

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Antimikrobní účinek látek určených k redukci kontaminace V

diplomová práce

Autor práce: Pavla Lepíková

Vedoucí práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Hradec Králové 2011

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré informační zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsem řádně citovala a uvedla v seznamu literatury. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Chtěla bych vyjádřit velké poděkování panu PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce. Také bych ráda poděkovala paní Idě Dufkové a Michaele Grätzové za pomoc při praktické části. Poděkování patří také doc. RNDr. Petru Klemmerovi, Csc. za poskytnutí speciálního počítačového programu, který nám umožnil vyhodnotit naměřené výsledky. Děkuji nejen firmě Synpo a.s. Pardubice za dodání vzorků malířských nátěrových hmot, ale také všem, kteří mi pomohli svými cennými radami.

Obsah

Zadání – cíl práce.....	6
Úvod.....	7
1. Teoretická část	8
1.1. Nátěry s antimikrobiální aktivitou	8
1.2. Záření a antimikrobiální účinky ZnO.....	9
1.3. ZnO a jeho způsoby deaktivace mikroorganismů.....	11
1.4. Koncentrace částic ZnO a antimikrobiální účinky.....	13
1.5. Velikost částic ZnO a antimikrobiální účinky	14
1.6. ZnO a jeho toxicita k mikroorganismům	16
2. Experimentální část	18
2.1. Použité mikroorganizmy.....	18
2.2. Použitá živná média	18
2.2.1. Pro kultivaci <i>E. coli</i>	18
2.2.2. Pro kultivaci <i>S. aureus</i>	18
2.2.3. Pro kultivaci <i>C. albicans</i>	19
2.3. Použité přístroje a pomůcky	19
2.4. Použité nátěrové hmoty	20
2.5. Pracovní postup.....	20
2.5.1. Příprava živných médií.....	20
2.5.2. Příprava bakteriální suspenze	21
2.6. Metody testování.....	21
2.6.1. Metoda 1	21
2.6.2. Metoda 2.....	22
2.6.3. Metoda 3.....	22
2.7. Vyjádření výsledků	23
3. Výsledky	24
3.1. Metoda 1 – Nátěry neozařované UV světlem	24
3.1.1. Výsledky testování - <i>Escherichia coli</i>	24
3.1.2. Výsledky testování - <i>Staphylococcus aureus</i>	28
3.1.3. Výsledky testování - <i>Candida albicans</i>	32
3.2. Metoda 2 – Nátěry ozařované UV světlem 30 minut před nanesením bakteriální suspenze....	36

3.2.1. Výsledky testování - <i>Escherichia coli</i>	36
3.2.2. Výsledky testování - <i>Staphylococcus aureus</i>	40
3.2.3. Výsledky testování - <i>Candida albicans</i>	44
3.3. Metoda 3 – Nátěry ozařované UV světlem současně s nanesenou bakteriální suspenzí	48
3.3.1. Výsledky testování - <i>Escherichia coli</i>	48
3.3.2. Výsledky testování - <i>Staphylococcus aureus</i>	52
3.3.3. Výsledky testování - <i>Candida albicans</i>	56
4. Diskuse	60
4.1. Účinnost nátěrů na bakterii <i>Escherichia coli</i>	64
4.2. Účinnost nátěrů na bakterii <i>Staphylococcus aureus</i>	65
4.3. Účinnost nátěrů na kvasinku <i>Candida albicans</i>	66
4.4. Celková účinnost nátěrů na testované mikroorganismy	67
5. Závěr	68
6. Souhrn	69
7. Použitá literatura	70

Zadání – cíl práce

Cílem této práce je zhodnocení antimikrobiálních účinků několika vzorků malířských nátěrových hmot, které nám byly dodány firmou Synpo a. s. Pardubice. Zabýváme se především vlivem UV záření na antimikrobiální účinky těchto nátěrů.

Úvod

Častý výskyt infekčních onemocnění a rychlý rozvoj rezistence na antibiotickou léčbu bakteriálních infekcí představuje vážnou hrozbu pro lidstvo. Je tedy snahou se různými způsoby chránit už před samotnou nákazou. Přestože je téměř nemožné vytvořit kompletně sterilní prostředí, existuje velká motivace k vyvíjení stále nových prostředků, které by toho třeba jen částečně mohly dosáhnout. Jednou z takových možností jsou i antimikrobiální nátěry. Ty by měly po dobu několika let své účinnosti snižovat riziko šíření infekcí nejen ve zdravotnických zařízeních. V tomto případě je výhodnější použít jako dezinfekční prostředek anorganické sloučeniny. To je také důvodem, proč je v posledních letech intenzivně studována antimikrobiální účinnost oxidu zinečnatého. Není tedy náhoda, že malířské nátěry, které jsou v této práci předmětem zkoumání, obsahují tento oxid v různých koncentracích. Jelikož by měl oxid zinečnatý vykazovat antimikrobiální aktivitu po ozáření UV světlem, byl předmětem našeho zkoumání především vliv tohoto záření na antimikrobiální účinky nátěrů. V neposlední řadě jsme se také zabývali vztahem koncentrace oxidu zinečnatého k antimikrobiální aktivitě. Pokoušeli jsme se tedy zkoumat, za jakých podmínek mohou tyto nátěry efektivně eliminovat růst patogenních mikroorganismů, a bránit tak šíření různých infekcí.

1. Teoretická část

Mikrobiologické kontaminanty jako jsou plísně, patogenní bakterie a viry, které jsou široce rozšířeny v interiérech prostředí, mohou způsobovat nejen respirační alergické reakce a astma, ale také různá infekční onemocnění (Xudong a Ying, 2008).

Nejen toto je důvodem, proč se lidstvo už mnoho let zabývá výrobou antimikrobiálních materiálů, které mají schopnost působit proti různým druhům mikroorganismů. Zároveň je v popředí snaha o vytvoření takových materiálů, které by byly šetrné k životnímu prostředí, bezbarvé, bez zápachu a odolné vůči působení ultrafialového a viditelného záření (Hochmannova a Vytrasova, 2010a).

Takové antimikrobiální materiály lze potom s výhodou použít k výrobě nátěrů, které mohou najít uplatnění v nemocnicích a dalších zdravotnických zařízeních, v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, případně i v dalších objektech se zvýšenými požadavky na hygienu prostředí (Hochmannová a Vytřasová, 2010b).

1.1. Nátěry s antimikrobiální aktivitou

Antimikrobiální nátěry se od běžně používaných nátěrů liší přítomností aditiva s antimikrobiálním účinkem. Jedná se např. o organické biocidy, koloidní částice nebo nanočástice stříbra, organické polymery s reaktivními antibakteriálními skupinami a také fotokatalytické oxidy, zejména oxid titaničitý a oxid zinečnatý (Hochmannová a Vytřasová, 2010b).

Organické sloučeniny, tradičně používané k dezinfekci, představují několik nevýhod, z nichž jednou je toxicita pro lidský organismus. Nejen z tohoto důvodu začíná stoupat zájem o anorganické dezinfekční prostředky, jako jsou oxidy kovů. Tyto anorganické sloučeniny mají totiž silné antibakteriální účinky už v nízkých koncentracích. Jsou také stabilnější v extrémních podmínkách a lze je považovat za netoxické. V posledních letech jsou intenzivně zkoumány fotokatalytické a antibakteriální vlastnosti nejen oxidu titaničitého, ale také oxidu zinečnatého. Mezi nanočásticemi oxidů kovu se vyznačuje oxid zinečnatý (ZnO) poměrně silnou inhibicí

růstu širokého spektra bakterií (Gordon et al., 2011). Děje se tak převážně na základě fotokatalytického procesu, při kterém dochází ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS). Tyto vysoce reaktivní sloučeniny pak narušují integritu buněčné membrány mikroorganismu, což vede k jeho nevratnému poškození (Zhang et al, 2010).

Oxid zinečnatý obsahovaly také malířské nátěrové hmoty, připravené na bázi akrylátové disperze, u nichž jsme v této práci zkoumali antimikrobiální účinky.

V současné době se mnoho vědeckých studií zabývá faktory, které ovlivňují antimikrobiální účinky částic ZnO. Mezi nejčastěji zkoumané vlivy patří záření, velikost a koncentrace částic, způsob výroby apod.

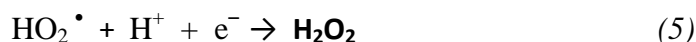
1.2. Záření a antimikrobiální účinky ZnO

Oxid zinečnatý je stejně jako oxid titaničitý fotoaktivním polovodičem, který může být aktivován pohlcením UV záření (Hochmannová a Vytřasová, 2010b).

Fotokatalytický jev

Tento jev využívá UV světlem ozářené fotoaktivní katalyzátory k vytvoření vysoce reaktivních radikálů. Ty pak mohou mineralizovat organické sloučeniny na netoxické formy, jako je oxid uhličitý a voda (Crittenden et al., 1997).

Po aktivaci oxidu zinečnatého UV světlem dochází k uvolnění elektronů z valenčního pásu do vodivostního pásu za vzniku kladně nabitého místa – díry a záporně nabitého elektronu (1). Bylo ukázáno, že vytvoření dvojice elektron-díra je důležité pro oxidační procesy. Následně dochází dírou k rozštěpení molekuly vody na OH^- a H^+ (2). Poté jsou molekuly přítomného vzdušného kyslíku přeměněny na superoxidový radikálový anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (3), který okamžitě reaguje s H^+ , aby vytvořil hydrogenperoxidový radikál (HO_2^{\bullet}) (4). Následné střetnutí s elektronem vede k tvorbě hydrogenperoxidového aniontu (HO_2^-). Jeho reakcí s hydrogenovým iontem pak dochází ke vzniku H_2O_2 (5). Tímto mechanismem lze vysvětlit baktericidní schopnost ZnO.



Při výše uvedeném ději dochází k vyšší baktericidní aktivitě za přítomnosti vzduchu než za použití dusíku. Je to proto, že molekuly kyslíku hrají důležitou roli při fotokatalytickém procesu (Liu a Yang, 2003).

Při srovnání fotokatalytické aktivity polovodičů ZnO a TiO₂ se ukázalo, že ZnO je za přítomnosti slunečního světla jako zdroje energie aktivnějším fotokatalyzátorem. Hlavním důvodem této větší aktivity je to, že ZnO absorbuje velkou část světelného spektra a větší světelné kvantum než TiO₂. Z toho plyne, že za použití ZnO jako katalyzátoru může být k jeho aktivaci využito i viditelné světlo (Sakthivel et al., 2003). Jiná studie naznačuje, že při ozáření viditelným světlem dochází v závislosti na délce ozáření k mnohem menší fotokatalytické aktivitě nátěrů obsahujících nanočástice ZnO, než je tomu po ozáření UV světlem. Naopak fotokatalytický účinek nátěrů s obsahem TiO₂, ozářovaných viditelným světlem, je zanedbatelný (Hochmannova a Vytrasova, 2010a).

Zda je možné aktivovat ZnO v běžné laboratoři osvětlené zářivkami vyzařujícími méně než 4% UV světla se zabývali autoři (Jones et al., 2008). Provedeným pokusem bylo zjištěno, že ZnO může být aktivován už tímto malým množstvím UV záření nebo běžným viditelným světlem. Za účelem ověření této možnosti byl proveden stejný pokus také za tmy. Výsledky jasně ukazují, že antibakteriální aktivita nanočástic ZnO je ve tmě nižší než při běžných laboratorních podmínkách. Dále autoři uvádějí, že okolní laboratorní podmínky jsou dostatečné pro optimální biocidní aktivitu nanočástic ZnO. To je také v souladu s novější prací autorek, které dospěly k závěru, že UV světlo, vyzařované při běžném laboratorním

osvětlení, je schopno zajistit fotokatalytické a antimikrobiální účinky interiérových nátěrů obsahujících nanočástice ZnO (Hochmannova a Vytrasova, 2010a).

V případě UV světlem aktivovaných nanočástic TiO₂ byla zaznamenána zvýšená inhibice bakteriálního růstu o více než 60%. V případě neaktivované formy to bylo pouze 20%. Nevýhodou použití TiO₂ tedy je, že k aktivaci tohoto fotokatalyzátoru je potřebné ozáření UV světlem (Jones et al., 2008).

Studie zabývající se fotokatalytickými a antimikrobiálními účinky interiérových nátěrů ukazuje, že nátěry obsahující nanočástice ZnO vykazují větší fotokatalytický účinek v závislosti na délce ozáření UV světlem než je tomu u nátěrů s obsahem TiO₂ (Hochmannova a Vytrasova, 2010a). Na druhé straně jiná studie stejných autorek ukázala, že silikátové nátěry s obsahem TiO₂ vykazovaly poněkud vyšší fotokatalytický účinek než nátěry se ZnO. Antimikrobiální účinek se však u nátěrů s TiO₂ neprojevil vůbec nebo jen částečně. Je tedy zřejmé, že vysoký fotokatalytický účinek nátěrů nemusí vždy znamenat i významný antimikrobiální efekt (Hochmannová a Vytřasová, 2010b). Fotokatalytické účinky stejně jako antimikrobiální účinky nátěrů jsou ovlivňovány druhem akrylátové disperze, typem a objemovou koncentrací fotokatalytických nanočástic oxidů a také morfologií povrchů (Hochmannova a Vytrasova, 2010a).

1.3. ZnO a jeho způsoby deaktivace mikroorganismů

Baktericidní vlastnosti nanočástic ZnO jsou zprostředkovány elektrostatickými interakcemi mezi nanočásticemi a buněčným povrchem. Toxické účinky nanočástic ZnO vůči patogenním druhům bakterií jsou zesíleny prodlouženým kontaktem mezi bakteriální buněčnou membránou a nanočásticemi. Později se však membrána roztrhne cytotoxickým působením ZnO nanočástic a dojde k úniku cytoplasmatického obsahu (Feris et al., 2010).

Reaktivní formy kyslíku, uvolňující se z povrchu ZnO, způsobují nevratné poškození mikroorganismů. Tyto sloučeniny mohou poškodit strukturu bakterie a narušit tak její biochemické procesy. V přítomnosti hydroxylového radikálu a molekulárního kyslíku dochází k oxidaci organických sloučenin až na CO₂ a H₂O.

Rychlost reakce závisí na intenzitě UV záření. Testy také ukázaly, že UV světlo vyzařované běžným laboratorním osvětlením je za určitých podmínek dostatečné (Lee a Brand, 2002).

Vzhledem k tomu, že jsou hydroxylové a superoxidové radikály negativně nabité částice, nemohou proniknout buněčnou membránou a musí tak zůstat v přímém kontaktu s vnějším povrchem bakterie. Avšak reakcí vzniklý H_2O_2 může bez problémů proniknout do buňky (Padmavathy a Vijayaraghavan, 2008).

Další možné vysvětlení antibakteriálního účinku ZnO je založeno na abrazivní povrchové struktuře ZnO. Abrazivnost nanočástic ZnO je v porovnání s mikročásticemi ZnO způsobena nerovnoměrnou povrchovou strukturou kvůli ostrým hranám a rohům. Tato povrchová drsnost potom přispívá k mechanickému poškození buněčné membrány *E. coli* (Padmavathy a Vijayaraghavan, 2008).

Jiní autoři se zabývali antifungálními vlastnostmi nanočástic ZnO na *Botrytis cinerea* a *Penicillium expansum*. Bylo zjištěno, že nejspíše existují odlišné mechanismy v působení ZnO proti těmto dvěma rozdílným druhům hub. V prvním případě se jedná o zásah do buněčné funkce a o deformaci houbových hyf. V druhém případě pak o zabránění ve vývoji konidioforů a konidií (He et al., 2011).

Přebytečné ionty kovů jsou toxické pro bakteriální buňky. Proto mají některé bakterie vyvinuté mechanismy pro regulaci influxních a efluxních procesů, které slouží k udržení stálé intracelulární koncentrace nejen zinečnatých iontů (Gaballa a Helmann, 1998).

Předpokládá se, že buněčná smrt je způsobena rozkladem buněčné stěny a následně rozkladem buněčné membrány. Poškození buněčné membrány vede přímo k úniku minerálních látek, proteinů a genetického materiálu, což způsobuje buněčnou smrt (Padmavathy a Vijayaraghavan, 2008).

Autoři také prokázali, že jednotlivé složky buněčné stěny *E. coli* měly různou odolnost vůči peroxidaci během fotokatalytického procesu s TiO_2 . Zjistili také, že lipopolysacharidová vrstva (její lipidová část působí jako endotoxin u gramnegativních bakterií) byla snadněji fotodegradována (Kiwi a Nadtochenko, 2005).

Mechanismus fotokatalytické inaktivace bakterií je stále nejasný. Poškození buněčné membrány je pozorováno buď ztrátou draselných iontů, proteinů a RNA z bakteriálních buněk nebo vzestupem intracelulárních kalciových iontů v důsledku zvýšené permeability buněčné membrány (Liu a Yang, 2003).

Je tedy vidět, že se problematikou deaktivace mikroorganismů fotokatalytickým ZnO zabývalo už mnoho autorů. Vypadá to však, že ještě stále není jednotný názor na přesný mechanismus deaktivace, ale nejspíše půjde o kaskádu více složitých dějů.

1.4. Koncentrace částic ZnO a antimikrobiální účinky

Bylo zjištěno, že koncentrace částic ZnO významně ovlivňuje jeho antimikrobiální účinky.

Na základě pozitivních výsledků fotokatalytické a antimikrobiální účinnosti silikátových nátěrů obsahujících ZnO byla připravena řada nátěrů s různou objemovou koncentrací ZnO, a to v rozmezí od 2,5 obj.% do 10 obj.%. Všechny koncentrace včetně nejnižší použité, tj. 2,5 obj.% zcela inhibovaly růst bakterií *E. coli*, *P. aeruginosa* a *S. aureus*. Vliv koncentrace ZnO se projevil také v inhibici růstu obou testovaných plísní. Úplná inhibice plísně *Aspergillus niger* byla pozorována u nátěrů s 5 obj.% a 7,5 obj.% ZnO a u plísně *Penicillium chrysogenum* až při koncentraci 10 obj.% ZnO (Hochmannová a Vytrásová, 2010b).

Cílem jiné studie stejných autorů bylo také mimo jiné zjistit vhodnou koncentraci ZnO v interiérových nátěrech. Objemová koncentrace ZnO se v jednotlivých nátěrech pohybovala od 1,25 obj.% do 5 obj.%. Z hlediska antimikrobiální účinnosti se zdála být nejnižší koncentrace 1,25% dostatečná pro inhibici růstu bakterií *E. coli* a *S. aureus*. Při koncentraci 3,75 obj.% docházelo k inhibici růstu všech testovaných bakterií, a také plísně *A. niger*. Nejvyšší koncentrace (tj. 5%) byla nezbytná k inhibici plísně *P. chrysogenum* a celkově vykazovala nejlepší inhibiční efekt pro všechny testované mikroorganismy (Hochmannová a Vytrásová, 2010a).

Další studie zkoumající antimikrobiální vlastnosti nanočástic ZnO uvádí, že tyto nanočástice v porovnání s kontrolou inhibují také fungální růst. Jelikož je tato aktivita

nanočástic ZnO závislá na koncentraci, může dojít vlivem jejího dalšího zvyšování také k zesílení rezistence nanočástic vůči fungálnímu růstu (Sharma et al., 2010).

Zdá se také, že suspenze ZnO vykazuje při nižších koncentracích (0,01-1mM) menší antimikrobiální aktivitu. Může tak být díky přítomnosti velice malého množství zinečnatých iontů, které se mohou stát živinou pro buňku mikroorganismu (Sawai, 2003).

K ověření výše uvedeného jiní autoři studovali antimikrobiální aktivitu $ZnCl_2$ ve formě suspenze při různých koncentracích a hodnotách pH. Počáteční pH 5 mM suspenze $ZnCl_2$ bylo 5,9. Následkem byl rychlý růst bakterie *E. coli*. Z toho vyplývá, že zinečnaté ionty nejsou toxické při nižších koncentracích a při tomto pH. Důvodem tedy může být to, že zinek je esenciálním kofaktorem v mnoha buněčných procesech. V rámci této studie se autoři zabývali také zkoumáním přežívání bakterií v kyselém a zásaditém prostředí. Zjistili, že pouze pH v rozmezí od 6 do 8 neovlivňuje růst bakterií bez ohledu na přítomnost iontů kovu (Padmavathy a Vijayaraghavan, 2008).

Z další práce vyplývá, že nanočástice ZnO v koncentraci mezi 3 až 10 mM způsobily 100% inhibici bakteriálního růstu (Brayner et al., 2006). To je ve shodě s výsledky jiného testování, které ukázalo, že koloidní suspenze malých nanočástic ZnO o koncentraci 5 mM může inhibovat růst většiny gram pozitivních bakterií o více než 95% (Jones et al., 2008).

1.5. Velikost částic ZnO a antimikrobiální účinky

Významné pokroky v oblasti nanotechnologií umožňují upravit materiály do nano rozměrů (<100 nm), čímž dochází k vytvoření jejich nových vlastností. Změny ve fyzikálně-chemických a strukturálních vlastnostech materiálů jsou způsobeny poklesem velikosti částic a mohou tak vést k novým biologickým účinkům. Tyto nanočástice se také vyznačují vyšší toxicitou (Kasemets et al., 2009).

Výše uvedené dokládá studie, porovnávající toxicitu mikročástic Al_2O_3 , SiO_2 a ZnO s jejich nano analogy. Výsledky ukazují, že tyto nanočástice působí toxicky na testované bakterie. Nicméně mikročástice těchto oxidů vykazují velice nízkou či

dokonce žádnou toxicitu. Znamená to tedy, že nanočástice jsou v porovnání s částicemi větších rozměrů více toxické (Jiang et al., 2009).

Vliv velikosti částic na antibakteriální aktivitu ZnO byl zkoumán za použití prášků ZnO s různou velikostí částic od 0,1 do 0,8 μm . Měřením bylo zjištěno, že antibakteriální aktivita roste se zmenšující se velikostí částic a jejich rostoucí koncentrací. Předpokládá se, že ke zvýšení antimikrobiální aktivity dochází díky zvýšené tvorbě H_2O_2 na povrchu ZnO. Je to proto, že při snižující se velikosti částic dochází ke zvýšení jejich počtu. Změny v antibakteriálním účinku na *S. aureus* byly podobné těm na *E. coli*. Nicméně velikost částic měla menší vliv na bakterii *S. aureus* než na *E. coli* (Yamamoto, 2001).

V rámci jiné studie byly připraveny dvěma různými metodami prášky ZnO, lišící se velikostí a povrchem. Fotokatalytický účinek nanočástic ZnO s rozměrem 10 nm, připravených metodou chemické depozice, byl nižší než ZnO s rozměrem 200 nm připraveného metodou tepelného odpařování. Tato skutečnost ukazuje, že metoda přípravy hraje větší roli než velikost a tvar nanočástic ZnO (Wang et al., 2007).

