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Metoda se používá pro hodnocení antibakteriální aktivity ošetřeného plastu, který inhibuje nebo zabíjí rostoucí testované bakterie. Standardizovaný testovací mikroorganismus se naočkuje na povrch zkoušené látky i na referenční vzorek (bez antibakteriální látky). Po 24 hodinové inkubaci se spočítají přeživší mikroorganismy a vyhodnotí se antimikrobiální aktivita zkoušené látky. Počet kolonií u příslušného zředění by měl být v rozsahu antibakteriální aktivity (R) od 30 do 100 [53].

Výhodou normy je, že je metodou kvantitativní a výsledky mohou být reprodukovatelné. Metoda zahrnuje zkoušky ověřující jak bakteriostatické tak i baktericidní vlastnosti. Mikrobiální koncentrace jsou standardizovány a bakteriím jsou poskytnuty živiny během celé inkubační doby a ty tak mají dostatek příležitostí k růstu, v případě že povrchy zkoumaných vzorků nejsou dostatečně antimikrobiální. Metoda stanovuje trojí experimentování, které napomáhá k přesnosti jednotlivých testů a tím se zvyšuje přesnost výsledků celé experimentální práce. Metoda zahrnuje kritérium pro počítání úrovní antimikrobiální aktivity u zkušebních vzorků, takže stanovení antimikrobiální aktivity udává přesné a porovnatelné výsledky. Mezi nevýhody patří, že metoda nepřesně odráží skutečnou situaci, protože se zředěné kapalně inokulum nanáší na značně velkou plochu povrchu, a pak se udržuje za mokra. Ve většině běžných případů však dochází k rychlému vysušení mikrobiálního kontaminantu na povrchu materiálu. Takže se doba, kdy by docházelo k interakci mezi antibakteriálně ošetřeným povrchem a mikroorganismy ve vodném prostředí zkracuje [56].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍLE PRÁCE

Cílem této praktické části je nejprve popsat MW syntézu plniv a přípravu kompozitních materiálů. Charakterizovat připravené materiály pomocí metod SEM, EDX a XRD. Dále stanovit MIC a MBC pomocí dilučních testů u vybraných materiálů jak v práškové formě, tak na mikro nosičích. Nakonec provedení antibakteriální charakterizace povrchu kompozitů obsahujících nano-Ag, mikro-ZnO či jejich kombinace pomocí normy ISO 22196:2007 (E).



## 5 PŘÍPRAVA KOMPOZITŮ

### 5.1 Použité materiály

Dusičnan stříbrný  $\text{AgNO}_3$  ( $\geq 99,5$  % čistota) a dihydrát octanu zinečnatého  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $>99$  % čistota) (dále jen ZAD) a hexamethylentetramin  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$  ( $>99$  % čistota) (dále jen HMT) byly dodány firmou Penta (Praha, Česká republika). Hexamethylentetramin byl použit jako srážecí činidlo a modifikátor růstu. Vodný roztok amoniaku (25 - 29 % hmot., dále jen  $\text{NH}_3\text{aq}$ ) byl zakoupen od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika). Všechny tyto chemikálie byly analytické čistoty, a proto byly použity bez dalšího čištění. Demineralizovaná voda byla použita ve všech těchto experimentech. Jako polymerní matrice bylo použito měkčeného PVC RB3 zdravotní jakosti, které bylo dodáno firmou Modenplast Medical (Itálie). Polymer je biokompatibilní dle normy ISO 10993 USP, třída VI. Arbocel<sup>®</sup> B 600 (P-celulóza) byl dodán firmou J. RETTENMAIER & SÖHNE GmbH + Co. KG (Německo) a  $\alpha$ -celulóza byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika). Oba typy celulózy byly ve formě jemného bílého prášku s vláknitou strukturou s délkou 100 až 500  $\mu\text{m}$ .

Pro srovnání antibakteriální aktivity plniv bylo použito komerční plnivo, které obsahuje nanočástice ZnO. Charakteristika použitého plniva je následující:

- Výrobce WIEHART, Pernhofen
- Hustota 5,6  $\text{g}/\text{cm}^3$
- Obsah ZnO min. 99 %
- BET měrný povrch 5,00 - 6,50  $\text{m}^2/\text{g}$

### 5.2 Příprava plniva

#### 5.2.1 Příprava Ag-ZnO částic

Příprava Ag-ZnO částic byla prováděna mikrovlnnou syntézou. Mikrovlnná pec (CWR-TECH, 1150W/230V-50Hz) byla upravena v otevřený systém k solvotermální syntéze s externím chladičem. Všechny chemické látky byly rozpuštěny v demineralizované vodě. Nejprve bylo 10,8 g roztoku  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  smícháno s 0,699 g roztoku  $\text{AgNO}_3$ . Celkový objem vody použité k rozpuštění byl 100 ml. Takto získaný roztok byl umístěn do

mikrovlnné trouby a zahříván po dobu 2 minut, poté bylo přidáno přes překapávací nástavec 6,998 g roztoku  $C_6H_{12}N_4$  v 50 ml a mikrovlnný ohřev pokračoval další 3 minuty. Produkt byl ochlazen na pokojovou teplotu, filtrován a promyt destilovanou vodou. Získaný prášek byl vysušen v laboratorní peci do konstantní hmotnosti. Výtěžek materiálu se pohyboval okolo hodnoty 1,2 g. Syntéza byla opakována ještě několikrát, aby bylo získáno dostatečné množství plniva pro zamíchání do polymerní matrice.

### 5.2.2 Příprava strukturovaných Ag-ZnO částic na povrchu celulózy

Syntéza Ag-ZnO částic na povrchu celulózy byla prováděna mikrovlnnou syntézou. K syntéze byla použita mikrovlnná pec s otevřeným systémem MWG1K-10 (Radan, Česká republika, 800 W, 2,45 GHz), vybavená externím chladičem. Mikrovlnná trouba byla provozována při plném výkonu 800 W. Standardní postup syntézy byl následující: 10,826 g  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  a 0,699 g  $AgNO_3$  bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody, potom byl 1 g celulózy rozptýlen v roztoku a směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Poté byla suspenze vystavena mikrovlnné energii po dobu 10 minut. 6,9 g HMT bylo rozpuštěno v 50 ml vody. Mikrovlnný ohřev pokračoval po dobu dalších 10 minut. Experimenty byly provedeny pro oba typy celulózy. Syntéza byla opakována s přidáním vodného roztoku amoniaku ( $NH_3aq$ ) s cílem zvýšit bazicitu reakční směsi. 14,2 ml  $NH_3aq$  bylo přidáno do reakčního systému po dokončení prvních dvou kroků. Mikrovlnný ohřev pokračoval po dobu dalších 10 minut, celková doba mikrovlnné expozice činila 30 minut. Získané disperze byly vždy ponechány k chlazení. Produkt byl oddělen mikrofiltrací a byl důkladně promyt destilovanou vodou. Filtrační koláče byly sušeny pomalu v laboratorní sušárně při teplotě 40 °C až do konstantní hmotnosti. Přehled použitých prekurzorů, redukčních a srážecích činidel, doby expozice a výtěžků vzorků je shrnut v Tab. 1.

Tab. 1 Přehled použitých prekurzorů, redukčních a srážecích činidel, doby expozice a výtěžků

Kód vzorku	Použitá celulóza	Prekurzory	Srážecí činidlo	Doba vystavení MW expozice [min]	Výtěžek [g]
A1	$\alpha$ -celulóza 1	ZAD, AgNO <sub>3</sub>	HMT	20	1,959
P1	P-celulóza 1	ZAD, AgNO <sub>3</sub>	HMT	20	1,959
A2	$\alpha$ -celulóza 2	ZAD, AgNO <sub>3</sub>	HMT, NH <sub>3</sub>	30	4,823
P2	P-celulóza 2	ZAD, AgNO <sub>3</sub>	HMT, NH <sub>3</sub>	30	5,236

### 5.2.3 Příprava strukturovaných Ag-ZnO částic na povrchu dřevní moučky

1 g dřevní moučky byl rozdispergováván v 50 ml vody při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Poté byl přidán roztok dihydrátu octanu zinečnatého a dusičnanu stříbrného o objemu 100 ml. Následně byla suspenze vystavena mikrovlnnému záření po dobu 10 minut. Pomocí překapávacího nástavce byl přidán do probíhajícího procesu HMT. Experimenty byly provedeny pro oba typy celulózy. Dále byla syntéza opakována s přidáním NH<sub>3</sub>aq s cílem zvýšit bazicitu reakční směsi. 14,2 ml NH<sub>3</sub>aq byl přidáno do reakčního systému po dokončení prvních dvou kroků a mikrovlnný ohřev pokračoval po dobu dalších 10 minut, aby byla celková doba mikrovlnné expozice 30 minut. Získané disperze byly vždy ponechány k ochlazení. Produkt byl důkladně přefiltrován a promyt destilovanou vodou. Filtrační koláče byly sušeny pomalu v laboratorní sušárně při teplotě 40 °C až do konstantní hmotnosti. Množství použitých prekurzorů, srážecích a redukčních činidel jsou shrnuty v Tab. 2

Tab. 2 Přehled použitých chemikálií, jejich množství a výtěžků syntéz

Kód vzorku	Hmotnost dřevní moučky [g]	Zn <sup>2+</sup> [g]	Ag <sup>+</sup> [g]	HMT [g]	NH <sub>3</sub> [ml]	Výtěžek [g]
DM-A	1,000	10,800	0,701	6,928	14,2	4,564
DM-B	1,000	10,800	0,701	6,928	-----	1,890
DM-C	1,000	10,800	-----	6,928	-----	1,664
DM-D	1,000	-----	0,701	6,928	-----	1,380
DM-E	1,000	10,800	-----	6,928	14,2	4,049
DM-F	1,000	-----	0,701	6,928	14,2	1,377

### 5.3 Termoplastická příprava

Podmínky termoplastické přípravy kompozitů byly stejné pro všechny plniva: Ag-ZnO částice, Ag-ZnO částice na povrchu celulózy i Ag-ZnO částice na povrchu dřevní moučky.

