



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITA FOTOAKTIVNÍCH POVRCHŮ

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PHOTOACTIVE SURFACES

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Barbora Rabenseifnerová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2023

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1722/2021 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Barbora Rabenseifnerová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Antibakteriální aktivita fotoaktivních povrchů

### Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární rešerši na téma metody stanovení antibakteriální aktivity fotoaktivních povrchů včetně platných ISO norem.
2. Zvolte vhodnou metodu stanovení antibakteriální aktivity na fotoaktivním povrchu.
3. Na vzorcích fotoaktivních povrchů testujte opakovatelnost použité metody pro ozáření i neozářený povrch.
4. Výsledky vyhodnoťte a diskutujte.

### Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Barbora Rabenseifnerová  
studentka

-----  
RNDr. Mária Veselá, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **Abstrakt**

Tato diplomová práce se zabývá antibakteriální aktivitou fotoaktivních povrchů u fólií se známým obsahem pyrithionu zinku v kombinaci s fotoaktivní částí. Jednotlivé fólie byly vystaveny po danou dobu osvětlení, pro potvrzení fotoaktivní účinnosti a po stejnou dobu byly uloženy pro porovnání do tmy. Byla použita metoda otisku, která byla doplněna metodou vycházející z ISO normy 27447:2019.

## **Abstract**

This master's thesis deals with the antibacterial activity of photoactive surfaces in fólia with a known content of zinc pyrithione in combination with the photoactive part. Individual fólia were exposed to illumination for a given period of time to confirm photoactive ability and stored for comparison in the dark for the same time. The imprinting method was used and supplemented by a method based on ISO standard 27447:2019.

## **Klíčová slova**

Fotoaktivní povrch, fotosenzitizátor, antibakteriální aktivita, otisková metoda, ISO norma 27447:2019

## **Key words**

Photoactive surface, photosensitizer, antibacterial activity, imprint method, ISO standard 27447:2019

RABENSEIFNEROVÁ, Barbora. *Antibakteriální aktivita fotoaktivních povrchů* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-02-21]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138962>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Mária Veselá.

### **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

### **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce, paní RNDr. Márii Veselé, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a také za věnovaný čas a trpělivost při řešení problémů. Dále bych chtěla poděkovat naší vedoucí oddělení kontroly kvality a svým kolegům ve společnosti Farmak a.s. za umožnění dokončení studia na VUT v Brně.

# Obsah

1	Úvod .....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Fotokatalýza .....	8
2.2	Fotosenzitizátory .....	9
2.2.1	Ftalocyaninová barviva .....	10
2.3	Reaktivní sloučeniny kyslíku .....	12
2.3.1	Citlivost mikrobiálních buněk vůči reaktivním kyslíkovým částicím.....	14
2.3.2	Hydroxylový radikál.....	14
2.3.3	Superoxidový radikál.....	14
2.3.4	Peroxylový a alkoxylový radikál.....	15
2.3.5	Peroxid vodíku .....	15
2.3.6	Ozon .....	15
2.3.7	Singletový kyslík.....	15
2.4	Detekce singletového kyslíku.....	16
2.4.1	Chemické metody .....	17
2.4.2	Fyzikální metody .....	18
2.5	Antimikrobiální jev .....	19
2.5.1	Bakterie .....	19
2.5.2	Viry.....	21
2.5.3	Plísně .....	21
2.6	Hodnocení antibakteriální účinnosti.....	21
3	Experimentální část .....	23
3.1	Laboratorní pomůcky .....	23
3.2	Chemikálie.....	23
3.3	Použitá bakterie .....	23
3.4	Otisková metoda pro stanovení antibakteriální účinnosti.....	24
3.5	Stanovení antibakteriální účinnosti fotoaktivních povrchů dle ISO 27447:2019.....	25

4	Výsledky a diskuse .....	27
4.1	Výsledky stanovení antibakteriální účinnosti metodou otisku .....	27
4.1.1	Experimenty s fólií č. 14 .....	28
4.1.2	Experiment s fólií č. 13 .....	29
4.1.3	Experiment s fólií č. 17 .....	30
4.2	Výsledky stanovení antibakteriální účinnosti dle ISO normy 27447:2019 .....	32
4.2.1	Experimenty s fólií č. 14 .....	33
4.2.2	Experimenty s fólií č. 13 .....	38
4.2.3	Experimenty s fólií č. 17 .....	42
5	Závěr.....	46
6	Seznam literatury.....	47
7	Seznam zkratk.....	51

# 1 Úvod

Mikrobiální škodliviny jsou jedním ze závažných zdrojů znečištění povrchů ploch. Skládají se z částic biologického původu (bakterie, viry, mikroskopické vláknité houby). Jedním z možných způsobů účinné destrukce mikroorganismů je jejich fotodynamická inaktivace. Absorpcí světelného záření molekulami fotosenzitizátoru dochází v přítomnosti kyslíku ke tvorbě singletového kyslíku a dalších reaktivních kyslíkových částic (ROS) způsobujících až totální destrukci jak bakterií, kvasinek, tak i virů. Pro vznik singletového kyslíku je nutný prostředník pro přenos energie.

Obvykle se jedná o sloučeniny a materiály odvozené od porfyrinu. Je známo, že různé ve vodě rozpustné ftalocyaninové a naftalocyaninové sloučeniny, zejména ty, které mají jako centrální atom některé kovy, mají fotosenzibilizační účinek a mohou proto být použity jako antimikrobiální aktivní sloučeniny. Přítomností fotosenzitizátoru lze připravit materiály, jejichž povrch má na světle silné antimikrobiální vlastnosti.