Zkoumáním částic ZnO modifikovaných polymery bylo zjištěno, že povrch částic je důležitým parametrem, který může vést ke zlepšení fotokatalytického rozkladu. Kalcinovaný prášek ZnO, připravený precipitační metodou z roztoku o pH 10, měl největší povrch částic a jeho fotokatalytický rozklad byl tak nejvyšší. Na druhou stranu ZnO, připravený stejnou metodou z roztoku o pH 8, měl tento povrch nejmenší a vykazoval i nejnižší fotokatalytickou degradaci. Z toho vyplývá, že degradační účinek závisí také na pH roztoku (Amornpitoksuk et al., 2011). S rostoucí hodnotou pH se totiž zvyšuje koncentrace OH. Ve výsledku tak dochází k fotogeneraci většího počtu hydroxylových radikálů a ke zvýšení fotokatalytického účinku (Lu et al., 2008).

Vlivem zmenšující se velikosti a zvětšujícím se povrchem získávají částice ZnO větší náboj, což vede k silné interakci se záporně nabitou buněčnou membránou. Proto dochází se snižující se velikostí částic ZnO ke zvýšení antibakteriální aktivity (Nair et al., 2009).

Lze tedy říci, že menší částice ZnO vykazují lepší antimikrobiální účinky.

1.6. ZnO a jeho toxicita k mikroorganismům

Testováním interiérových nátěrů bylo zjištěno, že nátěry s obsahem nanočástic ZnO mají vynikající antimikrobiální aktivitu proti bakteriím a plísním. Zato nátěry obsahující TiO₂ vykazují velmi malou či dokonce žádnou antimikrobiální aktivitu (Hochmannova a Vytrasova, 2010a).

Studie zabývající se toxicitou nanočástic ZnO na prokaryotní buňky ukázala, že antimikrobiální účinek byl menší na gramnegativní bakterie *E. coli* a *P. aeruginosa* než na grampozitivní bakterii *S. aureus* (Premanathan et al., 2011). Také další studie uvádí, že nanočástice ZnO vykazovaly větší toxicitu na testované grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* a *S. aureus* než na gramnegativní bakterii *E. coli* (Baek a An, 2011).

Výše uvedené poznatky se však liší od výsledků jiné práce, ve které došlo při kontaktu se suspenzí ZnO a po aktivaci UV světlem k většímu poklesu bakteriálních kolonií gramnegativní bakterie *E. coli* než grampozitivní bakterie *Lactobacillus helveticus* (Liu a Yang, 2003).

Rozdíl v antibakteriální aktivitě proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím byl v minulosti mnohokrát zkoumán. Tento rozdíl může být vysvětlen různou strukturou a odlišným chemickým složením buněčného povrchu těchto dvou typů bakterií. Buněčná stěna gramnegativních bakterií se liší od buněčné stěny grampozitivních bakterií přítomností vnější lipoproteinové membrány, která pokrývá peptidoglykanovou vrstvu (Amornpitoksuk et al., 2011).

Rozdílnost v působení může být i kvůli změně mechanismu interakce ZnO s bakteriální membránou. Grampozitivní bakterie mají v porovnání s gramnegativními bakteriemi silnější peptidoglykanovou buněčnou stěnu a jsou tak méně náchylné k membránovému poškození. Nicméně pro vytvořené reaktivní formy kyslíku jsou oba typy buněčných membrán stejně propustné. Rozdíly v citlivosti tak mohou být spojeny s intracelulárními procesy (Nair et al., 2009).

Mnoho vědeckých prací se zabývá nanočásticemi ZnO a jejich antimikrobiálními účinky. K jejich testování jsou většinou používány různé patogenní druhy mikroorganismů, které jsou častými původci nejrůznějších infekcí a onemocnění.

Také my jsme si vybrali k testování antimikrobiálních nátěrů mikroorganismy, které jsou častými patogeny pro člověka. Jedná se tak o bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a kvasinku *Candida albicans*.

E. coli a *S. aureus* jsou buněčné organismy, patřící mezi prokaryonta. Tyto bakterie se od sebe liší složením a strukturou buněčné stěny.

V případě bakterie *S. aureus* se jedná o fakultativně anaerobní koky, vyskytující se jednotlivě nebo ve shlucích (Rosypal et al., 1981). Buněčná stěna této grampozitivní bakterie je tvořena silnou peptidoglykanovou vrstvou (Buchta et al., 1998). *S. aureus* je sice součástí normální lidské mikroflóry, ale způsobuje i hnisavá onemocnění postihující kůži, podkožní vaziva a kosti. Dále mohou být infikovány také dýchací cesty, zažívací a urogenitální soustava (Rosypal et al., 1981).

Další použitou bakterií byla *E. coli*. Jedná se o gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčku (Rosypal et al., 1981). Ve srovnání s grampozitivními bakteriemi je její buněčná stěna tvořena tenčí peptidoglykanovou vrstvou, která je navíc kryta vnější membránou složenou z lipopolysacharidů (Buchta et al., 1998). Tato bakterie je typickým představitelem střevní mikroflóry obratlovců, kde je užitečným komenzálem. Za určitých okolností však může být nebezpečným patogenem postihujícím apendix, žlučník, močové cesty i dutinu břišní (Rosypal et al., 1981).

Posledním testovaným mikroorganismem byla kvasinka *C. albicans*. Jde o jednobuněčnou houbu, jejíž základem je eukaryotická buňka. Z tohoto důvodu se více podobá savčím buňkám než bakteriím. Přestože je tato kvasinka součástí přirozené mikroflóry člověka, patří zároveň také k nejčastějším původcům nozokomiálních mykóz (Buchta et al., 1998).

2. Experimentální část

2.1. Použité mikroorganismy:

Escherichia coli (*E. coli*) CCM 4517

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) CCM 4516

Candida albicans (*C. albicans*) ATCC 448559

2.2. Použitá živná média:

2.2.1. Pro kultivaci *E. coli*:

Mueller-Hintonův agar M 173, (výrobce HIMEDIA)

- složení: bovinní extrakt, hydrolyzát kaseinu, škrob, agar

Rapid' *E.coli* 2 agar 3564024, (výrobce HIMEDIA)

- složení: hovězí hydrolyzát, hydrolyzát kaseinu, škrob, agar

chromogenní substrát pro β - D - Glukuronidázu

chromogenní substrát pro β - D - Galaktosidázu

- pH (20°C) = 7,2 \pm 0,2

2.2.2. Pro kultivaci *S. aureus*:

Baird Parker Agar Base M 043, (výrobce HIMEDIA)

- složení: pankreatický lyzát kaseinu, bovinní extrakt, kvasničkový extrakt, glycin,

pyruvát sodný, chlorid lithný, agar

Egg Yolk Tellurite Emulsion

- sterilní žloutková suspenze s telluričitanem draselným
- určena k identifikaci rodu *Staphylococcus*
- složení: žloutek, sterilní fyziologický roztok, 3,5 % roztok telluričitanu draselného
- pH (25°C) = 7,0 ±0,2

2.2.3. Pro kultivaci *C. albicans*:

HiCrome *Candida* Differential Agar M 1297A, (výrobce HIMEDIA)

- složení: pepton speciál, kvasničkový extrakt, hydrogenfosforečnan(di)draselný, chloramfenicol, chromogenní směs, agar
- pH (25°C) = 6,3 ±0,2

Fyziologický roztok (0,9% NaCl ve vodě pro injekce – Fresenius)

Fyziologický roztok (0,9% NaCl ve vodě pro injekce – Fresenius) s přidavkem peptonu

2.3. Použité přístroje a pomůcky:

Autokláv PS20, (dodavatel firma Fisher Scientific)

Termostat Binder, (dodavatel firma Fisher Scientific)

Měřidlo intenzity UV záření SUV 10 Suncor (IUL)

UV-VIS Hyundai Sun 60W (zdroj dlouhovlnného záření, dále jen UV lampa)

Třepačka MS Minishaker IKA, (dodavatel firma Fisher Scientific)

Počítadlo kolonií Colony Counter (IUL)

Mikropipety s příslušnými špičkami (50µl a 100-1000µl)

Mikrobiologická klička, plynový kahan

Sterilní zkumavky

Petriho misky s živnou půdou o průměru 9,5 cm (dále jen plotny)

Sterilní L-hokejky

McFarlandova škála (dále jen škála) pro přípravu bakteriální suspenze o požadované koncentraci

Hliníková fólie

2.4. Použité nátěrové hmoty:

Zkoumané malířské nátěrové hmoty byly ve třech vrstvách nanесeny na plastové destičky. Každá z destiček byla rozdělena do šesti přepážkami oddělených rámečků. Do tří takových rámečků byl nanесen zkoumaný malířský nátěr A0A-7 nebo A0A-8, a ve třech zbylých rámečcích byl porovnávací malířský nátěr A0A-1.

Tyto destičky s různými typy nátěrových hmot nám byly dodány firmou Synpo a.s. Pardubice.

2.5. Pracovní postup:

2.5.1. Příprava živných médií:

Mueller-Hintonův agar :

Připravili jsme roztok živné půdy o koncentraci 3,8% (tj. 38 g v 1000 g vody). Tento roztok jsme posléze sterilizovali v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 15 minut a následně rozlili do připravených sterilních Petriho misek, zpravidla do výšky vrstvy 3 mm (Čechová, 2010).

Rapid' E.coli 2 agar:

Připravili jsme roztok živné půdy o koncentraci 3,7% (tj. 37 g v 1000 g vody). Roztok jsme sterilizovali po dobu 15 minut při teplotě 121°C a poté jsme jej rozlili do připravených sterilních Petriho misek, vždy do výšky vrstvy 3 mm (Čechová, 2010).

Baird Parker Agar Base:

Připravili jsme roztok živné půdy o koncentraci 6,3% (tj. 63,0 g v 1000 g vody). Tento roztok jsme následně sterilizovali při teplotě 121°C po dobu 15 minut. Poté jsme jej zchladili na teplotu 50°C a přidali žloutkovou emulzi (50 g). Nakonec jsme přidali sterilní roztok draselné soli telluricitanu (3 g) a rozlili do připravených sterilních Petriho misek, obvykle do výšky vrstvy 3 mm (Čechová, 2010).

HiCrome Candida Differential Agar:

Připravili jsme roztok živné půdy o koncentraci 4,3% (tj. 42,72 g v 1000 g vody). Roztok jsme ochladili na teplotu 50°C a rozlili do připravených sterilních Petriho misek, vždy do výšky vrstvy 3 mm (Čechová, 2010).

2.5.2. Příprava bakteriální suspenze:

Připravili jsme základní suspenzi bakterií podle McFarlandovy škály o koncentraci CFU 4×10^6 /ml. Následně jsme použili 10 μ l této základní suspenze a 40 ml fyziologického roztoku s přidavkem peptonu k přípravě suspenze se zředěním 1:4 000. Takto připravenou bakteriální suspenzi jsme použili ke zkoumání vzorků.

2.6. Metody testování:

Vzorky malířských nátěrových hmot jsme testovali třemi různými metodami, které se vzájemně liší převážně v délce expozice UV záření.

2.6.1. Metoda 1

Do jednotlivých rámečků destičky jsme nanесли 1 ml připravené bakteriální suspenze a destičku jsme umístili na třepačku kmitající se frekvencí 500 otáček/min. V časových intervalech 2, 5, 10, 15, 20 a 30 minut jsme z jednotlivých rámečků odebírali 50 μ l suspenze do zkumavky obsahující 0,5 ml fyziologického roztoku s přidavkem peptonu. Poté jsme roztok ve zkumavce promíchali a rozetřeli L-hokejkou na plotnu s živnou

půdou. Plotny jsme následně nechali inkubovat v termostatu při teplotě 37°C po dobu 24 hodin, v případě použití kvasinky *C. albicans* až 48 hodin. Po inkubaci jsme s použitím speciálního počítadla odečetli množství CFU bakterií. Také jsme si připravili kontrolní vzorek, sloužící k ověření kvality bakteriální suspenze. Příprava spočívala v tom, že jsme 50 µl této suspenze přidali do zkumavky k 0,5 ml fyziologického roztoku s přídatkem peptonu. Tuto suspenzi, která se nedostala do kontaktu s destičkou ani s UV zářením, jsme po důkladném promíchání rozetřeli L-hokejkou na plotnu a nechali inkubovat 24 hodin.

2.6.2. Metoda 2

Destičku s nátěry jsme nejprve ozařovali 30 minut pod UV lampou. Vzdálenost zdroje UV světla od destičky byla cca 10 cm. Poté jsme do jednotlivých rámečků destičky nanесли 1 ml bakteriální suspenze a destičku umístili na třepačku kmitající se frekvencí 500 otáček/min. V intervalech 2, 5, 10, 15, 20 a 30 minut jsme odebírali z každého rámečku 50 µl suspenze do zkumavky s obsahem 0,5 ml fyziologického roztoku s přídatkem peptonu. Následně jsme roztok promíchali a rozetřeli L-hokejkou na plotnu se živnou půdou. Takto připravené plotny jsme nechali inkubovat v termostatu při teplotě 37°C po dobu 24 hodin, v případě kvasinky *C. albicans* po dobu 48 hodin. Po inkubaci jsme pomocí počítadla odečetli množství CFU bakterií. Také jsme si připravili kontrolní vzorek, sloužící k ověření kvality bakteriální suspenze. Příprava spočívala v tom, že jsme 50 µl této suspenze přidali do zkumavky s obsahem 0,5 ml fyziologického roztoku s přídatkem peptonu. Tuto suspenzi, která se nedostala do kontaktu s destičkou ani s UV zářením, jsme po důkladném promíchání rozetřeli L-hokejkou na plotnu a nechali inkubovat 24 hodin.

2.6.3. Metoda 3

Do jednotlivých rámečků destičky jsme nanесли 1 ml připravené bakteriální suspenze. Tuto destičku jsme poté umístili na třepačku kmitající se frekvencí 500 otáček/min a pod UV lampu se vzdáleností cca 10 cm od destičky. V intervalech 0,5; 2; 5; 15 a 30 minut jsme z každého rámečku odebírali 50 µl suspenze do zkumavky s obsahem 0,5 ml fyziologického roztoku s přídatkem peptonu. Po důkladném promíchání jsme tento

roztok rozetřeli L-hokejkou na plotnu s živnou půdou. Takto připravené plotny jsme nechali inkubovat v termostatu po dobu 24 hodin, v případě *C. albicans* 48 hodin. Po inkubaci jsme pomocí speciálního počítadla odečetli množství CFU bakterií. Také jsme si připravili kontrolní vzorek, sloužící k ověření kvality bakteriální suspenze. Příprava spočívala v tom, že jsme 50 µl této suspenze přidali do zkumavky k 0,5 ml fyziologického roztoku s přídavkem peptonu. Tuto suspenzi, která se nedostala do kontaktu s destičkou ani s UV zářením, jsme po důkladném promíchání rozetřeli L-hokejkou na plotnu a nechali inkubovat 24 hodin.

2.7. Vyjádření výsledků:

Počet mikrobiálních kolonií (CFU), odečtený z jednotlivých ploten, jsme zaznamenali do tabulek. Získané hodnoty jsme porovnali s kontrolním vzorkem, který představoval 100% hodnotu v nárůstu mikrobiálních kolonií. Tímto způsobem jsme vyjádřili procentuální množství CFU jednotlivých nátěrů za daných podmínek. Z těchto hodnot jsme vytvořili grafy, které jsme proložili přímkou. Pomocí směrnic těchto jednotlivých přímk jsme vyjádřili účinnost nátěrů. Platí, že čím je hodnota směrnice přímky zápornější, tím je nátěr účinnější.

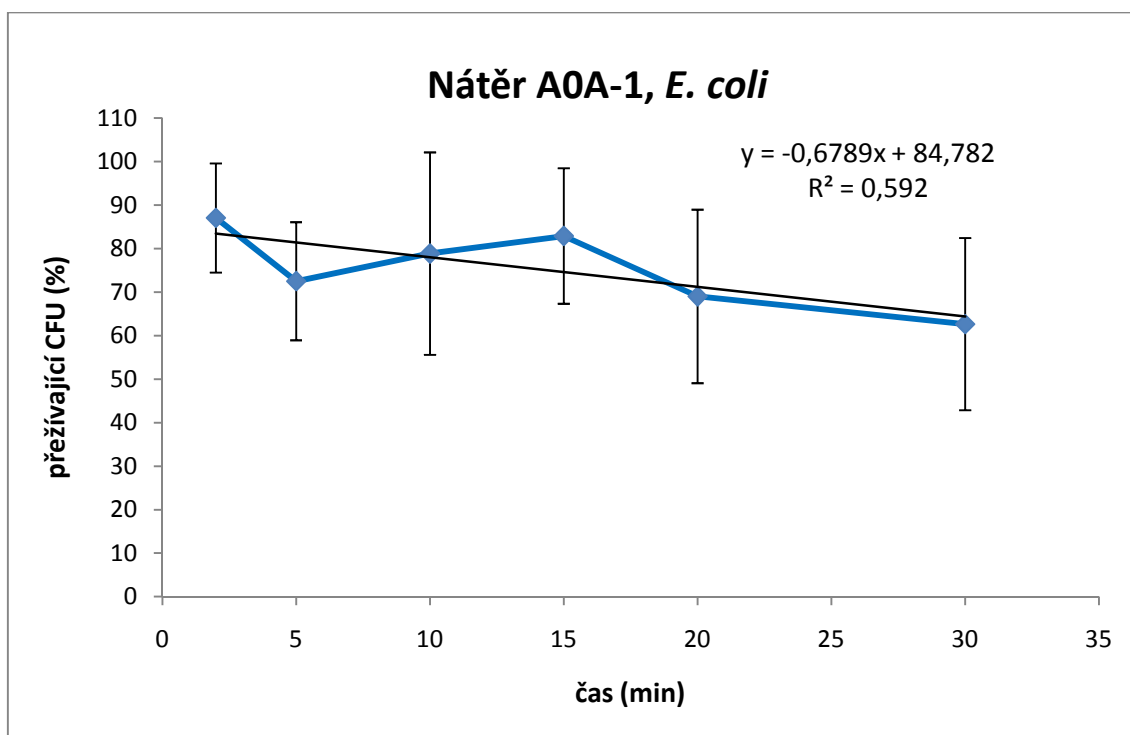
Výsledky zkoumání jsme rozdělili podle metody testování a v rámci jednotlivých metod pak podle druhu použitého mikroorganismu. Veškeré důležité výsledky jsme zpracovali do podoby grafů a tabulek. Uvedené grafy vyjadřují procentuální počet CFU v závislosti na čase. Údaje v tabulkách informují o parametrech jednotlivých směrnic přímk a dalších statistických údajích vypočítaných pomocí speciálního programu MS Excel LinReg 1.

3. Výsledky

3.1. Metoda 1 – Nátěry neozařované UV světlem

3.1.1. Výsledky testování - *Escherichia coli*

Z grafu a tabulky 3.1.1-1 je zřejmé, že v přítomnosti nátěru A0A-1 dochází s rostoucím časem k nepatrnému poklesu počtu CFU.

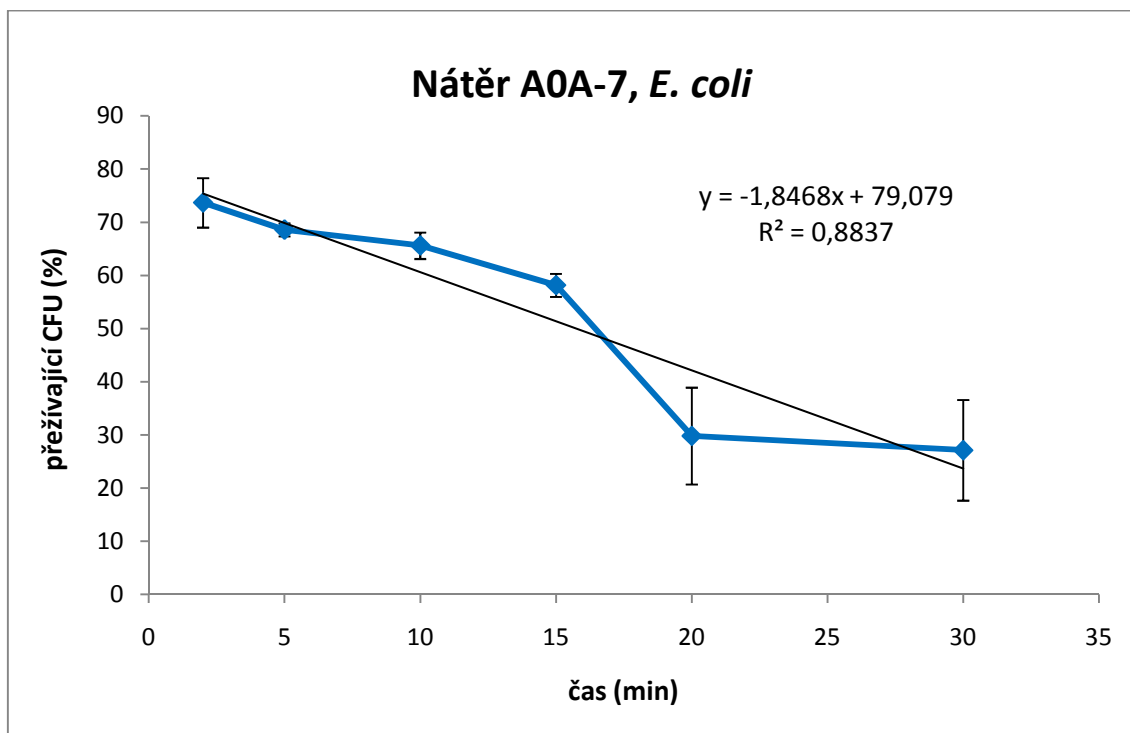


Graf 3.1.1-1 Nátěr A0A-1, počet CFU (%) *E. coli* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,68 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,68 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 84,9 \pm 4,6$
Koeficient korelace	$R = 0,776$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 6,35$

Tabulka 3.1.1-1

Z grafu a tabulky 3.1.1-2 je vidět, že počet CFU klesá už ve 20 minutách o více než polovinu. Lze tedy říci, že tento nátěr A0A-7 neozařovaný UV světlem vykazuje vůči bakterii *E. coli* velice dobrou antimikrobiální aktivitu.