#### 5.3.1 Míchání a lisování polymerní matrice s plnivem

Připravené plnivo bylo termoplasticky zamícháno s PVC peletami na Brabenderu (Brabender measuring mixer W 50 Brabender® GmbH & Co. KG). Koncentrace plniv byly stanoveny na 1, 3 a 5 % hmot. v případě Ag-ZnO částic. V případě Ag-ZnO částic na povrchu celulózy a dřevní moučky bylo zamícháno 5 % hmot. plniva. Míchání bylo prováděno při 170 °C a 20 otáčkách míchacích elementů za minutu po dobu prvních dvou minut a poté se zvedla rychlost na 50 otáček za minutu po následujících pět minut. Proces homogenizace byl kontrolován měřením kroutivého momentu hnacího motoru.

Získané kompozitní materiály i čisté PVC byly lisovány pod tlakem po dobu 2 minut při 170 °C. Tloušťka fólie byla 1 mm. Vzorky byly nařezány podle požadavků měřicí techniky. Referenční vzorky bez plniva byly připraveny za stejných podmínek.

## 6 MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍCH VLASTNOSTÍ PLNIVA

Měření antibakteriálních vlastností plniv bylo provedeno pomocí diluční metody v agaru. Výsledkem této metody je určení nejmenší koncentrace zkoušené antibakteriální látky (minimální inhibiční koncentrace - MIC), která je schopná inhibovat růst testovaných bakterií. Hodnoty MIC jsou využívány k vyhodnocení schopností bakterií odolávat lékům, ale také k hodnocení aktivity nových antibakteriálních látek. Diluční metoda v agaru zahrnuje začlenění různých koncentrací antibakteriální látky do nutričního agarového média a následnou aplikaci standardizovaného množství zkoušené látky na povrch agaru [57].

V průběhu testování se řešili nejrůznější problémy, spjaté především s fyzikálními vlastnostmi testované materiálu.

### 6.1 Materiály

K měření antibakteriálních vlastností bylo použito pouze jednoho bakteriálního kmene *Staphylococcus aureus* CCM 4516 z důvodu složitosti procesu, problematického chování testovaného vzorku a potřeby relativně velkého množství materiálu. Testovaný vzorek obsahující částice stříbra a ZnO byl připraven dle postupu 5.2.1. Tento materiál byl nerozpustný ve vodě, měl silnou afinitu proti vodnímu prostředí. Navíc v průběhu přípravy sedimentoval.

### 6.2 Postup

K měření antibakteriálních vlastností plniva byl použit modifikovaný postup, který byl popsán v článku „Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances“. K testování bylo použito diluční metody v agaru [57].

- Nejprve byl proveden křížový roztěr testované bakterie (*S. aureus*) na Petriho misce s Mueller-Hinton agarem (dále jen MHB). Inkubace probíhala po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C.
- Do 10 ml odměrné baňky bylo naváženo 128 mg zkušební vzorku Ag-ZnO a doplněno na objem MHB. Takto byl připraven zásobní roztok 128 mg/ml.

- Do 10 ml plastových zkumavek byly ze zásobního roztoku připraveny roztoky o následujících koncentracích:

$$1 \text{ ml roztoku } 128 \text{ mg/ml} + 7 \text{ ml MHB} = 16 \text{ mg/ml}$$

$$1 \text{ ml roztoku } 16 \text{ mg/ml} + 7 \text{ ml MHB} = 2 \text{ mg/ml}$$

$$1 \text{ ml roztoku } 2 \text{ mg/ml} + 7 \text{ ml MHB} = 0,250 \text{ mg/ml}$$

Z odměrné baňky nebylo možno převést celé množství zásobního roztoku, protože materiál sedimentoval, i přes opětovnou snahu jej rozdispergovat pomocí ultrazvuku a třepačky. Zbytek v odměrné baňce byl vysušen a zvážen. Přesné množství nebylo 128 mg/ml, ale 122,95 mg/ml

- Do 50 ml plastové zkumavky se připravila bakteriální suspenze (inokulum) tak, že se pomocí sterilní očkovací kličky převedlo malé množství naočkovaného bakteriálního kmene do 30 ml předem připraveného MHB. Ke stanovení koncentrace bakteriální suspenze se využilo Bürkerovy komůrky ve spojení se světelnou mikroskopií.
- Do skleněných zkumavek byl postupně odpipetován zásobní roztok, MHB i inokulum dle následujícího rozpisu:

$$2 \text{ ml roztoku } 128 \text{ mg/ml} + 2 \text{ ml inokula} = 64 \text{ mg/ml}$$

$$1 \text{ ml roztoku } 128 \text{ mg/ml} + 1 \text{ ml MHB} + 2 \text{ ml inokula} = 32 \text{ mg/ml}$$

$$0,5 \text{ ml roztoku } 128 \text{ mg/ml} + 1,5 \text{ ml MHB} + 2 \text{ ml inokula} = 16 \text{ mg/ml}$$

$$2 \text{ ml roztoku } 16 \text{ mg/ml} + 2 \text{ ml inokula} = 8 \text{ mg/ml}$$

$$1 \text{ ml roztoku } 16 \text{ mg/ml} + 1 \text{ ml MHB} + 2 \text{ ml inokula} = 4 \text{ mg/ml}$$

$$0,5 \text{ ml roztoku } 16 \text{ mg/ml} + 1,5 \text{ ml MHB} + 2 \text{ ml inokula} = 2 \text{ mg/ml}$$

$$2 \text{ ml roztoku } 2 \text{ mg/ml} + 2 \text{ ml inokula} = 1 \text{ mg/ml}$$

$$1 \text{ ml roztoku } 2 \text{ mg/ml} + 1 \text{ ml MHB} + 2 \text{ ml inokula} = 0,5 \text{ mg/ml}$$

$$0,5 \text{ ml roztoku } 2 \text{ mg/ml} + 1,5 \text{ ml MHB} + 2 \text{ ml inokula} = 0,25 \text{ mg/ml}$$

$$2 \text{ ml roztoku } 2 \text{ mg/ml} + 2 \text{ ml inokula} = 0,125 \text{ mg/ml}$$

$$1 \text{ ml roztoku } 2 \text{ mg/ml} + 1 \text{ ml MHB} + 2 \text{ ml inokula} = 0,06 \text{ mg/ml}$$

$$0,5 \text{ ml roztoku } 2 \text{ mg/ml} + 1,5 \text{ ml MHB} + 2 \text{ ml inokula} = 0,03 \text{ mg/ml}$$

- Před každým odběrem zásobního roztoku s částicemi Ag-ZnO byla provedena intenzivní homogenizace na mikrotřepačce.
- Do jedné skleněné zkumavky byly odpipetovány 2 ml zásobního roztoku Ag-ZnO 128 mg/ml a 2 ml MHB. Do další zkumavky byly odpipetovány 2 ml připravené bakteriální suspenze a 2 ml MHB.
- Všechny připravené zkumavky byly inkubovány přes noc při teplotě 35 °C. Během inkubace probíhala neustálá homogenizace suspenze pomocí orbitální třepačky při 300 kmitech za minutu. I přes tuto snahu některé suspenze během noci sedimentovaly.
- Zároveň byly nachystány skleněné zkumavky na desetinné ředění. Ze zkumavky s připraveným inokulem se odpipetoval 1 ml a byl smíchán s 9 ml fyziologického roztoku. Stejný postup se opakoval ještě šestkrát. Byla připravena série roztoků s až sedminásobným zředěním původního roztoku. Z každé zkumavky byl odpipetován 1 ml roztoku a v Petriho misce byl zalit PCA (Plate count agar). Petriho misky se nechaly inkubovat po dobu 24 hodin.
- Po skončení inkubace (24 hodin) byly zkumavky vytaženy z třepačky a byly nachystány Petriho misky na roztěr i zalití do agaru. Z každé zkumavky byl 2x odpipetován 1 ml do Petriho misek, které byly poté zality TSA (Tryptic soy agar). A z každé zkumavky bylo 2x odpipetováno 0,1 ml a následně rozetřeno na povrch připravených Petriho misek s TSA.
- Po zatuhnutí byly tyto Petriho misky vloženy do inkubátoru při 35 °C po dobu 24 hodin. Druhý den byly všechny misky prohlédnuty a byly spočítány kolonie a vyhodnocena MIC.

