

# Biologické vlastnosti nanočástic

Klára Pacolová

---

Bakalářská práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Klára Pacolová**  
Osobní číslo: **T12352**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Biologické vlastnosti nanočástic**

### Zásady pro vypracování:

Studentka se seznámí s dosud publikovanými informacemi o syntéze, vlastnostech a biologickém působení nanočástic. V teoretické části se zaměří především na různé skupiny nanočástic a jejich využití v medicíně. Prakticky se seznámí s prací v laboratoři buněčných kultur a mikrobiologické laboratoři a osvojí si základní techniky práce v těchto laboratořích. V praktické části pak provede a vyhodnotí sérii testů zaměřených na antibakteriální vlastnosti nanočástic.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.**

**ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.**

**ROSYTAL, S. Nový přehled biologie. . Praha: Scientia, 2003. ISBN 10: 80-7183-268-5.**

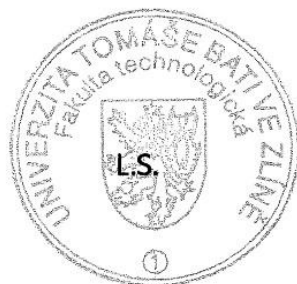
Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.**  
Centrum polymerních materiálů

Datum zadání bakalářské práce: **16. ledna 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **25. května 2015**

Ve Zlíně dne 2. března 2015

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



  
Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## 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 ..... 18.5.2015

..... Pacolová

<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 nevdělečně 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:

<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). Odpírá-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 užit 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Cílem bakalářské práce bylo seznámit se s problematikou interakce nanomateriálů s živými systémy. V praktické části pak získat praktické zkušenosti s testováním antibakteriální aktivity a to ověřením antibakteriální aktivity nanočástic stříbra u třech komerčně dostupných produktů. Experiment byl prováděn dle Českého lékopisu 5.1.3 Účinnost protimikrobních konzervačních látek. K provedení experimentu jsme zvolili běžně se vyskytující kmeny bakterií *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Výsledky jsou podle kritérií přijatelnosti vyhovující, tedy antibakteriální účinnost nanočástice stříbra se prokázala ve všech třech vzorcích.

Klíčová slova: nanočástice, antibakteriální aktivita, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis focused on the interaction of nanomaterial with biological systems. The antibacterial activity of silver nanoparticles with three commercially available products were tested in the practical part of the thesis. The experimental procedure was carried out according to the Czech Pharmacopoeia 5. 1. 3. Efficacy of antimicrobial preservatives. For the experiment, we chose the commonly occurring bacterial strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were used in the experiment. The results proved efficient antibacterial activity of silver nanoparticles in all three samples.

Keywords: nanoparticles, antibacterial activity, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

Ráda bych poděkovala doc. Ing Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat Ing. Daniele Veselé za ochotu a pomoc při realizaci praktické části a při jejím zpracování. Dále bych chtěla poděkovat rodičům za podporu ve studiu.

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

## Obsah

ÚVOD.....	10
TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 NANOMATERIÁLY.....	12
1.1 DEFINICE NANOMATERIÁLŮ A NANOTECHNOLOGIÍ.....	12
1.2 HISTORIE NANOMATERIÁLŮ A NANOTECHNOLOGIÍ.....	12
1.3 DRUHY NANOMATERIÁLŮ.....	13
1.3.1 PŘÍRODNÍ NANOMATERIÁLY.....	13
1.3.2 UHLÍKOVÉ NANOMATERIÁLY.....	14
1.3.3 NANOČÁSTICE ZLATA.....	15
1.4 VYUŽITÍ NANOMATERIÁLU.....	15
1.5 VÝROBA NANOMATERIÁLŮ.....	16
1.6 ZDRAVOTNÍ RIZIKA NANOTECHNOLOGIÍ.....	16
1.6.1 VLIV NA ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ.....	18
1.6.2 VLIV NA ČLOVĚKA.....	19
1.6.3 PRACOVNÍ LÉKAŘSTVÍ.....	20
2 NANOČÁSTICE STŘÍBRA.....	21
2.1 MOŽNÉ PŘÍPRAVY NANOČÁSTICE STŘÍBRA.....	21
2.1.1 CHEMICKÁ REDUKCE.....	21
2.1.2 OPTICKÁ REDUKCE.....	21
2.1.3 METODA POMOCÍ HYDROGELU.....	22
2.1.4 METODA POMOCÍ MICEL.....	23
2.1.5 METODA „ZELENÉ“ BIOSYNTÉZY.....	23
3 ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITA.....	25
3.1 BIOLOGICKO–CHEMICKÉ PŮSOBENÍ.....	25
3.2 FYZIKÁLNÍ PŮSOBENÍ.....	25
3.2.1 TEPEM.....	26
3.2.2 ZÁŘENÍM.....	26
3.3 ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK NANOSTŘÍBRA.....	29
3.4 VEDLEJŠÍ ÚČINKY ANTIBAKTERIÁLNÍCH LÁTEK.....	29
3.5 REZISTENCE MIKROBŮ K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM.....	29
3.6 METODY ANTIBAKTERIÁLNÍCH TESTŮ.....	30



3.6.1	DIFÚZNÍ DISKOVÁ METODA TAKÉ 6.1.3 ČSN EN ISO 20645 .....	30
3.6.2	AGAROVÁ DIFÚZNÍ METODA.....	30
3.6.3	DILUČNÍ METODA .....	30
3.6.4	6.1.1 AATCC TEST METHOD: 100-2004- ANITABCTERIAL FINISHES ON TEXTILE MATERIALS .....	31
3.6.5	6.1.2 AATCC TEST METHOD: 147-2004-ANTIBACTERIAL AKTIVITY ASSESSMENT OF TEXTILE MATERIALS .....	31
	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>32</b>
	<b>4 MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>TESTOVANÉ VZORKY.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2</b>	<b>POUŽITÉ BAKTERIE .....</b>	<b>34</b>
4.2.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	34
4.2.2	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	34
<b>4.3</b>	<b>PŘÍSTROJE.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>CHEMICKÉ LÁTKY .....</b>	<b>35</b>
	<b>5 DESIGN EXPERIMENTU .....</b>	<b>36</b>
	<b>6 PRAKTICKÉ PROVEDENÍ EXPERIMENTU .....</b>	<b>39</b>
	<b>7 VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
<b>7.1</b>	<b>ZKUŠEBNÍ KMEN: <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> CCM 4516 .....</b>	<b>41</b>
<b>7.2</b>	<b>ZKUŠEBNÍ KMEN: <i>ESCHERICHIA COLI</i> CCM 4517.....</b>	<b>43</b>
<b>7.3</b>	<b>SHRNUTÍ EXPERIMENTU.....</b>	<b>45</b>
<b>7.4</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>48</b>
	<b>8 ZÁVĚR .....</b>	<b>50</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>59</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>60</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>61</b>

## ÚVOD

Bakalářská práce se zabývá nanočásticemi, které jsou v dnešní době předmětem řady výzkumů a věnuje se jim velká pozornost nejen v odborných kruzích, ale také mezi laickou veřejností. Nanotechnologie se zabývá manipulací a výrobou nanomateriálů. Jako vědní obor se nanotechnologie řadí k nověji vzniklým, ovšem nanočástice se využívá již delší dobu, avšak nevědomě. Hlavní důvod proč se začaly nanočástice studovat je, že mají oproti základní sloučenině rozdílné vlastnosti, což umožňuje větší použití. Velký význam mají nanočástice v medicíně, kdy se dají použít např. jako nosiče léčiv, v kloubní protetice, v dentální hygieně či při léčení rakoviny. Také se uplatňují v dalších odvětvích jako např. potravinářském průmyslu, kde slouží ke zvyšování trvanlivosti potravin, ve stavitelství, pro výrobu pevnějšího materiálu, v mikroelektronice a také na výrobu samočisticích povrchů. S každým objevem nanočástice jsou spojené také možné rizika. Obecně platí, že aktivita částic souvisí s velikostí, tvarem a rozpustností. Proto je obtížné stanovit veškerá rizika s nimi spojená, jako např. jejich malé rozměry, které nanočástici dovolují pronikat přes buněčnou stěnu a umožňují ji volně se šířit organismem. Důležitým faktorem je tedy velikost částic, která se dá do jisté míry ovlivnit přípravou. Možné metody zahrnují chemickou redukci, optickou redukci, výrobu částic pomocí hydrogelu, micel a pomocí zelené biosyntézy.

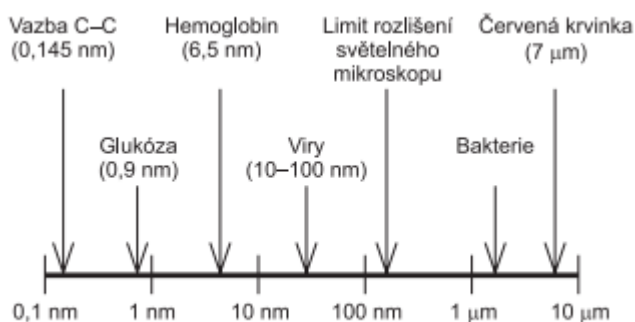
Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na nanočástice stříbra a na jejich antibakteriální aktivitu, což je vlastnost určitých látek reagovat s bakteriemi a negativně působit na jejich životní funkce. V praktické části jsem se věnovala prokázání této antibakteriální aktivity u dvou kmenů bakterií konkrétně u *Staphylococcus aureus* a u *Escherichia coli*. Postup experimentu je prováděn dle Českého lékopisu. Výsledky ukázaly prokazatelnost antibakteriální účinnosti nanočástice stříbra dle kritérii přijatelnosti stanovených Českým lékopisem.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 NANOMATERIÁLY

## 1.1 Definice nanomateriálů a nanotechnologií

Pojem nanotechnologie zahrnuje výrobu a manipulaci s materiálem v měřítku nanometrů (Picraux, 2014), přičemž pojem „nano“ vyjadřuje jednu miliardtinu ( $10^{-9}$ ) základní jednotky, v tomto případě tedy metr. Nanočástice se mohou vyskytovat v široké škále tvarů, např. koule, vločky, dendritické struktury, tyče a trubky (Pitkethly, 2004).



Obrázek 1 Škála velikosti částic (Prnka a Šperlink, 2004)

Dle (Hošek, 2011) je pak pro označení materiálu jako nanomateriál nutné splňovat následující podmínky:

- Musí mít alespoň jeden rozměr nebo svoji vnitřní strukturu v intervalu velikostí 1 – 100 nm.
- Musí využívat fyzikálních nebo chemických vlastností na úrovni atomů a molekul.
- Mohou být kombinovány tak, aby vytvářely větší struktury s důsledky do makrosvěta.

Nanotechnologie zanechává velký dopad na celé 21. Století, ať už je to v oblasti medicíny, či elektroniky. Už nyní je jasné, že vede k další průmyslové revoluci (Niroumand, Zain a Jamil, 2013).

## 1.2 Historie nanomateriálů a nanotechnologií

Jevy, které můžeme označit za nanotechnologie, byly nevědomě využívány velmi dlouhou dobu. Nejstarší dochovaný předmět využívající nanomateriál je datován kolem 4. st. n. l. Jednalo se o římský pohár vyrobený ze sodnovápeného skla obsahující nanočástice zlata a stříbra, které způsobují zabarvení předmětu. Tento pohár je nyní uložen v British Museum v Londýně. Nevědomě se také využívaly nanočástice kovu ve středověku, kde byly použity na okenní tabule katedrál (Poole a Owens, 2003). První průmyslová

produkce nanomateriálu je datována kolem roku 1940. Jednalo se o produkci sazí (Pitkethly, 2004). V roce 1959 předpověděl Richard Feynman možnost vytváření materiálů na úrovni atomů. Představil Feynmanovy diagramy, které graficky znázorňují interakce mezi jednotlivými částicemi. Za přínos v oboru nanotechnologie získal Nobeovu cenu (Nobelprize.org). Za jeho pokračovatele jsou považováni Gerd Binnig a Heinrich Rohrer, kteří byli také oceněni Nobelovou cenou za návrh prvního tunelového mikroskopu (Nobelprize.org). Další významnou osobností v oboru nanotechnologií je Don Eigler, který pracoval se skenovacím tunelovým mikroskopem. Tento druh mikroskopu se do té doby používal pouze k zobrazování atomů. Don Eigler ho poprvé využil v technice, kde sloužil k přesnému umístění atomů na povrch. Tedy technologie IBM. V neposlední řadě musím zmínit Kim Eric Drexlera, kterému se v roce 1974 povedlo dostat nanotechnologii do podvědomí lidí. Také si stál za názorem, že biologie nám ukazuje, že stroje na molekulární úrovni mohou existovat, mohou se programovat a mohou vytvářet další stroje (Jones, 2005). Nanotechnologii lze nyní aplikovat na veškeré lidské aktivity od tvorby materiálů nových vlastností, přes vytváření mikro a nanostrojů a aplikaci v technice, biologii i běžném životě. Příkladem praktického využití nanotechnologií je například výroba asfaltu, kde se využívá nanočástic jílu a oxidu křemičitého. Takto připravený asfalt je odolnější vůči vyšším teplotám (Yang a Tighe, 2013).

### 1.3 Druhy nanomateriálů

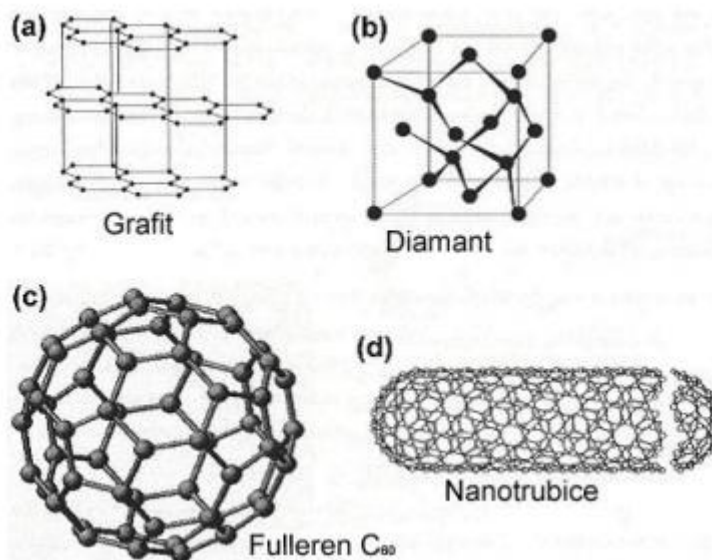
V současné době existuje velké množství různých nanomateriálů. S ohledem na rozsah práce se budeme dále zabývat pouze vybranými typy a to konkrétně uhlíkem, protože má velký potenciál spojený s objevem struktur nanotrubelek a fullerenu a dále zlatem, které má podobné vlastnosti jako stříbro. Samostatná kapitola pak bude věnována nanočásticím stříbra, které jsou intenzivně využívány.