Cílem této diplomové práce bylo vhodnou metodou stanovit antibakteriální aktivitu na fotoaktivním povrchu a otestovat opakovatelnost této metody pro ozářený i neozářený povrch. V této diplomové práci byla použita pro stanovení antibakteriální aktivity daného fotoaktivního povrchu metoda otisku a dále byla použita metoda vycházející z ISO normy 27447:2019, při které byla použita bakterie *E. coli*. Jako sledovaný fotoaktivní povrch byly použity fólie Lotus připravené na FCH VUT o známém množství pyrrithionu zinku, který vykazuje antibakteriální účinek v kombinaci s fotoaktivní částí.

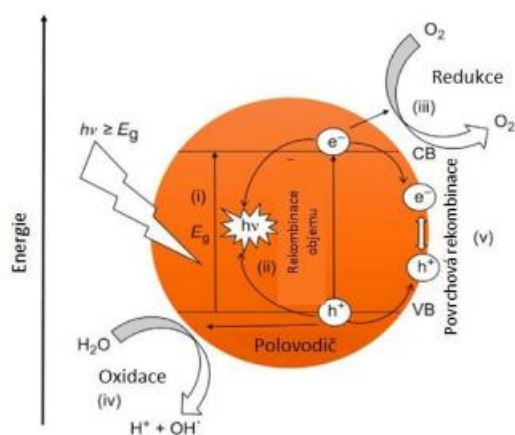
## 2 Teoretická část

### 2.1 Fotokatalýza

Na počátku studia fotokatalýzy stojí zejména jména Fujishima a Honda, kteří v roce 1972 publikovali článek o elektrochemickém štěpení vody pomocí UV záření pomocí  $\text{TiO}_2$  elektrod. Ten se stal základem výzkumu heterogenní fotokatalýzy.

Princip fotokatalýzy spočívá v rozdělení elektrických center na kladné a záporné centrum a jejich následné sloučení, za přeměny světelné energie na teplo. Tyto centra jsou od sebe oddělena v katalyzátoru účinkem elektromagnetického záření z ultrafialové oblasti (UV), viditelné (VIS), nebo infračervené (IR) oblasti spektra. IUPAC definuje fotokatalyzátor jako látku, která je schopná chemické transformace reaktantů díky absorpci světla, opakovaně s nimi tvoří přechodné chemické interakce a chemicky se regeneruje po každém cyklu takovýchto interakcí. Fotokatalýzu pak definuje jako změnu rychlosti chemické reakce či její iniciaci za účasti světla (fotonů) v přítomnosti látky (katalyzátoru), která absorbuje světlo a která se účastní chemické transformace reaktantů. Všechny fotokatalyzátory jsou v podstatě polovodiče. Jedná se o využití energie záření k mineralizaci a oxidaci řady látek. Výsledkem je rozklad všech usazených organických látek a mikroorganismů na oxid uhličitý a vodu. Fotokatalytické reakce jsou reakcemi homogenními nebo heterogenními. Jestliže jsou reaktant a fotokatalyzátor ve stejném skupenství, tj. plyn, pevná látka nebo kapalina, jedná se o homogenní fotokatalýzu. Příkladem takových katalyzátorů mohou být koordinační sloučeniny, barviva a přírodní pigmenty. V případě heterogenní fotokatalýzy jsou reaktant a fotokatalyzátor v rozdílné fázi. Příkladem takového katalyzátoru jsou chalkogenidy přechodných kovů. [1, 2, 3]

Fotokatalýza lze dále popsat jako fotogenerace páru elektron-díra, kdy po ozáření polovodiče světlem o vhodné vlnové délce (UVA) dochází k absorpci fotonu a přechodu elektronu z nevodivostního (valenčního) pásu do vodivostního, viz **obr. 1**. Kladně nabitá díra ( $\text{h}^+$ ) reaguje s molekulou vody a tím dojde ke vzniku hydroxylového radikálu a protonu.

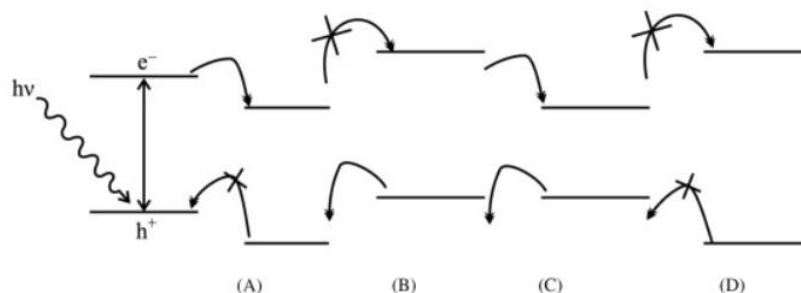


**Obrázek 1: Mechanismus fotokatalytické reakce [4]**

Naopak elektron reaguje s molekulou kyslíku a protonem a tím dochází ke vzniku superoxidového radikálu. K samotné degradaci organických látek pak dochází jednak pomocí děr samotných, neboť mají silný oxidační charakter, a dále i pomocí vznikajících hydroxylových či za přítomnosti kyslíku superoxidových radikálů. O osudu excitovaného elektronu a díry rozhodují relativní polohy vodivých a valenčních pásmů fotokatalyzátoru a redoxní hladiny reaktantu. Existují



čtyři způsoby, jak fotokatalyzátor a reaktant vzájemně interagují v závislosti na relativních polohách valenčních a vodivých pásů a redoxních úrovních. Jedná se o čtyři různé kombinace, viz **obr. 2**. Samozřejmým a častým jevem je ovšem i rekombinace páru elektron-díra. [4, 5, 6]