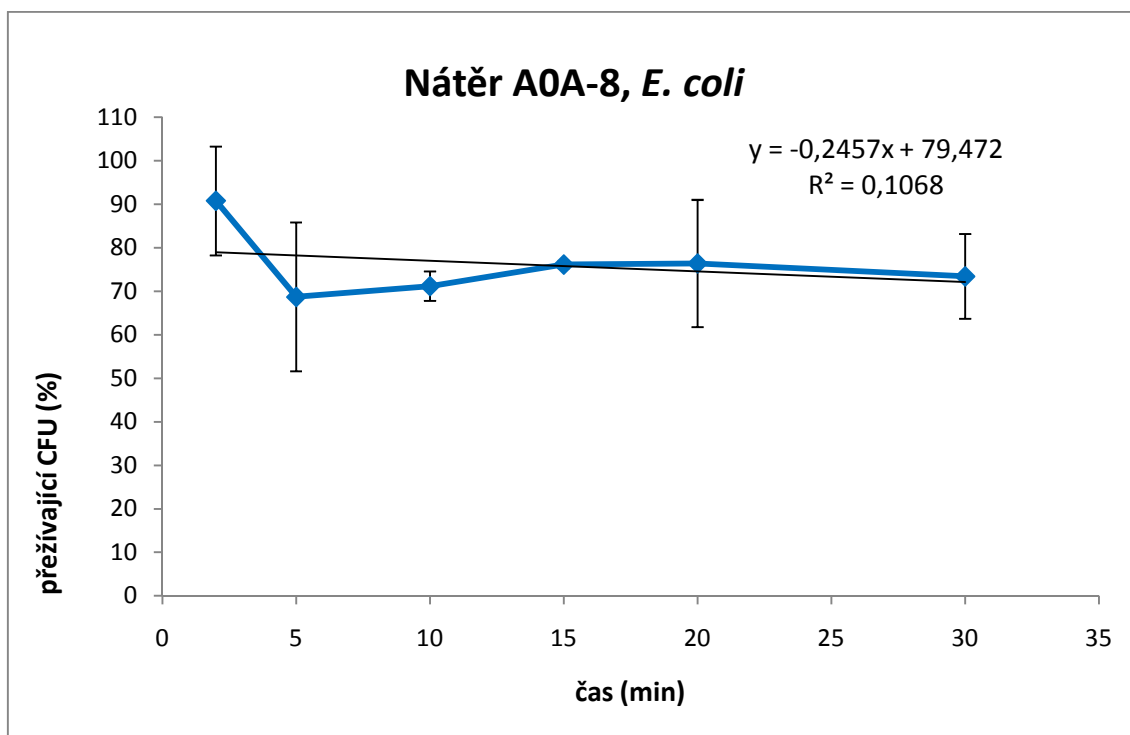


Graf 3.1.1-2 Nátěr A0A-7, počet CFU (%) *E. coli* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -1,85 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 1,85 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 79,1 \pm 5,6$
Koeficient korelace	$R = 0,940$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 7,74$

Tabulka 3.1.1-2

Graf s tabulkou 3.1.1-3 znázorňuje vliv kontaktu nátěru A0A-8 s bakteriální suspenzí, který se projevuje téměř nepatrným poklesem počtu CFU v čase. Z uvedeného vyplývá, že tento nátěr vykazuje vůči bakterii *E. coli* velice nízký antimikrobiální účinek.

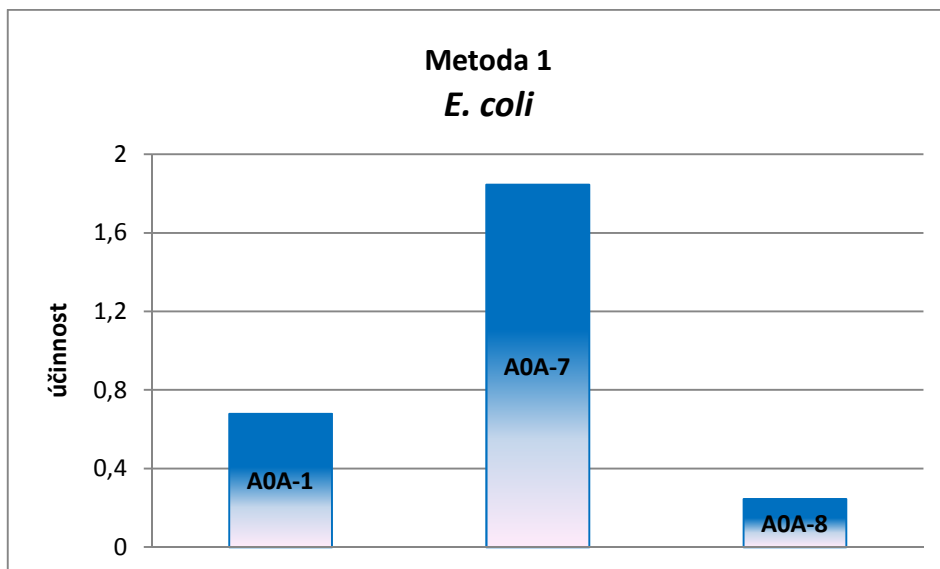


Graf 3.1.1-3 Nátěr A0A-8, počet CFU (%) *E. coli* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,25 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,25 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 79,5 \pm 5,9$
Koeficient korelace	$R = 0,327$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 8,21$

Tabulka 3.1.1-3

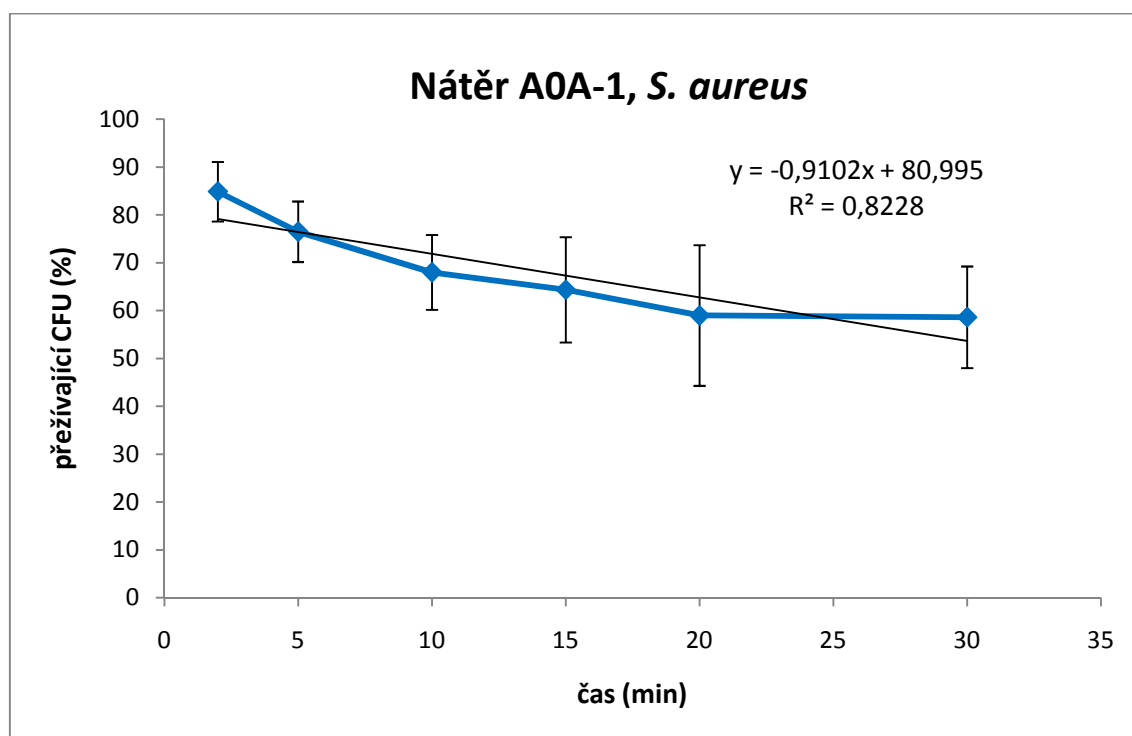
Sloupcový graf 3.1.1-4 porovnává antibakteriální účinnost nátěrů na bakterii *E. coli*. Jde o nátěry, které nebyly ozařovány UV světlem. Z grafu je tedy patrné, že nejlepší antimikrobiální aktivitu má za daných podmínek nátěr A0A-7 s obsahem 7,9 % ZnO.



Graf 3.1.1-4 Metoda 1, porovnání účinnosti nátěrů na bakterii *E. coli*.

3.1.2. Výsledky testování - *Staphylococcus aureus*

Z grafu a tabulky 3.1.2-1 je patrné, že při kontaktu neozařovaného nátěru A0A-1 s bakteriální suspenzí dochází k mírnému poklesu počtu CFU v závislosti na čase.

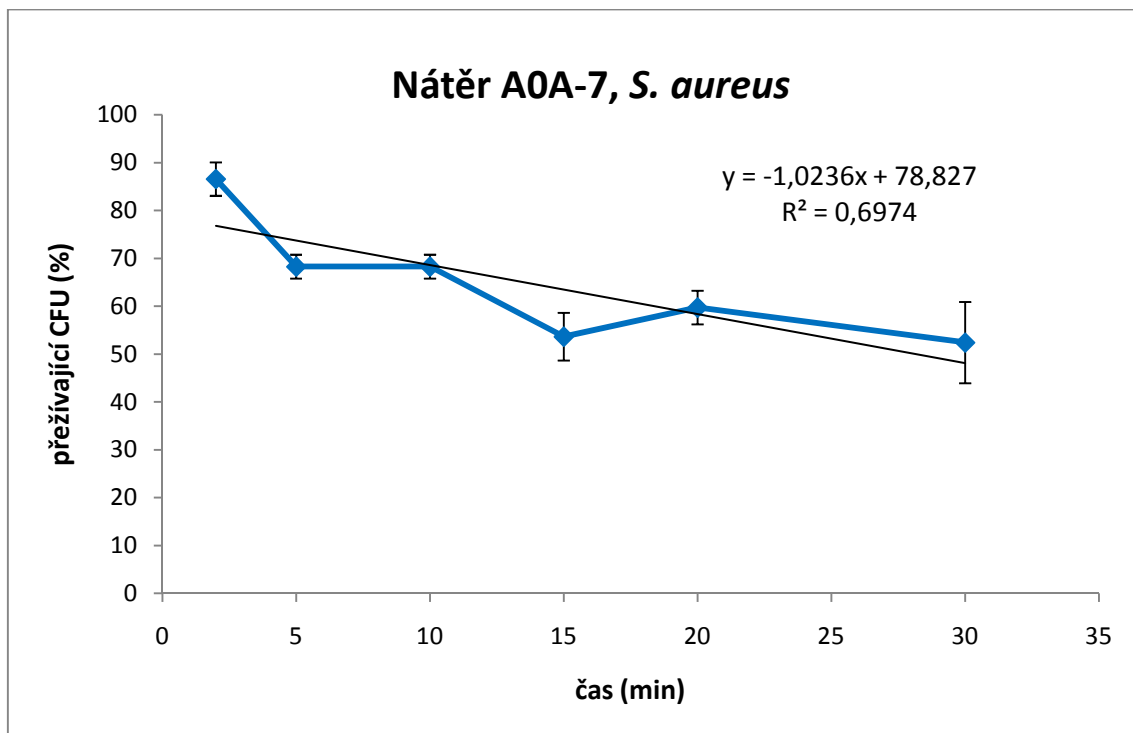


Graf 3.1.2-1 Nátěr A0A-1, počet CFU (%) *S. aureus* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,91 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,91 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 81,0 \pm 3,5$
Koeficient korelace	$R = 0,907$
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 4,88$

Tabulka 3.1.2-1

Z grafu a tabulky 3.1.2-2 je vidět, že i přes mírné výkyvy v počtu CFU nakonec dochází po 30 minutách k jejich poklesu zhruba o jednu třetinu.

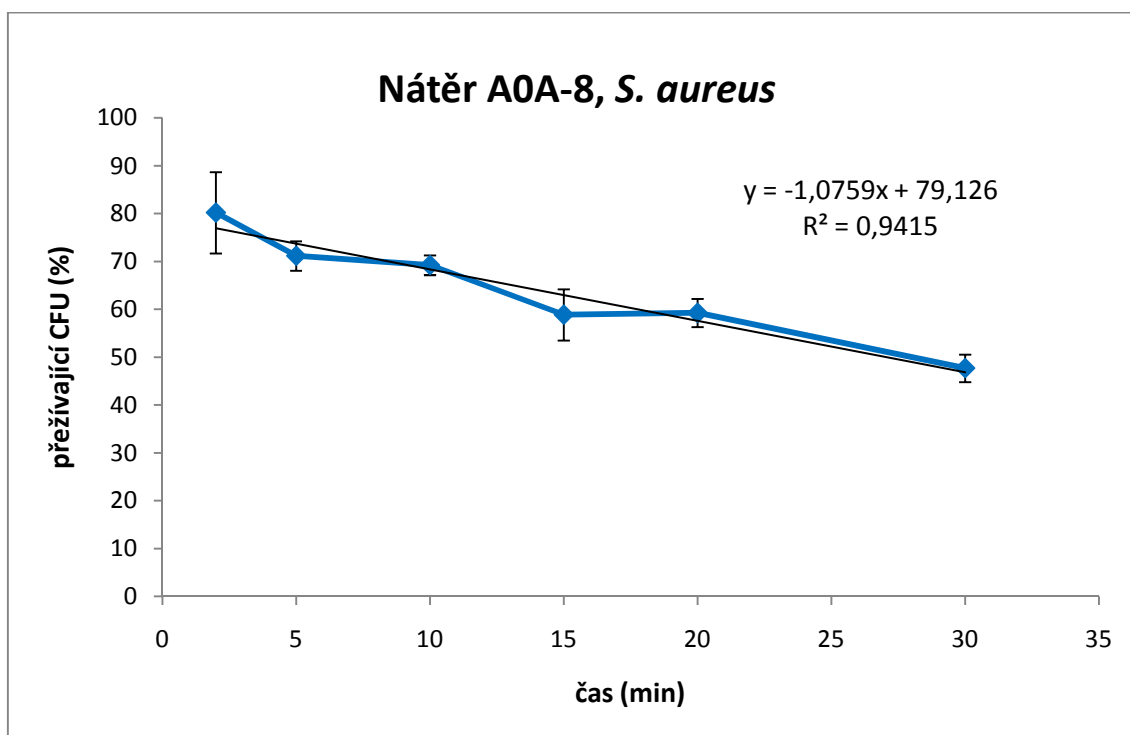


Graf 3.1.2-2 Nátěr A0A-7, počet CFU (%) *S. aureus* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -1,02 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 1,02 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 78,8 \pm 5,6$
Koeficient korelace	$R = 0,835$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 7,79$

Tabulka 3.1.2-2

Graf a tabulka 3.1.2-3 znázorňují pokles počtu CFU v závislosti na čase. Je vidět, že po půlhodinovém kontaktu neozařovaného nátěru A0A-8 s bakteriální suspenzí dochází k poklesu počtu CFU téměř o polovinu.

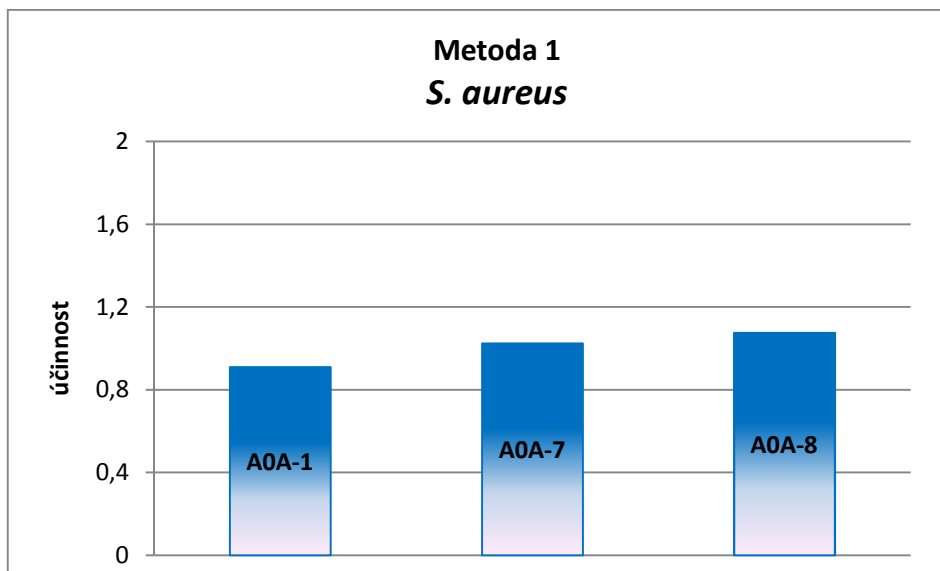


Graf 3.1.2-3 Nátěr A0A-8, počet CFU (%) *S. aureus* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -1,08 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 1,08 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 79,1 \pm 2,2$
Koeficient korelace	$R = 0,970$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 3,10$

Tabulka 3.1.2-3

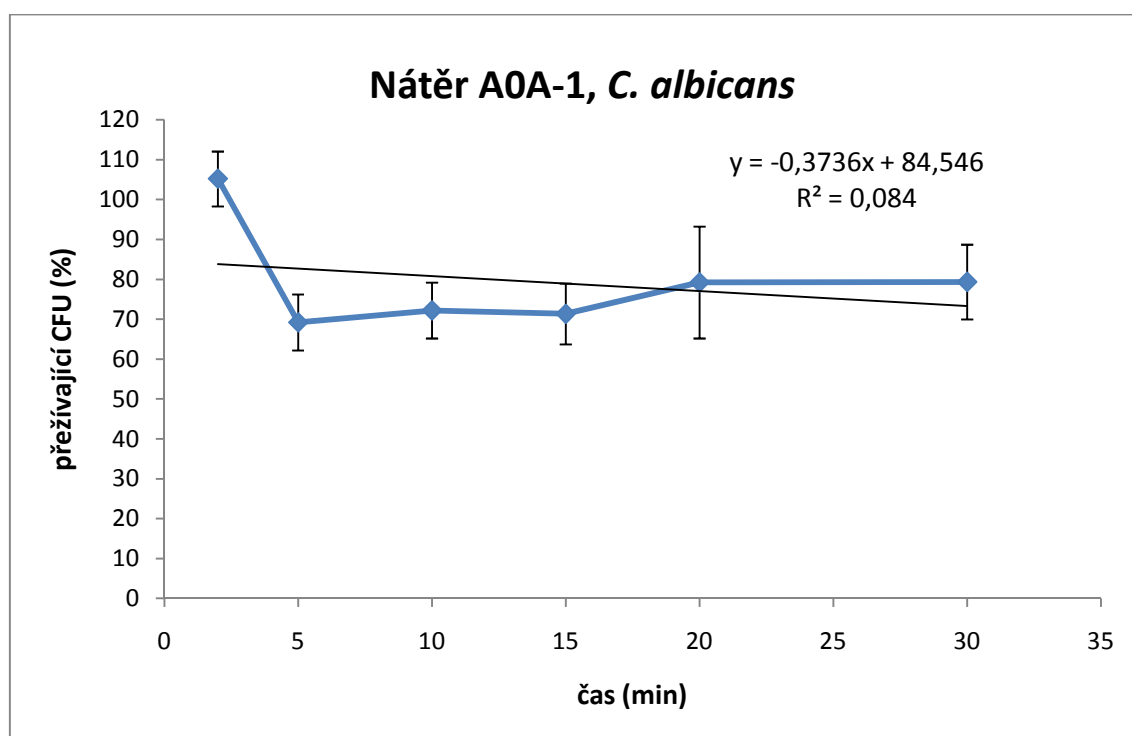
Sloupcový graf 3.1.2-4 porovnává účinnost jednotlivých nátěrů na bakterii *S. aureus*. Jedná se o nátěry, které nebyly při testování ozařovány UV světlem. Z níže uvedeného grafu je patrné, že nátěr A0A-8 s obsahem 11,6% ZnO je mírně účinnější než nátěr A0A-7 s obsahem 7,9% ZnO.



Graf 3.1.2-4 Metoda 1, porovnání účinnosti nátěrů na bakterii *S. aureus*.

3.1.3. Výsledky testování - *Candida albicans*

Z grafu a tabulky 3.1.3-1 vyplývá, že při kontaktu s neozářovaným nátěrem A0A-1 počet CFU klesá už po 5 minutách zhruba o jednu třetinu.

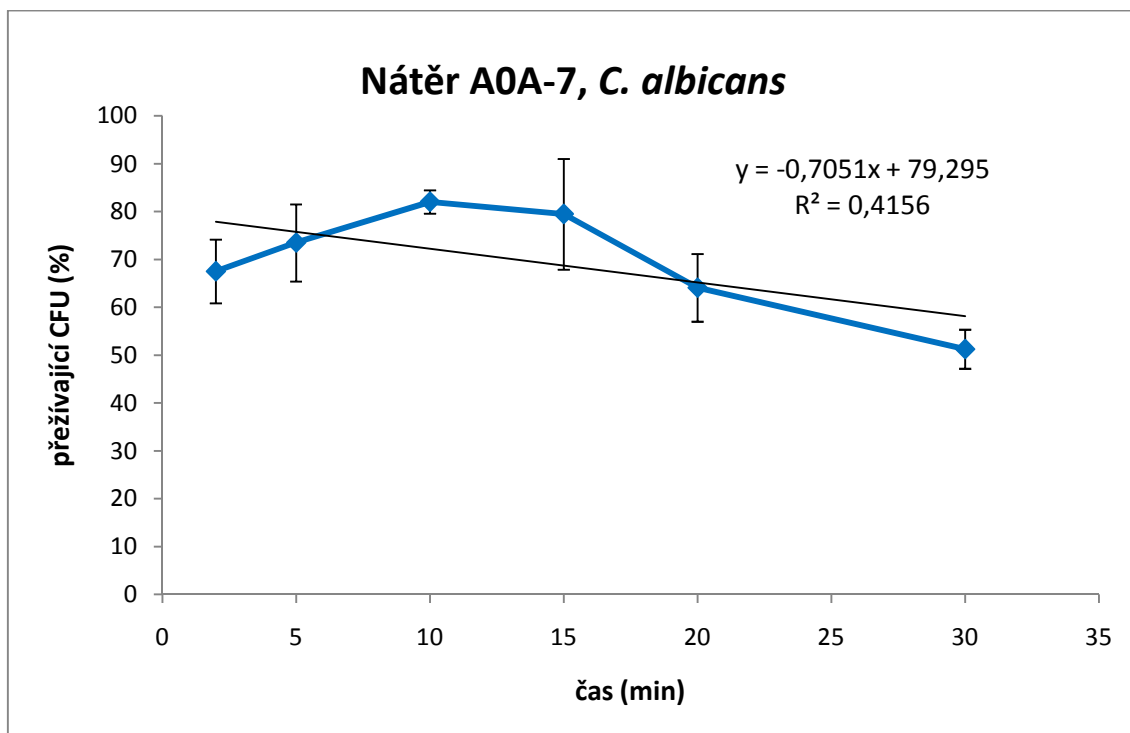


Graf 3.1.3-1 Nátěr A0A-1, počet CFU (%) *C. albicans* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,37 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,37 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 84,5 \pm 10,2$
Koeficient korelace	$R = 0,290$
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 14,25$

Tabulka 3.1.3-1

Z grafu a tabulky 3.1.3-2 je patrné, že při kontaktu neozářovaného nátěru A0A-7 s kvasinkovou suspenzí začíná docházet k většímu poklesu počtu CFU až po 15 minutách.