#### 1.3.1 Přírodní nanomateriály

Je zřejmé, že mnoho biologických materiálů lze klasifikovat také jako nanočástice. Jako nanočástice můžeme považovat i bílkoviny, které se obvykle vyskytují v rozměrech mezi 4 a 50 nm, nebo také viry s rozměry od 10 do 200 nm (Prnka a Šperlink, 2004). Pod přírodní nanomateriály řadíme např. krystaly různých minerálů, které vznikly jako důsledek jejich vnitřního uspořádání na atomové a molekulové úrovni (Hošek, 2011).

### 1.3.2 Uhlíkové nanomateriály

Uhlík je univerzální prvek se schopností vázat se různými způsoby a vytvářet tak materiály s velmi různorodými vlastnostmi. Může se vyskytovat např. ve formě grafitu, či diamantu. Další formou uhlíku jsou nanotrubičky, které byly objeveny v uhlíkovém nánosu vzniklém po obloukovém výboji. O objev nanotrubiček se zasloužili v roce 1985 vědci Harry Kroto, Richard Smalley a Robert Curl, kteří dostali Nobelovu cenu za přínos v oblasti chemie (Kroto et al., 1985). Tato vlákna měla průměr několik nanometrů a délku několik milimetrů. Vlákna obsahovala atomy uhlíku uspořádaných do grafémových pásů svinutých do tvaru bezešvé válcové trubice. Nanotrubičky jsou buď vícestěnné nebo jedностěnné (Purohit et al., 2014). V roce 1985 se náhodně objevila nová forma uhlíku. Jednalo se o fullereny (Aqel et al., 2012), které jsou složeny z 60 dokonale symetricky uspořádaných uhlíkových atomů. Za zmínku stojí zajímavé fyzikální, optické a elektrické vlastnosti těchto materiálů. Tyto vlastnosti lze upravovat připojením chemických skupin k atomům uhlíku. Např. krystalický C<sub>60</sub>, který je normálně nevodivý, se stane až supravodivý po navázání alkalického kovu, jako jsou draslík, cesium nebo rubidium (Purohit et al., 2014).



Obrázek 2 Morfologie uhlíku (Nanotechnoogie.cz)

### 1.3.3 Nanočástice zlata

Nanočástice zlata přitahují pozornost ve všech odvětvích průmyslu. Konkrétní využití je např. zvýšení elektroluminiscence ve světelných diodách, výroba senzorů, které jsou schopny detekovat velmi malé množství analyzovaného vzorku, jako jsou chemické výpary v rozmezí několika ppm. Kromě toho se zlaté nanočástice používají při výrobě barviv a pigmentů. Kladně působí i na životní prostředí. Viz kapitola rizika nanočástic. Pro své jedinečné vlastnosti patří mezi jedny z nejpoužívanějších nanočástic v biomedicině. Hlavní výhodou je, že jsou netoxické a biokompatibilní jak *in vivo* tak i v *in vitro* podmínkách. Pro biomedicínské aplikace, které vyžadují nižší koncentrace nanočástic zlata je důležité, že se ředěním nemění vlastnosti (Rad, Abbasi a Afzali, 2011). Nyní se začaly zkoumat nanočástice zlata při potenciální léčbě rakoviny. K detekci rakovinových buněk se používají rozměry částice 30 – 40 nm. Hlavní výhodou AuNPS (z angličtiny – Aurum Nanoparticles) je snadná syntéza, povrchová úprava, dále optické vlastnosti, které se dají ovlivňovat a vynikající biologická kompatibilita (Huang a El- Sayed, 2010).

## 1.4 Využití nanomateriálu

Oblast nanotechnologií je velmi progresivní, a proto níže uvedené příklady jsou pouze stručným výběrem možných materiálů a jejich aplikací. V současnosti nalézají uplatnění v mnoha oblastech běžného života jako je elektronika a zdravotnictví. Nejširší využití má AgNPs, jehož rozměry jsou menší než 20 nm (Abdel-Aziz, Shaneen a El-Nekeety, 2014). Využití ve zdravotnictví můžeme najít v podobě cílené dopravy léčiv. Jedná se o nanočástice  $Fe_3O_4$  o velikosti 30 – 50 nm. Dříve byl problém těchto NPs (z angličtiny – nanoparticles) v tom, že mají tendenci se shlukovat a tedy tvořit sekundární větší částice. Pro biologické použití je tedy potřeba vytvořit částici stabilní (Cui et al., 2014). Metodiku popsal ve svém článku Laurent et al., 2008. Jako další příklad toho, že mají nanočástice slibnou budoucnost je objevení nanočástice, která ovlivňuje molekuly oxidu dusnatého. NO je důležitý např. při hojení ran. Technologie využívá silanového hydrogelu v přítomnosti chitosanu. Přednosti této částice úspěšně odzkoušeli při léčbě zánětlivých ložisek způsobených multirezistentním kmenem bakterie *Staphylococcus aureus* (Martinez et al., 2009). Další využití nanočástic ve zdravotnictví je jejich využití v rámci kloubních náhrad. Používají se oxid zinku nebo titanu pro jejich antimikrobní vlastnosti (Pazdera, 2006). Aplikace nanotechnologií v oblasti výzkumu rakoviny poskytuje novou možnost léčení gastrointestinálních nádorů tvořících až 55 % všech úmrtí spojených s rakovinou (Laroui et al., 2013).

Uplatnění najdou i jako nanoroboti. Využití těchto nanorobotů je široké. Mohly by se v budoucnosti uplatnit v dentální hygieně, kde se využívá jejich obratnosti vzhledem k nanorozměru. Jako nanomateriál se v dentální medicíně používají nanočástice oxidu zirkoničitého s rozměrem pod 100 nm (Shetty, Swati a David, 2013).

Nanočástice se také vyskytují v potravinářském průmyslu, kde zvyšují trvanlivost potravin (Chellaram et al., 2014). Další pokrok využití nanomateriálu je ve stavebnictví, kde je snaha o vytvoření kompozitu s vysokou pevností, jejich využití je i při stavbě letadel, kdy se požaduje zmenšit zařízení a snížit spotřebu paliva, dále v mikroelektronice, kde se používají uhlíkové nanotrubky ke snížení spotřeby energie v displayích a obrazovkách (Mohammad et al., 2012). Uplatnění pro nanomateriál najdeme i v podobě samočisticích povrchů jako jsou například samočisticí okna, na které je použita vrstvička obsahující oxidu titaničitého o velikosti 15 nm (Dowling, 2004).

Nově vznikající technika je metoda analýzy nanopórů, kde se používá napětí k řízení molekul v prostředí mezi dvěma elektrolyty. Při této metodě se monitoruje průchod proudu přes nanopóry. Tedy, nanočástice s póry se vytvoří ve vodivém elektrolytu, kde je navíc izolační membrána, která od sebe odděluje dvě komory elektrolytu. Nabitě molekuly prochází přes póry díky elektrickému potenciálu a tím se moduluje proud iontů přes pórovou nanočástici. Tento proud ukazuje užitečné informace o struktuře a dynamickém pohybu molekul. Nedávné úspěchy naznačují, že senzory nanopórů mohou najít využití při sekvenaci DNA. Rychlé sekvenování jednotlivých částí lidského genomu, které by tato technologie měla umožnit, by pomohlo zlepšit naše chápání nemocí, dědičnosti a individuality jedince (Venkatesan a Bashir, 2011).

## 1.5 Výroba nanomateriálů

Nanočástice se dají vyrobit mnoho způsoby. Některé způsoby patří ke starším, ale s vývojem nanotechnologie se hledají i cesty nové. V podstatě existují čtyři způsoby, kterými se dají nanočástice připravit. První z nich je pomocí kapalného stavu (mokrý chemický proces), druhá je mechanická, třetí cesta je zabudování nanočástic do formy a poslední způsob je plynná syntéza (Pitkethly, 2004).

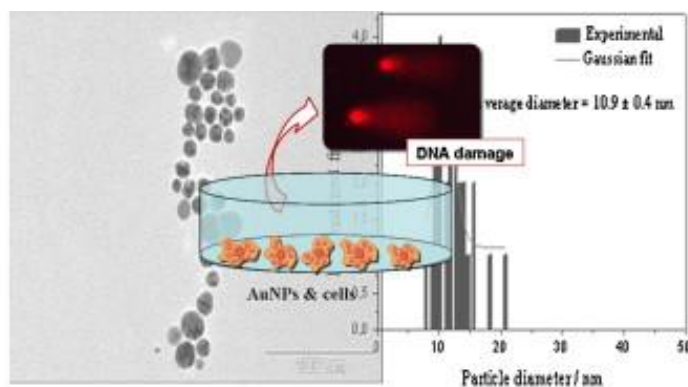
## 1.6 Zdravotní rizika nanotechnologií

Pokud chceme hovořit o riziku nanočástic je nutno zmínit, že aktivita a mobilita závisí na jejich velikosti, tvaru, rozpustnosti. Proto nelze označit konkrétní materiál jako nebez-



pečný. Nebezpečnost nanočástic se bude měnit v čase a prostředí. Skutečné nebezpečí spočívá v jejich malých rozměrech, které nanočástici dovolují pronikat přes buněčnou stěnu a umožňují ji volně se šířit organismem. Tím pádem mohou ovlivňovat katalytické schopnosti organismu a přímo zasahují do běžných fyziologických pochodů (Hošek, 2011).

Jako škodlivé nanočástice můžeme označit nanočástice oxidů přechodných kovů. S narůstající atomovou hmotností a zvětšujícím se protonovým číslem roste riziko škodlivosti. Nanočástice, zvláště ty o velikosti 16 – 80 nm, snadno pronikají buňkám do cytoplazmy a pak ničí membrány zevnitř. U některých nanočástic kovů můžeme hovořit až o genotoxicitě. V této souvislosti se zkoumá oxid zinečnatý. Používá se jako účinná substance pudrů, rtěnek, zubních past, opalovacích krémů. Částice oxidu zinečnatého pronikají z povrchu kůže do buněk a pak poškozují membrány a ještě závažněji způsobují mutace a rozpad DNA v buněčném jádře. Tyto nepříznivé projevy jsou způsobeny volnými radikály, které nanočástice produkují v buňce (Trafton, 2014). Jedna z technik, která posuzuje genotoxicitu je metoda „Commet Assay“. Testování je velmi rychlé a citlivé. Genotoxická částice volně projde do buňky a poškodí DNA. Za využití gelové elektroforézy je pak detekována míra poškození DNA pomocí velikosti „kometárního ocasu“ jež vzniká z jednotlivých fragmentů DNA. Velikost této zóny pak koreluje s oxidativním stresem vyvolaným působením nanočástic (Vasquez, 2012). Toxické účinky by naopak mohly být prospěšné v boji s nádorovými onemocněními. Na Massachusetts Institute of Technology se touto myšlenkou zabývají, a zkoumají možné použití nanočástic spolu s RNA. Pomocí takto upravených ribonukleových kyselin by mohlo být možné cíleně dopravit genotoxické nanočástice k místům výskytu nádorových buněk a účinně je zlikvidovat (Paino et al., 2012).



Obrázek 3 Využití cytotoxicity a genotoxicity AuNPS na nádorové buňky (Paino et al., 2012)

### 1.6.1 Vliv na životní prostředí

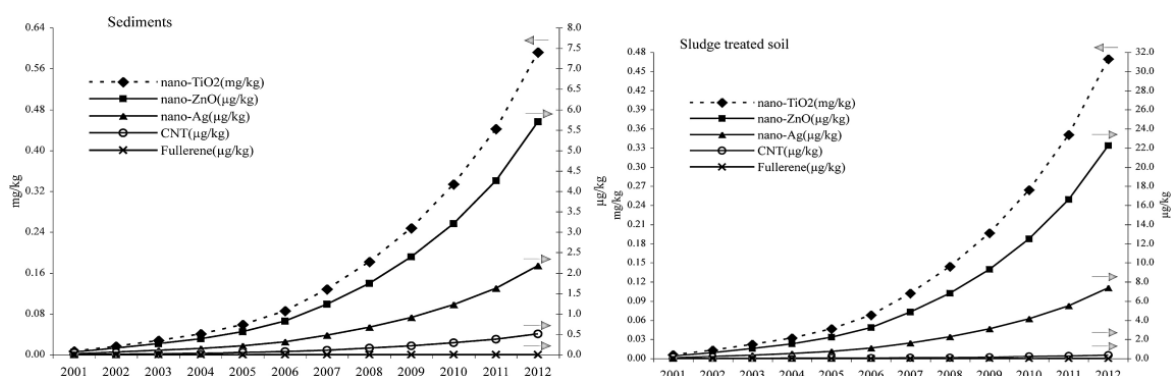
Distribuci nanočástic v životním prostředí můžeme rozdělit do dvou kategorií a to na: přirozený výskyt a na uměle se vyskytující.

#### 1.6.1.1 Přirozený výskyt

Nanočástice jsou do životního prostředí, nejčastěji do vzduchu, uvolňovány řadou přirozených pochodů. Především jde o mořský příboj, kterým se do vzduchu dostávají nanočástice mořských solí a organických materiálů, vulkanické erupce produkující keramické i kovové nanočástice, pády a exploze mikrometeoritů v atmosféře a samozřejmě všechny typy spalovacích procesů, zejména se jedná o lesní požáry, kdy se uvolňují směsi uhlíkových materiálů, které označujeme jako carbon blacks (Hošek, 2011).

#### 1.6.1.2 Uměle se vyskytující

V současné době musíme brát v potaz i nebezpečí uměle se uvolňujících nanočástic do životního prostředí a možnost jeho negativního ovlivnění. Nanočástice mohou přejít do vody, půdy, do ovzduší i do zvířat. S vývojem a s častější výrobou nanočástic roste také koncentrace jednotlivých částic v životním prostředí. Na obrázku je patrné velký nárůst výskytu částic v půdě, ve vodě i ve vzduchu. Tedy hlavně nano Ag, TiO<sub>2</sub>, ZnO, CNT a fullereny. Grafy zaznamenávají období od roku 2002 do roku 2012 v oblasti U.S. (Yao et al., 2013).



Obrázek 4 Koncentrace nanočástic v životním prostředí od roku 2002-2012 v oblasti U.S.