**Obrázek 2: Různé možnosti reakcí. A) Snížení. B) Oxidace. C) Redoxní reakce. D) Žádná reakce [1]**

- A. Redukce reaktantu probíhá, když je redoxní hladina reaktantu nižší než vodivý pás fotokatalyzátoru.
- B. Oxidace reaktantu probíhá, když je redoxní hladina reaktantu vyšší než valenční pásmo fotokatalyzátoru.
- C. Redukce i oxidace reaktantu probíhá, když je redoxní hladina reaktantu nižší než vodivé pásmo a vyšší než valenční pásmo.
- D. Ani oxidace, ani redukce není možná, pokud je redoxní hladina reaktantu vyšší než vodivé pásmo a nižší než valenční pásmo fotokatalyzátoru.

To, zda převládá odbourávání organických látek vlivem kladně nabitých děr, hydroxylových radikálů vznikajících z vody či radikálů ze samotné degradované látky, závisí jak na povaze částic prášku, teplotě okolí či pH, tak i na vlastnostech odbourávané organické látky. Každá látka má totiž svou typickou degradační dráhu a její meziprodukty mohou v menší či větší míře průběh fotokatalýzy ovlivnit. Význam fotokatalýzy spočívá v tom, že fotokatalyzátor poskytuje jak oxidační, tak redukční prostředí. K degradaci některých látek také dochází i pomocí samotného UV záření. [7, 8]

## 2.2 Fotosenzitizátory

Fotosenzitizátor je látka obsahující chromofory, silně absorbující fotony ve viditelné, případně UV oblasti světelného spektra, a následně přenášející absorbovanou energii na kyslík či jiné substráty. Jedná se obecně o aromatické či heterocyklické organické sloučeniny a barevné kovové komplexy, obvykle o barviva porfyrinové, fenazinové či ftalocyaninové struktury. Senzitizátory typu ( $\pi$ ,  $\pi^*$ ), kde excitovaný elektron pochází z  $\pi$  orbitalu, poskytují  $^1\text{O}_2$ . K tomuto typu náleží např. barviva jako eosin, akridin, bengálská červeň, methylenová modř, anthracen, dále porfyriny, expandované porfyriny a jejich metalokomplexy. Vznikající  $^1\text{O}_2$  atakuje bezprostřední okolí senzitivizátoru. Difuzní poloměr kulové oblasti, v níž se reakce může uskutečnit, je dán dobou života  $^1\text{O}_2$  a rychlostí difuze v daném prostředí. [9, 10] Důležitými charakteristickými parametry fotosenzitizátoru ovlivňujícími jeho využití pro fotoinaktivaci mikrobiálních buněk singletovým kyslíkem jsou obecně:

1. Kvantový výtěžek singletového kyslíku. Kvantové výtěžky většiny porfyrinoidních senzitivizátoru se pohybují v rozmezí od 0,3 až 0,8.
2. Fotostabilita senzitivizátoru. Fotosenzitizátor musí být dostatečně stabilní vůči přímé fotodegradaci a oxidaci vznikajícím  $^1\text{O}_2$ , případně oxidaci dalšími reaktivními

formami kyslíku. Všechny fotosenzitizátory sice podléhají fotodegradaci, ale se značně rozdílnou rychlostí.

3. Molární extinkční koeficient, lipofilicita (log P), ionizace (pKa).
4. Nízká toxicita je podmínkou při medicínských aplikacích.