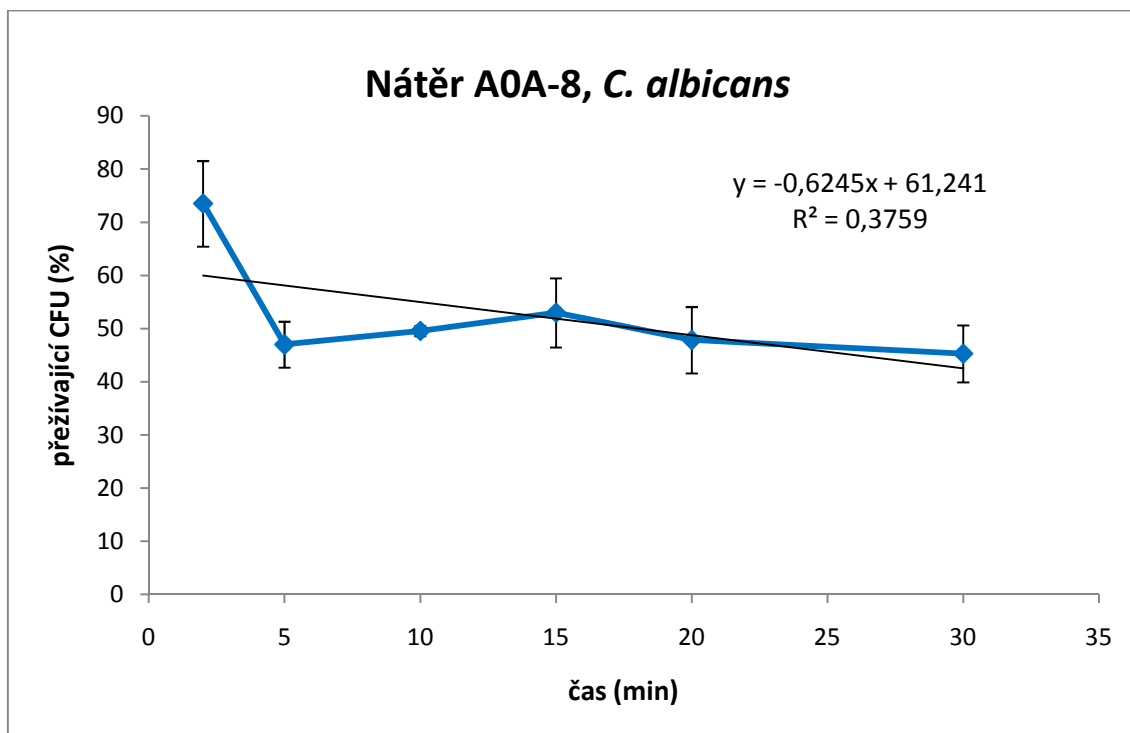


Graf 3.1.3-2 Nátěr A0A-7, počet CFU (%) *C. albicans* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,71 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,71 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 79,3 \pm 6,9$
Koeficient korelace	$R = 0,645$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 9,66$

Tabulka 3.1.3-2

Graf a tabulka 3.1.3-3 ukazují, že v průběhu 5 minutového kontaktu kvasinkové suspenze s nátěrem A0A-8 dochází k prudkému poklesu počtu CFU, který se však následně už výrazně nemění.

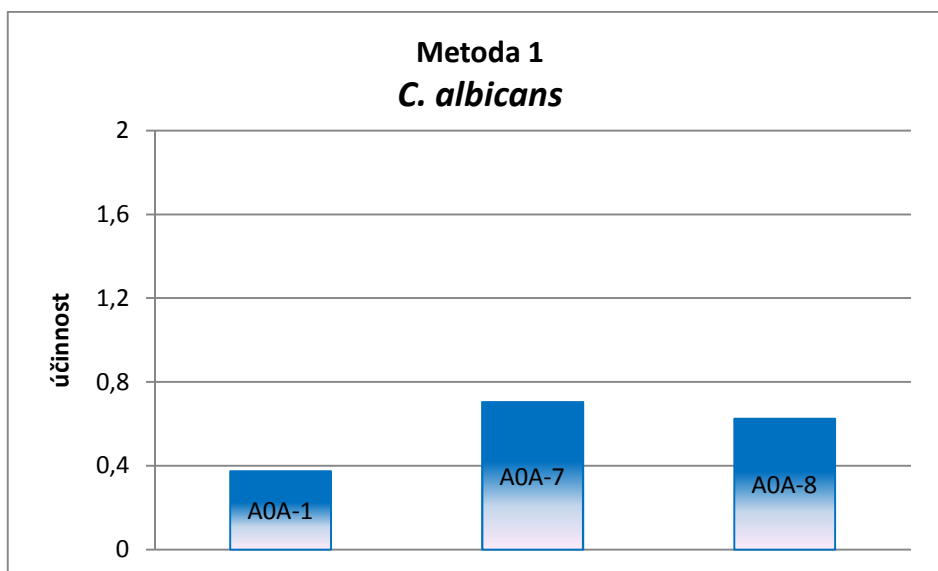


Graf 3.1.3-3 Nátěr A0A-8, počet CFU (%) *C. albicans* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,62 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,62 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 61,2 \pm 6,7$
Koeficient korelace	$R = 0,613$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 9,29$

Tabulka 3.1.3-3

Níže uvedený 3.1.3-4 sloupcový graf porovnává účinnost jednotlivých nátěrů na kvasinku *C. albicans*. V průběhu testování nebyly tyto nátěry ozařovány UV světlem. Z grafu je patrné, že lepší účinek vykazuje nátěr A0A-7 s obsahem 7,9% ZnO než nátěr A0A-8 s obsahem 11,6% ZnO.

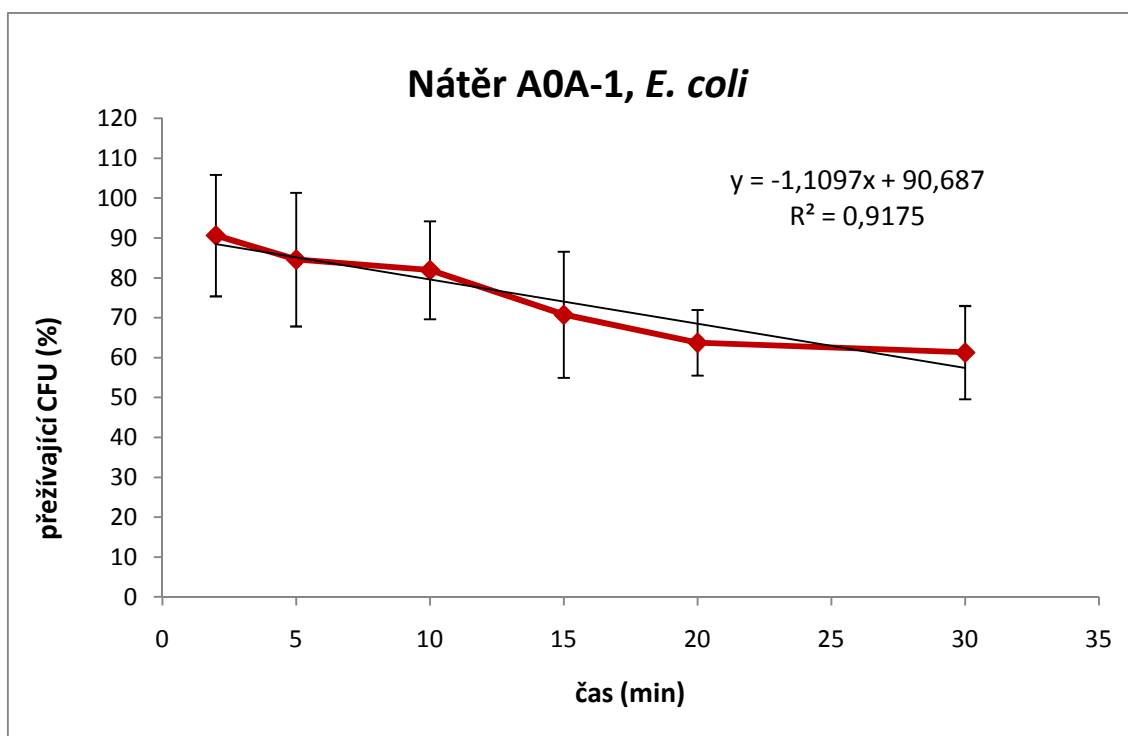


Graf 3.1.3-4 Metoda 1, porovnání účinnosti nátěrů na kvasinku *C. albicans*.

3.2. Metoda 2 – Nátěry ozařované UV světlem 30 minut před nanesením bakteriální suspenze

3.2.1. Výsledky testování - *Escherichia coli*

Z grafu a tabulky 3.2.1-1 je zřejmý mírný pokles počtu CFU v závislosti na čase.

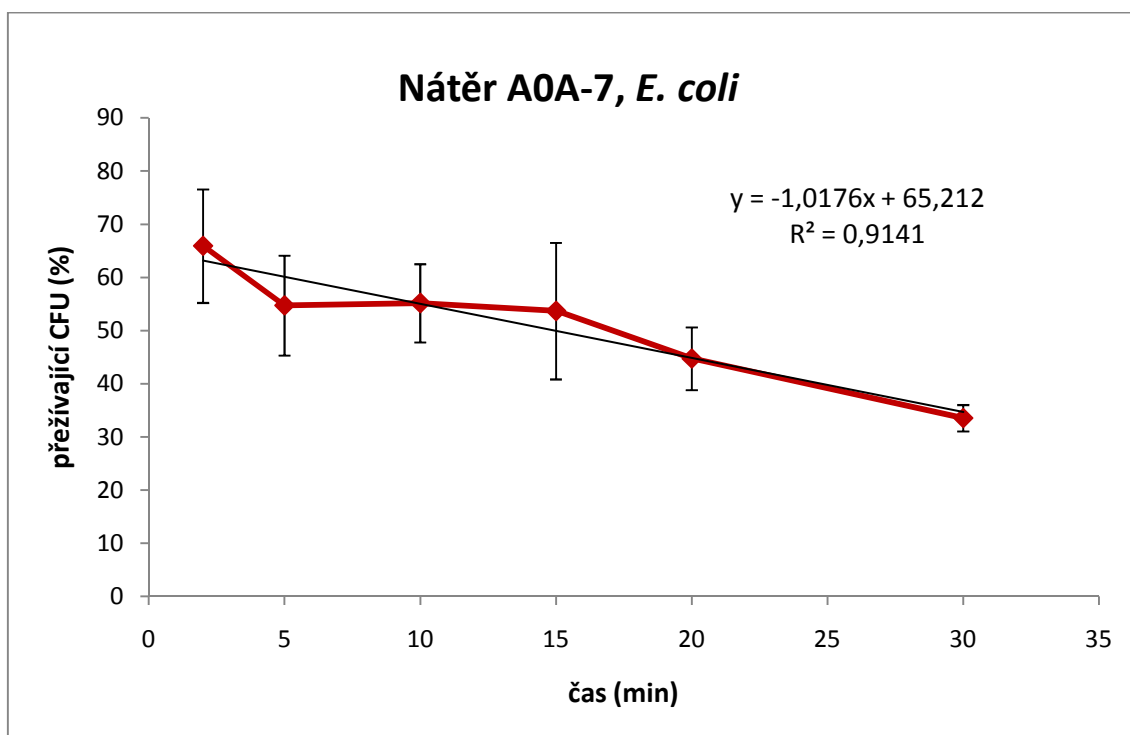


Graf 3.2.1-1 Nátěr A0A-1, počet CFU (%) *E. coli* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -1,11 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 1,11 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 90,7 \pm 2,8$
Koeficient korelace	$R = 0,958$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 3,84$

Tabulka 3.2.1-1

Z grafu a tabulky 3.2.1-2 vyplývá, že kontaktem předem ozařovaného nátěru A0A-7 s bakteriální suspenzí *E. coli* dochází k menšímu poklesu počtu CFU v čase než je tomu u stejného pokusu neozařovaného UV světlem.

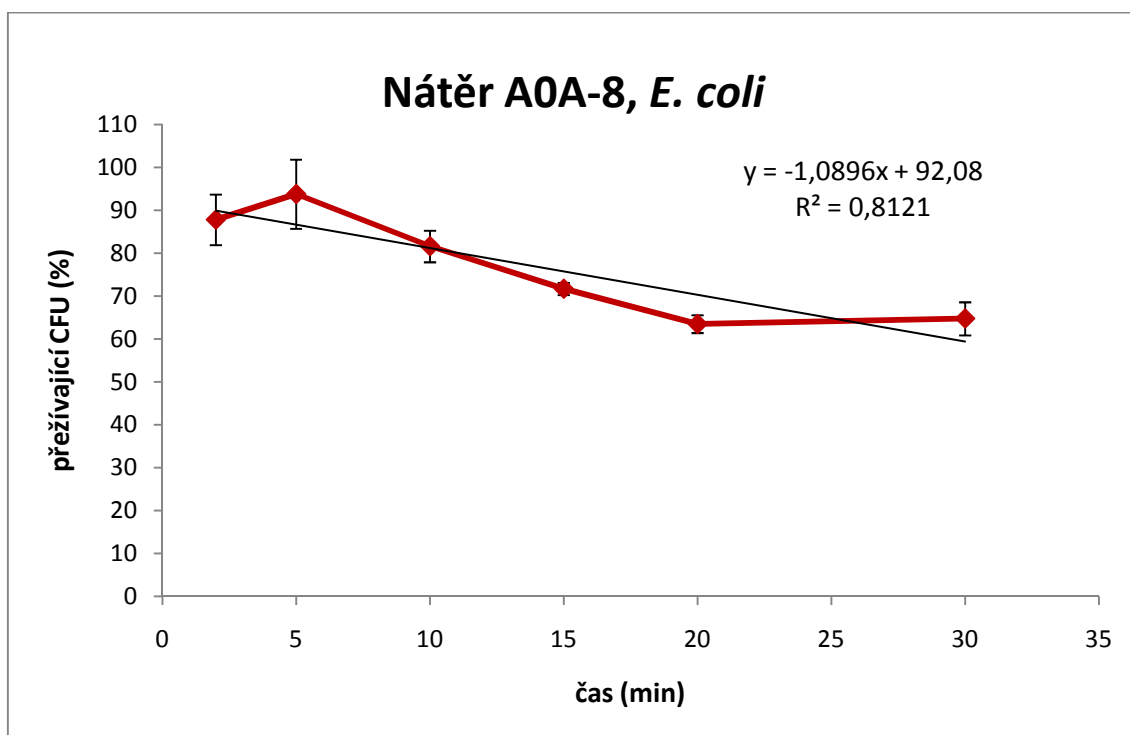


Graf 3.2.1-2 Nátěr A0A-7, počet CFU (%) *E. coli* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -1,02 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 1,02 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 65,2 \pm 2,6$
Koeficient korelace	$R = 0,956$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 3,60$

Tabulka 3.2.1-2

Graf a tabulka 3.2.1-3 znázorňuje pokles počtu CFU v závislosti na rostoucím čase. Schopnost nátěru A0A-8 inhibovat růst *E. coli* je vyšší než u stejného pokusu neozařovaného UV světlem.

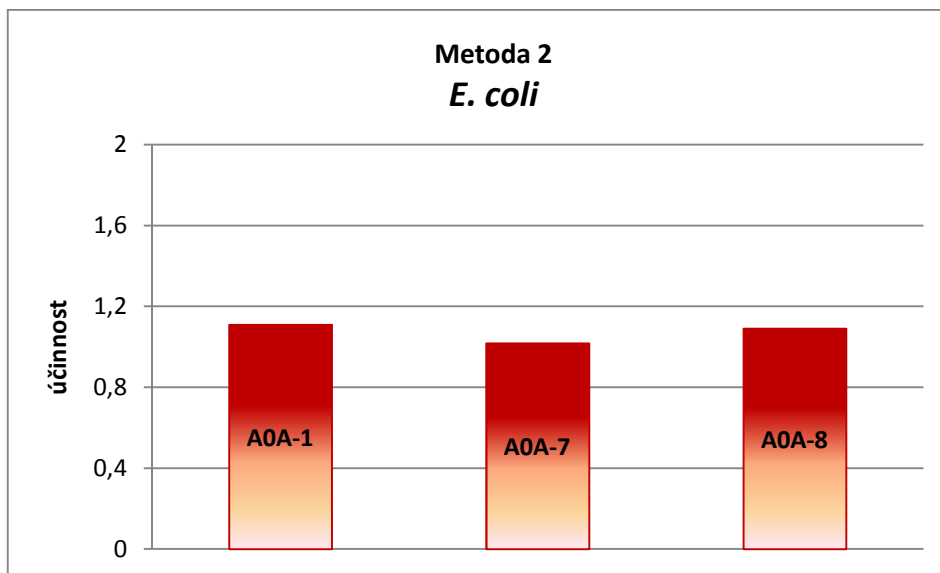


Graf 3.2.1-3 Nátěr A0A-8, počet CFU (%) *E. coli* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -1,09 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 1,09 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 92,1 \pm 4,4$
Koeficient korelace	$R = 0,901$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 6,05$

Tabulka 3.2.1-3

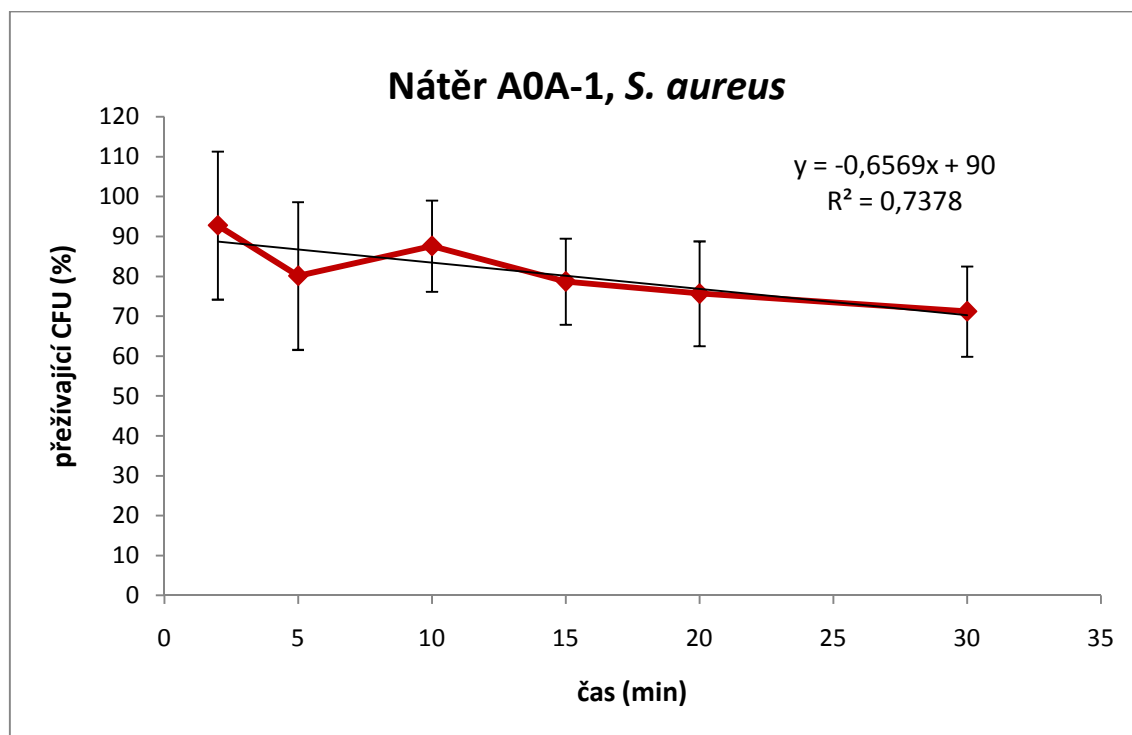
Uvedený sloupcový graf 3.2.1-4 porovnává antibakteriální účinek jednotlivých nátěrů na bakterii *E. coli*. Jde o nátěry, které byly ozařovány 30 minut před nanesením bakteriální suspenze. Z grafu lze za nejúčinnější považovat nátěr A0A-1, i přestože obsahuje 0 % ZnO.



Graf 3.2.1-4 Metoda 2, porovnání účinnosti nátěrů na bakterii *E. coli*.

3.2.2. Výsledky testování - *Staphylococcus aureus*

Graf s tabulkou 3.2.2-1 ukazuje, že vlivem kontaktu předem ozařovaného nátěru A0A-1 s bakteriální suspenzí *S. aureus* dochází k poklesu počtu CFU v čase.

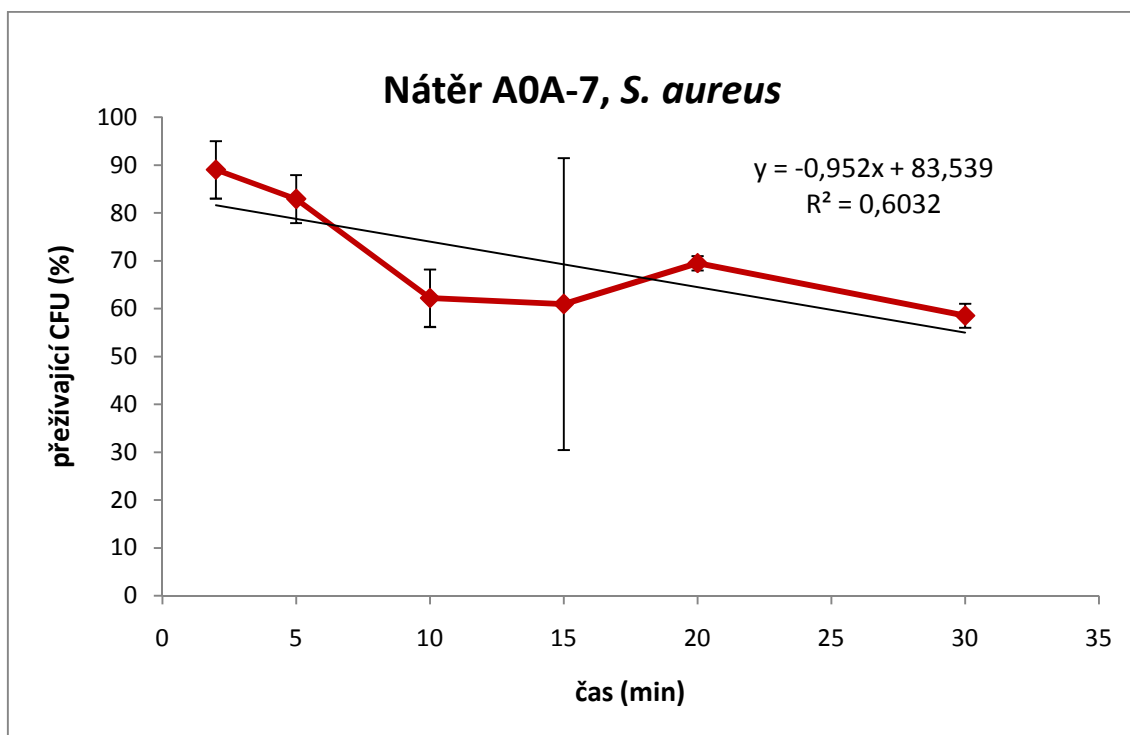


Graf 3.2.2-1 Nátěr A0A-1, počet CFU (%) *S. aureus* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,66 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,66 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 90,3 \pm 3,4$
Koeficient korelace	$R = 0,855$
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 4,66$

Tabulka 3.2.2-1

Z grafu a tabulky 3.2.2-2 je vidět, že v průběhu prvních 15 minut dochází k poklesu počtu CFU o jednu třetinu. Vzápětí je však tento pokles vystřídán mírným růstem. Tento náěr A0A-7 vykazuje menší účinek na bakterii *S. aureus* v porovnání se stejným náěrem avšak nezařovaným UV světlem.