### 6.3 Metoda vyhodnocení

Vypočet CFU na ml, které vyrostly přes noc v kultuře, se provádí dle následujícího vzorce:

$$N = \frac{C \times 10}{10^{-D}} \quad (1)$$

kde

$N$  je CFU (kolonie tvořící jednotky ( $\text{ml}^{-1}$ ));

$C$  je počet kolonií na misku;

$D$  je číslo 1:10 ředění.

## 7 MĚŘENÍ POVRCHOVÉ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY

Mezinárodní norma ISO 22196:2007 (E) specifikuje metodu hodnocení antibakteriální aktivity antibakteriálně ošetřených plastů a jiných neporézních ploch výrobků (včetně jejich meziproduktů). Její originální název zní „Plastics - Measurement of antibacterial activity on plastics surfaces“. První edice této normy byla vydána 15. 10. 2007 [53].

### 7.1 Materiály

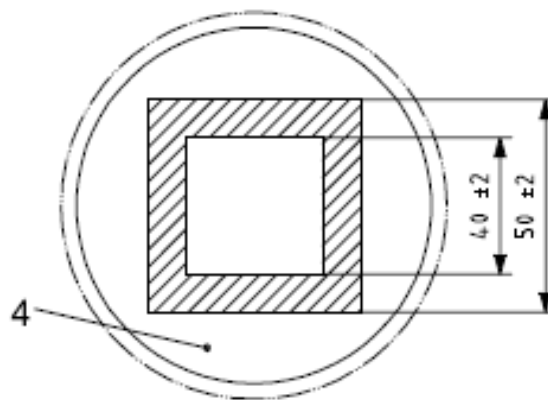
K testování antibakteriální aktivity byly použity dva druhy bakteriálních kmenů a to *Staphylococcus aureus* CCM 4516 a *Escherichia coli* CCM 4517. Tyto dva kmeny jsou vybrány jako zástupci grampozitivních bakterií (*S. aureus*) a gramnegativních bakterií (*E. coli*).

### 7.2 Postup

Při měření povrchové antibakteriální aktivity bylo postupováno v souladu s normou a stručný postup je zde popsán.

- K testování se připravily vzorky polymerních materiálů, tři s antibakteriální úpravou a šest bez antibakteriální úpravy, o rozměrech 50 × 50 mm. K překrytí každého vzorku se vystříhla polypropylenová fólie o rozměrech 40 x 40 mm. Všechny vzorky i krycí fólie byly vydezinfikovány 70 % etanolem a řádně osušeny.
- Pomocí sterilní očkovací kličky se převedlo malé množství naočkovaného bakteriálního kmene do 10 ml předem připraveného 1/500 nutričního bujónu. Takto se připravila bakteriální suspenze (inokulum). Bakterie byly v suspenzi dostatečně dispergovány. Inokulum by mělo mít koncentraci bakterií v rozmezí od  $2,5 \times 10^5$  buněk/ml do  $10 \times 10^5$  buněk/ml, s cílovou koncentrací  $6 \times 10^5$  buněk/ml. Ke stanovení koncentrace bakteriální suspenze se využívá Bürkerovy komůrky ve spojení se světelnou mikroskopií.
- Testované i referenční vzorky byly vloženy doprostřed Petriho misek a pomocí automatické pipety se na ně nanese 0,4 ml připraveného inokula. Vzorky byly poté překryty polypropylenovou krycí fólií tak, aby se inokulum rovnoměrně rozprostřelo po povrchu. Umístění fólie v Petriho misce je vidět na Obr. 15.





Obr. 15 Umístění fólie v Petriho misce [53]

- Uzavřené Petriho misky, obsahující naočkované zkušební vzorky, byly vloženy do inkubátoru při teplotě 35 °C a relativní vlhkosti vzduchu 90 %. V inkubátoru byly uchovávány po dobu 24 hodin.
- Ihned po naočkování se zbylé tři neošetřené zkušební vzorky opakovaně spláchly 10 ml SCDLP. Takto získaný roztok byl převeden do zkumavky. Ze zkumavky se odpipetoval 1 ml a byl smíchán s 9 ml fyziologického roztoku s fosforečnanovým pufrem. Stejný postup se opakovat ještě šestkrát. Byla připravena série roztoků s až sedminásobným zředěním původního roztoku. Tato série zředění byla provedena i s původním inokulem.
- Stejná procedura byla provedena po 24 hodinách i s inkubovanými vzorky (upravenými i referenčními).
- Následně byl proveden odběr 1 ml roztoku od každého zředění a ten byl převeden do Petriho misky, do níž bylo následně přilito přibližně 15 ml PC o teplotě 45 °C. Tento postup se provedl ještě jednou pro získání duplikátní misky. Vzniklý roztok se důkladně promíchal a nechal zatuhnout. Po zatuhnutí byly tyto Petriho misky vloženy do inkubátoru při 35 °C po dobu 40 - 48 hodin.
- Po 24 hodinách byly Petriho misky vytaženy z inkubátoru a bylo spočteno množství životaschopných bakterií. Po 48 hodinách inkubace bylo podruhé spočítáno množství životaschopných bakterií.
- Ze získaných hodnot se provedl výpočet množství životaschopných bakterií a následně i antibakteriální aktivita vzorků.

### 7.3 Metoda vyhodnocení

Pro každý zkušební vzorek se stanoví počet životaschopných bakterií.

$$N = \frac{(100 \times C \times D \times V)}{A} \quad (2)$$

kde

$N$  je počet životaschopných bakterií získaných ze zkušební vzorku (na  $\text{cm}^2$ ),

$C$  je průměrný počet bakterií pro duplikované misky,

$D$  je faktor ředění pro misky použité k výpočtu,

$V$  je objem SCDLP v ml, přidaný do vzorku,

$A$  je plocha krycí fólie v  $\text{mm}^2$ .

Po stanovení počtu životaschopných bakterií ve vzorku se vypočítá hodnota antibakteriální aktivity.

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t \quad (3)$$

kde

$R$  je antibakteriální aktivita,

$U_0$  je průměr dekadického logaritmu počtu životaschopných bakterií ( $\text{buněk}/\text{cm}^2$ ) ze vzorků bez antibakteriální úpravy ihned po inokulaci,

$U_t$  je poměr dekadického logaritmu počtu životaschopných bakterií ( $\text{buněk}/\text{cm}^2$ ) ze vzorků bez antibakteriální úpravy 24 hodin po inokulaci,

$A_t$  je poměr dekadického logaritmu počtu životaschopných bakterií ( $\text{buněk}/\text{cm}^2$ ) ze vzorků s antibakteriální aktivitou 24 hodin po inokulaci [53].

Pokud polymerní antibakteriální systémy docílí  $R$  hodnoty  $R \geq 2$  (to značí, že je antibakteriální látka účinná na 99,99 %) mohou být považovány za antibakteriální proti daným bakteriím [21].

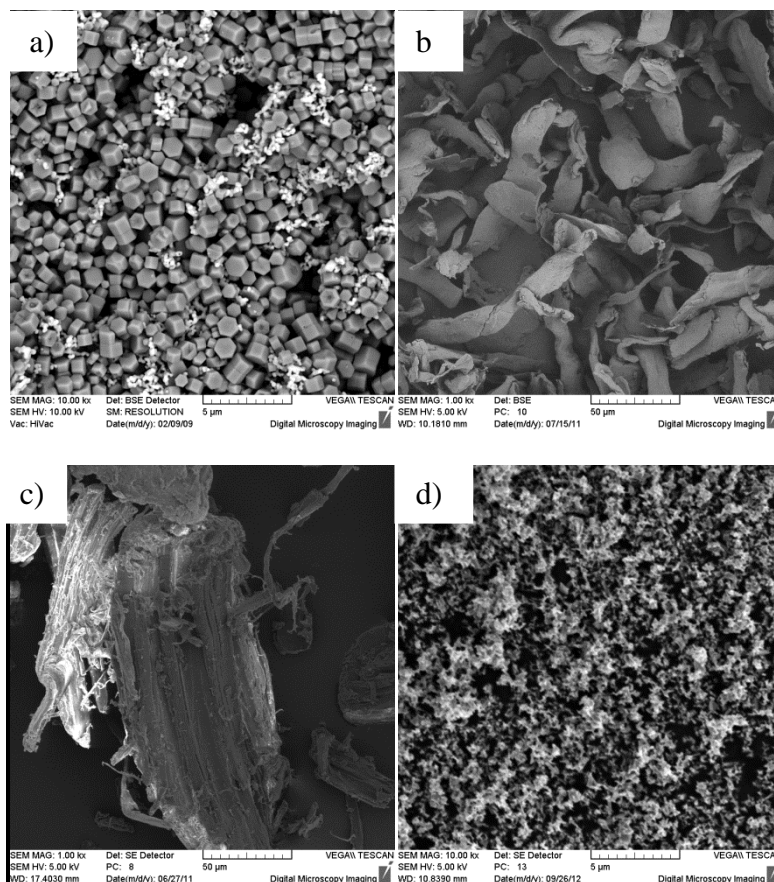
## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Charakterizace plniv

Plniva byla charakterizována pomocí dvou metod - skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a rentgenové difrakční analýzy (XRD).