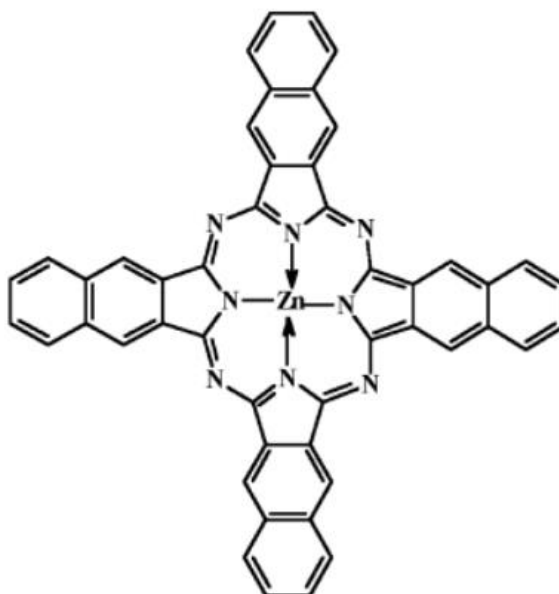
Podle Grotthusova-Draperova teorému vyvolává chemickou změnu pouze světelné kvantum absorbované molekulou. Jelikož molekula kyslíku nemá v běžně přístupné oblasti UV-VIS záření výraznější absorpci, nejčastěji se excituje nepřímo prostřednictvím fotosenzitizátoru. Fotosenzitizátor se absorpcí světelného kvanta dostává do excitovaného singletového stavu  $S_n$ , který rychlou relaxací přechází na nejnižší excitovaný singletový stav  $S_1$ . Stav  $S_1$  se spontánně deaktivuje vnitřní konverzí (ic), vyzářením přebytečné energie ve formě fluorescence nebo mezisystémovým přechodem (isc) do tripletového stavu  $T_1$ . Vznik  $T_1$  nastává nejčastěji během 0,1 až 10 ns. Deaktivace tripletového stavu mezisystémovým přechodem nebo fosforescencí jsou zakázané přechody, a proto mají tripletové stavy fotosenzitizátorů poměrně dlouhou dobu života a mohou se zúčastňovat řady bimolekulárních interakcí. Za určitých podmínek by bylo vhodné použít k uskutečnění fotosenzitivní reakce senzitivizátor imobilizovaný. Zatímco jeho neimobilizovaná forma je při fotodynamickém účinku v přímém kontaktu s mikroorganismy, imobilizací se vytvoří systém, v němž jsou fotosenzitizátor a mikroorganismy v oddělených fázích. V tomto případě stupeň inaktivace mikroorganismů závisí mimo jiné na koncentraci barviva obsaženého v materiálu v době ozáření. Nejjednodušším způsobem imobilizace je adsorpce, při ní jsou senzitivizátory zachyceny na povrchu nosiče fyzikálními, zejména van der Waalsovými silami, ale uplatňují se i další interakce: iontové, vodíkové nebo hydrofobní. Nevýhodou může být v některých případech malá pevnost vazby mezi nosičem a fotosenzitizátorem. Interakce fotosenzitizátor-nosič je totiž velmi závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech jak roztoku senzitivizátoru použitého při přípravě (jeho pH, teplotě, iontové síle či typu rozpouštědla), tak i samotného nosiče (např. jeho hydrofobicitě a porozitě). Snadno tak může dojít k vymytí fotosenzitizátoru z matrice. Při nízké koncentraci fotosenzitizátoru nezpůsobuje jeho adsorpce obvykle změnu konformace jeho molekul a tedy i jeho optických a fotosenzitivních vlastností. Při vysokém pokrytí povrchu absorbentu však může nastat jejich agregace. Pokud jde o typy nosičů, velmi často využívanými jsou křemičité materiály. Ty totiž vykazují pro potřeby fotodynamického účinku několik pozitivních vlastností, jako možnost řídit jejich porozitu a vytvořit materiály s vysokými měrnými a reaktivními povrchy. Levnými křemičitými materiály vhodnými pro imobilizaci fotosenzitizátorů jejich adsorpcí jsou sklo a jeho prekurzory. Velmi atraktivními nosiči v důsledku jejich nízké ceny jsou také silikagely. Absorpční a luminiscenční spektra porfyrinů a některých dalších barviv adsorbovaných na silikagelu prokázala, že tento typ imobilizace má na energii nízkých elektronových stavů pouze malý vliv. V případě bengálské červeně sorbované na silikagelu může singletový kyslík difundovat na vzduchu do vzdálenosti 1 až 2 mm. Silikagel byl využit i pro zakotvení methylenové modře. [11, 12, 13]

### 2.2.1 Ftalocyaninová barviva

Ftalocyaniny tvoří velkou skupinu organických barviv, která byla objevena na počátku 19. století. Jedná se o makrocyclické molekuly, které jsou strukturně podobné porfyrinům, ftalocyaniny obsahují čtyři další atomy dusíku ve vnitřním jádru a čtyři další arény na vnější straně. Struktura ftalocyaninu je odvozena od molekuly tetraazaporfyrinu. [14]

Barevné odstíny ftalocyaninů se pohybují od červenavých modří po žlutavé zeleně. Používají se hlavně jako pigmenty pro barvení ve hmotě, případně do laků. Budeme-li generalizovat, pak modré a zelené pigmenty jsou na bázi ftalocyaninů. Vynikají vysokými molárními absorpčními koeficienty,

nerozpustností jak ve vodě, tak i organických rozpouštědlech (ftalocyanin mědi je rozpustný pouze v koncentrované kyselině sírové). Vyznačují se také vysokou termmostabilitou (ftalocyanin mědi sublimuje až při 550 °C).