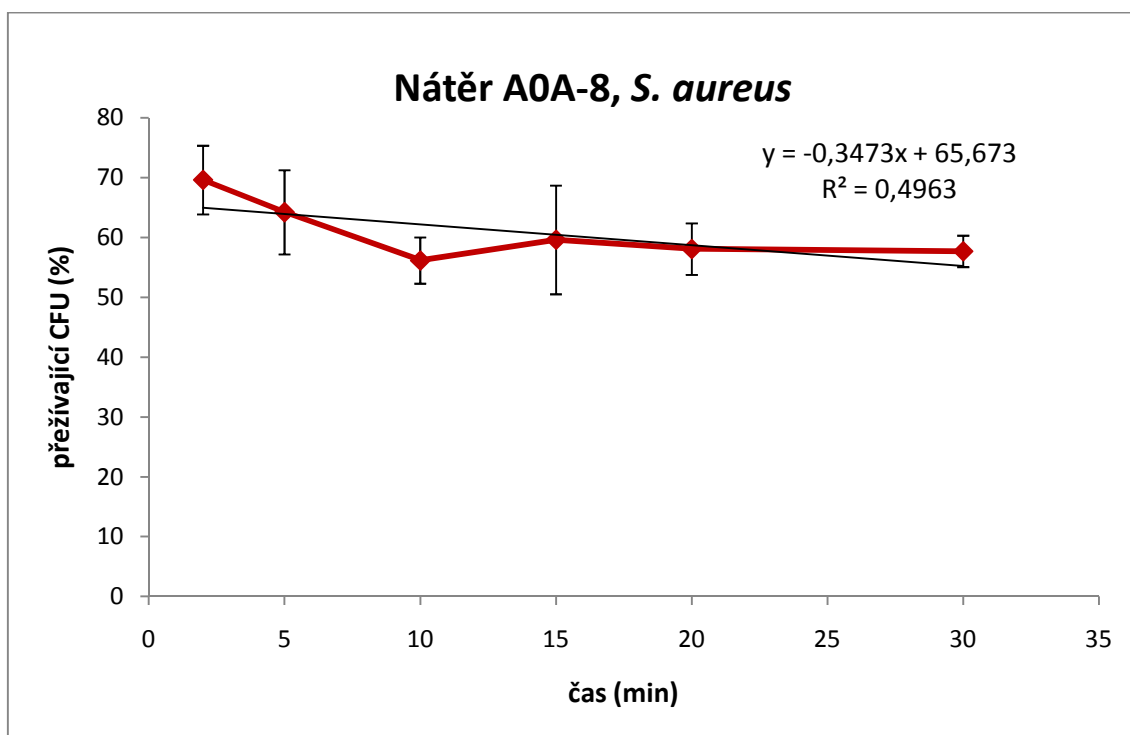


Graf 3.2.2-2 Nátěr A0A-7, počet CFU (%) *S. aureus* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,95 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,95 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 83,5 \pm 6,4$
Koeficient korelace	$R = 0,777$
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 8,92$

Tabulka 3.2.2-2

Z grafu a tabulky 3.2.2-3 je patrný velice mírný pokles počtu CFU v závislosti na rostoucím čase. Účinnost tohoto nátěru A0A-8 na bakterii *S. aureus* je asi o dvě třetiny nižší než v případě stejného nátěru, který však nebyl ozařován UV světlem.

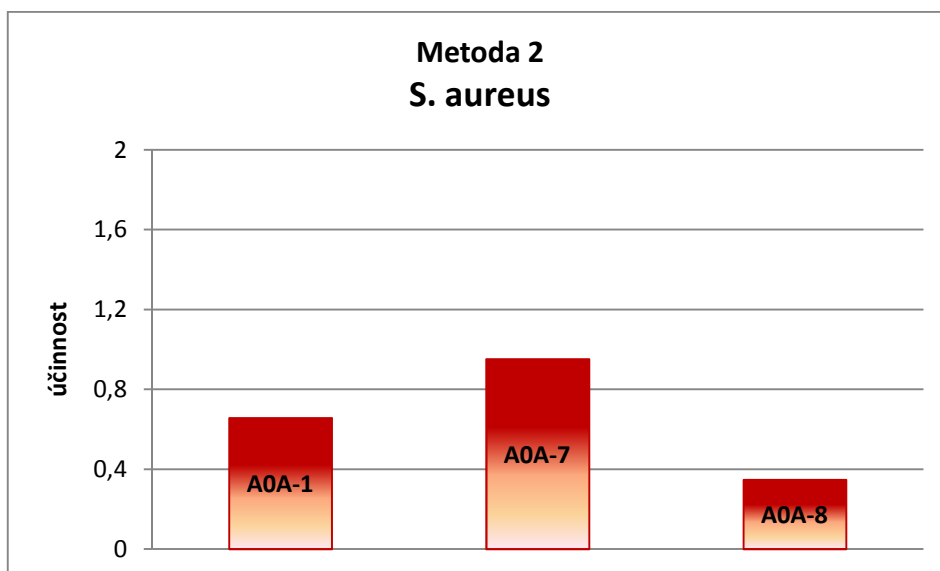


Graf 3.2.2-3 Nátěr A0A-8, počet CFU (%) *S. aureus* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,35 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,35 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 65,7 \pm 2,9$
Koeficient korelace	$R = 0,704$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 4,04$

Tabulka 3.2.2-3

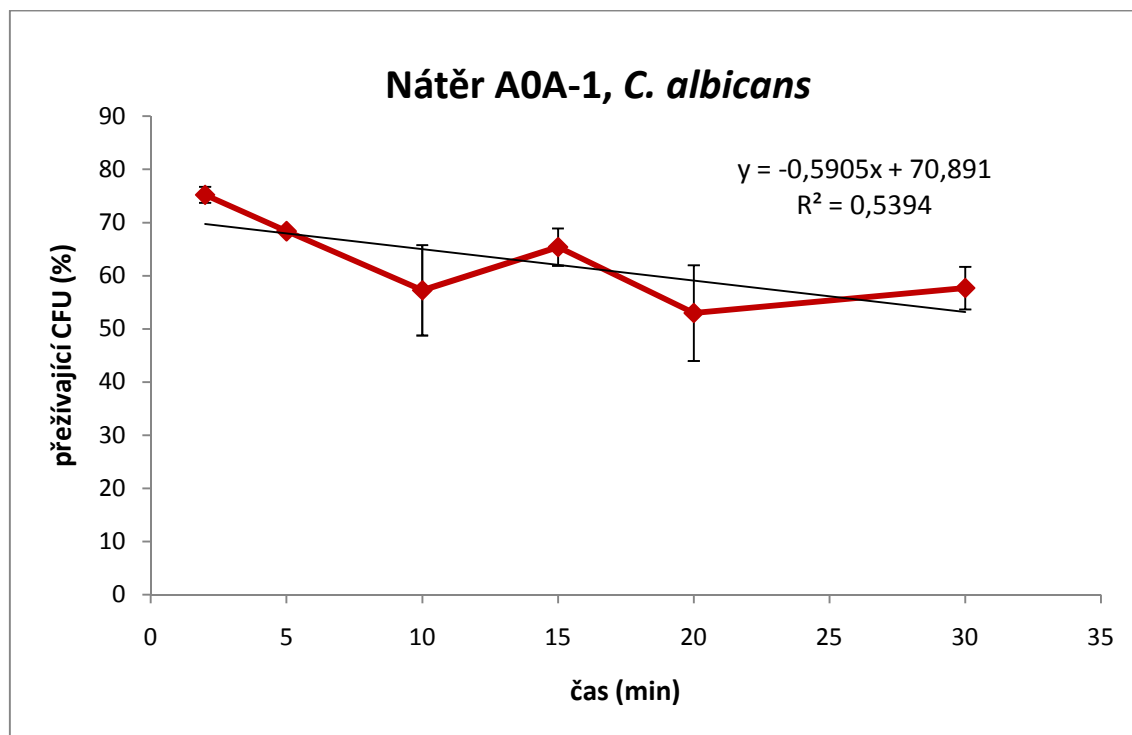
Níže uvedený sloupcový graf 3.2.2-4 porovnává účinnost jednotlivých nátěrů na bakterii *S. aureus*. Testované nátěry byly ozařovány UV světlem 30 minut před nanesením bakteriální suspenze. Z grafu je zřetelně vidět, že největší účinek na *S. aureus* má nátěr A0A-7 s obsahem 7,9% ZnO.



Graf 3.2.2-4 Metoda 2, porovnání účinnosti nátěrů na bakterii *S. aureus*.

3.2.3. Výsledky testování - *Candida albicans*

Z grafu a tabulky 3.2.3-1 je patrné, že kontaktem s předem ozařovaným nátěrem A0A-1 dochází k mírnému výkyvu v počtu CFU v čase. Tento nátěr je však na kvasinku *C. albicans* účinnější než stejný nátěr neozařovaný UV světlem.

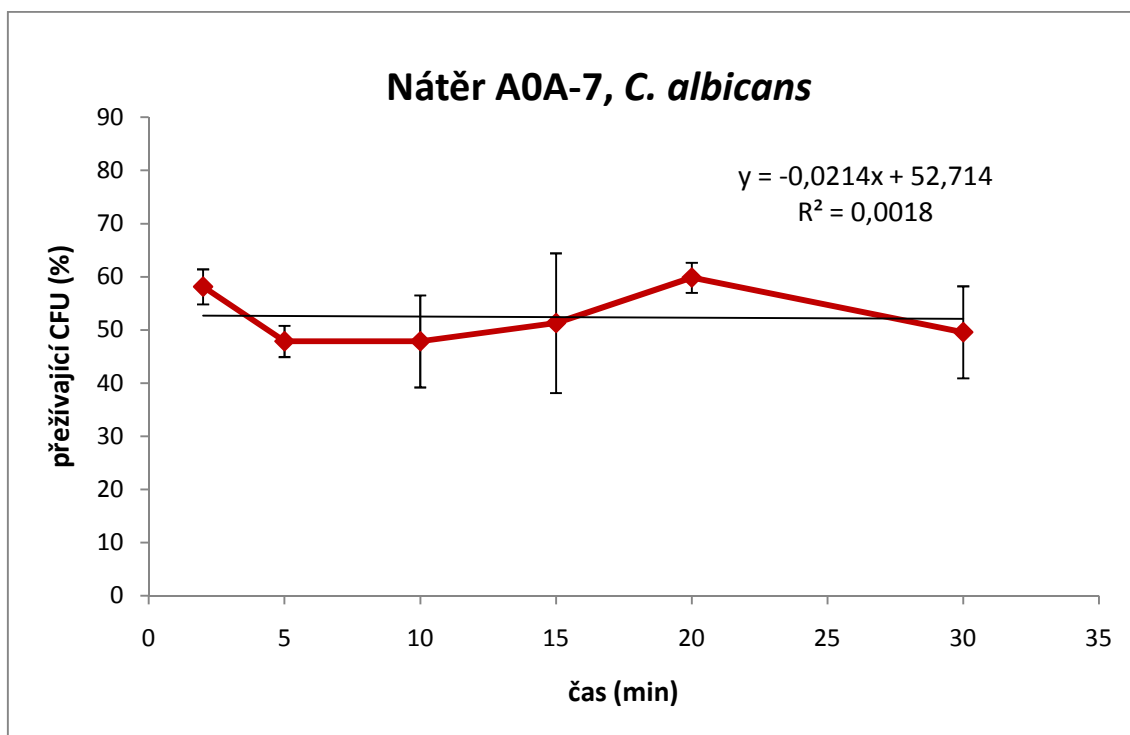


Graf 3.2.3-1 Nátěr A0A-1, počet CFU (%) *C. albicans* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,59 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,59 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 70,9 \pm 4,5$
Koeficient korelace	$R = 0,734$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 6,30$

Tabulka 3.2.3-1

Graf a tabulka 3.2.3-2 naznačují, že v prvních 10 minutách dochází k mírnému poklesu počtu CFU, což je vzápětí vystřídáno jeho pozvolným nárůstem. Tento nátěr má mnohonásobně menší účinek na kvasinku *C. albicans* než stejný nátěr neozařovaný UV světlem.

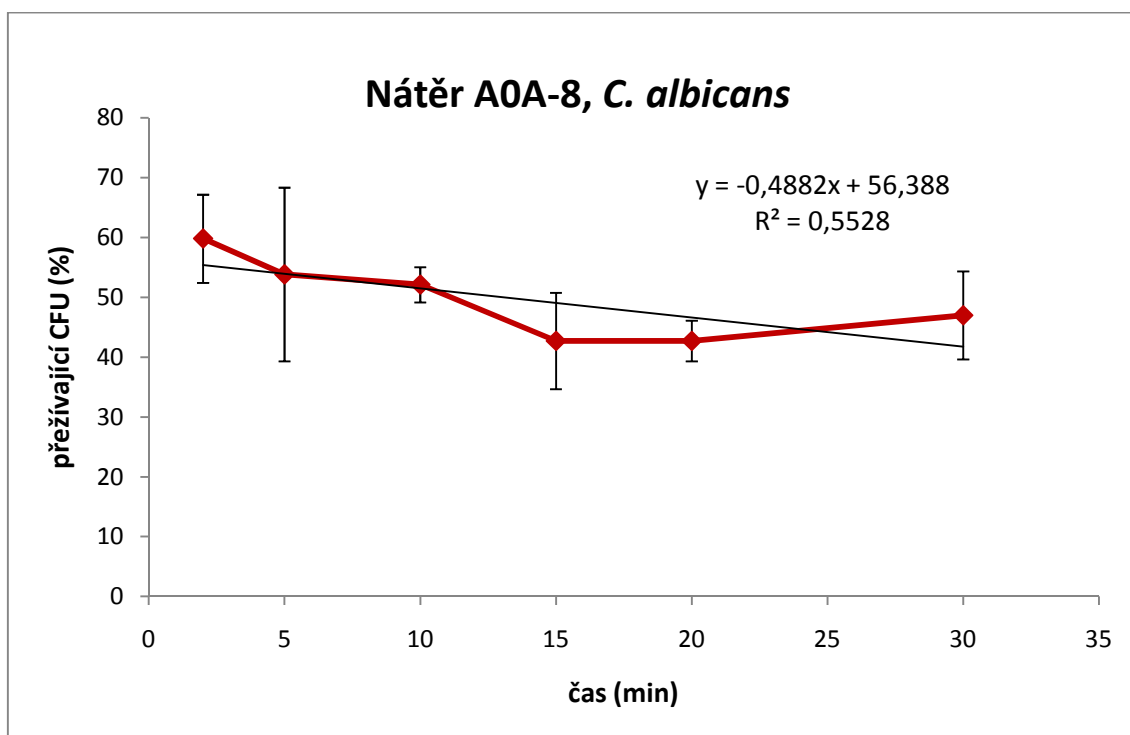


Graf 3.2.3-2 Nátěr A0A-7, počet CFU (%) *C. albicans* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,02 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,02 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 52,7 \pm 4,2$
Koeficient korelace	$R = 0,0420$
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 5,88$

Tabulka 3.2.3-2

Z grafu a tabulky 3.2.3-3 vyplývá, že kontaktem s předem ozařovaným nátěrem A0A-8 a kvasinkovou suspenzí dochází po 20 minutách k poklesu počtu CFU zhruba o třetinu.

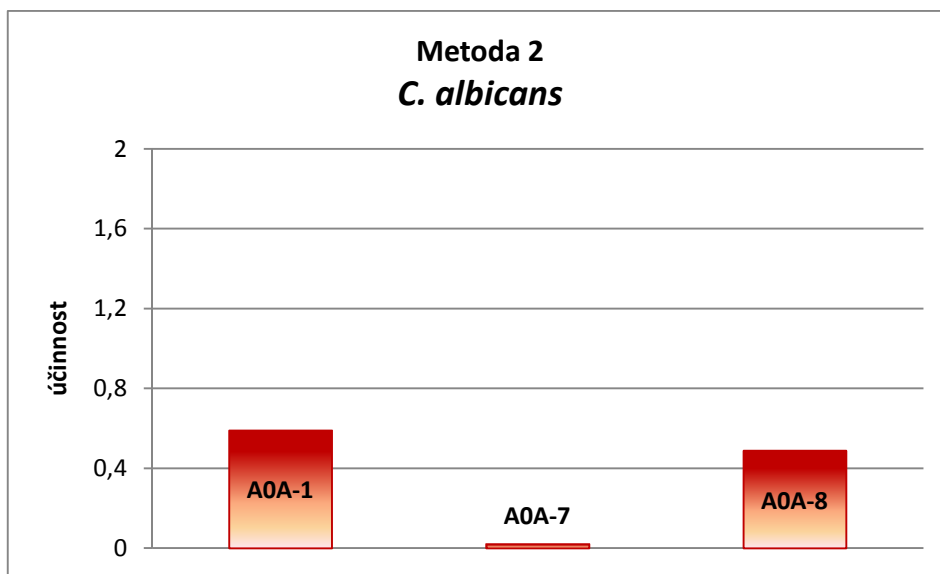


Graf 3.2.3-3 Nátěr A0A-8, počet CFU (%) *C. albicans* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,49 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,49 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 56,4 \pm 3,6$
Koeficient korelace	$R = 0,744$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 5,07$

Tabulka 3.2.3-3

Uvedený sloupcový graf 3.2.3-4 porovnává účinnost jednotlivých nátěrů na kvasinku *C. albicans*. Jedná se o nátěry, které byly ještě před nanášením kvasinkové suspenze 30 minut ozařovány UV světlem. Z grafu je vidět, že nejlepší účinek má za těchto podmínek nátěr A0A-1, i když obsahuje 0% fotokatalytického ZnO. Naopak na nátěr A0A-7 s obsahem 7,9% ZnO vykazuje kvasinka *C. albicans* nejmenší citlivost.

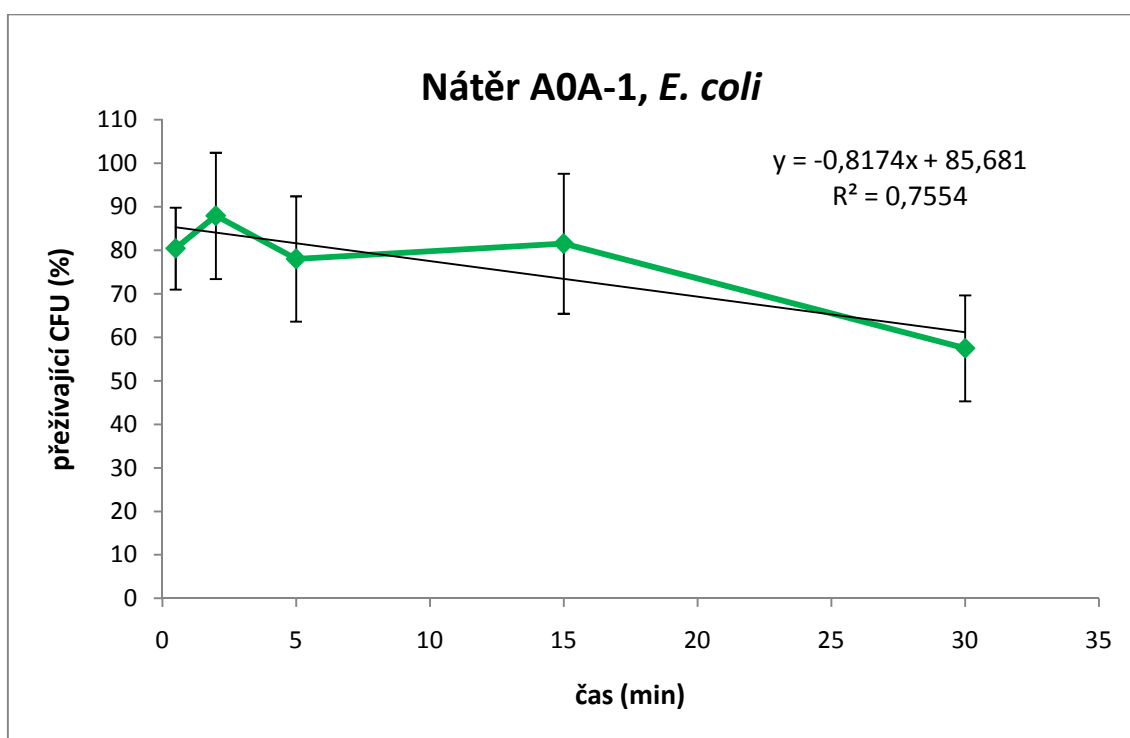


Graf 3.2.3-4 Metoda 2, porovnání účinnosti nátěrů na kvasinku *C. albicans*.

3.3. Metoda 3 – Nátěry ozařované UV světlem současně s nanesenou bakteriální suspenzí

3.3.1. Výsledky testování - *Escherichia coli*

Z níže uvedeného grafu a tabulky 3.3.1-1 vyplývá, že při kontaktu nátěru A0A-1 s bakteriální suspenzí *E. coli* dochází nepatrnému poklesu počtu CFU v závislosti na čase.

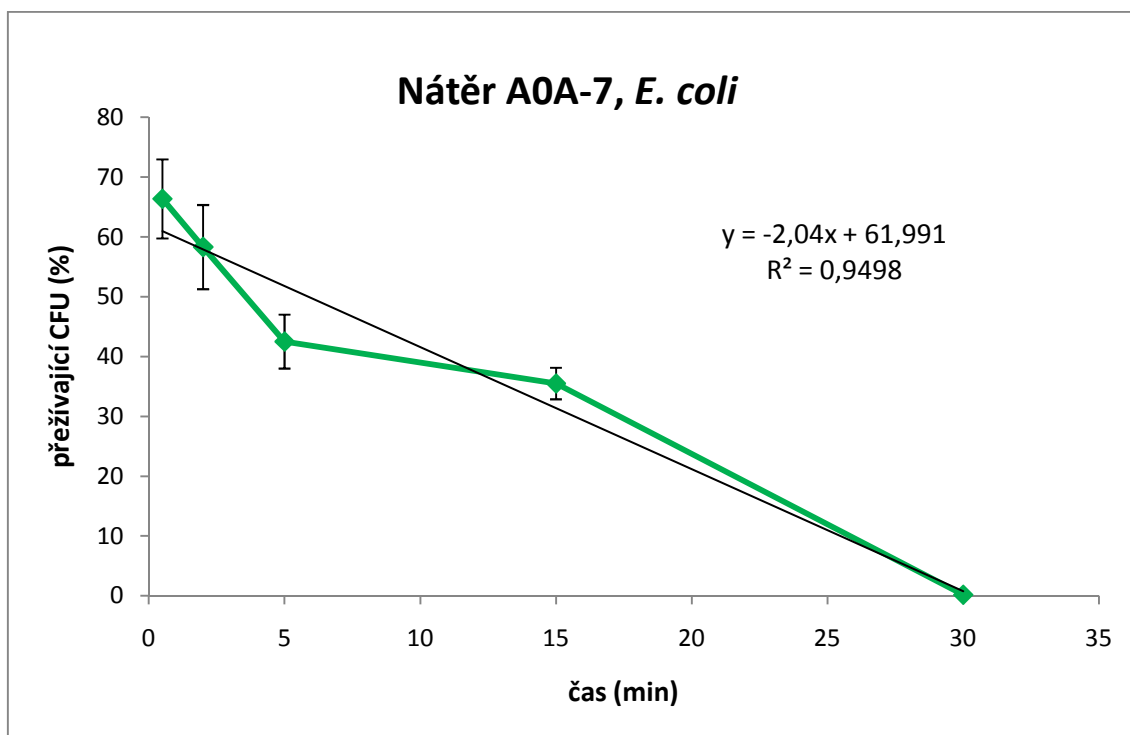


Graf 3.3.1-1 Nátěr A0A-1, počet CFU (%) *E. coli* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,82 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,82 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 85,7 \pm 4,1$
Koeficient korelace	$R = 0,869$
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 6,59$

Tabulka 3.3.1-1

Z grafu a tabulky 3.3.1-2 je patrné, že po 30 minutovém kontaktu nátěru A0A-7 s bakteriální suspenzí *E. coli* dochází k poklesu počtu CFU o 100 %. V tomto případě má tento nátěr nejlepší antimikrobiální účinek v porovnání se stejnými nátěry testovanými jinými metodami.