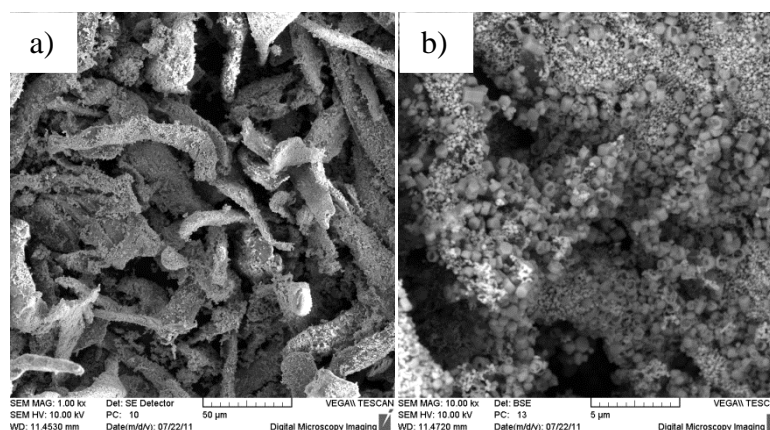
#### 8.1.1 SEM

Na Obr. 16 a) můžeme pozorovat hexagonální struktury mikročástic „matičky“ ZnO o velikosti částic do 1  $\mu\text{m}$  a nanočástice stříbra (světlé body) tvořící agregáty o průměru do 200 nm. Obr. 16 b) zobrazuje mikročástice čisté celulózy o velikosti 10 - 200  $\mu\text{m}$ , Obr. 16 c) zobrazuje polydisperzní částice dřevní moučky o velikosti 50 - 500  $\mu\text{m}$  a Obr. 16 d) zobrazuje nanočástice komerčního plniva ZnO, nanočástice mají velikost do 100 nm.



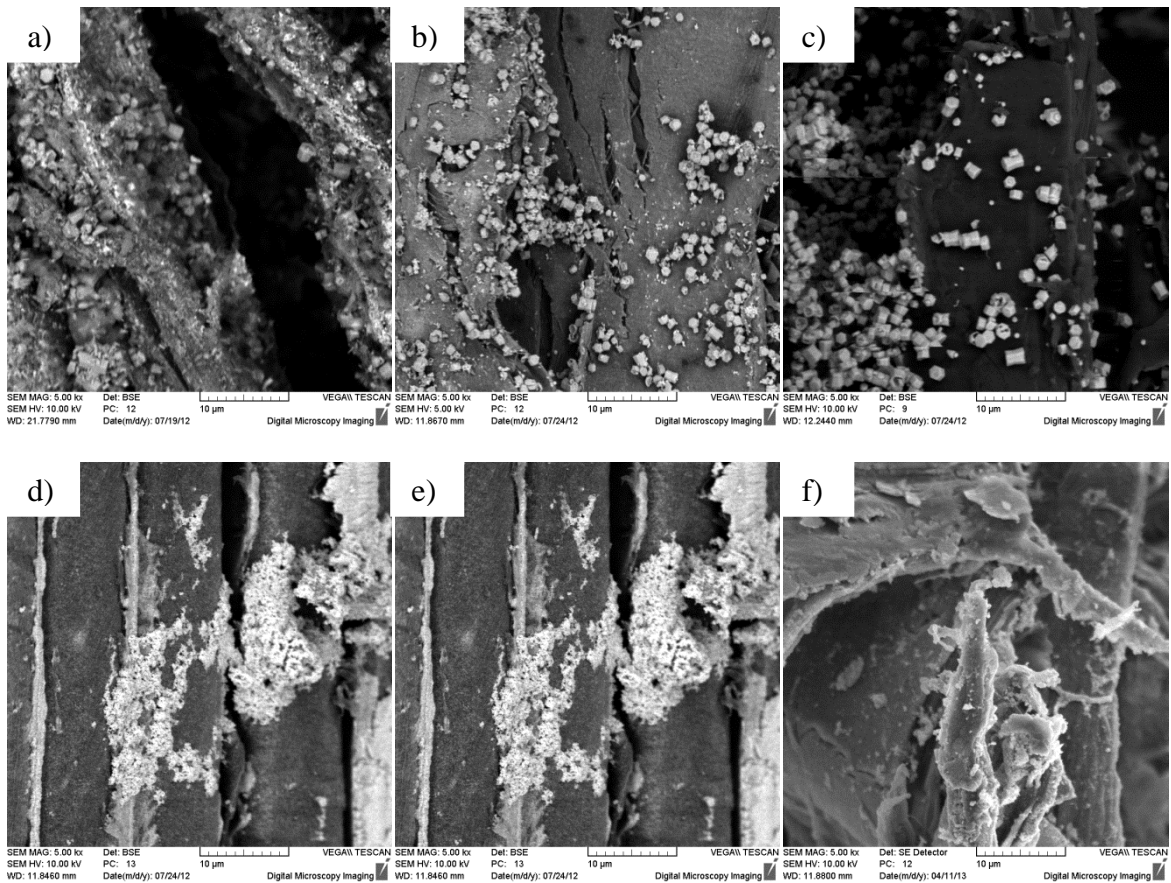
Obr. 16 SEM snímky - a) Ag-ZnO částice, b) celulóza, c) dřevní moučka, d) nanočástice ZnO

Na Obr. 17 a) můžeme pozorovat modifikovaný povrch P-celulózy částicemi Ag-ZnO, při detailním prozkoumání Obr. 17 b) můžeme spatřit strukturu částic. Mikročástice ZnO se jeví jako hexagonální duté útvary („matičky“) o velikosti do 1  $\mu\text{m}$ . Nanočástice stříbra jsou pozorovány jako světlé body o velikosti částic do 100 nm.



Obr. 17 SEM snímky - a) Ag-ZnO na povrchu celulózy, b) detail Ag-ZnO částic na povrchu celulózy

Na Obr. 18 lze vidět detail kombinace částic Ag-ZnO na povrchu dřevní moučky. V prvním případě na Obr. 18 a) je zobrazen povrch celulózy pokrytý mikročásticemi ZnO, který, jak můžeme vidět na detailu, představuje dvě hlavní morfologie ZnO částic. Primární částice ZnO tvoří hexagonální útvary o velikosti do 3  $\mu\text{m}$ . Sekundární fáze ZnO je složena z hexagonálních tyčkových mikročástic ZnO o délce do 1  $\mu\text{m}$ . Mezi těmito částicemi jsou patrné světlé body, které představují nanočástice stříbra o průměru do 200 nm. Obr. 18 b) ukazuje primární strukturu ZnO a nanočástice stříbra na mikronosiči celulózy. Mikrostruktura ZnO je pozorovatelná na Obr. 18 c) a na Obr. 18 d) můžeme vidět nanočástice stříbra. Opět je patrné vidět primární i sekundární fázi ZnO na Obr. 18 e) a nanočástice stříbra na Obr. 18 f).