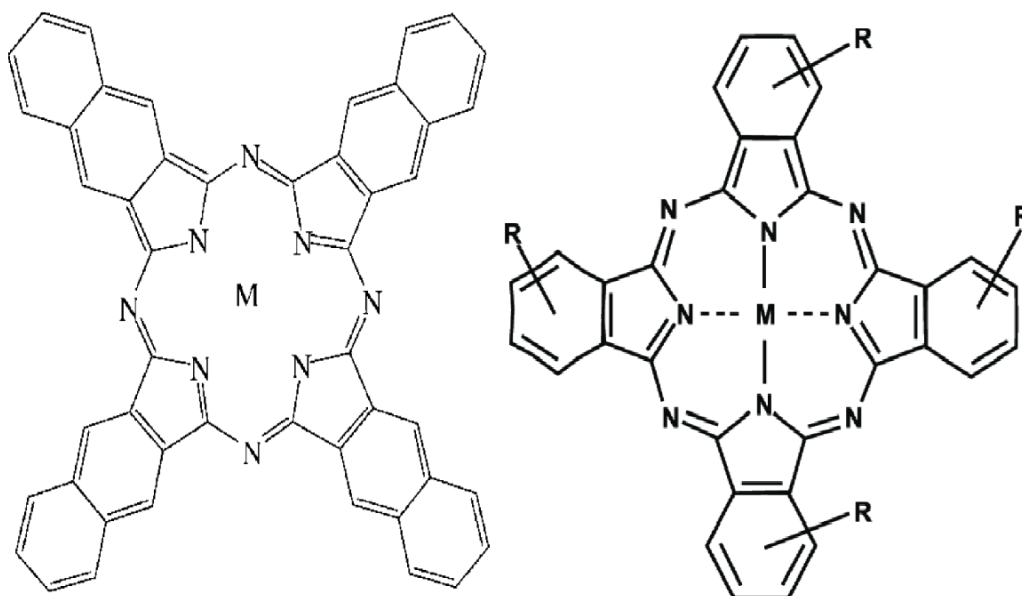


**Obrázek 3: Naftalocyanin zinečnatý [17]**

Ftalocyaniny tvoří s kovy dvě řady barviv, lišících se podstatně svými vlastnostmi. Sloučeniny první skupiny, ftalocyaniny Na, K, Ca, Ba, Cd, se chovají jako soli. Nerozpouští se v rozpouštědlech a nesublímují. Sloučeniny druhé skupiny, ftalocyaniny Cu, Co, Zn, Pt, jsou komplexní sloučeniny, nerozpouštějí se v rozpouštědlech, sublimují bez rozkladu za vysokých teplot, nepůsobí na ně kyseliny. Povaha centrálního atomu ovlivňuje celkové fotofyzikální vlastnosti ftalocyaninů – kvantový výtěžek formace triplexního stavu a jeho dobu života. Ftalocyaniny obsahující paramagnetický kov (Cu, Co, Fe, Ni, V, Cr a Pd) vykazují krátké doby života tripletového stavu. Ftalocyaniny s diamagnetickým kovovým iontem (Zn, Al a Ga) dosahují značných kvantových výtěžků v organických rozpouštědlech díky relativně dlouhé době života tripletových stavů. Ftalocyaniny mají dva hlavní absorpční pásy: Q pásmo, obecně v rozmezí 600–700 nm, a Soretovo (B) pásmo v rozmezí 300–400 nm. V praxi jsou nejdůležitější ftalocyanin mědi a kobaltu. Jedná se o mimořádně stálá barviva a pigmenty modrých a zelených odstínů. Vznikající ftalocyanin mědi se může vyskytovat v několika krystalických modifikacích s různými barvicími vlastnostmi. Jedná se o tetraazatetrabenzoporphin a základní polyenový chromogen molekuly má kruh aza-anulenového typu. Barva molekuly je relativně málo ovlivněna substitucí v benzenových kruzích. Ftalocyanin mědi má čtyřnásobnou osu symetrie společnou s porfirinovým systémem a má dva absorpční pásy ve viditelné oblasti nebo blízko k ní, označené jako Q-pásy a B-pásy. Q-pás je v tomto případě nejdůležitější a nejintenzivnější, který se vyskytuje při 657,5 nm, s molárním extinkčním koeficientem blízkým 100 000 dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Pásmo B, při 325 nm nijak nepřispívá k modré barvě pigmentu. Byla studována spektra různých ftalocyaninů kovů v plynné fázi, ftalocyanin olovnatý, absorbující při 698 nm, je nejvíce batochromní. Ftalocyanin niklu absorbuje maximálně při 651 nm, má tedy hypsochromický posun ve srovnání s nemetalizovanou molekulou, která absorbuje při 686 nm a 622,5 nm, přičemž dva Q-pásy vznikají v důsledku ztráty čtyřnásobné osy symetrie.

V případě ftalocyaninu bez kovů vykazuje samotný polymorf X silný absorpční vrchol při 830 nm, a proto byl použit v laserových tiskárnách s lasery na 820 nm. [14, 15, 16]

Základní skelet ftalocyaninů patří do skupiny tzv. Azo [18] annulenů, což je podskupina tak zvaných [18] annulenů. Annulene je kruh, v tomto případě cyklický systém konjugovaných dvojných vazeb s 18  $\pi$  elektrony. Vodíkové atomy ftalocyaninových dvoudenních chelátových cyklů jsou pro získání fotochemických vlastností molekul substituovány. Ftalocyaniny mohou mít substituenty  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  a  $R^4$  a naftalocyaniny mohou mít substituenty  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  a  $R^6$ . Tyto substituenty jsou vázány na ftalocyaninové nebo naftalocyaninové kruhy a jsou navzájem nezávisle vybrané ze skupiny zahrnující: vodík, halogen, hydroxyl, kyanoskupinu, nitrilovou skupinu, oxiiiminovou skupinu nebo např. rozvětvenou alkoxy skupinu vzorce. [17, 18]



**Obrázek 4: Obecné porovnání struktury naftalocyaninu (nalevo) se strukturou ftalocyaninu (napravo)[44]**

Ftalocyaniny, zejména ve spojení s vhodným kovem, mohou podléhat řadě fotochemických reakcí, které ve spojení s molekulárním kyslíkem produkují molekuly singletového kyslíku. Excitovaný singletový kyslík, vytvořený v těchto fotosenzibilizujících reakcích, je oxidační činidlo. Průmyslová syntéza vychází např. z ftalanhydridu, močoviny a chloridu měďnatého. [17, 18]