(Yao et al., 2013)

Například výskyt nanočástice stříbra ve vodě k roku 2013 je 0,010 – 0,03  $\mu\text{g}/\text{kg}$  v půdě 0,02 – 0,43  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a ve vzduchu 0,0017  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Což je ovšem velmi málo ve srovnání s nanočásticemi ZnO, kterých je ve vodě 76  $\mu\text{g}/\text{kg}$  v půdě 3194  $\mu\text{g}/\text{kg}$  údaj o koncentraci ve vzduchu chybí. Možná detekce a separace nanočástic kovů v přírodě se v závislostech na velikost částice provádí pomocí filtrace, dialýzy, chromatografie, centrifugace a jiných (Yao et al., 2013). Nemusí se ale vždy jednat o negativní účinek nanočástic. Např. zlaté nanočástice mohou být řešením některých ekologických problémů, jako je například znečištění vody. Hlavní výhodou zlata je, že je stabilní a nepodléhá oxidaci a tím může katalyzovat reakce jako např. oxidaci oxidu uhelnatého na oxid uhličitý. Také bylo prokázáno, že účinně odstraňuje rtuť z pitné vody (Rad, Abbashi a Afzali, 2011). Úplné závěry o vlivu částic a bezpečnosti se nyní zkoumá a jsou také předmětem řady mezinárodních výzkumných programů (Yao et al., 2013).

### 1.6.2 Vliv na člověka

S ohledem na závažnost toxicity je rozumné počítat s tím, že biodistribuce, akumulace, metabolismus a vylučování nanočástic se bude lišit v závislosti na typu částice a způsobu vniknutí do organismu. Nanočástice mohou vstoupit do těla aspirací, perorálně, intravenózně, perkutánně a následně se distribuovat do celého těla (Yildirimer et al., 2011). Přestup přes kůži může být např. aplikací opalovacího krému, který obsahuje kombinaci nanočástic titanu a oxidu zinečnatého. *In vitro* studie ukazují, že nanočástice  $\text{TiO}_2$  vlivem UV záření ovlivňují negativně buněčné funkce hlavně proliferaci, diferenciaci a apoptózu (Jatana a Delouise, 2014). Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) zařadila  $\text{TiO}_2$  do kategorie karcinogen skupiny 2B (potenciálně karcinogenní pro lidi). Mnohé studie ukazují, že nanočástice  $\text{TiO}_2$  NP je ještě toxičtější než  $\text{TiO}_2$ . Z provedených experimentů, kdy se krysám podávalo po 40 dní nanočástice  $\text{TiO}_2$  o velikosti 21 nm a  $\text{TiO}_2$  se ukázalo, že je  $\text{TiO}_2$  NP toxičtější (Shi et al., 2013). Hlavním místem, kde se požití nanočástice kumulují, jsou játra. Nanočástice v nich přetrvávají dlouhou dobu po požití. U prováděného experimentu se ukázalo, že zlaté nanočástice o velikosti od 3 – 100 nm a koncentraci 8 mg/kg/ týden po dobu 4 týdnů mají rozdílnou toxicitu. Částice o velikosti 3, 5, 50 a 100 nm nevyvolávaly toxické účinky, zatímco částice v rozmezí 8 – 37 nm prokazovaly nežádoucí účinky, které se projevovaly jako nechut' k jídlu, únava, úbytek na váze. Není to pouze zlato, které se hromadí v játrech. Mezi jedny z dalších patří nanočástice stříbra, které mají také tendenci se kumulovat v játrech. Mozek, na rozdíl od jater, má velmi omezené regenerační schopnosti a proto musí být obzvláště chráněn před vlivy částic. Vystavení

člověka prostředí, kde je stříbro ionizováno ( $\text{Ag}^+$ ), vede k výraznému úbytku neurotransmiterů dopaminu a serotoninu v mozku, které jsou klíčové komponenty motorických funkcí (Yildirimer et al., 2011). Obecně platí, čím je nanočástice menší, tím spíše způsobuje zánět a další nežádoucí účinky (Warheit, 2004).

### 1.6.3 Pracovní lékařství

Výzkum v oblasti nanotechnologií v posledních desetiletích výrazně pokročil. Výroba a využívání těchto materiálů je už skoro každodenní samozřejmostí. To je ovšem spojeno s tím, že velmi rychle přibývá počet lidí pohybujících se v prostředí výroby. A jsou tím pádem ovlivňováni nanočásticemi po velkou část svého života. Studie ukazující možný vliv na pracovníky je zatím v počátcích. Hlavní roli může hrát biologické monitorování. Jedná se o opakované měření biochemických markerů v tělních tekutinách a tkáních. Takto mohou biologické „markery“ přispívat k určení potenciálních rizik nanomateriálů a pochopení jejich mechanismů. Měření aktivity markerů se provádí v krvi a v moči. V krvi stanovujeme především kadmium, rtuť, olovo, zlato a stříbro. Prozatím se měření neprovádí přímo na konkrétních lidech, ale jsou prováděny simulace prostředí na krysách. Výsledky testů nejsou ještě jednoznačné, protože se nyní zkouší podávat krysám neadekvátní množství dané nanočástice (Iavicol et al., 2014).

## 2 NANOČÁSTICE STŘÍBRA

### 2.1 Možné přípravy nanočástice stříbra

Příprava nanočástic stříbra se ukázala jako velmi snadná, proto se nyní stříbrné částice hojně zkoumají a vyrábí. Mezi nejpoužívanější metody k přípravě částic patří kondenzační metody. Jsou postaveny na redukci stříbrné soli za pomoci níže zmíněných metod. Jedná se o spojování atomů v homogenních soustavách do větších celků. Kondenzační metody lze ještě dále dělit na fyzikální, které jsou založeny na kondenzaci par kovu a chemické, které díky řadě chemických reakcí vytvoří nerozpustný produkt. Tedy se jedná o redukci iontových sloučenin, kde je možné použít kromě běžně dostupných anorganických či organických činidel také radikály, které jsou vyvolávány např. působením UV záření, světla nebo  $\gamma$  záření. Už méně používanou metodou přípravy částic je dispergační metoda, která je opakem kondenzační. Zde jsou velké částice rozptylovány za tvorby menších (Kvítek, 2008). Mezi dispergační metody patří např. laserová ablace. Výhoda laserové ablace je, že nezanechává v systému zbytková chemická činidla. Nanočástice jsou velmi čisté. Jejich velikost se odvíjí od vlnové délky a intenzitě laseru, na době ozáření a také na použitém rozpouštědle (Lee, Han a Kim, 2001).

#### 2.1.1 Chemická redukce

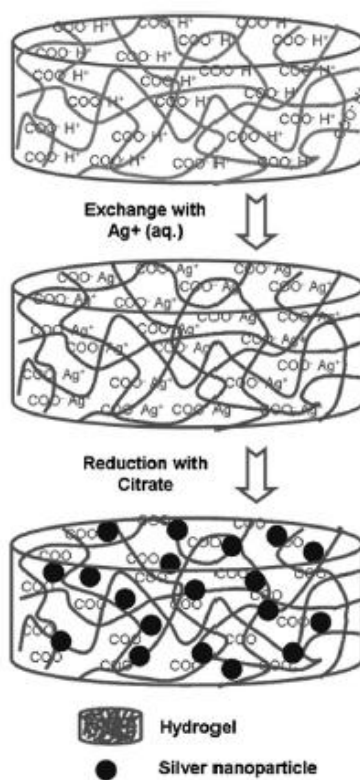
Tato metoda se v průmyslu využívá nejvíce. Používá se dusičnan stříbrný jako prekurzor pro výrobu nanočástice stříbra. Borohydrid sodný ( $\text{NaBH}_4$ ) a dodecyl sulfát (SDS) se používají jako redukční činidlo a stabilizátor. Proces přípravy je následující.  $\text{AgNO}_3$  se rozpustí v neionizované vodě, ke které se po částech přidá stabilizátor a redukční činidlo. (Lee, Song a Lee, 2010). V této metodě jsou stříbrné ionty v roztoku redukovány na příznivější uskupení v podobě malých kovových shluků. Proces redukce je zahájen solvatomnými elektrony, které jsou generované pomocí ionizujícího záření (Kholoud et al., 2010).

#### 2.1.2 Optická redukce

Tato metoda spočívá v tom, že se vytvoří micelární roztok, do kterého se přidá reakční směs dusičnanu stříbrného navázaného na anilin. Reakce je zahájena fotolýzou. Touto metodou se dají připravit nanočástice o velikosti 10 – 30 nm. Takto připravené částice vykazují velkou stabilitu (Li et al., 2012).

### 2.1.3 Metoda pomocí hydrogelu

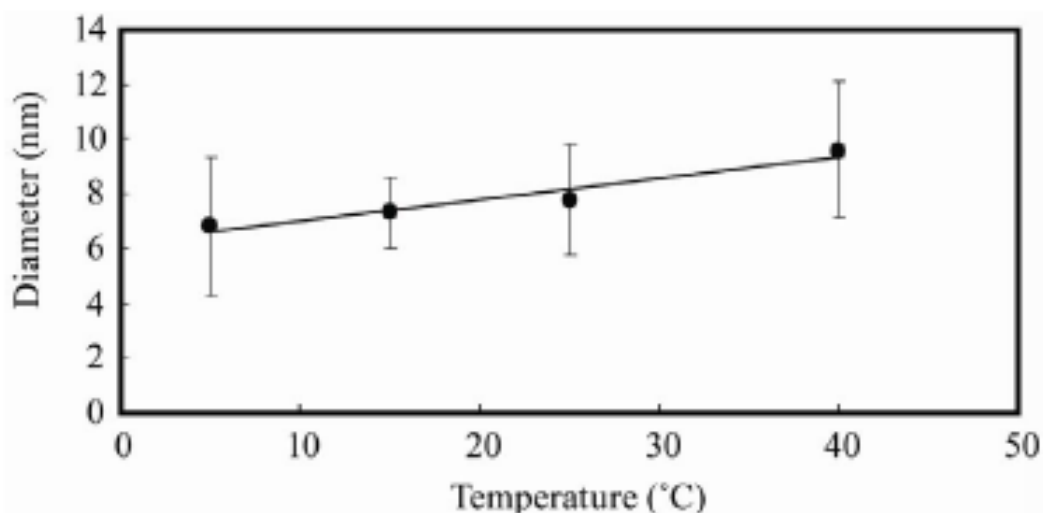
Při této metodě se tvorba nanočástic provádí v hydrogelu. Většinou se používá kyselina polyakrylová ve spojení s akrylamidem nebo systém na bázi polyvinylalkohol/polystyren – CO-polyethylenglykol-methakrylát (PVA/PS-PEGMA). Hydrogel tady slouží jako nanoreaktor, který má za úkol nukleaci a růst nanokrystalů, které vedou ke vzniku nanočástic. Dále je zapotřebí síťovací činidlo jako např. N,N- methylenbisakrylamid, citrát sodný, persíran draselný a dusičnan stříbrný. Velikost se pohybuje v rozmezí 4 – 30 nm. Částice v nanokompozitech prokázaly vynikající antibakteriální účinky na *Escherichia coli*. Antibakteriální aktivita závisí na velikosti nanokompozitů, množstvím nanočástic stříbra a množstvím přítomného monomeru kyseliny v rámci hydrogelu. Nejpokročilejší rys této techniky je, že lze měnit velikost a morfologii nanočástic změnou monomerní sítě působením činidla o změněné koncentraci (Thomas et al., 2007).



Obrázek 5 Příprava nanostříbra v polymerní síti (Thomas et al., 2007)

### 2.1.4 Metoda pomocí micel

Příprava nanočástic probíhá v reverzních micelách. Reverzní micely jsou termodynamicky stabilní. Stříbrné nanočástice jsou syntetizovány ve vodě, ve které se reakční složky rozpustí. Příprava částic nevyžaduje speciální zařízení ani extrémně vysoké teploty nebo tlak. Nicméně, produktivita stříbrných nanočástic pomocí reverzního micelárního systému je omezena nízkou koncentrací reaktantů. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM, Transmission Electron Mikroskopy) se dá určit, že stříbrné nanočástice vykazují širokou škálu tvarů. Velikost částice je silně závislá na reakční teplotě. Střední průměr nanočástic se postupně zvyšuje s rostoucí teplotou. Tento nárůst je patrný z grafu. Na experiment byla použita směs DK-SS což je sacharóza, 99 hm % představují monoestery, a 1 hm % di a triestery mastných kyselin. A dále složku, která tvoří 60 hm % kyseliny stearové a 40 hm % kyseliny palmitové (Noritomi, 2011).

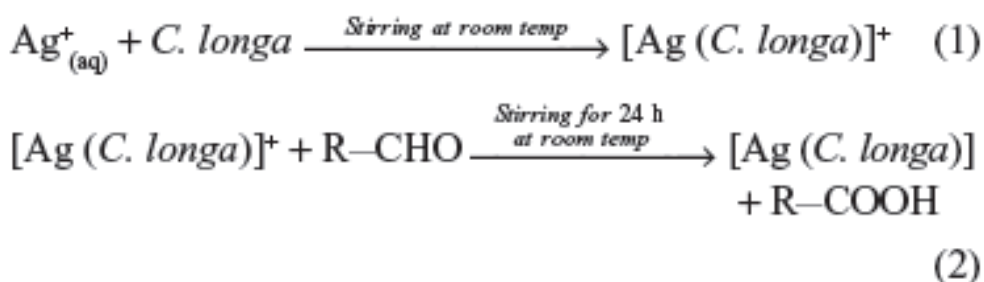


Obrázek 6 Vliv reakční teploty na průměr nanočástic stříbra v reverzních micel DK-SS:  $[AgNO_3]_{ov} = 0,1 \text{ M}$ ;  $[NaBH_4]_{ov} = 1,0 \text{ M}$ ; n-butanol / isooktan, obsahující 50 g / l DK-SS a 60 mM  $H_2O$ ; reakční doba = 3 h. (Noritomi, 2011)

### 2.1.5 Metoda „zelené“ biosyntézy

Možnost vytvoření nanočástic pomocí biosyntézy patří k novějším metodám. Jako hlavní surovina nezbytná pro přípravu nanočástic se využívá extraktu z listů. Výhoda metody je rychlost, nízké náklady, a šetrnost vůči životnímu prostředí. Není zapotřebí ani vysoká teplota, tlak či jiné chemikálie. Další výhodou je, že může být syntéza použita ve větším měřítku (Jeeva et al., 2014). Rostlinný extrakt lze použít z rostliny *Partenium hysterphorus*

nebo z hlíz *Curcuma longa* a jiných. Příprava probíhá tak, že se listy několikrát promyjí, aby se odstranil nežádoucí prach. Připraví se rostlinný extrakt, který se smíchá s dusičnanem stříbrným, který zde slouží jako prekurzor stříbra. Dále se do roztoku přidá zvolená koncentrace HNO<sub>3</sub> a HCl. Zvolená koncentrace má ve výsledku vliv na velikost částic. V roztoku byla pozorována tvorba červenohnědé barvy. Roztok se skladuje při pokojové teplotě po dobu 24 hodin pro sedimentaci částic. Dále se směs odstředí a nalije na pelety, které se centrifugují. Takto se dají připravit nanočástice o velikosti kolem 10 nm (Kumar, 2012).