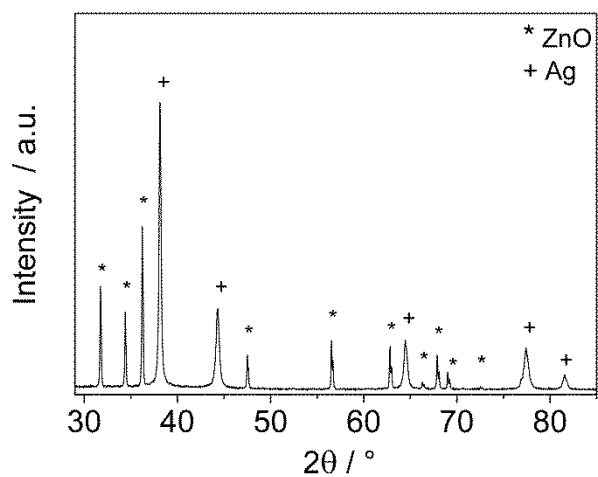


Obr. 18 SEM snímky - Kombinace částic ZnO, Ag a Ag-ZnO na povrchu dřevní moučky

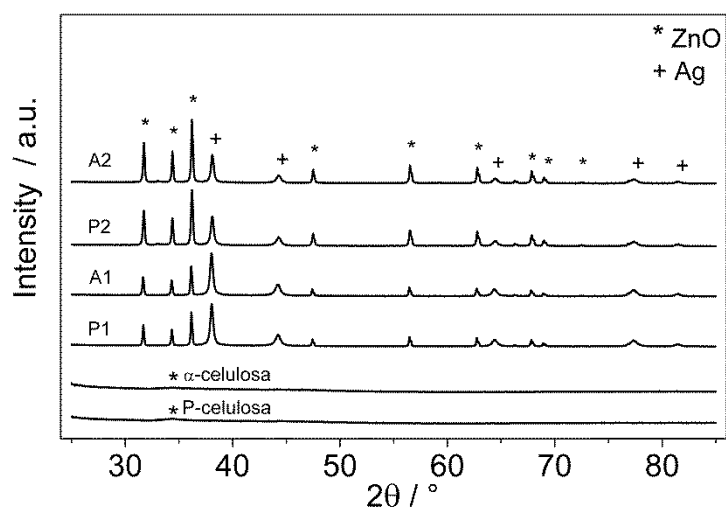
a) DM-A, b) DM-B, c) DM-C, d) DM-D, e) DM-E a f) DM-F

### 8.1.2 XRD

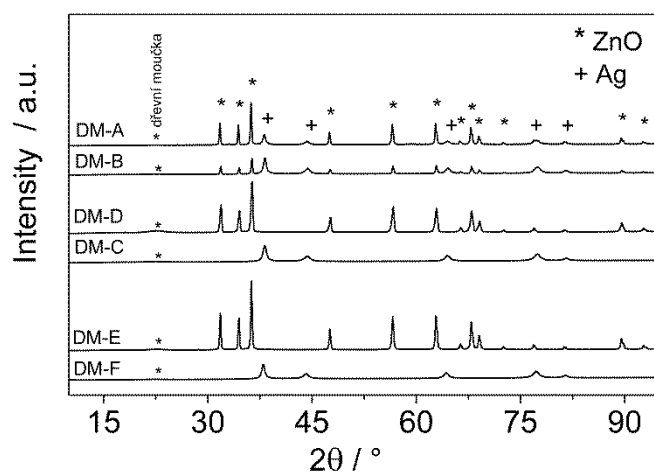
Částice pozorovatelné pomocí elektronové mikroskopie potvrzuje XRD analýza, kde na Obr. 19 je znázorněn difraktogram plniva s obsahem Ag-ZnO, na Obr. 20 difraktogram Ag-ZnO na povrchu celulózy a na Obr. 21 difraktogram Ag-ZnO na povrchu dřevní moučky. Píky označené hvězdičkou (\*) značí krystalografickou strukturu ZnO a označení plus (+) přísluší krystalické struktuře stříbra.



Obr. 19 XRD - Ag-ZnO



Obr. 20 XRD - Ag-ZnO na povrchu celulózy



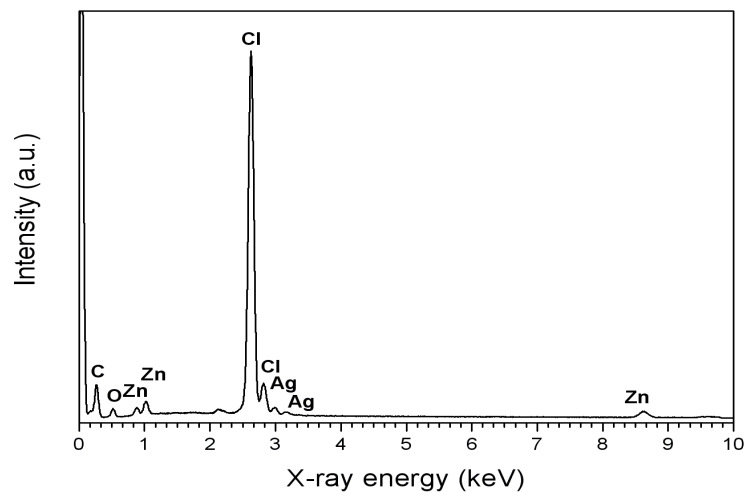
Obr. 21 XRD - Ag-ZnO na povrchu dřevní moučky

## 8.2 Charakterizace kompozitu

Kompozity byly charakterizovány pomocí dvou metod - skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a energiově disperzní spektroskopie (EDX).

### 8.2.1 EDX

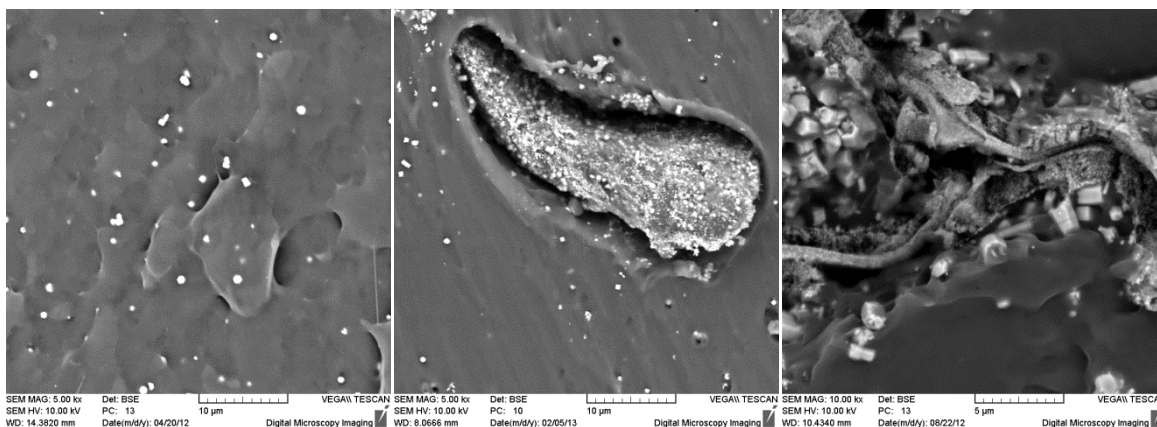
K EDX analýze byl vybrán reprezentativní vzorek PVC s 5 % hmot. plniva Ag-ZnO. Na Obr. 22 můžeme vidět zastoupení prvků ve vzorku, který byl získán z lomu kompozitního materiálu. Ve vzorku je přítomno především velké množství chlóru obsaženého v polyvinylchloridu (PVC). Obsah stříbra a zinku je dán přítomností plniva Ag-ZnO v polymerním materiálu.



Obr. 22 EDX - PVC s 5 hmot. % plniva Ag-ZnO

### 8.2.2 SEM

Na Obr. 23 jsou reprezentativní SEM snímky, na kterých můžeme pozorovat mikrostrukturu ZnO a nanočástice stříbra na lomu kompozitního materiálu. Plnivo Ag-ZnO v koncentraci 5 hmot. % na Obr. 23 a), na Obr. 23 b) na povrchu celulózy a na Obr. 23 c) na povrchu dřevní moučky.

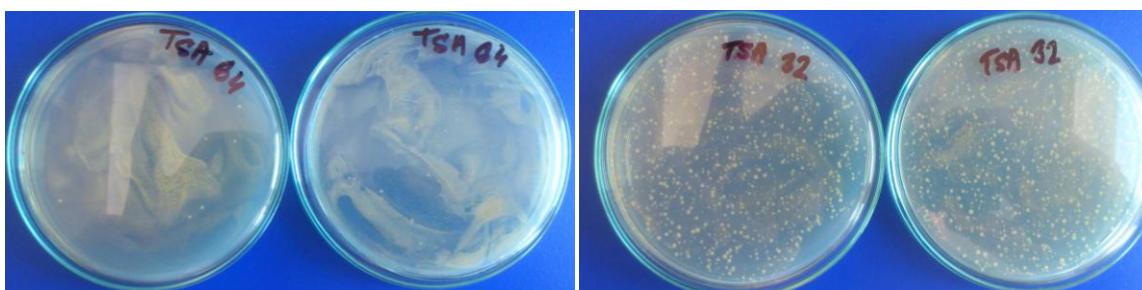


Obr. 23 a) 5 hmot. % Ag-ZnO-PVC, b) 5 hmot. % Ag-ZnO-celulóza-PVC, c) 5 hmot. % Ag-ZnO-dřevní moučka-PVC

### 8.3 Charakterizace antibakteriálních vlastností plniva

Antibakteriální vlastnosti plniva Ag-ZnO byly zkoušeny pomocí diluční metody v agaru. V tomto případě bylo testování provedeno jen u bakteriálního kmene *Staphylococcus aureus* o koncentraci 2,9 CFU/ml. Inkubace probíhala na miskách, které byly připraveny, buď rozetřením na povrch agarů, nebo zalitím do agarů. Bakterie byly pozorovatelné jen na miskách, kde byl roztok rozetřen na povrch TSA. Zalití do agarů způsobilo vznik neprůhledné suspenze, přes kterou nebylo možno spočítat bakteriální kolonie.