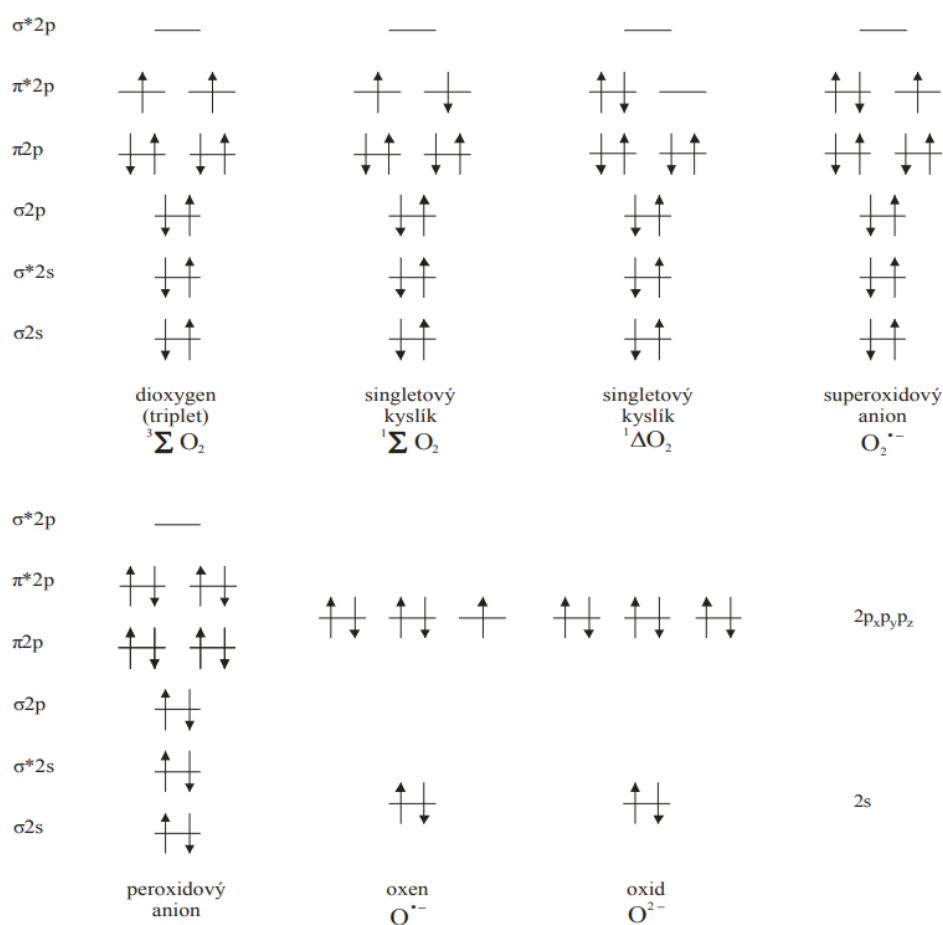
### 2.3 Reaktivní sloučeniny kyslíku

Termín reaktivní formy kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species) byl vytvořen k definování vznikající třídy endogenních, vysoce reaktivních molekul obsahujících kyslík, které mají minimálně jeden nepárovaný elektron. To způsobuje jejich relativně vysokou reaktivitu ale zároveň jejich schopnost samostatné existence. Celkově pojem ROS zahrnuje jak volné radikály, hydroxylový radikál, superoxidový anion, tak i další různé molekuly jako je např. peroxid vodíku.

Reaktivní formy kyslíku, zejména hydroxylové a peroxylové radikály, peroxid vodíku a superoxidový radikálový anion, se již dlouho podílejí na oxidačním poškození mastných kyselin, DNA, proteinů i dalších buněčných složek. Nadprodukce reaktivních sloučenin kyslíku je spojena s četnými poruchami. Oxidační stres způsobený nerovnováhou mezi nadměrnou tvorbou reaktivních sloučenin kyslíku a omezenou antioxidační obranou je spojen s mnoha patologiemi, včetně poruch

souvisejících s věkem, rakoviny, kardiovaskulárních, zánětlivých a neurodegenerativních onemocnění, jako je Parkinsonova a Alzheimerova choroba. [19, 21]

Základní tripletový molekulární kyslík je paramagnetický diradikál se dvěma nepárovými valenčními elektrony zabírajícími oddělené  $\pi^*$  orbitály s paralelními spiny. Většina neradikálových organických molekul je diamagnetická, s páry elektronů s opačnými spiny. Omezení spinu platí pro molekulární kyslík, aby se účastnil redoxních reakcí s jinými atomy nebo molekulami, protože musí přijmout z redukčního činidla pár elektronů, které mají stejný spin (tj. nediamagnetický), takže se vejdou do volných prostorů v  $\pi^*$  orbitalech kyslíku. Kyslík tedy není schopen účinně oxidovat biomolekuly. Omezení spinu má za následek, že kyslík během redoxních reakcí přijímá přednostně jeden elektron najednou. Molekulární kyslík tak může rychle reagovat s jinými radikály jedoelektronovým přenosem.



**Obrázek 5: Molekulové orbitály dvouatomových molekul kyslíku [19]**

Jednoelektronová redukce kyslíku vede k tvorbě superoxidového radikálového aniontu ( $O_2^{\cdot-}$ ). Jednoelektronová redukce  $O_2^{\cdot-}$  vede k tvorbě dalších ROS, jako je peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). Redukcí peroxidu vodíku pak vzniká hydroxylový radikál ( $OH^\cdot$ ), který podléhá redukcí za vzniku vody (nebo hydroxidu  $OH^-$ ). Základní stav nebo molekulární kyslík  $O_2$  mohou však být přeměněny na reaktivnější formy obsahující kyslík. Přenos energie do  $O_2$  vede k tvorbě reaktivnější formy molekulárního kyslíku, singletového kyslíku ( ${}^1O_2$ ). Termínem singletový kyslík  ${}^1O_2$  jsou označovány molekuly kyslíku v nejnižších excitovaných stavech  ${}^1\Sigma_g^+$  a  ${}^1\Delta_g$ . Pokud mají dva elektrony, které zůstávají v jednotlivých  $\pi^*$  orbitalech nespárované, opačný spin, dochází ke vzniku singletového excitovaného

stavu  $^1\Sigma_g^+$ . Jestliže jsou v jednom  $\pi^*$  orbitalu dva elektrony s opačnými spiny, vzniká singletový stav  $^1\Delta_g$ . [19, 22, 23]