Obrázek 7 Příprava NP pomocí zelené biosyntézy (Shameli et al., 2012)

Na obrázku vidíme rovnici (1) roztok matrice se nechá reagovat s Ag<sup>+</sup> za vzniku [Ag (C. longa)]<sup>+</sup> + komplex, který reaguje s aldehydovou skupinou ve struktuře extraktu. V druhé rovnici dochází ke snížení stříbrných iontů z důvodů oxidace aldehydové skupiny na karboxylovou (Shameli et al., 2012).



### 3 ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITA

Antibakteriální aktivita je vlastnost určitých látek reagovat s bakteriemi a negativně působit na jejich životní funkce. S ohledem na antibakteriální látku, koncentraci a délku vlivu se může jednat o kombinace biologického a chemického nebo fyzikální působení. Když mluvíme o antibakteriální aktivitě, je vhodné zavést definice bakteriocidních látek a bakteriostatických látek. Zkráceně, bakteriocidy jsou látky, které usmrcují bakterie, kdežto bakteriostatické látky pouze inhibují růst (Hampl a Paleček, 2002).

#### 3.1 Biologicko – chemické působení

V podstatě se jedná o dva základní mechanismy vyvolané bakteriostatickou látkou nebo látkou bakteriocidní. Bakteriostatické látky reversibilně blokují funkci biomolekul, aniž je ničí. Zastavují ovšem některé fyziologické funkce v buňce a v důsledku toho i růst a množení. Je-li taková látka po krátké době odstraněna, životní funkce bakterií mohou být obnoveny. Trvá-li však působení látky déle, dochází k ireversibilním dysfunkcím a k zahynutí bakteriální buňky. Do chemických látek, které působí bakteriostaticky, můžeme zahrnout enzymové jedy nebo antimetabolity. Příkladem je kyselina malonová, která je strukturálním analogem kyseliny jantarové. Antimetabolit je na místo metabolitu zabudován do makromolekuly. To vede ke změnám v primární, sekundární i terciární struktuře makromolekuly a k její možné dysfunkci. Např. na místo fenylalaninu může být do bílkoviny zabudován p-fluorfenylalanin.

Mezi bakteriostatické látky patří i antibiotika, které jsou produkty tzv. sekundárního metabolismu, čímž je míněna syntéza velkého množství sloučenin, z nich dosud známá antibiotika představují jen zlomek z celého počtu. Látky baktericidní ničí bakterie třemi mechanismy. A to: ireverzibilní alterací bílkovin zahrnující procesy alkylace a oxidace, dále poškozením molekuly DNA a rozrušením uspořádanosti buněčných membrán. Jde o látky snižující povrchové napětí. Nejznámější baktericidní látky jsou fenoly, oxidující látky ( $H_2O_2$ ,  $KMnO_4$ , chlór a jiné halogeny), kyseliny a louhy, těžké kovy, alkylující látky, formaldehyd a některé jiné aldehydy, alkoholy ale pouze při vysoké koncentraci c >70 % (Bednář et al., 1996).

#### 3.2 Fyzikální působení

Fyzikální působení na daný organismus můžeme také označit jako sterilizaci. Pod pojmem sterilizace rozumíme odstranění všech mikroorganismů z prostředí i z předmětu.

Hlavní využití je v zdravotnictví. Je daleko účinnější než dezinfekce, která je povahy chemické. Mezi fyzikální působení řadíme tepelné působení a záření (Rutala a Weber, 2004).

### 3.2.1 Teplem

V bakteriologii se ke sterilizaci využívá v malé míře plamen. Opálení se provádí pouze u malých kovových předmětů, které nejsou nijak předem ošetřeny desinfekcí na bázi alkoholu. Sterilizace je poté neúčinná, hoří totiž pouze lihové páry a daný předmět je prakticky studený. Další možnost sterilizace je horkým vzduchem. Zde se používá teplota v rozmezí 160 °C – 180 °C. Zařízení se nazývají horkovzdušné sterilizátory, které mají zabudovány ventilátory s nuceným oběhem vzduchu. Jediná nevýhoda sterilizátorů je, že se do nich dají vkládat pouze předměty ze skla nebo z porcelánu. Účinnost je skoro 100 %. Prakticky jsou při 180 °C zabity všechny nesporeující mikroorganismy do pěti minut, sporeující do dvaceti minut.

Další metoda sterilizace je pára pod tlakem. Přístroj, který se používá ke sterilizaci, se nazývá parní sterilizátor neboli autokláv. Hlavní výhodou autoklávů je, že se dá takto sterilizovat nejen sklo, kov, ale dále i obvazové materiály, některé roztoky, některé druhy plastů, bavlněné i lněné prádlo. Princip autoklávu spočívá v tom, že horká pára při styku s chladnějšími předměty kondenzuje a předává předmětu velké množství výparného tepla. Tato změna usmrtí přítomné mikroorganismy tepelnou denaturací bílkovin, rozkladem nukleových kyselin a porušením buněčných membrán (Votava, 2005).

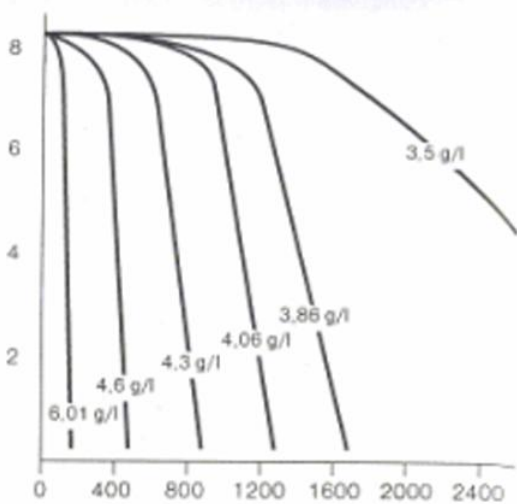


Obrázek 8 Autokláv (Black, 2012)

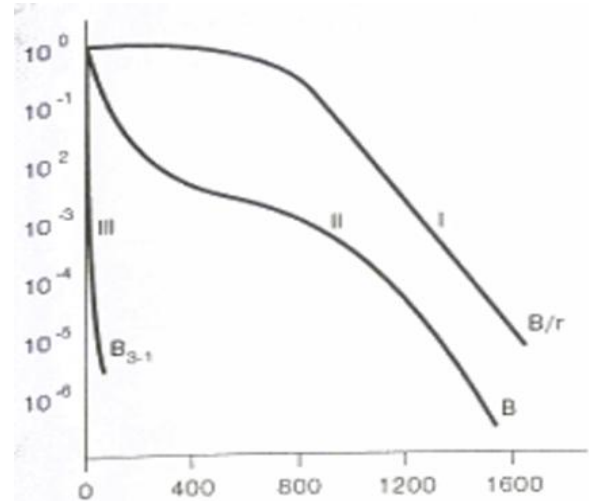
### 3.2.2 Zářením

Mohlo by se zdát, že jasným favoritem je tady UV záření, bohužel je jeho nevýhoda v tom, že UV záření neproniká do hloubky. Jde o vlnění od 40 – 390 nm, kde je jeho efektivní působení kolem 200 nm. Kinetika hynutí pod účinkem UV světla nebo pod účinkem vysoké teploty je vztažena na koncentraci živých buněk a na čas. Rychlostní konstanta je

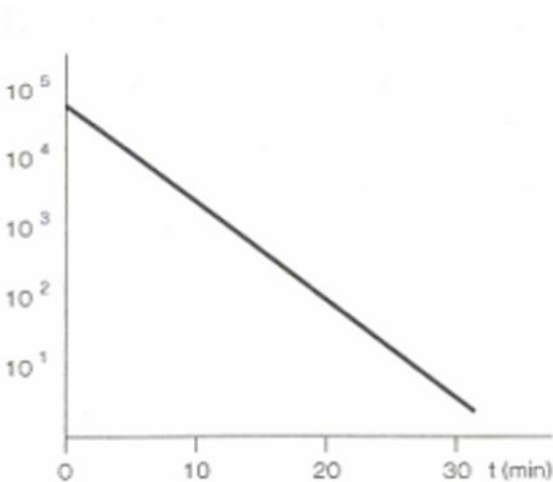
míra rychlosti hynutí. Čím je konstanta větší, tím je faktor účinnější. Další důležité záření při sterilizaci je ionizační záření tzv. radiační, které působí na vlnové délce 0,1 nm až 40 nm. Většinou se používá ke sterilizaci některých typů pryží, jako jsou ve zdravotnické kanaly, injekční stříkačky. Výhodou ionizačního záření je, že proniká jak obaly, tak sterilizovaným materiálem. Většinou se používá dávka záření 25 kilogray, která zaručí snížení počtu bakterií o  $10^8$  (Black, 2012).



Obrázek 9 Hynutí *E. coli* při různých koncentracích fenolů v závislosti log živých buněk na čase (Bednář et al., 1996)



Obrázek 10 Křivka hynutí tří různých kmenů *E. coli* pod vlivem UV záření v závislosti přeživších bakterií na energii eng/mm (Bednář et al., 1996)



Obrázek 11 Počet živých bakteriálních spor v závislosti na čase při teplotě 120 °C (Bednář et al., 1996)

### 3.3 Antibakteriální účinek nanostrříbra

Nyní se zaměřím pouze na antibakteriální aktivitu nanočástice stříbra.

Účinek nanočástice stříbra je stále atraktivní pro biomedicínské a farmaceutické oblasti, jako alternativní možnost léčby infekčních onemocnění způsobených kmeny bakterií rezistentních na antibiotika, zejména Gramnegativní bakterie (Desselberger, 2000). Antibakteriální aktivita koloidů stříbra / nanostrříbra se úzce vztahuje k velikosti částic. Čím jsou stříbrná jádra menší, tím je vyšší antibakteriální aktivita (Kholoud et al., 2010). Vlastnosti, které mohou změnit stabilitu a biologickou aktivitu jsou spojeny s velikostí, tvarem a výrobní metodou. Např. stříbrné nanočástice ve tvaru desky mají vyšší antibakteriální aktivitu proti *Escherichia coli*, než stříbrné nanočástice ve tvaru tyče (Salem et al., 2014).

Nanostrříbro u bakterií inhibuje replikaci DNA, ribozomální expresi, zasahuje do bakteriálního transportu elektronů při všech dějích (Yamanaka a Hara, 2005). U stříbra byla prokázána afinita k fosfátům, se kterými se váže za vzniku  $Ag_3PO_4$ , a tudíž dochází k poruše transportu elektronů a oxidativní fosforylace v buňce (Klouda, 2000). V současné době se testuje nano strříbro na bakteriích *Vibrio cholerae* a *Escherichia coli*, které jsou příčiny těžkého průjmu v nejhorším případě smrti. K onemocnění dochází převážně v rozvojových zemích. Oba patogeny vykazují podobné rezistentní chování vůči antibiotikám. V pokusu byly na patogeny použity nanočástice o průměru 5nm, připravené pomocí zelené biosyntézy. Byla prokázána inhibice aldenyl cyklasy, což je enzym pro tvorbu biofilmu (Salem et al., 2014).

### 3.4 Vedlejší účinky antibakteriálních látek

Jako vedlejší účinky můžeme posuzovat toxicitu, oslabení imunitní reakce organismu, alergické reakce a nepřímé účinky. Mezi přímé toxické účinky řadíme lokální projevy, gastrointestinální, které zahrnují neurotoxické, ototoxické, hepatotoxické, nefrotoxické, hematotoxické působení. Z alergických reakcí je asi nejběžnější alergie na penicilin (Julák, 2006).

### 3.5 Rezistence mikrobů k antimikrobiálním látkám

Některé mikroorganismy jsou primárně rezistentní na některé antimikrobiální látky. Např. Gramnegativní tyčky jsou přirozeně rezistentní vůči penicilínu, linkosamidům a makrolidům. Streptokoky jsou rezistentní na aminoglykosidy. Větší problém pro nás je

získaná rezistence na antibiotika, kdy daný kmen by měl být na antibiotikum primárně citlivý, ale získal vůči němu rezistenci. Např. již jednou zmíněný penicilin, který byl primárně určen na *S. aureus*, ale již nyní na 90 % druhů nepůsobí. Mechanismy vzniku rezistence na antibiotika se dělí to čtyř dějů. A to na: změnu cílové molekuly antibiotika, zhoršení průniku do buňky, aktivní vyčerpání z buňky a inaktivace vlivem enzymů (Votava, 2005).

### 3.6 Metody antibakteriálních testů

K důkazu účinnosti antibakteriální látky se velmi často využívají difúzní metody, které slouží k semikvantitativnímu stanovení citlivosti bakterií na danou antibakteriální látku. Hlavní roli zde hraje koncentrační gradient, který se snižuje vlivem difúze antibakteriální látky ze zdroje do okolí. Snížený koncentrační gradient zabrání růstu bakterií do vzdálenosti účinné inhibiční zóny (Závadová, 1986).

#### 3.6.1 Difúzní disková metoda také 6.1.3 ČSN EN ISO 20645

Metoda je založena na principu difundování antibakteriálního přípravku do prostředí. Při této zkoušce se pracuje s bakteriemi *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* (ČSN EN ISO 20645) Zkoumaný vzorek se umístí na agarovou půdu, která je inokulována testovacími bakteriemi. Vyhodnocování se provádí po 24 h, kdy se zkoumá nárůst bakterií pod vzorkem nebo případně v okolí vzorku. Stanovuje se inhibiční zóna, která lze nejspolehlivěji stanovit podle vztahu MIC, což je nejnižší koncentrace látky, která již inhibuje viditelný růst. Udává se v jednotkách  $\mu\text{g/ml}$  nebo  $\text{mg/l}$  a průměr inhibiční zóny (Závadová, 1986). Vyhodnocení zkoušky je hodnoceno jako dobré, na hranici účinnosti nebo nedostačné (ČSN EN ISO 20645).