Byla stanovena hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC) Ag-ZnO materiálu na 64 mg/ml. Při této hodnotě nenarostly žádné kolonie, resp. jen ojediněle cca 5 kolonií, což ve srovnání s další koncentrací může být zanedbáno, jak je patrné na Obr. 24



Obr. 24 Nárůst a srovnání kolonií *S. aureus* pro Ag-ZnO 64 mg/ml a 32 mg/ml



## 8.4 Charakterizace antibakteriálních vlastností kompozitu

Při měření antibakteriální povrchové aktivity byly testovány kompozitní materiály s obsahem plniv Ag-ZnO, Ag-ZnO na povrchu celulózy a kombinace částicových plniv ZnO, Ag a Ag-ZnO na povrchu dřevní moučky. Jako matrice pro antibakteriální testy bylo zvoleno medicínální PVC ve všech třech případech. Povrch antibakteriálně modifikovaných kompozitů byl vystaven kolonizaci kmeny *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. V následujících tabulkách jsou uvedeny počty životaschopných bakterií ve vzorcích (hodnota N), které byly spočítány dle rovnice (1). Na základě znalosti počtu kolonií bylo následně pomocí rovnice (2) vypočítána hodnota antibakteriální aktivity (R).

V Tab. 3 jsou uvedeny počty životaschopných bakterií a hodnoty antibakteriální aktivity 1. série vzorků PVC s plnivou Ag-ZnO o různých koncentracích 1%, 3%, 5% a 5% hmot. komerčního ZnO. Jak je patrné z tabulky, kompozit PVC-Ag-ZnO je více aktivní proti bakteriím *E. coli*, kdy vykazuje vynikající antibakteriální vlastnosti již při koncentraci 1 % hmot. Oproti tomu vykazuje slabší antibakteriální vlastnosti proti *S. aureus*, kdy se za dostatečnou antibakteriální aktivitu dá považovat kompozitní materiál s obsahem 3 % hmot. plniva Ag-ZnO. Ukazuje se, že v systému jsou více účinné nanočástice stříbra, než mikročástice ZnO. Ve srovnání s komerčním plnivem, dosahuje o trochu nižších hodnot proti bakteriím *S. aureus* při stejném plnění.

Tab. 3 Antibakteriální aktivita - 1. série vzorků

Vzorek	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	N (cfu/cm <sup>2</sup> )	R = U <sub>t</sub> - A <sub>t</sub>	N (cfu/cm <sup>2</sup> )	R = U <sub>t</sub> - A <sub>t</sub>
PVC čisté	2.1.10 <sup>5</sup>	U <sub>t</sub> = 5.3	4.4.10 <sup>6</sup>	U <sub>t</sub> = 6.6
PVC-Ag-ZnO 1 %	3,1.10 <sup>3</sup>	1,8	1	6,6
PVC-Ag-ZnO 3 %	1,9.10 <sup>1</sup>	4,0	< 1	> 6,6
PVC-Ag-ZnO 5 %	5,9.10 <sup>1</sup>	3,5	1	6,6
PVC-komerční ZnO 5 %	1,0	5,3	< 1	> 6,6

V Tab. 4 jsou uvedeny počty životaschopných bakterií a hodnoty antibakteriální aktivity 2. série vzorků PVC s plnivem 5 %  $\alpha$ -celulózou, 5 % P-celulózou a Ag-ZnO na povrchu  $\alpha$ -celulózy i P-celulózy (značení viz Tab. 1). Kompozitní materiály plněné čistou celulózou vykazují velmi nízkou nebo žádnou antibakteriální aktivitu. Ovšem kompozitní materiály obsahující Ag-ZnO částice na povrchu celulózy vykazují excelentní antibakteriální vlastnosti proti oběma typům bakterií, nepatrně vyšší než u kompozitů s čistým plnivem Ag-ZnO. Příčinou může být zvětšení aktivního povrchů, který je v kontaktu s bakteriemi přítomností nosiče celulózy.

Tab. 4 Antibakteriální aktivita - 2. série vzorků

Vzorek	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	N (cfu/cm <sup>2</sup> )	R = U <sub>t</sub> - A <sub>t</sub>	N (cfu/cm <sup>2</sup> )	R = U <sub>t</sub> - A <sub>t</sub>
PVC čisté	1,3.10 <sup>5</sup>	U <sub>t</sub> = 5,1	1,3.10 <sup>7</sup>	U <sub>t</sub> = 7,1
PVC $\alpha$ -celulóza 5 %	1,4.10 <sup>5</sup>	0	1,1.10 <sup>7</sup>	0,074
PVC P-celulóza 5 %	1,3.10 <sup>5</sup>	0	1,3.10 <sup>7</sup>	0,021
PVC-A1 5 %	9,1	4,2	<1	>7,1
PVC-A2 5 %	2,8	4,7	<1	>7,1
PVC-P1	<1	>6,6	<1	>7,1
PVC-P2	4,1	4,5	8,1	6,2

V Tab. 5 jsou uvedeny počty životaschopných bakterií a hodnoty antibakteriální aktivity 3. série vzorků PVC s plnivem Ag, ZnO či Ag-ZnO na povrchu dřevní moučky. Popis vzorků je uveden v Tab. 2. V případě antibakteriálních aktivit kompozitů plněných pouze dřevní moučkou vykazuje R záporných hodnot, což dokazuje, že vlivem přídatku dřevní moučky kolonie bakterií rostly rychleji než v případě čistého PVC. Plnění polymerní matrice dřevní moučkou se jeví jako kontraproduktivní.

U vzorku DM-A-PVC můžeme vidět výrazný rozdíl antibakteriálních aktivity proti *S. aureus* a *E. coli*. U vzorku DM-B-PVC se antibakteriální aktivity kompozitu mezi bakteriemi vyrovnává, což může být způsobeno vyšším obsahem mikročástic ZnO v plnivu.

Kompozity DM-C-PVC a DM-E-PVC obsahují jako plnivo jen mikročástice ZnO na nosiči celulózy v různém zastoupení. To může být důvod, proč je antibakteriální aktivita kompozitu relativně nízká.

U kompozitů DM-D-PVC a DM-F-PVC je v plnivu zastoupeno jenom stříbro na nosiči celulózy s vyšším obsahem u kompozitu DM-F-PVC. Proto DM-F-PVC kompozit vykazuje vyšší antibakteriální vlastnosti oproti kompozitu DM-D-PVC.

Tab. 5 Antibakteriální aktivita - 3. série vzorků

Vzorek	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	N (cfu/cm <sup>2</sup> )	R = U <sub>t</sub> - A <sub>t</sub>	N (cfu/cm <sup>2</sup> )	R = U <sub>t</sub> - A <sub>t</sub>
PVC čisté	1,3.10 <sup>5</sup>	U <sub>t</sub> = 5,1	6,9.10 <sup>6</sup>	U <sub>t</sub> = 6,8
DM-PVC 5 %	6,1.10 <sup>5</sup>	-0,68	9,5.10 <sup>6</sup>	-0,14
DM -A-PVC 5 %	1,2.10 <sup>3</sup>	2,0	<1	>6,8
DM-B-PVC 5 %	1,0	5,1	2,4.10 <sup>2</sup>	4,5
DM-C-PVC 5 %	2,8.10 <sup>2</sup>	2,6	7,3.10 <sup>3</sup>	3,0
DM-D-PVC 5 %	6,3.10 <sup>3</sup>	1,3	7,5.10 <sup>6</sup>	-0,038
DM-E-PVC 5 %	3,1.10 <sup>2</sup>	2,6	3,6.10 <sup>4</sup>	2,3
DM-F-PVC 5 %	<1	>5,1	1,3.10 <sup>3</sup>	3,7

## ZÁVĚR

Pomocí mikrovlnné syntézy byly připraveny série vzorků s obsahem mikročástic ZnO, nanočástic Ag a jejich kombinace, samostatně či na nosičích celulózy a dřevní moučky. Tyto materiály byly termoplasticky zamíchány do polymerní matrice PVC. Pro práškové materiály a kompozity byla provedena charakterizace pomocí metod SEM, XRD, EDX a provedeny antibakteriální testy prášku a kompozitního materiálu.