### 2.3.1 Citlivost mikrobiálních buněk vůči reaktivním kyslíkovým částicím

Reaktivní kyslíkové částice (ROS) produkované fotosenzitizátory se obecně chovají stejným způsobem jako jiné exogenní stresové faktory. V nižších koncentracích podporují syntézu proteinů, které buňku chrání vůči toxickému účinku druhé dávky. Nejvýznamnějším faktorem v boji mikroorganismů proti oxidativnímu stresu je jejich vztah ke kyslíku. Na rozdíl od aerobních mikroorganismů, které jsou vybaveny enzymy degradace produktů oxidativního stresu, obsahují anaerobní mikroorganismy těchto enzymů mnohem méně a mohou být tedy snadněji působením ROS usmrceny. V anaerobních bakteriích hraje roli hlavního exogenního stresoru kyslík. První obrannou linií proti jeho toxicitě představuje negativní aerotaxe a dále složení média. Při kultivaci v komplexním médiu vzrůstá vůči němu jejich odolnost. Další důležitou vlastností mikrobiální kultury ovlivňující její citlivost k fotoprocesu je fyziologický stav. [20, 22]

### 2.3.2 Hydroxylový radikál

Hydroxylový radikál ( $\cdot\text{OH}$ ) je jeden z nejreaktivnějších radikálů, s poločasem doby života  $\approx 10^{-9}$  sekundy. Je tří elektronovým redukčním produktem kyslíku. Jakmile vznikne hydroxylový radikál v buňce, vzhledem ke své vysoké reaktivitě, téměř okamžitě zreaguje s některou molekulou v jeho okolí. Je schopen poškozovat purinové a pyrimidinové báze v nukleových kyselinách tak, že zápis genetické informace není přesný a tím způsobuje mutace. Působením dalšího elektronu reaguje hydroxylový radikál přes hydroxidový ion na molekulu vody. Hydroxylový radikál může vznikat reakcí kovových iontů s  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fentonova reakce) nebo homolytickým štěpením peroxidu vodíku indukovaným UV zářením ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ). Radikál  $\cdot\text{OH}$  je produkovaný téměř ve všech aerobních buňkách mnoha reakcemi. Kromě nežádoucího vzniku v dýchacím řetězci je generovaný několika dalšími způsoby, jako je dekompozice ozonu, homolytické štěpení vody způsobené ionizačním zářením ( $\gamma$  – záření, např. při radioterapii), nebo působením ultrazvuku. [19, 20]

### 2.3.3 Superoxidový radikál

Superoxidový radikál ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) vzniká z molekuly kyslíku jednelektronovou redukcí, dále může superoxidový radikál vznikat reakcí singletového kyslíku s elektronem. Je mnohem méně reaktivní než radikál  $\cdot\text{OH}$  a neprostupuje biologickými membránami. Avšak řada biomolekul je na něj citlivá. Jeho škodlivost spočívá především v tom, že může v kyselém prostředí dismutovat na  $\text{H}_2\text{O}_2$ , který reakcí s přechodnými kovy generuje velmi reaktivní hydroxylový radikál. Samotný superoxidový radikál může *in vivo* působit jako redukční činidlo. [19, 20]

Superoxid může vznikat během metabolických dějů nebo vlivem ozonu,  $\gamma$  záření aj. Vzniká také v buňkách (monocyty, makrofágy a další), požitím drog, jedů a těžkých kovů. Za podmínek normálního metabolismu je hlavním zdrojem  $\cdot\text{O}_2^-$ , řetězec mitochondriálního elektronového transportu, který propouští několik elektronů přímo na  $\text{O}_2$  v rámci normálního metabolismu. Superoxidový radikál pochází ze dvou míst dýchacího řetězce mitochondrií, z komplexu I (NADH dehydrogenasa) a komplexu III (ubichinon-cytochrom-c-reduktasa), které jsou jeho hlavním zdrojem. Superoxid působí lipoperoxidaci a poškozování dalších biomolekul, i když pomaleji než hydroxylový radikál. [20, 23, 24]

### 2.3.4 Peroxylový a alkoxylový radikál

Peroxylový ( $\text{ROO}\cdot$ ) a alkoxylový ( $\text{RO}\cdot$ ) radikál jsou obvykle dobrými oxidačními činiteli. Jsou-li odvozeny od mastné kyseliny (tvoří lipidy) jsou označovány  $\text{LOO}\cdot$  a  $\text{LO}\cdot$ . Peroxylové radikály jsou považovány za hlavní zdroj oxidačního stresu v živočišné tkáni. Vznikají nejčastěji autooxidací volných nebo vázaných nenasycených mastných kyselin v lipidech (triacylglycerolech nebo heterolipidech) molekulárního kyslíku na alkoxylový radikál vzniklý odtržením vodíkové radikálu působením světla nebo tepla nebo atakem  $\cdot\text{OH}$ . Vzniká tak lipoperoxylový radikál  $\text{LOO}\cdot$ .