#### 3.6.2 Agarová difúzní metoda

Nyní se využívá toho, že je dané inokulum přímo rozptýleno v ještě rozehřáté agarové vrstvě v Petriho misce. Metoda je výhodná pro striktní anaeroby. Takto se také může provést test na úhrn bakterií přímo z materiálu. Současně se doporučuje přítomné aeroby potlačit kanamycinem a vankomycinem (Závadová, 1986).

#### 3.6.3 Diluční metoda

Princip spočívá v rozpuštění antibiotik v tekutém bujonu nebo v pevném agaru. Rozlišujeme dvě metody a to pomocí makrotestu nebo mikrotestu. Tyto metody měří nejnižší

koncentraci antibiotik, která již inhibuje viditelný růst. Výhoda metod je v tom, že lze otestovat současně jeden kmen vůči více antibiotikům (Špaček, Buchta a Jílek, 2013).

#### **3.6.4 6.1.1 AATCC Test Method: 100-2004- Antibacterial Finishes on Textile Materials**

Tato metoda ukazuje kvantitativní postup hodnocení stupně antibakteriální aktivity. Posuzuje se antibakteriální účinnost daného textilního materiálu, který je v interakci s danou bakterií. Určuje se faktor redukce, který ukazuje, o kolik došlo ke snížení inokulované koncentrace bakterií. Faktor se přepočítává na počet obnovených bakterií vzhledem k neupravenému standardu (AATCC Test Method, 2012)

#### **3.6.5 6.1.2 AATCC Test Method: 147-2004-Antibacterial activity Assessment of textile materials**

Jedná se o metodu stanovení antibakteriální aktivity upravených textilních povrchů. Metoda je velmi citlivá, ale obtížná na provedení a časově náročná na rutinní kontrolu kvality. Ve výsledku se hodnotí velikost tzv. halo zón, což jsou oblasti okolo testovaného vzorku (AATCC Test Method, 2011).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Testované vzorky

Stříbro v podobě nanočástic je v poslední době využíváno v celé řadě kosmetických a zdravotnických přípravků. Jeho účinnost může být odlišná s ohledem na lékovou formu, koncentraci, velikost a tvar částic a mnoha dalších faktorech. V praktické části byly testovány pouze vzorky jedné formy nanočástic a to konkrétně koloidní. Praktická část práce se zaměřila na ověření antibakteriálního efektu komerčně dostupných přípravků obsahujících stříbro v koloidní formě. Jednotlivé vzorky nejsou označeny výrobcem a jsou definovány jako vzorek č. I, vzorek č. II a vzorek č. III. Výrobky byly zakoupeny jak v distribuční síti lékáren, tak i v internetovém obchodě. Mezi zakoupením výrobků a jejich testováním byly vzorky uchovávány v podmínkách definovaných v příbalovém letáku. Vzorky byly použity do 24 hodin od zakoupení. Jednotlivé vzorky je možno definovat následujícím způsobem:

Vzorek č. I. Jednalo se o krém, který kromě koloidního stříbra obsahoval konopný extrakt. Využití krému předpokládá jeho kontakt se zdravou či mírně podrážděnou kůží. Konzistence vzorku byla na pomezí gelu a krému. Produkt je volně dostupný ve specializovaných prodejnách. Objem výrobku stanovil výrobce na 15 ml. Před samotným testováním byl vzorek homogenizován. Vzorek nebyl u bakterie *E. coli* stanoven, jelikož se do něj vneslo inokulované množství bakterie připravené ve fyziologickém roztoku, tedy 9 % NaCl. Až po vnesení takto připraveného inokula jsme si uvědomily, že přítomné chloridové ionty inaktivují ionty stříbrné. Tato reakce se projevila vznikem sraženiny. Tudíž jsme musely připravit nové inokulum pouze v demineralizované vodě. Vzorek č. I. se tedy nepodařilo stanovit.

Vzorek č. II. V tomto případě se jednalo o sprej, který obsahoval koloidní stříbro o koncentraci 20 ppm. Velikost nanočástic uvádí výrobce od 1,5 – 10 nm. Sprej je primárně určen pro zevní použití, aplikuje se lokálně na tváře, paže i podpaží. Při častějším použití by měl výrazně snižovat pocení. Tedy má se chovat jako deodorant, antiperspirant. Výrobce uvádí, že je nutné skladovat sprej ve tmě. Pumpičkový aplikátor umožňuje rovnoměrné nanesení produktu. Celkový objem výrobku činil 25 ml. Možné zakoupení je pouze na webových stránkách výrobce. Jeho dohledatelnost je velmi snadná, jedná se totiž o český výrobek. Před samotným testováním byl vzorek homogenizován.

Vzorek č. III. Jedná se o gel, který kromě koloidního stříbra také obsahuje extrakt z konopí, panthenol a koenzym Q10. Gel má zmírňovat potíže při nadměrném pocení nohou. Celkový obsah výrobku byl 75 ml. Celý obsah se pro experiment nevyužil. Gel se dá zakoupit ve všech lékárnách. Před samotným testováním byl vzorek také homogenizován.

## 4.2 Použité bakterie

V experimentu byly použity dva zkušební kmeny a to *Staphylococcus aureus* CCM 4516 (ATCC; American Type Culture Collection 6538) a *Escherichia coli* CCM 4517 (ATCC; American Type Culture Collection 8739).

### 4.2.1 *Escherichia coli*

*E. coli* patří mezi bakterie fakultativně anaerobní, nesporulující. Náleží ke Gramnegativním bakteriím, které mají bakteriální stěnu tvořenou vrstvou proteoglykanu a vrstvou lipopolysacharidu. Bakteriální buňky jsou typicky tyčinkovité o délce asi 2  $\mu\text{m}$  a tloušce 0,5  $\mu\text{m}$ . *E. coli* se vyskytuje v zažívacím traktu teplokrevných organismů (Rosypal, 2003). Některé poddruhy mohou působit neškodně, ale např. sérovary O157:H7, O111:B4, O121, O104:H21 způsobují závažné onemocnění, protože produkují toxiny, které mohou být v konečné fázi až letální. K infekci ve většině případů dochází po požití neomyté zeleniny a špatně tepelně upraveného masa. Pro zamezení šíření bakteriální infekce se jedinci podávají antibiotika např. streptomycin nebo gentamicin, na které je *E. coli* citlivá. Vůči antibiotikům se může vytvořit rezistence. Ta vzniká zneužíváním antibiotik, jejich nadužíváním a také přidáváním do krmiva zvířatům k podpoře jejich růstu. Výskyt bakterie není omezen pouze na hostitelské prostředí, ale může se vyskytovat i mimo tělo. Přítomnost bakterie nám slouží jako indikátor znečištění vod (Juhaňák, 2012).

### 4.2.2 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* běžně nazývaný jako zlatý stafylokok, patří mezi anaeroby, které netvoří spory. Je představitelem Grampozitivních kok, které nelze pod mikroskopem odlišit od jiných Grampozitivních kok např. od *Streptococcus pyogenes*. *Staphylococcus aureus* je taktéž významný patogen, který má široké pole působnosti. Od méně závažných kožních onemocnění až po stavy ohrožující život. Vyskytuje se na pokožce a sliznicích. Mezi nejznámější nemoci vyvolané touto bakterií patří: endokarditida, což je onemocnění srdečních chlopní v důsledku tvorby biofilmu, pneumonie, osteomyelitida, která se po postižení kloubů projevuje jako hnisavá artritida, dále pak záněty mléčné žlázy a v neposlední řadě

také syndrom toxického šoku. Ten je způsoben proniknutím toxinu nebo i enterotoxinů, případně jejich producentů do krevního oběhu. I zde je nutná antibiotická terapie, která je v tomto případě velmi komplikovaná. Na *staphylococca* byl použit penicilin, na který se rychle začala tvořit rezistence u některých kmenů, protože se díky přenosům plasmidů vytvořil enzym penicilinas, který tuto rezistenci podporuje. Nyní se zavádí jako antibiotikum vaktomycin, na který je většina kmenů citlivých (Julák, 2006).

### 4.3 Přístroje

Pro experiment byly využívány následující přístroje a zařízení: Biologický inkubátor INE 400 Memmert 531, laminární box s řízenou cirkulací vzduchu Thermo Elecron LED GmbH (Germany), optický mikroskop (Olympus CKX 41), autokláv tuttner typ 3150 ELV, minitřepačka MS1 Laboratory Equipment (USA), stolní digitální váhy Denver Summit SI- 4002 (Germany), vodní lázeň Memmert, počítač kolonií Count Plus Schütt Labortechnik (Germany).

### 4.4 Chemické látky

Demineralizovaná voda, Soyabean Casein Digest Agar (Tryptone Soya Agar) HiMedia Laboratories (India), lecitin 3 g/l, polysorbát 30 g/l, NaCl

Neutralizátor- Jako neutralizátor se často používá komplex složený z lecitinu a polysorbátu. Dále se přidává třetí složka v závislosti na povaze látky, kterou chceme zneutralizovat. Pro stříbro nebylo nic doporučeno, proto jsme použili NaCl. Tedy výsledný neutralizátor byl složený z lecitinu o koncentraci 3 g/l, z polysorbátu o koncentraci 30 g/l a z NaCl 5 %.

Léčivý přípravek- Jedná se o látku nebo o kombinaci více látek, které jsou určeny k léčení.

Léková forma- každý lék je zpracován do určité formy, která odpovídá požadovanému způsobu použití. Lékové formy se dělí na pevné, polotuhé a kapalné. Mezi polotuhé formy patří masti, pasty, gely. A do kapalných forem řadíme roztoky, kapky, spreje a další. V našem pokusu byly použity následující lékové formy a to polotuhé a kapalné. Je nutné dbát na to, s jakou konzistencí se pracuje, neboť rozdílná léková forma ovlivňuje rychlost uvolňování účinné látky.

## 5 DESIGN EXPERIMENTU

Design experimentu vychází z Českého lékopisu 2009, konkrétně jeho Doplnku 2013. Vlastní předpis je pak v části „Účinnost protimikrobních konzervačních látek“. Postup zahrnuje následující: Léčivý přípravek, který nemá vlastní dostačující protimikrobní účinek, může být nadstaven konzervační látkou. Většinou se přidává protimikrobní látka do přípravků na vodné bázi. Antimikrobní látka zamezuje množení bakterií ve výrobku a tím pádem chrání pacienta před případným poškozením nebo infekcí. Účinnost protimikrobní konzervace se může snížit nebo zvýšit léčivou látkou přípravku, do něhož je přidána. Protimikrobní účinnost se stanoví v jeho konečném obalu a v průběhu doby jeho použitelnosti, aby se zjistilo, jestli se daná látka nijak nenarušila. V průběhu vývoje léčivého přípravku se má prokázat, že protimikrobní účinnost přípravku s přidáním vhodné protimikrobní látky zajišťuje ochranu před nežádoucími účinky. Účinnost protimikrobního působení se prokazuje dále popsanou zkouškou.

### 5.1 ZKOUŠKA ÚČINNOSTI PROTIMIKROBNÍ KONZERVACE

Podstata zkoušky je naočkování předepsaného množství vhodných mikroorganismů do léčivého přípravku v jeho konečném obalu. Skladování naočkovaného přípravku musí být při předepsané teplotě a odebírání vzorků po určených intervalech. Dále se stanovuje počet přežitých mikroorganismů. Konzervační vlastnosti přípravků jsou dostačující, jestliže při zkoušce počet mikroorganismů významně nevzroste. Kritéria přijatelnosti poklesu počtu mikroorganismů v závislosti na čase se liší podle druhu přípravku a stupně požadované ochrany. Zkoušky se provádějí s každým kmenem samostatně. Při této metodě jsou zkušební kmeny: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*, *Escherichia coli*.

### 5.2 PŘÍPRAVA INOKULA

Nejprve bych vysvětlila, co to inokulum je. Jedná se o suspenzi bakterií, které jsou v prostředí média, v našem případě v testovaném vzorku. Poté je tedy toto inokulum přeneseno na živnou půdu.

Před zkouškou se naočkuje na povrch agaru s hydrolyzáty sóji a kaseinu. Kultury bakterií se inkubují 18 h až 24 h při 30 °C až 35 °C. Narostlé kolonie bakterií se pomocí sterilní suspenzní kapaliny převedou do vhodné nádoby a stejnou kapalinou se naředí tak, aby obsahovaly  $10^8$  mikroorganismů v mililitru. Z každé suspenze se ihned odebere vzorek

a stanoví se počty jednotek vytvářejících kolonie v mililitru každé suspenze počítáním na pevných půdách nebo metodou filtrace. Tato hodnota slouží ke stanovení velikosti inokula a je východiskem pro provedení zkoušky. Suspenze se mají použít ihned po přípravě.

### 5.3 POSTUP ZKOUŠKY

Ke stanovení počtu životaschopných bakterií v inokulovaném přípravku se používá stejná živná půda jako při kultivaci příslušné bakterie. Naočkuje se série zkoušeného přípravku tak, aby v gramu nebo v mililitru bylo  $10^5$  až  $10^6$  bakterií. Objem suspenze inokula nemá přeskočit 1 % objemu přípravku. Pečlivě se promíchá, aby se dosáhlo stejnoměrného rozptýlení. Naočkovaný přípravek se udržuje při teplotě 20 °C až 25 °C, chráněn před světlem. Z každého obalu se odebírá vhodný vzorek, obvykle 1 g nebo 1 ml a to ihned po naočkování a poté v daných intervalech. Podle druhu přípravku se stanoví počet životaschopných bakterií. Zajistí se odstranění jakékoliv zbytkové protimikrobní účinnosti přidáním inaktivační látky. Použije-li se specifická inaktivační látka, je nutno přiměřenými kontrolami ověřit, zda je systém schopen umožnit růst zkouškového kmene. Podle kritéria přijatelnosti posuzujeme účinnost dané látky. Přijatelnost se odvíjí i od použití přípravku.

### 5.4 Kritéria přijatelnosti

Požadavky pro hodnocení protimikrobní účinnosti jsou uvedené v tabulce vyjádřeny v logaritmu snížení počtu životaschopných mikroorganismů proti hodnotám získaným pro čerstvě naočkované přípravky.