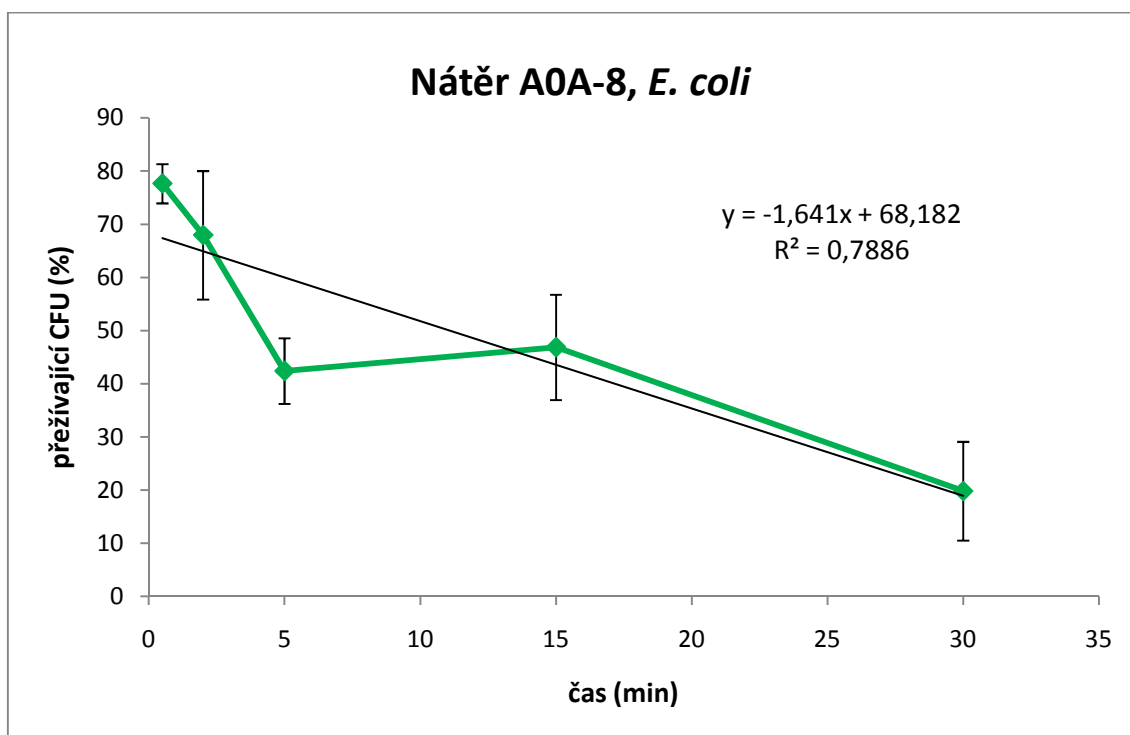


Graf 3.3.1-2 Nátěr A0A-7, počet CFU (%) *E. coli* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -2,04 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 2,04 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 62,0 \pm 4,1$
Koeficient korelace	$R = 0,975$
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 6,65$

Tabulka 3.3.1-2

Z grafu a tabulky 3.3.1-3 vyplývá, že v přítomnosti nátěru A0A-8 dochází k prudkému poklesu počtu CFU v čase. Tento nátěr má největší schopnost inhibovat růst *E. coli* v porovnání se stejnými nátěry testovanými podle jiných metod.

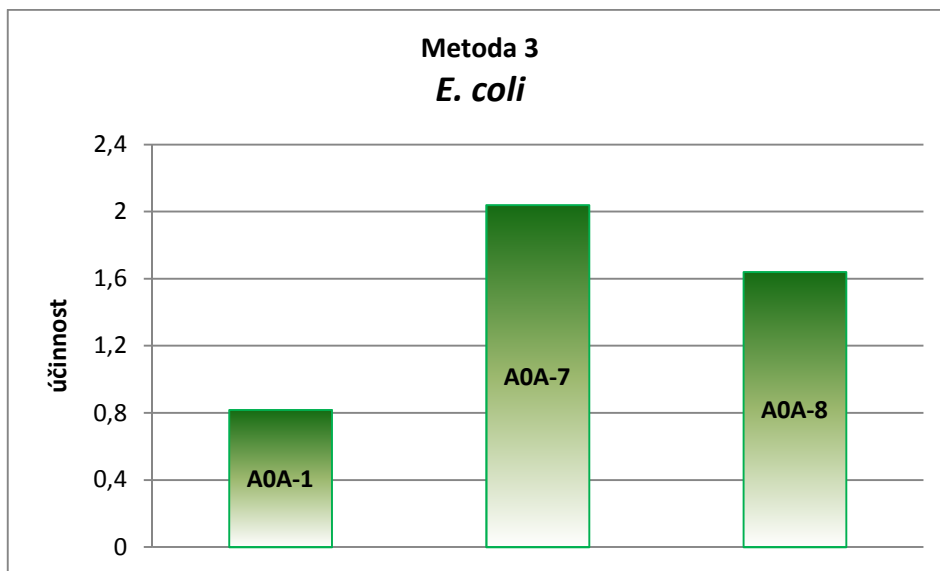


Graf 3.3.1-3 Nátěr A0A-8, počet CFU (%) *E. coli* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -1,64 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 1,64 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 68,2 \pm 7,5$
Koeficient korelace	$R = 0,888$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 12,0$

Tabulka 3.3.1-3

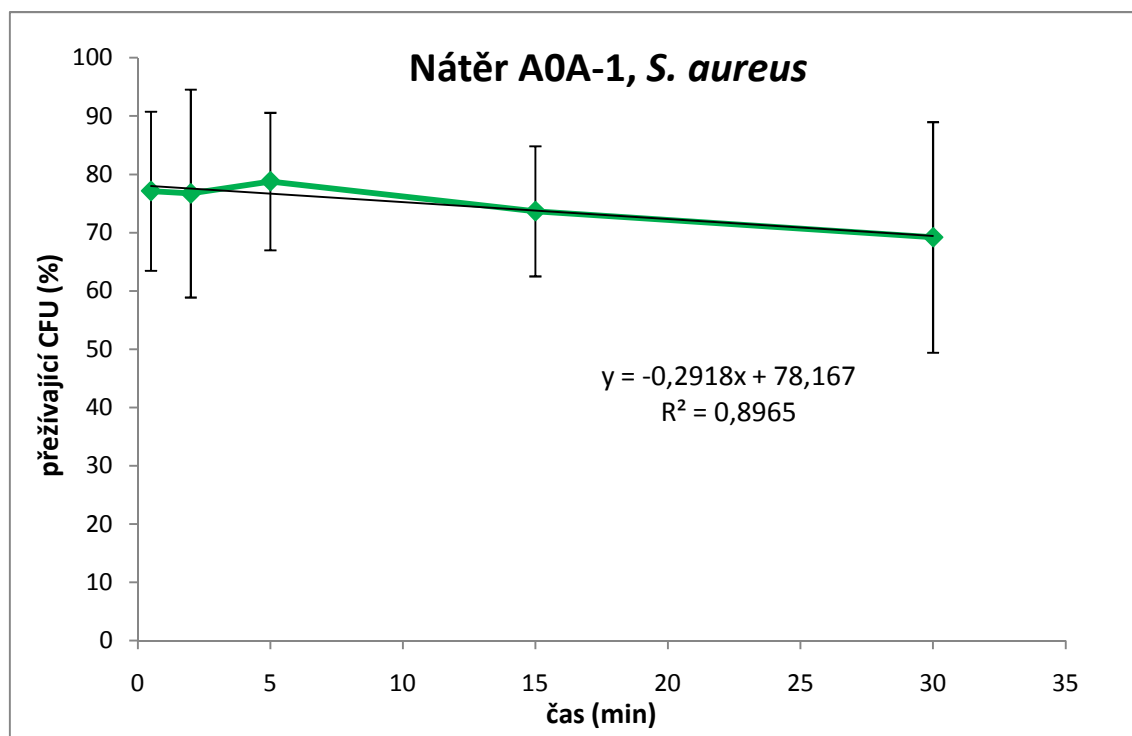
Sloupcový graf 3.3.1-4 porovnáva antibakteriální účinnost jednotlivých nátěrů na *E. coli*. Jedná se o nátěry, které byly ozařovány UV světlem současně s nanesenou bakteriální suspenzí. Z níže uvedeného grafu vyplývá, že nejlepší antimikrobiální účinnost na *E. coli* má nátěr A0A-7 s obsahem 7,9 % ZnO.



Graf 3.3.1-4 Metoda 3, porovnání účinnosti nátěrů na bakterii *E. coli*.

3.3.2. Výsledky testování - Staphylococcus aureus

Z grafu a tabulky 3.3.2-1 je zřejmý velice mírný pokles počtu CFU v závislosti na čase. Tento nátěr A0A-1 má na bakterii *S. aureus* nejmenší antibakteriální účinek v porovnání se stejnými nátěry testovanými podle jiných metod.

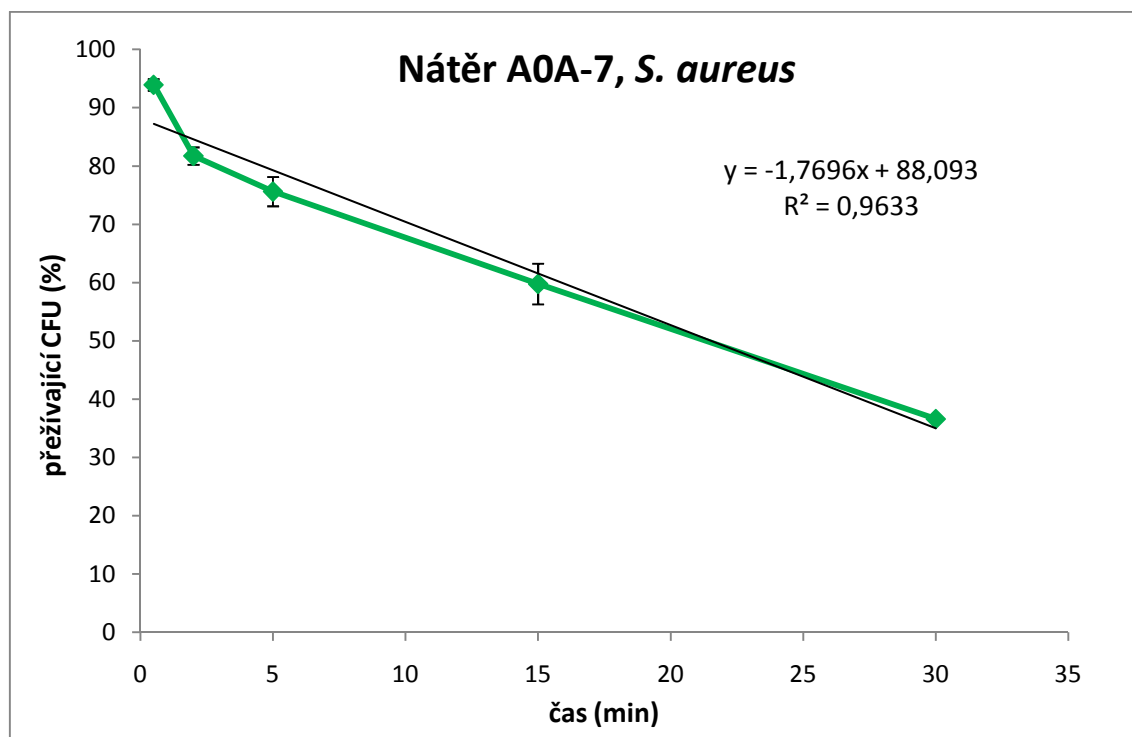


Graf 3.3.2-1 Nátěr A0A-1, počet CFU (%) *S. aureus* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,299 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,299 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 78,3 \pm 0,93$
Koeficient korelace	$R = 0,943$
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 1,50$

Tabulka 3.3.2-1

Graf s tabulkou 3.3.2-2 znázorňuje vliv kontaktu nátěru A0A-7 s bakteriální suspenzí, kdy dochází k celkovému poklesu počtu CFU v čase o více než polovinu. Tento nátěr A0A-7, ozařovaný UV světlem současně s bakteriální suspenzí působí nejúčinněji na bakterii *S. aureus*.

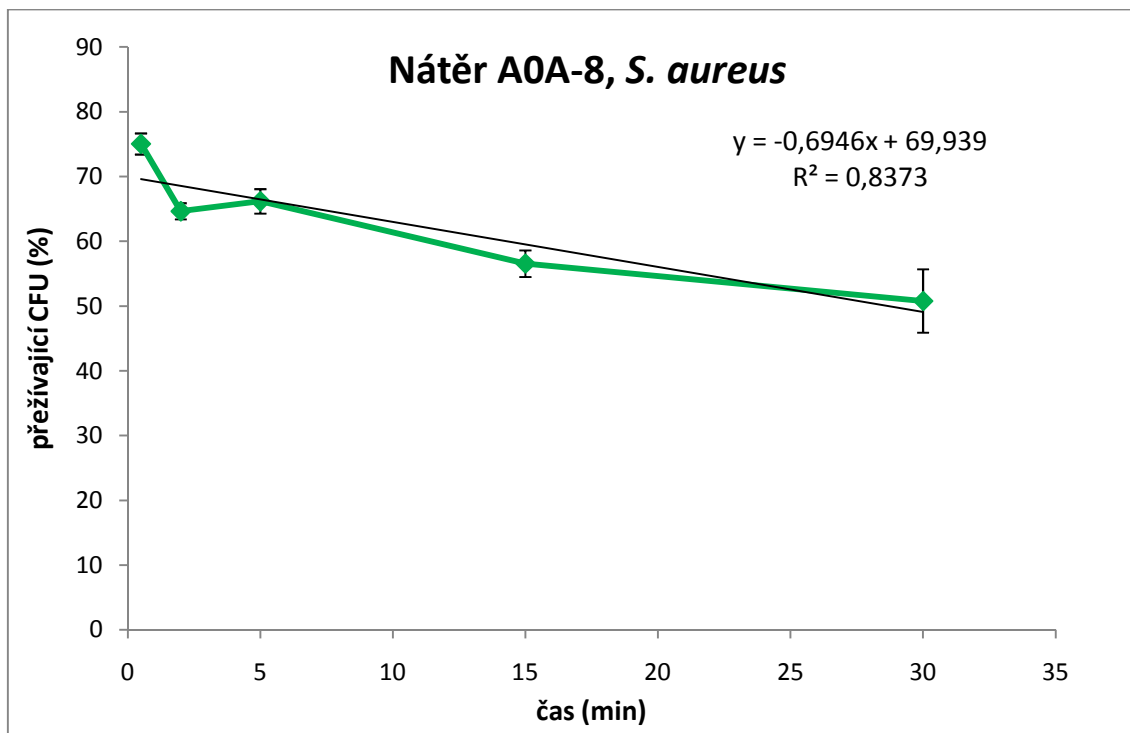


Graf 3.3.2-2 Nátěr A0A-7, počet CFU (%) *S. aureus* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -1,77 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 1,77 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 88,1 \pm 3,0$
Koeficient korelace	$R = 0,982$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 4,89$

Tabulka 3.3.2-2

Z grafu a tabulky 3.3.2-3 je patrné, že za současného ozařování nátěru A0A-8 s bakteriální suspenzí dochází k menšímu poklesu počtu CFU v závislosti na čase.

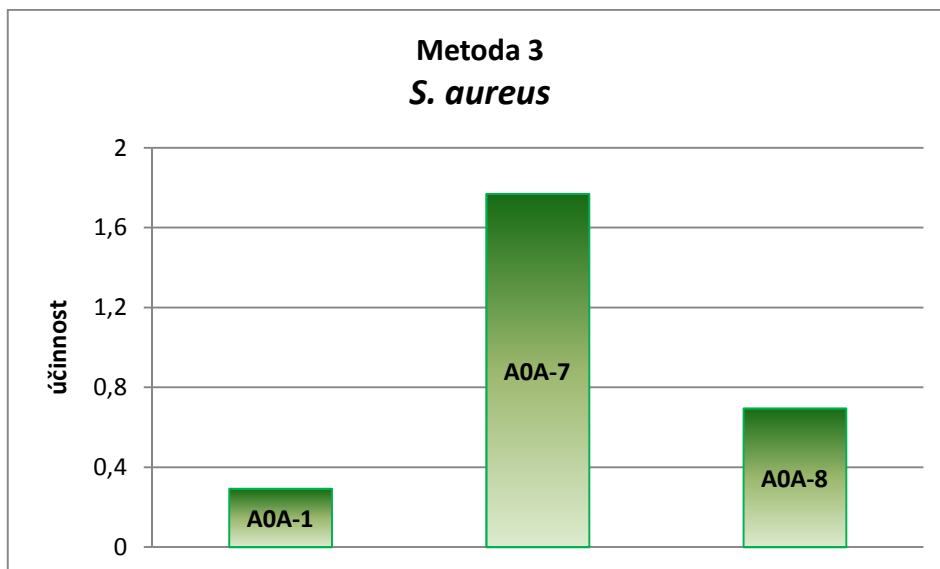


Graf 3.3.2-3 Nátěr A0A-8, počet CFU (%) *S. aureus* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,69 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,69 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 69,9 \pm 2,7$
Koeficient korelace	$R = 0,915$
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 4,34$

Tabulka 3.3.2-3

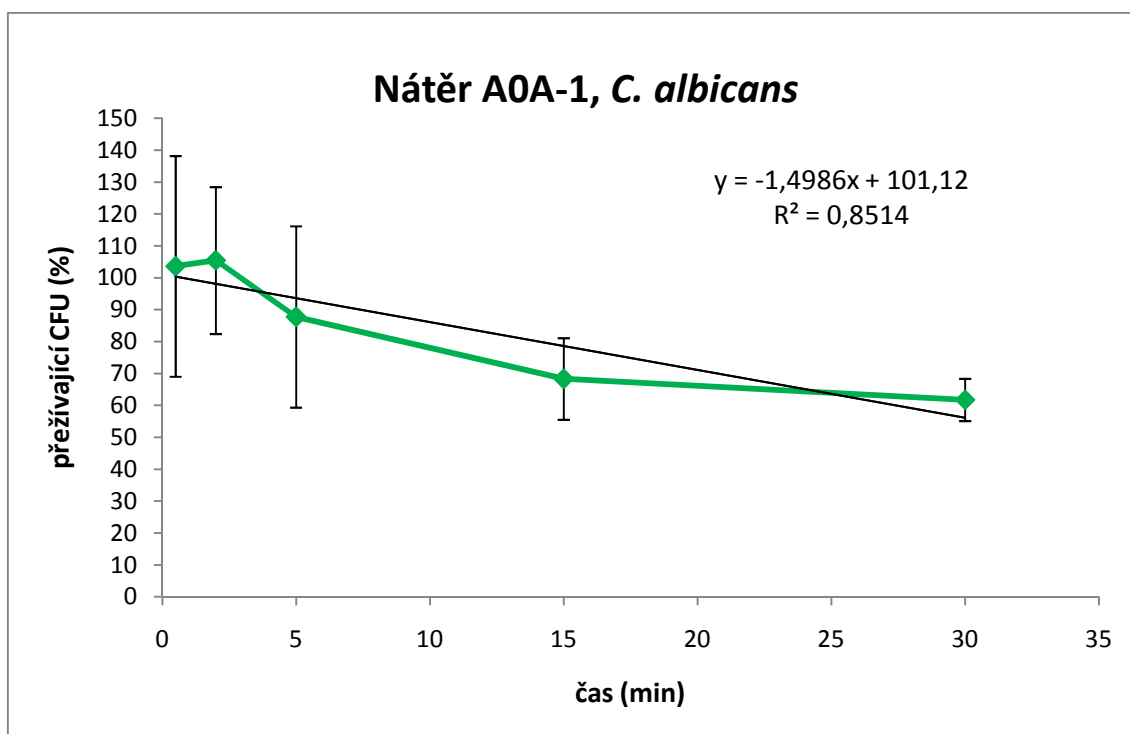
Sloupcový graf 3.3.2-4 porovnává účinnost jednotlivých nátěrů na bakterii *S. aureus*. Všechny tyto nátěry byly při testování ozařovány UV světlem současně s bakteriální suspenzí. Výsledky ukazují, že jednoznačně nejlepší antimikrobiální aktivitu má za těchto podmínek nátěr A0A-7 s obsahem 7,9% ZnO.



Graf 3.3.2-4 Metoda 3, porovnání účinnosti nátěrů na bakterii *S. aureus*.

3.3.3. Výsledky testování - *Candida albicans*

Z grafu a tabulky 3.3.3-1 je vidět, že kontaktem nátěru A0A-1 s kvasinkovou suspenzí dochází po 30 minutách k poklesu počtu CFU téměř o polovinu. Tento nátěr, ozařovaný současně s kvasinkovou suspenzí, vykazuje nejlepší účinnost na *C. albicans* v porovnání se stejnými nátěry testovanými podle jiných metod.