### Charakterizace hierarchických plniv

- SEM snímky demonstrují měnící se hexagonální strukturu mikročástic ZnO a sférickou strukturu nanočástic stříbra, připravené samostatně nebo na nosičích celulózy a dřevní moučky.
- XRD potvrzuje přítomnost krystalické fáze stříbrných nanočástic a ZnO mikročástic. Opět samostatně připravených, ale i na nosiči celulózy a dřevní moučce.
- Byl proveden diluční test a stanovena MIC na hodnotu 64 mg/ml, navzdory značným problémům při neustálé sedimentaci a přípravě kalibrační křivky. To mohlo negativně ovlivnit stanovení MIC, a proto může být MIC vyšší.

### Charakterizace kompozitu

- Pomocí SEM snímání byla zjištěna distribuce plniva Ag-ZnO v polymerní matrici a to jak samostatně, tak na nosičích celulózy a dřevní moučky.
- EDX analýzou potvrzeno přítomnost zinečnatých a stříbrných prvků ve struktuře matrice.
- Měřením povrchové antibakteriální aktivity antibakteriálně ošetřených kompozitů se zjistilo, že testované vzorky byly ve většině případů více účinné proti bakteriím *Escherichia coli* než *Staphylococcus aureus*. Tyto dva bakteriální kmeny byly vybrány jako zástupci grampozitivních a gramnegativních bakterií. Rozdílná účinnost může být vysvětlena především odlišnou stavbou buněčné stěny těchto mikroorganismů. Polymerní antibakteriální systémy, které dosáhly R hodnoty  $R \geq 2$  mohou být považovány za antibakteriální proti daným bakteriím. Nejvyšší hodnota povrchové antibakteriální aktivity  $R > 6,6$  pro *S. aureus* byla naměřena u Ag-ZnO na povrchu P-celulózy na PVC. Nejvyšší hodnota povrchové antibakteriální aktivity  $R > 7,1$  pro

*E. coli* byla naměřena u třech vzorků, Ag-ZnO na povrchu  $\alpha$ -celulózy 5 % na PVC a Ag-ZnO na povrchu P-celulózy na PVC. Měřením byl ověřen antibakteriální účinek plniv Ag-ZnO a to i na nosičích - celulóze a dřevní moučce. Otevírá se proto cesta k využití těchto materiálů v širokém spektru aplikací např. při výrobě zdravotnických prostředků.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] HRSTKA, Miroslav. *Obecná biologie*. Vyd. 2. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007, ISBN 978-80-214-3464-6.
- [2] RŮŽIČKA, Jan. *Mikrobiologie pro technology životního prostředí*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické, Technologická fakulta ve Zlíně, 1999, ISBN 8021413743.
- [3] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, ISBN 8085605716.
- [4] ADAMUS, Tomáš. *Základy mikrobiologie a imunologie*. 1. vyd. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita, 2007, ISBN 978-80-248-1284-7.
- [5] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005, ISBN 8086850005.
- [6] Schéma bakteriální buňky. *Commons.wikimedia.org* [online]. 30. March 2008. [cit. 2012-12-17].      Obrázek ve formátu SVG. Dostupné z:  
[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ef/Average\\_prokaryote\\_cell\\_s.svg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ef/Average_prokaryote_cell_s.svg)
- [7] GÖPFERTO VÁ, Dana. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena: pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. 3. dopl. vyd. Praha: Triton, 2002, ISBN 80-725-4223-0.
- [8] DEMNEROVÁ, Kateřina. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, ISBN 8070804157.
- [9] VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, ISBN 80-902-8966-5.
- [10] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, ISBN 9788024731704.
- [11] SCHINDLER, Jiří. *Ze života bakterií*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2008, ISBN 978-80-200-1666-9.
- [12] *Klinicky významné bakterie*. 1. vyd. Praha: Triton, 2012, ISBN 978-807-3875-886.
- [13] KAPRÁLEK, František. *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum, 1999, ISBN 8071848115.
- [14] JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006, Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-1270-4.

- [15] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, ISBN 978-80-7080-676-0.
- [16] BUCHTA, Vladimír. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998, ISBN 80-718-4565-5.
- [17] PODSTATOVÁ, Hana. *Mikrobiologie. Epidemiologie. Hygiena: učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium*. 1. vyd. Olomouc: Epava, 2001, ISBN 80-862-9707-1.
- [18] PODSTATOVÁ, Hana. *Základy epidemiologie a hygieny*. Praha: Karolinum, 2009, ISBN 978-802-4616-315.
- [19] Bakterie *Escherichia coli*. *Feww.wordpress.com* [online]. [cit. 2013-03-01]. Dostupné z: [http://feww.files.wordpress.com/2011/06/e-coli-o104\\_h4.png](http://feww.files.wordpress.com/2011/06/e-coli-o104_h4.png)
- [20] Bakterie *Staphylococcus aureus*. *Medchrome.com* [online]. [cit. 2013-03-01]. Dostupné z: <http://medchrome.com/wp-content/uploads/2010/05/staph.-aureus.jpg>
- [21] MARAMBIO-JONES, C., HOEK, E. M. V. *A Review of the Antibacterial Effects of Silver Nanomaterials and Potential Implications for Human Health and the Environment*. (Report). *Journal of Nanoparticle Research: An Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology*, June, 2010, vol. 12, no. 5, ISSN: 1388-0764.
- [22] ZVEKIC, Dusan, Vladimir SRDIC, et al. Antimicrobial properties of ZnO nanoparticles incorporated in polyurethane varnish. *Processing and Application of Ceramics*. 2011, roč. 5, č. 1, s. 41-45. ISSN 1820-6131. DOI: 10.2298/PAC1101041Z. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1820-61311101041Z>
- [23] M. YOUSEF, Jehad a Enas N. DANIAL. *In Vitro* Antibacterial Activity and Minimum Inhibitory Concentration of Zinc Oxide and Nano-particle Zinc oxide Against Pathogenic Strains. *International JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*. 2012-8-31, roč. 2, č. 4, s. 38-42. ISSN 2166-5966. DOI: 10.5923/j.health.20120204.04. Dostupné z: <http://article.sapub.org/10.5923.j.health.20120204.04.html>
- [24] SWAIN, Erik. Nanotech silver fights microbes in medical devices. *Mddionline.com* [online]. May 2005. [cit. 2013-03-07]. Dostupné z: <http://www.mddionline.com/article/nanotech-silver-fights-microbes-medical-devices>
- [25] Mechanismus vzniku bakteriální rezistence. *Zdravky.cz* [online]. [cit. 2013-03-06]. Dostupné z: [http://www.zdravky.cz/uploads/article/2249\\_big.jpg](http://www.zdravky.cz/uploads/article/2249_big.jpg)

- [26] SEDLÁK, J. *Mikrovlnná syntéza ZnO částic*. Zlín, 2008. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Technologická fakulta.
- [27] Struktura ZnO. *Webelements.com* [online]. [cit. 2013-03-14]. Dostupné z: [http://www.webelements.com/\\_media/compounds/Zn/O1Zn1-1314132.jpg](http://www.webelements.com/_media/compounds/Zn/O1Zn1-1314132.jpg)
- [28] Antibakteriální a antimikrobiální materiály. *Azom.com* [online]. [cit. 2013-03-19]. Dostupné z: <http://www.azom.com/news.aspx?newsID=8441>
- [29] JUNG, W. K., H. C. KOO, et al. *Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2008-03-25, roč. 74, č. 7, s. 2171-2178 [cit. 2013-03-13]. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.02001-07. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02001-07>
- [30] HUH, Ae Jung a Young Jik KWON. *Nanoantibiotics: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era*. *Journal of Controlled Release*. 2011, roč. 156, č. 2, s. 128-145. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365911004792>
- [31] GHOSH, Somnath, V. S. GOUDAR, et al. ZnO/Ag nanohybrid: synthesis, characterization, synergistic antibacterial activity and its mechanism. *RSC Advances* [online]. 2012, roč. 2, č. 3, s. 930. ISSN 2046-2069. DOI: 10.1039/c1ra00815c. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1ra00815c>
- [32] Chemical properties of silver. *Lenntech.com* [online]. [cit. 2013-03-20]. Dostupné z: <http://www.lenntech.com/periodic/elements/ag.htm>
- [33] XIE, Y., Y. HE, et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011-03-22, roč. 77, č. 7, s. 2325-2331. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.02149-10. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02149-10>
- [34] Sulfanilamid. *Wikimedia.org* [online]. [cit. 2013-03-27]. Dostupné z: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5b/Sulfanilamide-skeletal.svg>
- [35] SEM. *Paru.cas.cz/lem/book/* [online]. [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/7.0.html>