Tabulka 1 Kritéria přijatelnosti

<b>Logaritmus snížení počtu zárodků</b>					
	<b>6 h</b>	<b>Po 24 h</b>	<b>Po 7 dnech</b>	<b>Po 14 dnech</b>	<b>Po 28 dnech</b>
<b>Bakterie A</b>	2	3	-	-	-
<b>Bakterie B</b>	-	1	3	-	-

-beze změny/ bez nálezu

Požadavky v řádku A vyjadřují doporučenou účinnost, které se má dosáhnout. V odůvodněných případech, kdy tyto požadavky nemohou být splněny, např. pro zvýšené riziko nežádoucích účinků, se musí uplatnit požadavky uvedené v řádku B.

## 6 PRAKTICKÉ PROVEDENÍ EXPERIMENTU

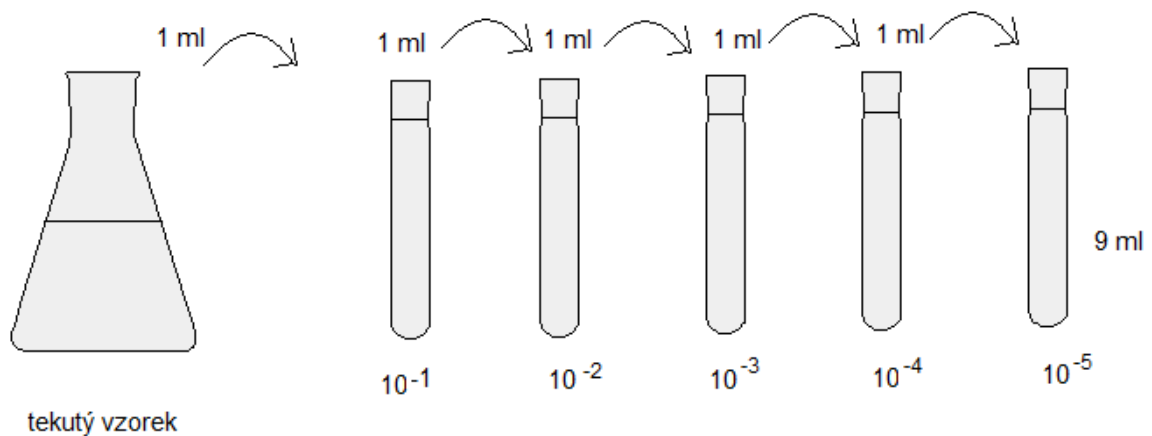
Před samotným započítáním experimentu byla nejdříve připravena živná půda a neutralizátor.

Pro zkoušku byl připravený neutralizátor, tedy inaktivační látka, o objemu 200 ml. Jednotlivé složky byly naváženy a zality demineralizovanou vodou do požadovaného objemu. Lecitin o koncentraci 3 g/l byl navážen v množství 0,6 g. Polysorbát byl navážen na hmotnost 6 g. NaCl bylo odváženo 1,7 g. Dále byla připravena živná půda. Bylo naváženo 6 x 16 g TSA a zalito 400 ml demineralizované vody. Složky byly zhomogenizovány a spolu s neutralizátorem vloženy do autoklávu. Mezi tím, byly připraveny testovací vzorky a to tak, že se každý rozdělil na polovinu. Tedy pro zkušební kmen *E. coli* a *S. aureus*. Navážené množství bylo vloženo do nádobek s tmavým sklem, pro minimalizaci případného rozkladu přípravku působením slunečního záření. Jako další krok je příprava životaschopných bakterií. Odebrala se část bakterií, které byly den předem nakultivovány na TSA agaru a přidaly se k 9 ml fyziologického roztoku.

**První experiment:** Při prvním provedení pokusu, došlo k zjištění, že fyziologický roztok působí jako stabilizátor. Tato skutečnost nebyla popsána ani v lékopise, ani jsme ji nedohledali v odborné literatuře. Z tohoto důvodu došlo při využití fyziologického roztoku k zastavení reakce, protože podporoval vylučování stříbra. Byli jsme tedy nuceni začátek pokusu opakovat s tím, že se inokulum připravilo do demineralizované vody.

**Druhý experiment:** Nyní se připravilo inokulum do demineralizované vody. Po důkladné homogenizaci se odebral vzorek bakterií, sloužící k odhadu počtu kolonií. Pomocí mikroskopu jsme na Bürkerově komůrce zkontrolovali, že počet bakterií přibližně odpovídá hodnotám stanovených v Českém lékopisu. Bürkerova komůrka je sestavená tak, že je na horní ploše uprostřed zbroušena do hloubky 0,1 mm, na dně tohoto zábrusu je na ploše 100 mm<sup>2</sup> počítací mřížka definovaných rozměrů. Ve svislém i vodorovném směru je mřížka tvořená liniemi od sebe vzdálenými 0,25 mm. Které tvoří čtverce o ploše 0,0625 mm<sup>2</sup>. Další linie jsou ve vzdálenosti 0,125 mm. Určení přibližného počtu mikroorganismů se provádí dle vzorce  $N_{org.} \cdot v = N_{org.} / (\text{počítaná plocha v mm}^2 \times \text{hloubka komůrky v mm} \times \text{ředění})$ . Do testovacích skleniček bylo vloženo inokulum podle hmotnosti vzorku. Důležitým parametrem zde bylo, že množství vpraveného inokula nemělo přesáhnout 1 % celého množství vzorku. Dále byly do stojánku umístěny zkumavky s 9 ml neutralizátoru. Do první bylo odpipetováno množství 1 ml bakterií *E. coli* a do druhé 1 ml *S. aureus*. Poté

jsme odpipetovali do druhé zkumavky 1 ml připraveného vzorku s inokulem a prováděli jsme ředění od  $10^0$  až po  $10^{-5}$ . Ředění je nutné z důvodu počitatelnosti kolonií. Vlastní ředění se provádí desetinou řadou, tedy původní vzorek se ředí postupně o řády: 10x, 100x, 1000x, 10000x, 100000x. Postup desetinného ředění probíhá následovně: Do zkumavky se převede vzorek o určitém objemu a poté se zředí s devítinásobkem jeho objemu fyziologickým roztokem nebo demineralizovanou vodou. V tomto experimentu se odebral vzorek o objemu 1 ml a zředil se s 9 ml neutralizátoru. Směs se ve zkumavce zhomogenizuje. Poté je postup analogický. Znovu se odebere 1 ml vzorku. Který se zředí s 9 ml neutralizátoru. Takto se postupuje až do zředění  $10^{-5}$ . Viz obrázek



Obrázek 12 Postup ředění

Do připravených Petriho misek se začal odlévat agar s 1 ml zředěného vzorku. U každého ředění se stanovovaly dvě Petriho misky. Analogicky se takto postupovalo u obou kmenů bakterií. Následně byly misky vloženy do inkubátoru na dobu 24 h. Po uplynutí stanovené doby se určil počet kolonií, které působení antibakteriální látky přežily. Výsledky se vyhodnocují pouze u ředění, při kterých jsou bakteriální kolonie počitatelné. Měření se provádělo také po 48 h a po 7 dnech, po 14 dnech, po 28 dnech. Hodnoty byly zaznamenány do tabulky viz. níže. Výpočet pro zjištění hodnoty cfu/ml se dá vypočítat jako průměrný počet kolonií/ příslušné ředění.



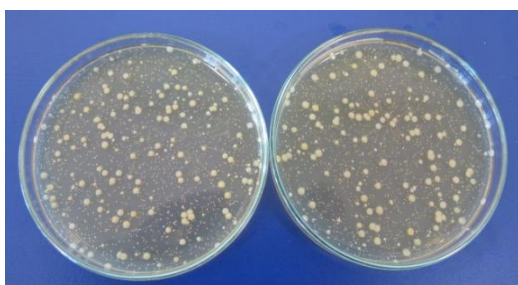
## 7 VÝSLEDKY

Stanovení antibakteriální aktivity nanočástice stříbra je velice důležité. Neboť je řešením některých onemocnění způsobených bakteriemi. Pomocí antibakteriální aktivity se dá i onemocněním předcházet. Uvedené výsledky poskytují obraz o reálné účinnosti testovaných komerčních produktů.

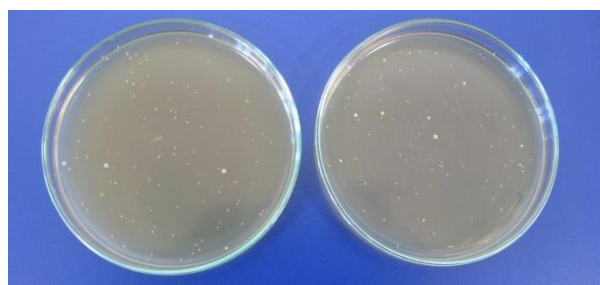
### 7.1 Zkušební kmen: *Staphylococcus aureus* CCM 4516

Inokulum bylo připraveno do sterilní demineralizované vody. Koncentrace inokula stanovena pomocí metody zalévání do agaru TSA. Paralelně se prováděly dvě stanovení a průměrná hodnota počtu bakterií byla  $1,0 \cdot 10^7$  cfu/ml. Číslo odpovídá počtu životaschopných bakterií v 1 ml vzorku. Inokulace daného vzorku probíhala tak, že inokulum nemělo přesáhnout 1 % vzorku. Tím pádem u ve vzorku č. I bylo 5,5 g krému a 0,055 ml inokula. Ve vzorku č. II bylo 10 g spreje s 0,1 ml inokula a ve vzorku č. III bylo 20 g gelu s 0,2 ml inokula. Všechny inokulované vzorky byly homogenizovány a skladovány ve tmě za laboratorní teploty. Inkubace probíhala po dobu 24 h při teplotě 36 °C.

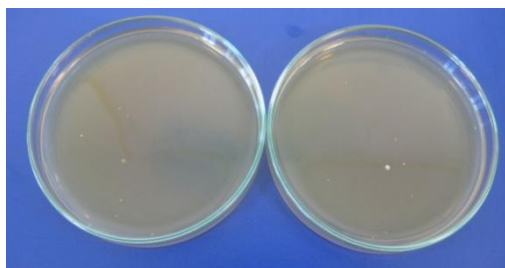
Fotografické záznamy ukazují působení nanočástice stříbra ve vzorku č. 1 inokulované bakterií *S. aureus*.



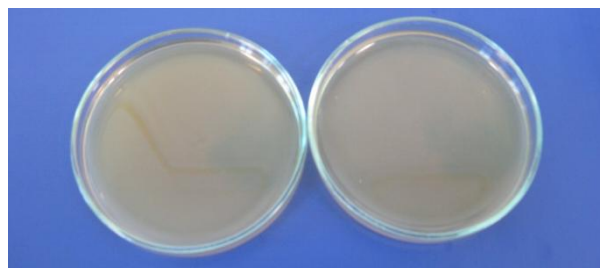
A)



B)



C)



D)

Obrázek 13 Fotografie výsledků testů antibakteriální aktivity ve vzorku č. I

A) Bakteriální suspenze *S. aureus* při ředění  $10^{-5}$  B) Vzorek č. I Inokulovaný *S. aureus* ihned po naočkování C) Vzorek č. I Inokulovaný *S. aureus* po 24 h D) Vzorek č. I Inokulovaný *S. aureus* po 7 dnech

Tabulka 2 Antibakteriální účinnost koloidního stříbra na kmen *Staphylococcus aureus* po dobu 28 dnů

<b>Antibakteriální účinnost koloidního stříbra na kmen <i>Staphylococcus aureus</i> po dobu 28 dnů</b>					
<b>Označení vzorku</b>	<b>Počet cfu/ ml</b>				
	<b>Čerstvě naočk. gel</b>	<b>Po 24 h</b>	<b>Po 7 dnech</b>	<b>Po 14 dnech</b>	<b>Po 28 dnech</b>
<b>Vzorek č. I</b>	$1,5 \cdot 10^5$	11	-*	-	-
<b>Vzorek č. II</b>	-	-	-	-	-
<b>Vzorek č. III</b>	$5,3 \cdot 10^4$	-	-	-	-

Poznámka: cfu/ml (Colony Forming Unit) jedná se o jednotku udávající počet životaschopných bakterií v 1 ml vzorku. Český ekvivalent je KTJ/ml (kolonie tvořící jednotky).

\*Bez nálezu

Dle Českého lékopisu musí být vyhodnocení experimentu vyjádřeno v logaritmickeém snížení počtu životaschopných zárodků proti hodnotám získaných po čerstvě naočkované přípravky.

Tabulka 3 Logaritmus snížení počtu zárodků u bakterie *Staphylococcus aureus*

Logaritmus snížení počtu zárodků					
Označení vzorku	Čerstvě naočk. gel	Po 24 h	Po 7 dnech	Po 14 dnech	Po 28 dnech
Vzorek č. I	0	4	5	-	-
Vzorek č. II	5	-	-	-	-
Vzorek č. III	1	5	-	-	-

–beze změny/ bez nálezu

## 7.2 Zkušební kmen: *Escherichia coli* CCM 4517

Inokulovaná bakteriální suspenze byla připravena do sterilní demineralizované vody. Také se stanovila koncentrace inokula metodou zalévání do agaru TSA. Číselná hodnota  $2,6 \cdot 10^8$  cfu/ml byla stanovena jako průměrná hodnota dvou měření a odpovídá počtu životaschopných bakterií. Podmínka při inokulaci vzorku je stejná jako u bakterie *S. aureus* a musí být i tady splněna podmínka, že množství inokula nesmí přesáhnout 1 % vzorku. Vzorek č. I se bohužel nepodařilo stanovit. Důvody jsou objasněny výše. Vzorek č. II obsahoval 10 g spreje s 0,1 ml inokula. Vzorek č. III obsahoval 20 g gelu s 0,2 ml inokula. Všechny inokulované vzorky byly zhomogenizovány a skladovány ve tmě za laboratorní teploty. Inkubace probíhala po dobu 24 h při teplotě 36 °C.

Tabulka 4 Antibakteriální účinnost koloidního stříbra na kmen *Escherichia coli* po dobu 28 dnů

<b>Antibakteriální účinnost koloidního stříbra na kmen <i>Escherichia coli</i> po dobu 28 dnů</b>					
<b>Označení vzorku</b>	<b>Počet cfu/ ml</b>				
	<b>Čerstvě naočk. gel</b>	<b>Po 24 h</b>	<b>Po 7 dnech</b>	<b>Po 14 dnech</b>	<b>Po 28 dnech</b>
<b>Vzorek č. I</b>	/	/	/	/	/
<b>Vzorek č. II</b>	-	-	-	-	-
<b>Vzorek č. III</b>	$1,5 \cdot 10^5$	$6,5 \cdot 10^3$	-	-	-

Poznámka: cfu/ml (Colony Forming Unit) jedná se o jednotku udávající počet životaschopných bakterií v 1 ml vzorku. Český ekvivalent je KTJ/ml (kolonie tvořící jednotky).