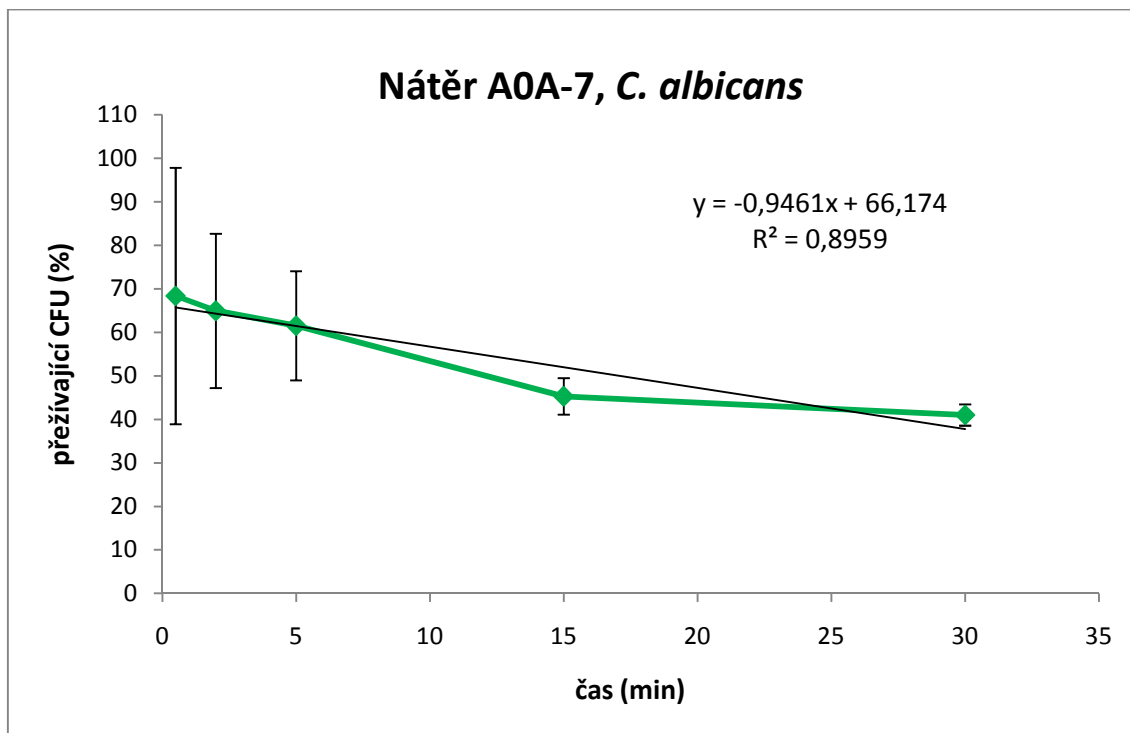


Graf 3.3.3-1 Nátěr A0A-1, počet CFU (%) *C. albicans* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -1,50 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 1,50 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 101 \pm 5,5$
Koeficient korelace	$R = 0,921$
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 8,93$

Tabulka 3.3.3-1

Z grafu a tabulky 3.3.3-2 vyplývá, že v případě nátěru A0A-7 současně ozařovaného s kvasinkovou suspenzí dochází k mírnému poklesu počtu CFU v čase.

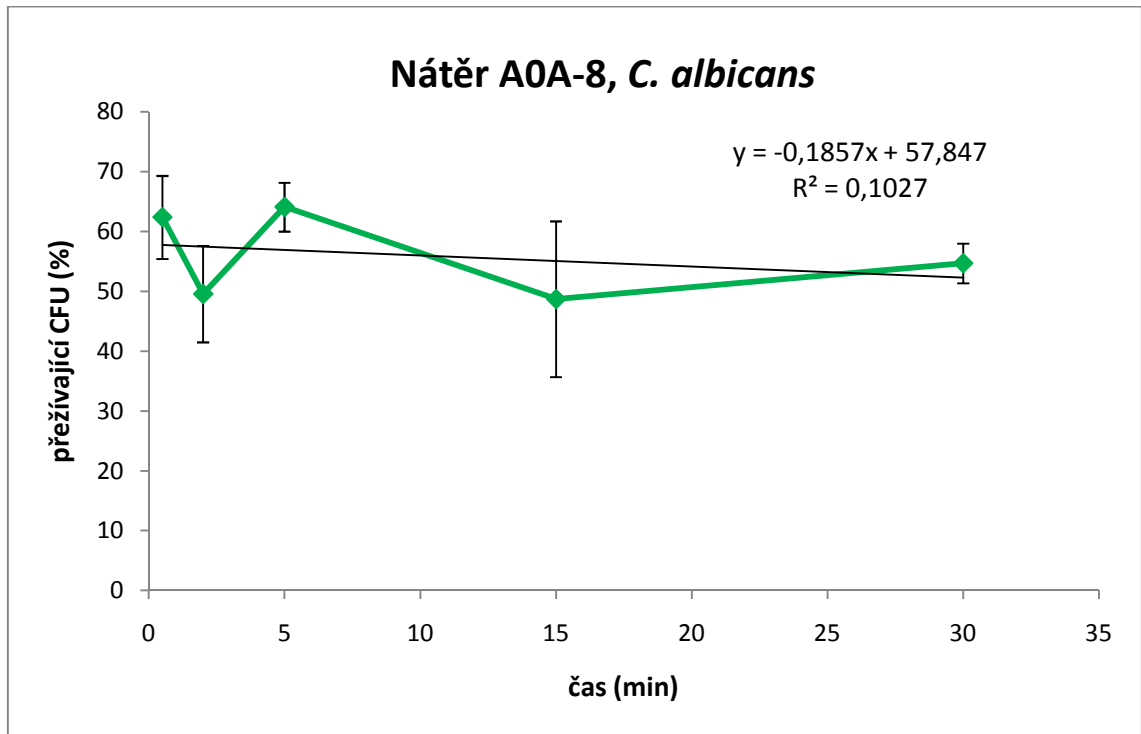


Graf 3.3.3-2 Nátěr A0A-7, počet CFU (%) *C. albicans* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,95 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,95 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 66,2 \pm 2,8$
Koeficient korelace	$R = 0,946$
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 4,57$

Tabulka 3.3.3-2

Graf a tabulka 3.3.3-3 ukazují, že i přes výkyvy v počtu CFU dochází nakonec k jejich mírnému poklesu. V porovnání s ostatními testovacími metodami má tento nátěr A0A-8 ozařovaný současně s kvasinkovou suspenzí nejmenší účinek na *C. albicans*.

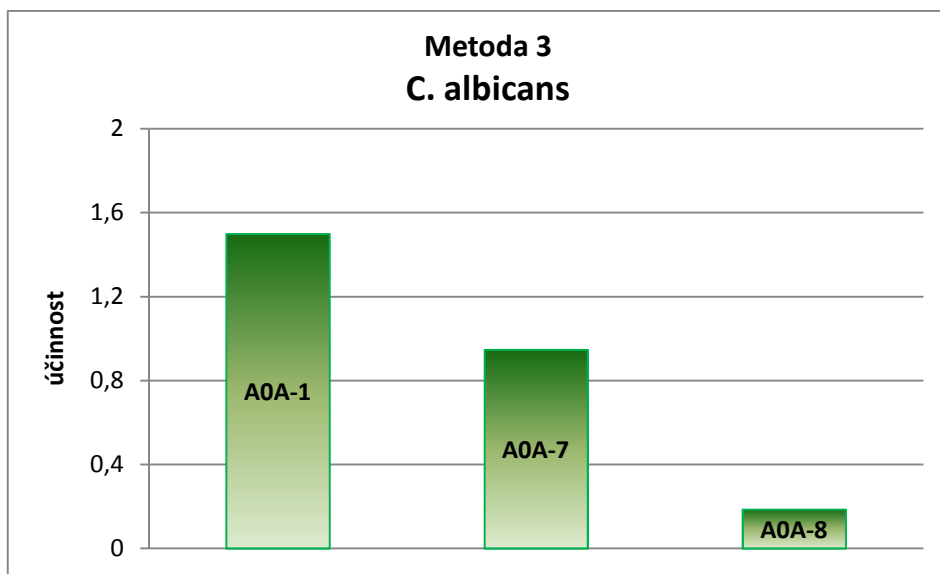


Graf 3.3.3-3 Nátěr A0A-8, počet CFU (%) *C. albicans* v závislosti na čase.

Regresní funkce	$y = kx + q$
Směrnice	$k = -0,19 \pm 0,036$
Účinnost ($-1 \times k$)	$\eta = 0,19 \pm 0,036$
Absolutní člen	$q = 57,8 \pm 4,8$
Koeficient korelace	$R = 0,320$
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 7,78$

Tabulka 3.3.3-3

Níže uvedený sloupcový graf 3.3.3-4 porovnává účinnost jednotlivých nátěrů na kvasinku *C. albicans*. V průběhu testování byly tyto nátěry ozařovány UV světlem současně s kvasinkovou suspenzí. Z grafu je jednoznačně vidět, že největší účinek vykazuje za daných podmínek nátěr A0A-1, a to i když neobsahuje fotokatalytický ZnO.



Graf 3.3.3-4 Metoda 3, porovnání účinnosti nátěrů na kvasinku *C. albicans*.

4. Diskuse

V této práci bylo naší snahou na základě vlivu UV záření porovnat antimikrobiální účinky několika vzorků malířských nátěrových hmot. Ty byly vyrobeny na bázi akrylátové disperze a lišily se pouze jinou koncentrací fotokatalyticky aktivního ZnO. Zabývali jsme se tedy i vztahem mezi koncentrací ZnO a jeho antimikrobiálními účinky. Poté jsme provedli vyhodnocení účinnosti těchto jednotlivých nátěrů, a to s ohledem na metodu testování i na použitý mikroorganismus.

Uvedené grafy 4.1.-4.3. znázorňují účinnost jednotlivých nátěrů, testovaných podle tří odlišných metod, na konkrétní mikroorganismus. Grafy 4.4. pak vyjadřují s ohledem na metodu testování celkovou účinnost nátěrů na všechny testované mikroorganismy.

Z grafů 4.1. je na první pohled vidět, že nejlepší účinnost na bakterii *E. coli* má současně ozařovaný nátěr A0A-7 s obsahem 7,9 % ZnO. V případě tohoto nátěru došlo během 30 minut ozařování s bakteriální suspenzí *E. coli* k úplné inhibici jejího růstu. Také po celkovém zhodnocení výsledků jsme zjistili, že účinnost současně ozařovaných nátěrů na *E. coli* se jeví jako nejlepší. Pravděpodobně zde určitou roli sehrálo i to, že přítomné UV záření mohlo vedle aktivace ZnO v nátěrech působit ještě navíc baktericidně. Rovněž lze vzít v úvahu také zvýšenou teplotu při ozařování nátěrů ze zdroje UV světla, vzdáleného cca 10 cm od testovaných vzorků. Po celkovém hodnocení účinnosti nátěrů na *E. coli* jsme došli k závěru, že nejlepší účinek mají nátěry s obsahem 7,9 % ZnO (A0A-7). Zajímavé je, že nátěry neobsahující ZnO (A0A-1) vykazovaly celkově lepší účinnost na *E. coli* než nátěry obsahující 11,6 % ZnO (A0A-8). Hochmannová a Vytřasová (2010) ve své studii uvádějí, že nejvyšší koncentrace nemusí vždy znamenat i nejvyšší inhibici růstu mikroorganismů. To je také v souladu se zkušenostmi získanými již dříve při hodnocení antimikrobiální účinnosti lazurovacích laků na dřevo.

Z grafů 4.2. je patrné, že nejlepší antimikrobiální aktivitu vůči bakterii *S. aureus* vykazuje, stejně jako u *E. coli*, současně ozařovaný nátěr A0A-7 s obsahem 7,9% ZnO. Po 30 minutovém kontaktu tohoto nátěru s bakteriální suspenzí došlo k poklesu počtu CFU téměř o dvě třetiny. Jako celkově nejúčinnější nátěry na *S. aureus* se jeví ty, které nebyly ozařovány UV světlem. Lze se domnívat, že běžné laboratorní osvětlení

postačilo k aktivaci ZnO obsaženého v nátěrech, což by odpovídalo výsledkům studie, která se zabývala tím, zda je možné aktivovat ZnO v běžné laboratoři osvětlené zářivkami. Bylo zjištěno, že ZnO může být aktivován už tímto malým množstvím UV světla vyzařovaným zářivkami nebo běžným viditelným světlem (Jones et al., 2008). K podobným závěrům dospělo i mnoho dalších autorů. Otázkou tedy zůstává, jak dlouhá doba je potřebná k aktivaci nátěrů obsahujících ZnO za podmínek běžného laboratorního osvětlení. Z jedné studie vyplývá, že při ozáření viditelným světlem dochází v závislosti na délce ozáření k mnohem menší fotokatalytické aktivitě nátěrů, obsahujících nanočástice ZnO, než je tomu po ozáření UV světlem. (Hochmannova a Vytrasova, 2010a). V našem výzkumu byly nátěry vystaveny těmto běžným laboratorním podmínkám pouze po dobu 30 minut. Je tedy možné, že v tomto případě by mohlo dojít k ještě větší aktivaci po delší době. Po vyhodnocení celkové účinnosti nátěrů na bakterii *S. aureus* jsme zjistili, že nejlepší antibakteriální účinky vykazovaly opět nátěry s obsahem 7,9% ZnO (A0A-7). Nejhorší účinnost pak měly nátěry neobsahující ZnO (A0A-1).

Z grafů 4.3. vyplývá, že nejlepší antimikrobiální účinek na kvasinku *C. albicans* vykazuje současně ozařovaný nátěr A0A-1, i přestože neobsahuje fotokatalytický ZnO. Je také patrné, že celkově nejlepší účinnost na *C. albicans* mají současně ozařované nátěry. Lze se tedy domnívat, že zde určitou roli sehrálo samotné UV záření, které mohlo navíc působit baktericidně. Z výsledků rovněž vyplývá, že celkově nejlepší účinek na kvasinku *C. albicans* mají nátěry neobsahující fotokatalyticky aktivní ZnO (A0A-1). Studie zabývající se vhodnou koncentrací nanočástic ZnO v interiérových nátěrech uvádí, že úplná inhibice plísně *Aspergillus niger* byla pozorována u nátěrů s 5 obj.% a 7,5 obj.% ZnO a u plísně *Penicillium chrysogenum* až při koncentraci 10 obj.% ZnO (Hochmannová a Vytrasová, 2010b). Je tedy patrné, že inhibiční koncentrace ZnO se u různých druhů hub liší. Další studie také ukazuje že, aktivita nanočástic ZnO je závislá na koncentraci a vlivem jejího dalšího zvyšování tak může dojít i ke zvýšení rezistence nanočástic vůči fungálnímu růstu (Sharma et al., 2010). To může být také jeden z důvodů, proč nátěry A0A-8 obsahující 11,6% ZnO byly nejméně účinné na kvasinku *C. albicans*.

Grafy 4.4. znázorňují celkovou účinnost nátěrů na testované mikroorganismy v rámci jednotlivých metod testování. V případě nátěrů neozařovaných UV světlem má největší účinnost na mikroorganismy nátěr A0A-7 s obsahem 7,9 % ZnO (viz. 4.4-1). U

nátěrů předem ozařovaných je to potom nátěr A0A-1 neobsahující fotokatalytický ZnO (viz. 4.4-2). Ze současně ozařovaných má nejlepší antimikrobiální účinek nátěr A0A-7 s obsahem 7,9 % ZnO (viz. 4.4-3). Na základě všech získaných výsledků můžeme říci, že celkově neúčinnější na všechny testované mikroorganismy byl nátěr A0A-7 obsahující 7,9 % ZnO. To by se shodovalo se studií, ve které byla připravena řada nátěrů s různou objemovou koncentrací ZnO v rozmezí od 2,5 obj.% do 10 obj.%. Všechny koncentrace včetně nejnižší použité, tj. 2,5 obj.% zcela inhibovaly růst bakterií *E. coli*, *P. aeruginosa* a *S. aureus* (Hochmannová a Vytřasová, 2010b). Výše uvedené také souhlasí s výsledky jiného testování, které ukázalo, že nanočástice ZnO v koncentraci mezi 3 až 10 mM způsobily 100% inhibici bakteriálního růstu (Brayner et al., 2006). Z grafů 4.4. je patrné, že celková účinnost nátěrů A0A-1 (0 % ZnO) a A0A-8 (11,6 % ZnO) je nízká a zároveň i velice podobná. Tento výsledek opět potvrzuje jeden ze závěrů výše zmíněné studie, že nejvyšší koncentrace nemusí vždy znamenat i největší inhibici růstu mikroorganismů.

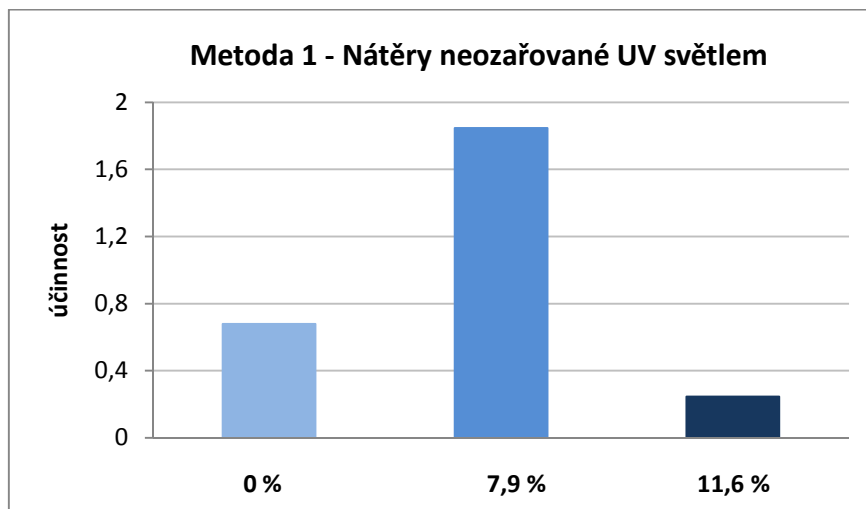
Při porovnání jednotlivých metod testování zjišťujeme, že celkově nejlepší účinnost mají současně ozařované nátěry. Lze tedy konstatovat, že UV záření má pozitivní vliv na antimikrobiální účinky nátěrů. Z grafů je také patrné, že vzhledem k použité metodě a v rámci působení na jednotlivé mikroorganismy mnohdy docházelo ke značným výkyvům v účinnosti nátěrů. Může to být důsledkem toho, že v homogenní bakteriální suspenzi, v průběhu testování nanosené do vzorkovnice, došlo ke shlukování mikrobů i přes neustálé třepání. Shluky mikrobů tak byly nerovnoměrně rozprostřeny v suspenzi takže záleželo na tom, z které části byl daný vzorek odebrán, což se mohlo významně podílet na zkreslení výsledků. Stejně tak nelze ani vyloučit možnost, že došlo v průběhu testování kadhezi mikrobů na povrch nátěru.

Výsledky také ukazují, že testované nátěry byly účinnější na gramnegativní bakterii *E. coli* než na grampozitivní bakterii *S. aureus*. To je v souladu s poznatkem, že grampozitivní bakterie mají v porovnání s gramnegativními bakteriemi silnější peptidoglykanovou buněčnou stěnu a jsou tak méně náchylné k membránovému poškození (Nair et al., 2009). Stejný autor ale také uvádí, že pro vytvořené reaktivní formy kyslíku jsou oba typy buněčných membrán stejně propustné. Rozdíly v citlivosti tak mohou být spojeny s intracelulárními procesy (Nair et al., 2009). Je tedy patrné, že rozdíl v antibakteriální aktivitě proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím není stále úplně jasný. Také mnohé studie, zkoumající toxicitu ZnO ke grampozitivním

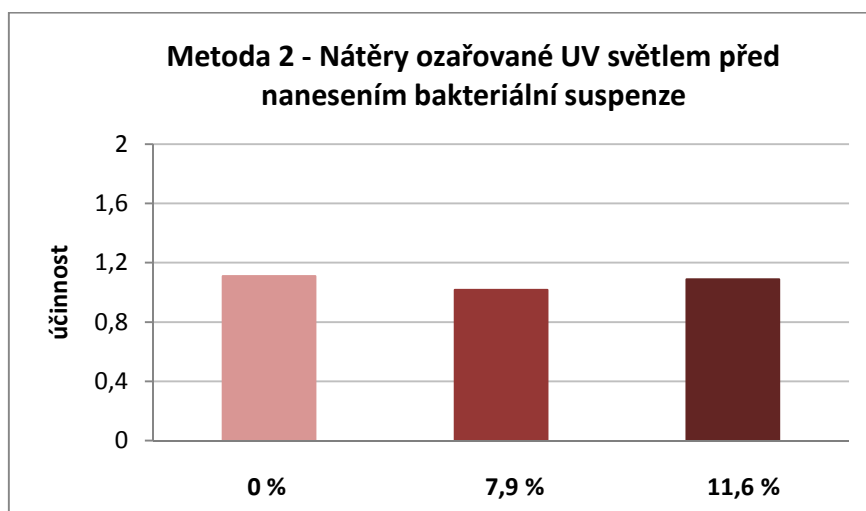
a gramnegativním bakteriím, přicházejí s odlišnými výsledky. Ze všech mikroorganismů použitých k testování měla nejmenší citlivost ke zkoumaným nátěrům kvasinka *C. albicans*. Může tomu být i díky její buněčné struktuře, která se od bakteriální významně liší.

Je také třeba říci, že antimikrobiální účinky nátěrů obsahující ZnO mohou být ovlivněny i jinými faktory. Velkou roli hraje zřejmě pojivový systém, celková objemová koncentrace nátěrové hmoty, obsah oxidu a jeho rozptýlení v nátěru, typ a obsah ostatních pigmentů, plniv a aditiv a také morfologie povrchu nátěru (Hochmannová a Vytřasová, 2010b). Mnohými faktory jsme se však nemohli zabývat, jelikož nám nebyly prozrazeny firmou, která nám dodala vzorky malířských nátěrů.

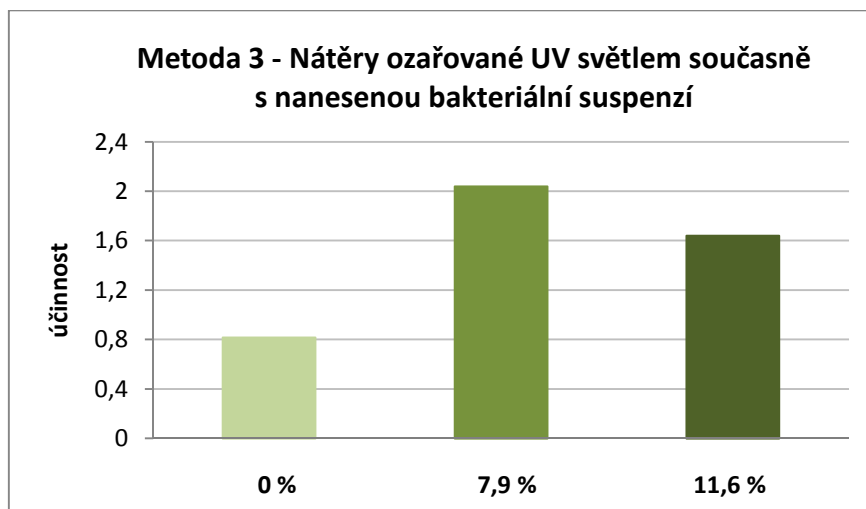
4.1. Účinnost nátěrů na bakterii *Escherichia coli*



Graf 4.1-1 Metoda 1, antimikrobiální účinnost nátěrů na *E. coli*.