- [36] Nanorozměry. *Nano.tul.cz* [online]. [cit. 2013-03-27]. Dostupné z: <http://nano.tul.cz/system/files/images/rozmary.jpg>
- [37] Buněčná stěna. *Microbewiki.kenyon.edu* [online]. [cit. 2013-03-27]. Dostupné z: <http://microbewiki.kenyon.edu/images/1/1b/Gram.jpg>
- [38] Růstová křivka bakteriální kultury. *Wikiskripta.eu* [online]. [cit. 2013-03-27]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Bacterial\\_growth\\_cs.svg](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Bacterial_growth_cs.svg)
- [39] SHAMELI, Kamyar, Mansor AHMAD, et. al. Investigation of antibacterial properties silver nanoparticles prepared via green method. *Chemistry Central Journal* [online]. 2012, roč. 6, č. 1, s. 73. ISSN 1752-153x. DOI: 10.1186/1752-153X-6-73. Dostupné z: <http://journal.chemistrycentral.com/content/6/1/73>
- [40] LI, Qilin, Shaily MAHENDRA, et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research* [online]. 2008, roč. 42, č. 18, s. 4591-4602. ISSN 00431354. DOI: 10.1016/j.watres.2008.08.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135408003333>
- [41] Antibakteriální aktivita nanočástic ZnO. *Sciencedirect.com* [online]. [cit. 2013-04-2]. Dostupné z: <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0142961211008076-gr5.jpg>
- [42] Struktura stříbra. *Mineralogie.sci.muni.cz* [online]. [cit. 2013-04-2]. Dostupné z: [http://mineralogie.sci.muni.cz/kap\\_7\\_2\\_prvky/obrazek72\\_10b.jpg](http://mineralogie.sci.muni.cz/kap_7_2_prvky/obrazek72_10b.jpg)
- [43] DOI, Takeo. The anatomy of dependence. [online]. Překlad John Bester.. doi:10.1186/2228-5326-2-32. Dostupné z: <http://www.inl-journal.com/content/2/1/32>
- [44] Antibakteriální aktivita nano-Ag. *Enea.it* [online]. [cit. 2013-04-2]. Dostupné z: <http://www.enea.it/it/produzione-scientifica/img-eai/n.-1-2012/Fig6nano.jpg>
- [45] ALIREZA JAFARI. Synergistic antibacterial effects of nano zinc oxide combined with silver nanocrystales. *African Journal of Microbiology Research* [online]. 2011-12-16, roč. 5, č. 30. ISSN 19960808. DOI: 10.5897/AJMR11.392. Dostupné z: [http://www.academicjournals.org/AJMR/abstracts/abstracts/abstract2011/16Dec/Jafari et al.htm](http://www.academicjournals.org/AJMR/abstracts/abstracts/abstract2011/16Dec/Jafari%20et%20al.htm)
- [46] CHOOK, Soon, Chin CHIA, et al. Antibacterial performance of Ag nanoparticles via rapid MW-assisted synthesis method. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2012, roč. 7, č. 1, s. 541. ISSN 1556-276x. DOI: 10.1186/1556-276X-7-541. Dostupné z: <http://www.nanoscalereslett.com/content/7/1/541>

- [47] QURASHI, Ahsanulhaq, N. TABET, et al. Ultra-fast Microwave Synthesis of ZnO Nanowires and their Dynamic Response Toward Hydrogen Gas. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2009, roč. 4, č. 8, s. 948-954 [cit. 2013-04-03]. ISSN 1931-7573. DOI: 10.1007/s11671-009-9317-7. Dostupné z: <http://www.nanoscalereslett.com/content/4/8/948>
- [48] Microwave synthesis. *Organic-chemistry.org* [online]. [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <http://www.organic-chemistry.org/topics/microwave-synthesis.shtm>
- [49] Test methods in detecting antimicrobial resistance. *Amrls.cvm.msu.edu* [online]. [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/detecting-antimicrobial-resistance/test-methods>
- [50] Mikrobiologická vyšetření *Old.lf3.cuni.cz* [online]. [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/>
- [51] Disková difuzní metoda. *Biomikro.vscht.cz* [online]. [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/cz/research/groups/rokoska/images/image-5.jpg>
- [52] Diluční mikrometoda. *Old.lf3.cuni.cz* [online]. [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/rep/mic.htm>
- [53] ISO 22196:2007 (E). *Plastics : Measurements of antibacterial activity on plastic surfaces*. Tokyo: Society of Industrial technology for Antimicrobial Articles, 2007
- [54] XRD. *Chempoint.cz* [online]. [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/rentgenova-difrakcni-analyza-na-praskovych-vzorcich>
- [55] EDX. *Ateam.zcu.cz* [online]. [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: [http://www.ateam.zcu.cz/sosnova\\_metal06.pdf](http://www.ateam.zcu.cz/sosnova_metal06.pdf)
- [56] Antimicrobial Activity of Plastics. *Antimicrobialtestlaboratories.com* [online]. [cit. 2013-05-04]. Dostupné z: [http://www.antimicrobialtestlaboratories.com/ISO\\_22196\\_test\\_for\\_antimicrobial\\_activity\\_of\\_plastics.htm](http://www.antimicrobialtestlaboratories.com/ISO_22196_test_for_antimicrobial_activity_of_plastics.htm)
- [57] WIEGAND, Irith, Kai HILPERT a Robert E W HANCOCK. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 2008, vol. 3, issue 2, s. 163-175. DOI: 10.1038/nprot.2007.521. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2007.521>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

Ag	Stříbro
ZnO	Oxid zinečnatý
ATP	Adenosintrifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
PVC	Polyvinylchlorid
MW	Mikrovlny
UV	Ultrafialové záření
G+	Grampozitivní bakterie
G-	Gramnegativní bakterie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
EDX	Energiově disperzní rentgenová spektroskopie
XRD	Rentgenová difrakční prášková analýza
HMT	Hexamethylentetramin (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> )
ZAD	Dihydrát octanu zinečnatého (Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)
AgNO <sub>3</sub>	Dusičnan stříbrný
NH <sub>3</sub> aq	Vodný roztok amoniaku
ppm	Parts per million (částic na jeden milion)
ISO	International Organization for Standardization
CFU	Colony-forming unit (Kolonie tvořící jednotky)
EPEC	Enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>

EIEC	Enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
STEC	Shiga-like toxigenní <i>Escherichia coli</i>
EAggEC	Enteroagregativní <i>Escherichia coli</i>
UPEC	Uropatogenní <i>Escherichia coli</i>
MHB	Mueller-Hinton agar
PCA	Plate count agar
TSA	Tryptic soy agar

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Stavba bakteriální buňky [6].....	14
Obr. 2 Rozdíly ve stavbě buněčné stěny bakterií [35].....	16
Obr. 3 Růstová křivka buněčné kultury [38] .....	17
Obr. 4 Bakterie <i>Escherichia coli</i> [19].....	19
Obr. 5 Bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> [20].....	20
Obr. 6 Sulfanilamid [34].....	27
Obr. 7 Mechanismus vzniku bakteriální rezistence [25] .....	29
Obr. 8 Nanorozměry [35].....	30
Obr. 9 Struktura stříbra [42] .....	31
Obr. 10 Antibakteriální aktivita nano-Ag [44] .....	33
Obr. 11 Struktura ZnO [27] .....	34
Obr. 12 Antibakteriální aktivita nanočástic ZnO [41] .....	35
Obr. 13 Disková difuzní metoda [51] .....	40
Obr. 14 Diluční stanovení MIC [52].....	41
Obr. 15 Umístění fólie v Petriho misce [53].....	53
Obr. 16 SEM snímky - a) Ag-ZnO částice, b) celulóza, c) dřevní moučka, d) nanočástice ZnO .....	55
Obr. 17 SEM snímky - a) Ag-ZnO na povrchu celulózy, b) detail Ag-ZnO částic na povrchu celulózy .....	56
Obr. 18 SEM snímky - Kombinace částic ZnO, Ag a Ag-ZnO na povrchu dřevní moučky .....	57
Obr. 19 XRD - Ag-ZnO .....	58
Obr. 20 XRD - Ag-ZnO na povrchu celulózy .....	58
Obr. 21 XRD - Ag-ZnO na povrchu dřevní moučky .....	58
Obr. 22 EDX - PVC s 5 hmot. % plniva Ag-ZnO .....	59
Obr. 23 a) 5 hmot. % Ag-ZnO-PVC, b) 5 hmot. % Ag-ZnO-celulóza-PVC, c) 5 hmot. % Ag-ZnO-dřevní moučka-PVC.....	60
Obr. 24 Nárůst a srovnání kolonií <i>S. aureus</i> pro Ag-ZnO 64 mg/ml a 32 mg/ml .....	60

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 Přehled použitých prekurzorů, redukčních a srážecích činidel, doby expozice a výtěžků.....	47
Tab. 2 Přehled použitých chemikálií, jejich množství a výtěžků syntéz .....	48
Tab. 3 Antibakteriální aktivita - 1. série vzorků .....	61
Tab. 4 Antibakteriální aktivita - 2. série vzorků .....	62
Tab. 5 Antibakteriální aktivita - 3. série vzorků .....	63