Dle Českého lékopisu musí být vyhodnocení experimentu vyjádřeno v logaritmickeém snížení počtu životaschopných zárodků proti hodnotám získaných po čerstvě naočkované přípravky.

Tabulka 5 Logaritmus snížení počtu zárodku u bakterie *Escherichia coli*

<b>Logaritmus snížení počtu zárodků</b>					
<b>Označení vzorku</b>	<b>Čerstvě naočk. gel</b>	<b>Po 24 h</b>	<b>Po 7 dnech</b>	<b>Po 14 dnech</b>	<b>Po 28 dnech</b>
<b>Vzorek č. I</b>	/	/	/	/	/
<b>Vzorek č. II</b>	6	-	-	-	-
<b>Vzorek č. III</b>	1	3	6	-	-

### **7.3 Shrnutí experimentu**

Rozsah experimentu byl delší než jeden týden, proto jsem v následující tabulce shrnula jednotlivé úkony, které probíhaly v rozdělených časových intervalech.

Tabulka 6 Postup práce

doba pokusu	Prováděná práce			
<b>1. Týden</b>				
<b>Den 1</b>	Příprava živné půdy TSA agarů	Přeočkování a kultivace bakterií	Příprava neutralizátoru	Rozdělení každého vzorku na polovinu
<b>Den 2</b>	Příprava inokula <i>E. coli</i> , tak <i>S. aureus</i>	vpravení inokula do vzorků, homogenizace	Stanovení koncentrace inokula (ředění od $10^0$ po $10^{-7}$ ); Zalévání do agarů inkubace 24 h	Neutralizace vzorku -Ředění zneutralizovaného vzorku od $10^0$ po $10^{-5}$ -Zalévání do agarů -inkubace 24 h
<b>Den 3</b>	Vyhodnocení výsledků z minulého dne	Neutralizace vzorku Ředění zneutralizovaného vzorku od $10^0$ po $10^{-5}$	Zalévání do agarů inkubace 24 h	
<b>Den 4</b>	Vyhodnocení výsledků z minulého dne			
<b>2. Týden</b>				
<b>Den 1</b>	Neutralizace vzorku Ředění zneutralizovaného vzorku od $10^0$ po $10^{-5}$	Zalévání do agarů inkubace 24 h		
<b>Den 2</b>	Vyhodnocení výsledků z minulého dne			

3. Týden				
Den 1	Neutralizace vzorku Ředění zneutralizovaného vzorku od $10^0$ po $10^{-5}$			
Den 2	Vyhodnocení výsledků z minulého dne			
4. Týden				
Den 1	Neutralizace vzorku Ředění zneutralizovaného vzorku od $10^0$ po $10^{-5}$	Zalévání do agaru inkubace 24 h		
Den 2	Vyhodnocení výsledků z minulého dne			

## 7.4 Diskuze

Výsledky testů zkoumající kmeny bakterií dopadly podle očekávání. Z uvedených tabulek je zřejmé, že největší antibakteriální aktivitu vykazoval vzorek č. II. Z počátku jsem se domnívala, že takto výrazná antibakteriální účinnost je vyvolaná menší velikostí nanočástic. Kholoud uvádí ve své práci *Synthesis and application of silver nanoparticles*, že antibakteriální účinnost nanostříbra je větší, čím jsou jeho rozměry menší. Což se jasně nedalo v mé práci prokázat, protože Vzorek č. II obsahoval stříbrné částice o velikosti 1,5 – 10 nm, to je přibližně stejná hodnota jako u vzorku č. I a č. III., které jsou označeny za koloidy. Koloidní stříbro je definované na rozměr 1 – 10 nm. Tento parametr tedy nemůžeme brát v úvahu. Výrazná antibakteriální účinnost u vzorku č. II se dá tedy zdůvodnit jinou konzistencí vzorku. V knize s názvem *Základní a aplikovaná farmakologie* napsaná Dagmarou Lincovou je definováno, že faktor ovlivňující absorpci léčiva je rozpustnost. Léčiva, která jsou podávána ve vodném roztoku, jsou absorbována mnohem rychleji než léčiva v olejové nebo pevné lékové formě. Dle Desselberga působí nanostříbro hlavně na Gramnegativní bakterie. V našem případě působilo nanostříbro velmi pozitivně i na Grampozitivní bakterie. V úvahu ale také musíme vzít, že vzorky č. I a č. III. Nejsou čisté a obsahují dále ve velké míře kanabinoidy, které jsou také známy svou antibakteriální účinností. Ve své práci to např. uvádí Ibrahim K. A. s názvem *Microbial metabolism of cannaf flavin A and B isolated from Cannabis sativa*. Celkově lze ale prováděný experiment s jistotou považovat za úspěšný. Antibakteriální aktivita stříbra byla dle kritérií přijatelnosti stanovené Českým lékopisem prokázána.

Dále jsem se zamýšlela na tím, jak by tento experiment dopadl, kdyby se nejednalo o nanočástice stříbra, ale o nanočástice zlata. Zde bych chtěla podotknout, že nanočástice zlata se ve větší míře využívají k realizaci jiných vlastností než antibakteriálních. Hojně se využívají v elektronice, kde není kladen důraz na antibakteriální aktivitu. Nicméně jeho antibakteriální aktivitu potvrdilo více autorů nezávisle na sobě. Všichni připravili zlato pomocí zelené syntézy, tedy syntézy pomocí rostlinného organismu. Nevýhoda této metody je, že se přesně nedá určit velikost takto připravených částic. Ovšem antibakteriální účinnost zlata působila jak na bakterie Gramnegativní, tak na bakterie Grampozitivní. Metodiku a antibakteriální účinnost nano zlata na bakterie *E. coli* a *S. aureus* popsal ve své práci Islam et al., 2015. Pro zlato stejně jako pro stříbro platí, že antibakteriální účinnost



roste s klesajícím rozměrem. Proto se domnívám, že by experiment mohl dopadnout velmi podobně.

Mezi částice vykazující antibakteriální aktivitu patří také nanočástice ZnO. Pro svůj experiment bych ji ovšem nezvolila. Ohledně nano ZnO se nyní vedou diskuze o možnosti negativního působení na lidský organismus. Tyto pochybnosti se začaly objevovat zhruba před třemi lety, kdy se začínaly zveřejňovat články o negativním působením nanočástic. Některé studie jako např. Gulanan et al., 2012 v článku *Green synthesized ZnO nanoparticles agens bacterial and fungal pathogens* uvádí, že nanočástice ZnO jsou nebezpečné pouze chemicky připravené, naopak nanočástice připravené pomocí zelené biosyntézy vykazují antibakteriální aktivitu. Aktuální studie z roku 2015 provedená Khan et al. s názvem *Comparative study of cytotoxin and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles* popisují ve svém experimentu, že nanočástice ZnO způsobují hemolýzu v závislosti na jejich koncentraci. S nanočásticemi ZnO se pojí tak velké rizika, že dle mého názoru by rozhodně neměly být součástí jakýchkoliv přípravků, které by mohly přijít do kontaktu s organismem. Pro můj experiment jsou tedy nevhodné.

## 8 ZÁVĚR

V teoretické části jsem se zaměřila na tři hlavní části a to na nanomateriály obecně, kde jsem se zabývala hlavními definicemi, jak jsou tedy nanomateriály charakterizovány a co musí splňovat. Dále jsem popsala, jak se vyvíjely a dostávaly do podvědomí člověka. S tím souvisí i spousta ocenění, která jsou zmíněna v kapitole Historie nanomateriálů a nanotechnologií. Je zřejmé, že vědní obor zabývající se nanotechnologií se vyvíjí a druhů materiálů přibývá. Ve své práci jsem druhy materiálů rozdělila na přírodní, uhlíkové, a nanočástice zlata. Uhlíkové nanomateriály jsem zvolila z toho důvodu, že se řadí mezi materiály, které se stále zkoumají a jsou zajímavé hlavně svou rozmanitou strukturou. Jejich využitelnost je hlavně v technice, kde se uplatňuje jejich vysoká supravodivost. Nanočástice zlata, jsem zařadila proto, že jsou často s nanočásticemi stříbra často srovnávány a mohou také vykazovat antibakteriální aktivitu. Důležitý parametr nanomateriálů je jejich využitelnost ať už v medicíně nebo v průmyslu a podle nároku na materiál také výroba. S každým nanomateriálem zároveň přichází určitá rizika, s jejichž důsledky se můžeme setkat v působení na životní prostředí, ale také v působení na nás samotné.

Jako hlavní část celé práce považuji kapitolu věnující se nanočásticem stříbra, které jsem si vybrala pro antibakteriální působení, které souvisí s rozměrem částic. Velikost nanočástic se dá ovlivnit jejich přípravou a to pomocí chemické redukce, optické redukce, pomocí micel, pomocí hydrogelu nebo pomocí metody zelené biosyntézy.

V závěru teoretické části je uvedena antibakteriální účinnost, která je vyvolaná jednak biologicko – chemickým působením a jednak fyzikálním působením, tedy teplem a zářením. Bohužel, i zde je existence vedlejších účinků, které jsou popsány v podkapitole. Prokázání antibakteriálního působení se provádí pomocí třech metod: difúzní desková metoda, agarová difúzní metoda a třetí diluční metoda.

Praktická část vychází z poznatků uvedených v teoretické části. Zaměření experimentu je na antibakteriální účinky nanočástice stříbra. Tato aktivita se zkoumala u třech náhodně vybraných vzorcích, volně dostupných v síti lékáren, na bakteriální kmeny *E. coli* a *S. aureus*. I zde je kapitola věnovaná metodice a popisu produktů a chemikálií, které byly při práci použity. Dále je detailně popsán celý experiment slovně a výsledky jsou shrnuty do přehledných tabulek. Poslední část práce je věnovaná diskuzi o prováděném experimentu.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AATCC Test Method 100-2012 Antibacterial Finishes on Textile Materials: Assessment of: Developed in 1961 by AATCC Committee RA31 (Revised 2012) [online]. 1961 [cit. 2015-02-11].  
Dostupné z: [http://www.aatcc.org/technical/test\\_methods/scopes/tm100.cfm](http://www.aatcc.org/technical/test_methods/scopes/tm100.cfm)
2. ABDEL-AZIZ, M. S., M. S. SHAHEEN a A. A. EL-NEKEETY, 2014. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. *Journal of Saudi Chemical Society* [online]. Vol. 18, issue 4. DOI: 10.1016/j.jscs.2013.09.011. [cit. 2014-07-22]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610313001014>
3. Antibacterial Activity Assessment of Textile Materials: Parallel Streak Method: Developed in 1976 by AATCC Committee RA31 (Revised 2011) [online]. 1976 [cit. 2015-02-11].  
Dostupné z: [http://www.aatcc.org/technical/test\\_methods/scopes/tm147.cfm](http://www.aatcc.org/technical/test_methods/scopes/tm147.cfm)
4. AQEL, A. et al., 2012. Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. Vol. 5, issue 1, pp. 1-23. DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.08.022. [cit. 2015-02-11]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535210001747>
5. BEDNÁŘ, M. et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. issue 1, Praha Marvil, ISBN 80-238-0297-6.
6. BLACK, J. G., 2012. *Microbiology: principles and explorations*. Issue 8, Hoboken, NJ: Wiley, pp. 851 ISBN 978-047-0541-098.
7. CUI, X. et al., 2014. Aluminium hydroxide stabilised MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as dual-modality contrasts agent for MRI and PET imaging. *Biomaterials* [online]. Vol. 35, issue 22, pp. 5840-5846. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.004. [cit. 2015-0-12]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24768194>
8. ČSN EN ISO 20645 - Plošné textilie - Zjišťování antibakteriální aktivity - Zkouška šíření agarovou destičkou. *Textilní zkušební ústav* [online]. [cit. 2015-02-11]. Dostupné z: <http://www.tzu.cz/mikrobiologie-CZ12409>
9. DESSELBERGER, U., 2000. Emerging and Re-emerging Infectious Diseases. *Journal of Infection* [online]. Vol. 40, issue 1, pp. 3-15. DOI: 10.1053/jinf.1999.0624. [cit. 2014-09-07].

10. DOWLING, A. P., 2004. Development of nanotechnologies. *Materials Today* [online]. Vol. 7, issue 12, pp. 30-35. DOI: 10.1016/S1369-7021(04)006285 [cit. 2015-02-07]. Dostupné z:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702104006285>
11. GUNALAN, S., R., SIVARAJ a V. RAJENDRAN., 2012. Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Progress in Natural Science: Materials International* [online]. Vol. 22, issue 6, pp. 693-700. DOI: 10.1016/j.pnsc.2012.11.015. ISSN 10020071. [cit. 2014-10-12]. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002007112001426>
12. HAMPL, F. a J. PALEČEK, 2002. *Farmakochemie*. issue 1. Praha: VŠCHT, p. 413. ISBN 80-708-0495-5
13. HOŠEK, J., 2011. *Úvod do nanotechnologie*. issue. 1. V Praze: České vysoké učení technické, p. 170. ISBN 978-80-01-04555-8.
14. HUANG, X. a M. A. EL-SAYED, 2010. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research* [online]. Vol. 1, issue 1, pp. 13-28. DOI: 10.1016/j.jare.2010.02.002. [cit. 2014-10-12]. Dostupné z:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123210000056>
15. CHELLARAM, C. et al., 2014. Significance of Nanotechnology in Food Industry. *APCBEE Procedia* [online]. Vol. 8, pp. 109-113. DOI: 10.1016/j.apcbee.2014.03.010. [cit. 2014-10-12]. Dostupné z:  
[http://www.elsevier.com/\\_data/assets/pdf\\_file/0006/235167/Significance-of-Nanotechnology-in-Food-Industry.pdf](http://www.elsevier.com/_data/assets/pdf_file/0006/235167/Significance-of-Nanotechnology-in-Food-Industry.pdf)
16. IAVICOLI, I. et al., 2014. Biomarkers of nanomaterial exposure and effect: current status. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. Vol. 16, issue 3. DOI: 10.1007/s11051-014-2302-9. [cit. 2015-03-3].
17. ISLAM, N. U. et al., 2015. *Pistacia integerrima* gall extract mediated green synthesis of gold nanoparticles and their biological activities. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. DOI: 10.1016/j.arabjc.2015.02.014 [cit. 2014-10-12]. Dostupné z:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535215000489>
18. JATANA, S. a L. A. DELOUISE, 2014. Understanding engineered nanomaterial skin interactions and the modulatory effects of ultraviolet radiation skin exposure. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* [online].