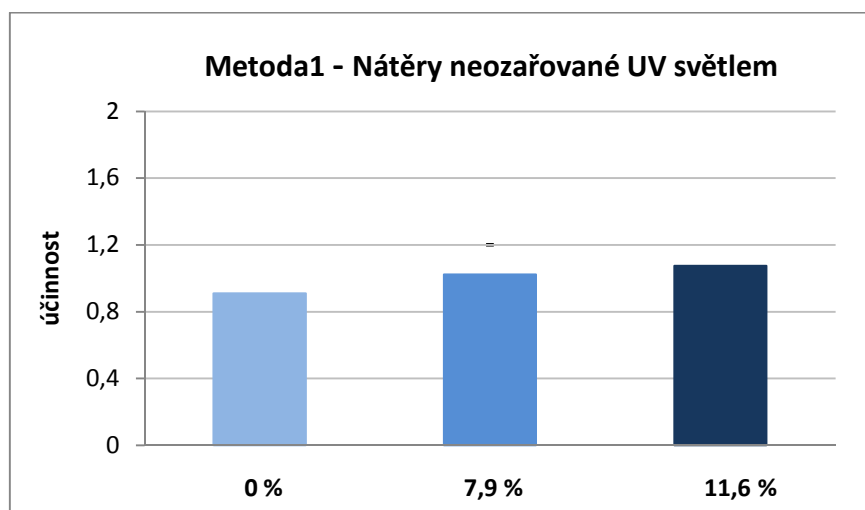


Graf 4.1-2 Metoda 2, antimikrobiální účinnost nátěrů na *E. coli*.

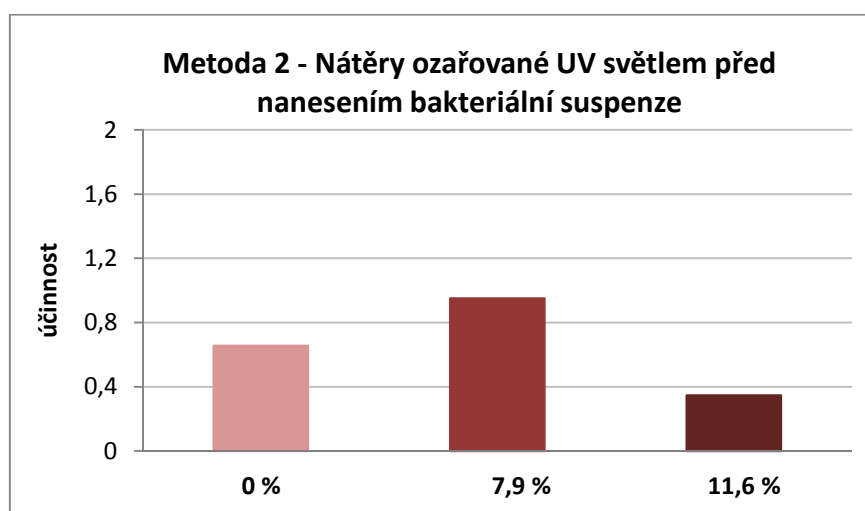


Graf 4.1-3 Metoda 3, antimikrobiální účinnost nátěrů na *E. coli*.

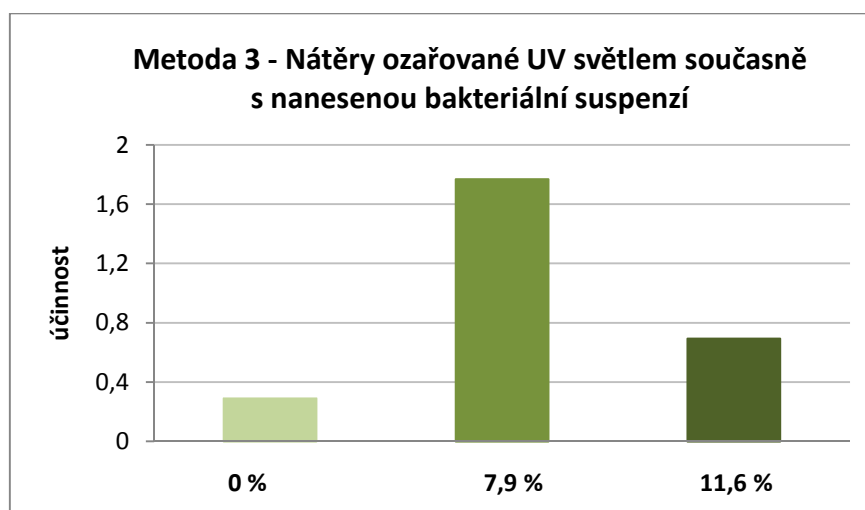
4.2. Účinnost nátěrů na bakterii *Staphylococcus aureus*



Graf 4.2-1 Metoda 1, antimikrobiální účinnost nátěrů na *S. aureus*.

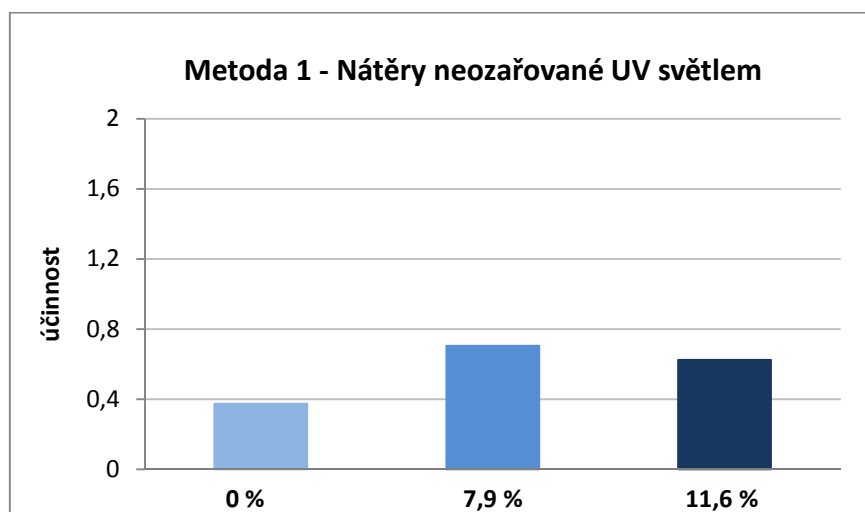


Graf 4.2-2 Metoda 2, antimikrobiální účinnost nátěrů na *S. aureus*

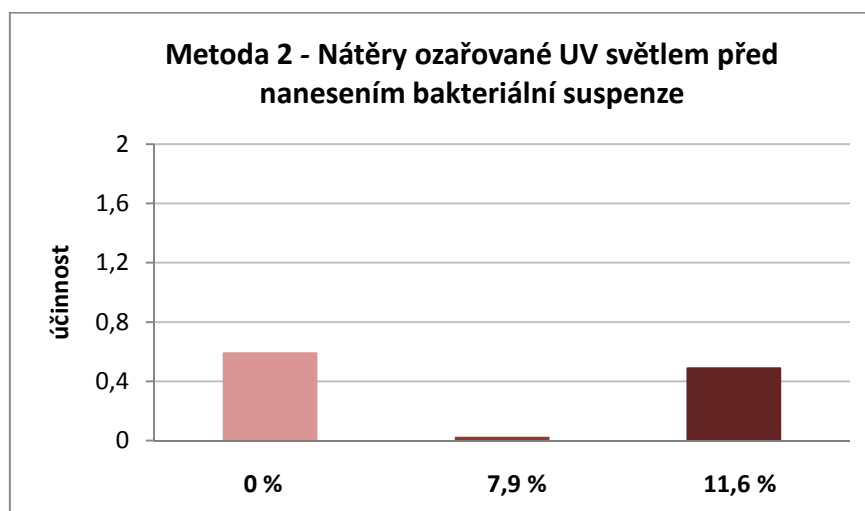


Graf 4.2-3 Metoda 3, antimikrobiální účinnost nátěrů na *S. aureus*

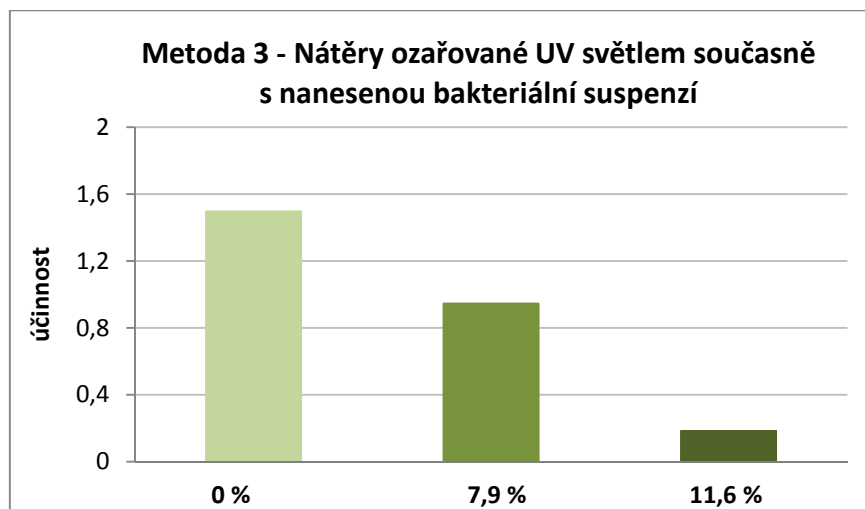
4.3. Účinnost nátěrů na kvasinku *Candida albicans*



Graf 4.3-1 Metoda 1, antimikrobiální účinnost nátěrů na *C. albicans*.

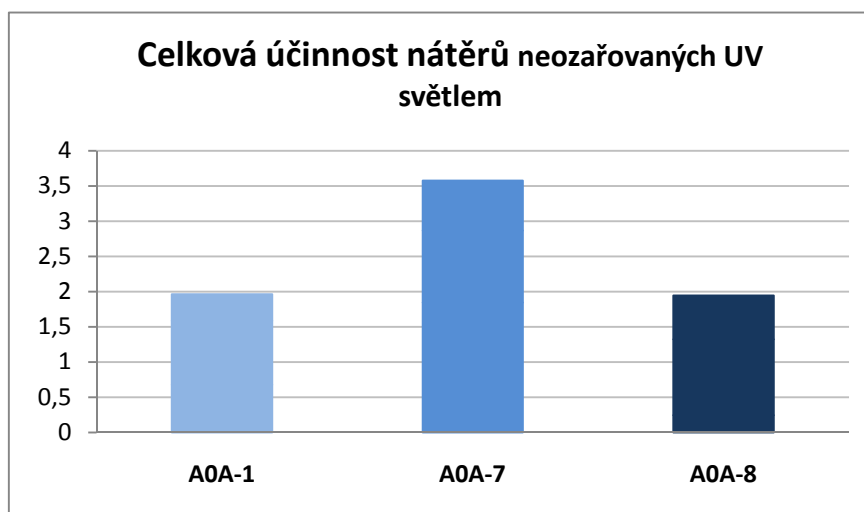


Graf 4.3-2 Metoda 2, antimikrobiální účinnost nátěrů na *C. albicans*.

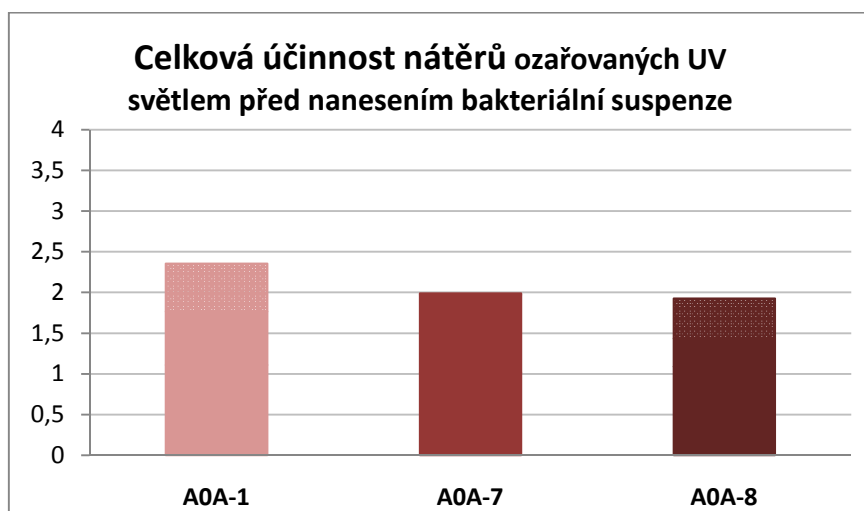


Graf 4.3-3 Metoda 3, antimikrobiální účinnost nátěrů na *C. albicans*.

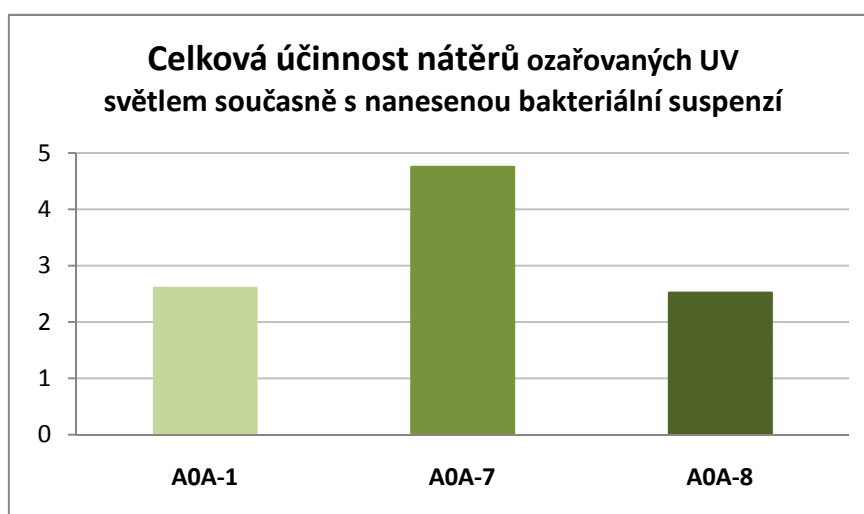
4.4. Celková účinnost nátěrů na testované mikroorganismy



Graf 4.4-1 Metoda 1, celková účinnost nátěrů na testované mikroorganismy.



Graf 4.4-2 Metoda 2, celková účinnost nátěrů na testované mikroorganismy.



Graf 4.4-3 Metoda 3, celková účinnost nátěrů na testované mikroorganismy.

5. Závěr

V této práci jsme došli k závěru, že největší účinnost na testované mikroorganismy měly nátěry ozařované současně s nanesenou bakteriální suspenzí. Tímto se nám podařilo prokázat, že UV záření ovlivňuje antimikrobiální vlastnosti zkoumaných nátěrů. Na druhé straně je zajímavé, že nátěry ozařované před nanesením bakteriální suspenze se ukázaly být nejméně účinné, a to i mnohdy v porovnání s nátěry neozařovanými UV světlem. Z výsledků také vyplývá, že jednoznačně nejúčinnější byl nátěr A0A-7, obsahující 7,9 % fotokatalyticky aktivního ZnO. Nejmenší účinek pak vykazoval nátěr s obsahem 11,6 % ZnO. Lze tedy vidět, že i koncentrace ZnO obsažená v nátěrech významně ovlivňuje jejich antimikrobiální účinek. Testováním byla také prokázána největší citlivost gramnegativní bakterie *E. coli*. Celkově nejmenší účinek pak měly nátěry na kvasinku *C. albicans*.

6. Souhrn

Tato práce se zabývá převážně vlivem UV záření na antimikrobiální účinky několika malířských nátěrů, které se lišily pouze různou koncentrací oxidu zinečnatého. Proto zde byl zkoumán i vztah koncentrace tohoto oxidu k antimikrobiálním účinkům. V rámci této práce byly nátěry testovány třemi různými metodami. Jako testovací mikroorganismy byly použity druhy *S. aureus*, *E. coli* a *C. albicans*. První metodou testované nátěry nebyly vůbec ozařovány UV světlem. Při druhé metodě byly nátěry ozařovány 30 minut před nanesením bakteriální suspenze. Třetí metodou testované nátěry byly ozařovány současně s nanesenou bakteriální suspenzí. Po kultivaci odebraných vzorků byly zjišťovány počty CFU. Zpracováním získaných hodnot bylo zjištěno, že nátěry testované třetí metodou vykazovaly nejlepší účinek. Byl tak prokázán vliv UV záření na antimikrobiální vlastnosti zkoumaných nátěrů. Výsledky rovněž ukázaly, že nejúčinnější byl nátěr s obsahem 7,9 % ZnO. Testováním byla prokázána největší citlivost gramnegativní bakterie *E. coli*. Nejmenší účinek pak měly nátěry na kvasinku *C. albicans*.

Abstract

This thesis deals largely with the influence of UV radiation on the antimicrobial effects of several paint coats, which differed only varying concentrations of zinc oxide. Therefore, the relationship of concentration of oxide to the antimicrobial effects was studied, too. In this work, paints were tested by three different methods. As the test microorganisms were used *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*. Using the first method, tested paints were not irradiated with UV light at all. Using the second method, paints were irradiated 30 minutes before applying the bacterial suspension. Using the third method, tested paints were irradiated simultaneously with bacterial suspensions. After cultivation of removed samples, CFU numbers were determined. By processing the values was found that the paints tested using the third method had the best effect. Thus the influence of UV radiation on the antimicrobial properties of the examined paints was proved. Results also showed that the most effective paint contained 7.9% ZnO. Testing demonstrated the greatest sensitivity of Gram-negative bacteria *E. coli*. The paints had the smallest antimicrobial effect on *C. albicans*.

7. Použitá literatura

AMORNPITOKSUK, P.; SUWANBOON, S. et al.: Synthesis, photocatalytic and antibacterial activities of ZnO particles modified by diblock copolymer. *Powder Technology*, 2011, Vol. 212, Issue 3, s. 432-438. ISSN 0032-5910.

BAEK, Y.-W.; AN, Y.-J.: Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of the Total Environment*, 2011, Vol. 409, s. 1603-1608.

BRAYNER, R.; FERRARI-ILIOU, R. et al.: Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett*, 2006, Vol. 6, Issue 4, s. 866–870. ISSN 1530-6984. Převzato z Jones et al., 2008.

BUCHTA, V.; JÍLEK, P. et al.: *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha, 1998, [s. 90, 143, 155], ISBN 80-7184-565-5.

CRITTENDEN, J.C.; SURI, R.P.S. et al.: Decontamination of water using adsorption and photocatalysis. *Water Research*, March 1997, Vol. 31, Issue 3, s. 411-418. ISSN 0043-1354.

ČECHOVÁ, P.: Antimikrobní účinek látek určených k redukci kontaminace (diplomová práce). Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biologických a lékařských věd, 2010.

ESKANDARI, M.; HAGHIGHI, N. et al.: Growth and investigation of antifungal properties of ZnO nanorod arrays on the glass. *Physica B: Condensed Matter*, January 2011, Vol. 406, Issue 1, s. 112–114. ISSN 0921-4526.

FERIS, K.; OTTO, C. et al.: Electrostatic interactions affect nanoparticle-mediated toxicity to gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Langmuir*, 2010, Vol. 26, Issue 6, s. 4429–4436. ISSN 0743-7463. Převzato z Sharma et al., 2010.

GABALLA, A.; HELMANN J. P., *J. Bacteriol.*, 1998, Vol. 180, s. 5815. ISSN 0021-9193. Převzato z Padmavathy et al., 2011.

GORDON, T.; PERLSTEIN, B. et al.: Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, January 2011, Vol. 374, Issues 1-3, s. 1-8. ISSN 0927-7757.

HE, L.; LIU, Y. et al.: Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological Research*, 2011, Vol. 166, Issue 3, s. 207-215. ISSN 0944-5013.

HOCHMANNOVÁ, L.; VYTRÁSOVÁ J.: Vliv nanočástic TiO₂ a ZnO na fotokatalytické a antimikrobiální účinky silikátových nátěrů. *Chem. Listy*, 2010b, Vol. 4, Issue 10, s. 940-944. ISSN 1213-7103.

HOCHMANNOVA, L.; VYTRASOVA, J.: Photocatalytic and antimicrobial effects of interior paints. *Progress in Organic Coatings*, January 2010a, Vol. 67, Issue 1, s. 1-5. ISSN 0300-9440.

JIANG, W.; MASHAYEKHI, H.; XING, B.: Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environmental Pollution*, 2009, Vol. 157, Issue 5, s. 1619–1625. ISSN 0269-7491.

JONES, N.; RAY, B. et al.: Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, February 2008, Vol. 279, Issue 1, s. 71-76. ISSN 0378-1097.

KASEMETS, K.; IASK, A. et al.: Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*, 2009, Vol. 23, s. 1116-1122.

KIWI, J.; NADTOCHENKO, V.: Evidence for the mechanism of photocatalytic degradation of the bacterial wall membrane at the TiO₂ interface by ATR-FTIR and

laser kinetic spectroscopy. *Langmuir*, 2005, Vol. 21, Issue 10, s. 4631-4633. ISSN 0743-7463. Převzato z Markowska-Szczupak et al., 2011.

LEE, D.; BRAND, S.: Enterprise in Nanotechnology, University of Leeds, May 2002. Převzato z Hochmannova a Vytrasova, 2010a.

LIU H.-L.; YANG T.C.-K.: Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus helveticus* by ZnO and TiO₂ activated with ultraviolet light. *Process Biochemistry*, December 2003, Vol. 39, Issue 4, s. 475-481. ISSN 1359-5113.

LU, W.; LIU, G. et al.: Tyrosine-assisted preparation of Ag/ZnO nanocomposites with enhanced photocatalytic performance and synergistic antibacterial activities. *Nanotechnology*, 2008, Vol. 19, Issue 44. ISSN 0957-4484. Převzato z Amornpitoksuk et al., 2011.

MARKOWSKA-SZCZUPAK, A.; ULFIG, K.; MORAWSKI, A.W.: The application of titanium dioxide for deactivation of bioparticulates: An overview. *Catalysis Today*, 2011, Vol. 169, Issue 1, s. 249-257. ISSN 0920-5861.

NAIR, S.; SASIDHARAN, A. et al.: Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *J Mater Sci: Mater Med*, 2009, Vol. 20, s. 235-241. ISSN 0957-4530.

PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R.: Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Science Technology of Advanced Materials*, 2008, Vol. 9, č. 3. ISSN 1468-6996. Převzato z Eskandari et al., 2011.

PREMANATHAN, M.; KARTHIKEYAN, K. et al.: Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2011, Vol. 7, Issue 2, s. 184-192. ISSN 1549-9634.

ROSYPAL, S. et al.: *Obecná bakteriologie*. SNP Praha, 1981, [s. 644, 645, 670.]

SAKTHIVEL, S.; NEPPOLIAN, B. et al.: Solar photocatalytic degradation of azo dye: comparison of photocatalytic efficiency of ZnO and TiO₂. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 2003, Vol. 77, Issue 1, s. 65–82. ISSN 0927-0248.

SAWAI, J.: Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, Vol. 54, Issue 2, s. 177. ISSN 0167-7012. Převzato z Padmavathy et al., 2008.

SHARMA, D.; RAJPUT, J. et al.: Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. *Thin Solid Films*, 2010, Vol. 519, Issue 3, s. 1224–1229. ISSN 0040-6090.

WANG, H.; XIE, CH. et al.: Comparison of dye degradation efficiency using ZnO powders with various size scales. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, Vol. 141, Issue 3, s. 645–652. ISSN 0304-3894.

YAMAMOTO, O.: Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *International Journal of Inorganic Materials*, 2001, Vol. 3, s. 643-646.

YANG, X.; WANG, Y.: Photocatalytic effect on plasmid DNA damage under different UV irradiation time. *Building and Environment*, March 2008, Vol. 43, Issue 3, s. 253-257. ISSN 0360-1323.

ZHANG, L.; JIANG, Y. et al.: Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. coli*, *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, Vol. 12, Issue 5, s. 1625-1636, ISSN 1388-0764.