- ne]. Vol. 6, issue 1, pp. 61-79. DOI: 10.1002/wnan.1244. [cit. 2015-04-04]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24123977>
19. JEEVA, K. et al., 2014. Caesalpinia coriaria leaf extracts mediated biosynthesis of metallic silver nanoparticles and their antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Industrial Crops and Products* [online]. Vol. 52, pp. 714-720. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.11.037. [cit. 2015-02-27].
20. JONES, R., 2005. Biology, Drexler, and nanotechnology. *Materials Today* [online]. Vol. 8, issue 8, p. 56. DOI: 10.1016/S1369-7021(05)71057-9. [cit. 2015-03-03].
21. JUHAŇÁK, S., 2012. *Klinicky významné bakterie*. Issue 1. Praha Triton, p. 123. ISBN 978-807-3875-886.
22. JULÁK, J., 2006. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Issue 1. Praha Karolinum, p. 404. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-1270-4.
23. KHOLOUD, M. M. et al., 2010. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. Vol. 3, issue 3, pp. 135- 140. DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.04.008. [cit. 2015-03-27].  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535210000377>
24. KLOUDA, P., 2000. *Základy biochemie*. issue 1. Ostrava. ISBN 10:80-86369-11-0
25. KROTO, H. W. et al., 1985. Smalley Nature [online]. Issue 318 p. 162 DOI: 10.1038/318162a0 [cit. 2015-04-04].  
Dostupné z:  
<http://www.nature.com/nature/journal/v318/n6042/abs/318162a0.html>
26. KUMAR, A. D., 2012. Rapid and Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Leaf Extracts of Parthenium Hysterophorus: A Novel Biological Approach [online]. Pp. 169-171. ISSN: 2230-8407. [ cit. 2015-03-27]  
Dostupné z: [http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/866\\_pdf.pdf](http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/866_pdf.pdf)
27. KVÍTEK, L., 2008. Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra. Habilitační práce. Olomouc, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, p. 79.
28. LAROUI, H. et al., 2013. Nanotechnology in diagnostics and therapeutics for gastrointestinal disorders. *Digestive and Liver Disease* [online]. Vol. 45, issue 12, pp. 995-1002. DOI: 10.1016 / j.dld.2013.03.019. [ cit. 2014-09-27].  
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23660079>
29. LAURENT, S. et al., 2008. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Appli-

- cations. *Chemical Reviews* [online]. Vol. 108, issue 6, pp. 2064-2110. DOI: 10.1021/cr068445e. [ cit. 2015-03-03].  
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr068445e>
30. LEE, I., S. W. HAN, a K. KIM, 2001. Simultaneous preparation of SERS-active metal colloids and plates by laser ablation. *J. Raman Spectrosc* [online]. Vol. 32, pp. 947–952. DOI: 10.1002/jrs.781 [ cit. 2014-09-27].  
Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jrs.v32:11/issuetoc>
31. LEE, S. M., K. CH. SONG a B. S. LEE, 2010. Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Korean Journal of Chemical Engineering* [online]. Vol. 27, issue 2, s. 688-692. DOI: 10.1007/s11814-010-0067-0. [ cit. 2015-04-04] Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11814-010-0067-0>
32. LI, Z. et al., 2012. Reversed micelle Synthesis of Ag/polyaniline nanocomposites via an in situ ultraviolet photo-redox mechanism. *Polymer Composites* [online]. Vol. 33, issue 4, pp. 451-458. DOI: 10.1002/pc.21211. [ cit. 2015-02-04]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pc.21211/abstract>
33. MARTINEZ, M. et al., 2009. Nitric Oxide Releasing Nanoparticles Are Therapeutic for Staphylococcus aureus Abscesses in a Murine Model of Infection. *PLoS ONE* [online]. Vol. 4, issue 11, DOI: 10.1371/journal.pone.0007804. [ cit. 2015-01-20].
34. MOHAMMAD, A. B. et al., 2012. Elements of Nanotechnology Education in Engineering Curriculum Worldwide. *Procedia - Social and Behavioral Sciences* [online]. Vol. 60. DOI: 10.1016/j.sbspro.2012.09.398. [ cit. 2014-08-04]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877042812038530>
35. <http://www.nanotechnologie.cz/storage/nanotechnologie200610.pdf> [online]. [ cit. 2015-02-15].
36. NIROUMAND, H., M. F. M. ZAIN a M. JAMIL, 2013. The Role of Nanotechnology in Rammed Earth Walls and Earth Buildings. *Procedia - Social and Behavioral Sciences* [online]. Vol. 89, pp. 243-247. DOI:10.1016/j.sbspro.2013.08.842. [ cit. 2015-04-04]
37. Nobelprize. Org [online]. [cit. 2015-04-04].
38. NORITOMI, H., 2011. Preparation of Highly Concentrated Silver Nanoparticles in Reverse Micelles of Sucrose Fatty Acid Esters through Solid-Liquid Extraction

Method. *Advances in Chemical Engineering and Science* [online]. Vol. 01, issue 04. DOI: 10.4236/aces.2011.14041 [cit. 2015-04-04].

Dostupné z:

<http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=8200#.VW31bntmko>

39. PAINO, I. M. M. et al., 2012. Cytotoxicity and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology Letters* [online]. Vol. 215, issue 2, pp. 119-125. DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.09.025. [cit. 2015-04-04] Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23046612>
40. PAZDERA, J. 2006. Problém implantátů vyřeší nanokrystaly. Brown Univ., Rhode Island, USA [online]. [cit. 2014-10-18].  
Dostupné z: <http://osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=2005>
41. PICRAUX, T. S., 2014. Encyklopedia Britannica. [online]. [cit. 2014-10-24]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/962484/nanotechnology>
42. PITKETHLY, M. J., 2004. Nanomaterials – the driving force. *Materials Today* [online]. Vol. 7, issue 12, pp. 20-29. DOI: 10.1016/S1369-7021(04)00627-3. [cit. 2014-10-10]. Dostupné z:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702104006273>
43. POOLE, Ch. P. a F. J. OWENS, 2003. Introduction to nanotechnology. Canada: Wiley-Interscience. ISBN 471-07935-9
44. PRNKA, T. a K. ŠPERLINK, 2004. Šestý rámcový program evropského výzkumu a technického rozvoje. issue. 1. Ostrava: Repronis, p. 67. ISBN 80-732-9070-7
45. PUROHIT, R. et al., 2014. *Procedia Materials Science* [online]. Vol. 6. pp. 716-728. DOI: 10.1016/j.mspro.2014.07.088. [cit. 2014-10-18].  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211812814004532>
46. RAD, A. G., H. ABBASI a M. H., 2011. Gold Nanoparticles: Synthesising, Characterizing and Reviewing Novel Application in Recent Years. *Physics Procedia* [online]. Vol. 22, pp. 203-208. DOI: 10.1016/j.phpro.2011.11.032. [cit. 2014-09-27].  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1875389211006869>
47. ROSYPAL, S., 2003. *Nový přehled biologie*. Issue . 1. Praha: Scientia, p. 130. ISBN 80-718-3268-5.

48. RUTALA, W. A. a D. J. WEBER, 2004. Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: What Clinicians Need to Know. *Clinical Infectious Diseases* [online]. Vol. 39, issue 5, pp. 702-709. DOI: 10.1086/423182. [cit. 2015-04-04].
49. SALEM, W. et al., 2015. Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. Vol. 305, issue 1, pp. 85-95. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.11.005. [cit. 2014-07-01].  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422114001532>
50. SHAMELI, K. et al., 2012. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Curcuma longa* tuber powder. *International Journal of Nanomedicine* [online]. Vol. 7, pp. 5603- 5610. DOI: 10.2147/IJN.S36786. [cit. 2015-03-27].  
Dostupné z: <http://www.dovepress.com/green-biosynthesis-of-silver-nanoparticles-using-curcuma-longa-tuber-p-peer-reviewed-article-IJN>
51. SHETTY, N., J. P. SWATI a K. DAVID, 2013. Bentham Science Publisher Bentham Science PUBLISHER. Nanorobots: Future in dentistry. *The Saudi Dental Journal* [online]. Vol. 25, issue 2, pp. 85-106. DOI: 10.2174/978160805131111201010085. [cit. 2015-01-12]. Dostupné z: <http://m.eurekaselect.com/chapter.php?enid=50890&cid=304>
52. SHI, H. et al., 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. Vol. 10, issue 1, p. 15. DOI: 10.1186/1743-8977-10-15. [cit. 2015-01-26].  
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23587290>
53. ŠPAČEK, J., V. BUCHTA a P. JÍLEK, 2013. *Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí*. Issue 1. Praha: Grada, P. 359. ISBN 978-802-4745-541.
54. THOMAS, V. et al., 2007. A versatile strategy to fabricate hydrogel–silver nanocomposites and investigation of their antimicrobial activity. *Journal of Colloid and Interface Science*. [online]. Vol. 315, issue 1, pp. 389-395. DOI: 10.1016/j.jcis.2007.06.068. [cit. 2015-01-16].
55. TRAFTON, A., 2014., Tiny particles may pose big risk. MIT News Office. [online]. [cit. 2014-12-11]. Dostupné z: <http://newsoffice.mit.edu/2014/tiny-particles-may-pose-big-risk>
56. VASQUEZ, M. Z., 2012. Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*



[online]. Vol. 747, issue 1, pp. 142-156. DOI:10.1016/j.mrgentox.2012.05.002. [cit. 2015-01-11].

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634422>

57. VENKATESAN, B. M. a R. BASHIR, 2011. Nanopore sensors for nucleic acid analysis. *Nature Nanotechnology* [online] Vol. 6, issue 10, pp. 615-624. DOI: 10.1038/nnano.2011.129. [cit. 2014-10-02].

Dostupné z: <http://www.nature.com/nnano/focus/nanopores/index.html>

58. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, p. 351. ISBN 80-868-5000-5.

59. WARHEIT, D. B., 2004. Nanoparticles: health impacts?. USA: The DuPont Company, *Materials today* [online]. ISSN:1369 7021. [cit. 2014-12-11].

Dostupné z:

[http://fisica.ciencias.uchile.cl/~emenendez/docencia/fc710/Pdfs/nanohealth\\_risk.pdf](http://fisica.ciencias.uchile.cl/~emenendez/docencia/fc710/Pdfs/nanohealth_risk.pdf)

60. YAMANAKA, M. a K. HARA, 2005. Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on *Escherichia coli*, Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. Vol. 71, issue 11, pp. 7589-7593. DOI: 10.1128/AEM.71.11.7589-7593.2005. [cit. 2015-02-11].

Dostupné z:

<http://aem.highwire.org/content/71/11/7589.full.pdf+html>

61. YANG, J. a S. TIGHE, 2013. A Review of Advances of Nanotechnology in Asphalt Mixtures. *Procedia- Social and Behavioral Sciences* [online]. Vol. 96. DOI: 10.1016/j.sbspro.2013.08.144. [cit. 2014-12-11].

Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877042813022702>

62. YAO, D., et al. 2013. Limitation and Challenge Faced to the Researches on Environmental Risk of Nanotechnology. *Procedia Environmental Sciences* [online]. Vol. 18, pp. 149-156. DOI: 10.1016/j.proenv.2013.04.020. [cit. 2015-01-12]

Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878029613001527>

63. YILDIRIMER, L. et al., 2011. Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano Today* [online]. Vol. 6, issue 6, pp. 585-607. DOI: 10.1016/j.nantod.2011.10.001. [cit. 2015-01-07].

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3533686/>

64. ZÁVADOVÁ, M., 1986. Anaerobní bakterie a anaerobní infekce. issue 1., Praha 1: zdravotnické nakladatelství, ISBN 08-063-86.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ppm	Množství jednoho dílu z milionu ( $\mu\text{g/ml}$ )
NPs	Z angličtiny- nanoparticles - nanočástice
RNA	Ribonukleová kyselina
CNT	Z angličtiny- Carbon nanotube – uhlíkové nanotrubičky
TEM	Transmisní elektronový mikroskop
PVA/PS-PEGMA	Polyvinylalkohol/polystyren-CO-Polyethylenglykol-methakrylát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Škála velikosti částic (Prnka a Šperlink, 2004).....	12
Obrázek 2 Morfologie uhlíku (Nanotechnoogie.cz).....	14
Obrázek 3 Využití cytotoxicity a genotoxicity AuNPS na nádorové buňky (Paino et al., 2012).....	17
Obrázek 4 Koncentrace nanočástic v životním prostředí od roku 2002-2012 v oblasti U.S. (Yao et al., 2013).....	18
Obrázek 5 Příprava nanostříbra v polymerní síti (Thomas et al., 2007).....	22
Obrázek 6 Vliv reakční teploty na průměr nanočástic stříbra v reverzních micel DK-SS: [AgNO <sub>3</sub> ] ov = 0,1 M; [NaBH <sub>4</sub> ] ov = 1,0 M; n-butanol / isooktan, obsahující 50 g / l DK-SS a 60 mM H <sub>2</sub> O; reakční doba = 3 h. (Noritomi, 2011).....	23
Obrázek 7 Příprava NP pomocí zelené biosyntézy (Shameli et al., 2012).....	24
Obrázek 8 Autokláv (Black, 2012).....	26
Obrázek 9 Hynutí <i>E. coli</i> při různých koncentracích fenolů v závislosti log živých buněk na čase (Bednář et al., 1996).....	28
Obrázek 10 Křivka hynutí tří různých kmenů <i>E. coli</i> pod vlivem UV záření v závislosti přeživších bakterií na energii eng/mm (Bednář et al., 1996).....	28
Obrázek 11 Počet živých bakteriálních spor v závislosti na čase při teplotě 120 °C (Bednář et al., 1996).....	28
Obrázek 12 Postup ředění.....	40
Obrázek 13 Fotografie výsledků testů antibakteriální aktivity ve vzorku č. I.....	42

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Kritéria přijatelnosti.....	37
Tabulka 2 Antibakteriální účinnost koloidního stříbra na kmen <i>Staphylococcus aureus</i> po dobu 28 dnů.....	42
Tabulka 3 Logaritmus snížení počtu zárodků u bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> .....	43
Tabulka 4 Antibakteriální účinnost koloidního stříbra na kmen <i>Escherichia coli</i> po dobu 28 dnů.....	44
Tabulka 5 Logaritmus snížení počtu zárodku u bakterie <i>Escherichia coli</i> .....	44
Tabulka 6 Postup práce.....	46