Peroxylové i alkoxylové radikály mohou odtrhávat  $\text{H}\cdot$  z jiných molekul, což je např. významné při peroxidaci lipidů. Peroxylový radikál oxiduje askorbovou kyselinu a také NADH na radikál  $\text{NAD}\cdot$ , který může rychle reagovat s kyslíkem a generovat superoxidový radikál. Peroxylové a alkoxylové radikály mohou tedy reagovat s lipidy, sacharidy, bílkovinami i mnoha dalšími metabolicky významnými molekulami a poškozovat je. Mohou také generovat reaktivní superoxidový radikál, snadno protonující na reaktivnější hydroperoxylový radikál. [20, 23]

### 2.3.5 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) není radikálem ale je reaktivní dvouelektrodový redukční produkt kyslíku, tvořený dismutací ze superoxidu enzymem superoxidodismutasou nebo přímo z kyslíku. V čistém stavu i ve vodném roztoku je  $\text{H}_2\text{O}_2$  poměrně stálý. Má oxidační a redukční vlastnosti. Reakce s biomolekulami jsou pomalé. Jeho reaktivita se násobí v přítomnosti zdrojů iontů železa, např. hemových proteinů. Je stabilnější než  $\cdot\text{O}_2^-$ , a může být zdrojem většiny reakcí  $\cdot\text{O}_2^-$ . Patří mezi méně reaktivní formy kyslíku. Není považován za radikál, ale do skupiny ROS patří, protože ovlivňuje vznik radikálů, tedy vznik hydroxylového radikálu. Nemá žádný větší význam, avšak účastní se důležitých reakcí s ionty  $\text{Fe}^{2+}$  či  $\text{Cu}^+$ . Snadno difunduje přes buněčné membrány, ne však zcela volně. Jeho difuze je ovlivněna složením membránových lipidů. [20]

### 2.3.6 Ozon

Ozon ( $\text{O}_3$ ) je tříatomový plyn, špatně rozpustný ve vodě. Má typický zápach a dráždí plíce a oči. Molekula má angulární tvar, obdobně jako molekula vody, a je spíše biradikál  $\cdot\text{O}-\text{O}-\text{O}\cdot$ . V atmosféře je tvořen disociací kyslíku UV-C světlem na atom kyslíku, který reaguje s molekulou kyslíku. Ozon se snadno váže na dvojnou vazbu mastných kyselin a vytváří ozonidy, které se mohou rozkládat na toxické aldehydy a jiné produkty, včetně  $\cdot\text{OH}$ . Ozon také rychle oxiduje glutation, askorbát a proteiny, napadá  $-\text{SH}$  skupinu, aminokyseliny tyrosin, tryptofan, histidin a metionin v bílkovinách a jiné biomolekuly. Ozon je silně baktericidní. [20, 21]

### 2.3.7 Singletový kyslík

Singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ) je reaktivní neradikálová forma molekuly kyslíku, přesněji excitovaný stav kyslíkové molekuly, má vyšší obsah energie než tripletový kyslík v základním stavu, je schopen oxidovat mnoho biomolekul, včetně nukleových kyselin, lipidů a proteinů. Singletový kyslík má silné oxidační vlastnosti a je přibližně  $1500\times$  reaktivnější než tripletový kyslík, vzniká řadou fyzikálních, chemických, fotochemických nebo biologických reakcí. Příkladem vzniku  $^1\text{O}_2$  fyzikálním procesem je mikrovlnný výboj v kyslíkové atmosféře. Chemickou cestou je např. klasická reakce chlomanu s peroxidem vodíku, tepelný rozklad endoperoxidů, reakce ozonu a ozonidů s různými látkami a rozklad peroxochromanu nebo peroxomolybdenanu, případně dosud diskutovaná dismutace superoxidu na kyslík a peroxid vodíku. V biologických systémech produkují  $^1\text{O}_2$  některé peroxidasy. K přímým fotochemickým reakcím, patří fotolýza ozonu, probíhající zejména ve vysokých vrstvách atmosféry,

fotolýza komplexů s přenosem náboje kyslík-organická molekula (CT přechody) a fotoexcitace molekulárního kyslíku. Mimořádný význam pro tvorbu  $^1\text{O}_2$  mají fotosenzitizované reakce. Působením určitého záření je molekula excitována do signetového stavu. K přírodním senzibilizujícím sloučeninám patří riboflavin (vitamín B2) a jeho deriváty FAD a FMN, chlorofyly A a B, bilirubin a různé porfyriny volné i vázané s proteinem. Podstatou vysoké reaktivity  $^1\text{O}_2$  je skutečnost, že jeho reakce s většinou chemických látek jsou spinově dovolené. Dominujícím procesem je spinově dovolený přechod  $\text{O}_2(^1\Sigma_g) \rightarrow \text{O}_2(^1\Delta_g)$ . Z toho vyplývá, že  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  vzniká dvěma reakčními cestami – přímou a nepřímou přes energeticky bohatší meziprodukt  $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ . Účast  $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$  v oxidačních reakcích nebyla doposud prokázána. Význam  $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$  pro tyto reakce spočívá v tom, že je v nezanedbatelné míře prekurzorem  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ , který je oxidačním činidlem fotosenzitizovaných oxidací. Singletový kyslík reaguje dvěma základními způsoby: 1) může jiné molekuly oxidovat, 2) může na ně přenést svou excitační energii a tím se vrátí do základního stavu a interagující molekula přejde do excitovaného stavu. Tato reakce je označována jako zhášení singletového stavu, typickou zhášení reakci provádí karotenoidy v chloroplastech. Elektronovou excitací, v přítomnosti molekulárního kyslíku pomocí ultrafialového nebo viditelného záření, dochází ke změnám rozložení elektronů v protivazebných orbitalech molekuly fotosenzitizéru a tak dochází k takzvané fotoexcitaci fotosenzitizéru, který poté předá svou energii kyslíku v základním stavu. Doba života excitovaného stavu fotosenzitizéru musí být dostatečně dlouhá, aby zhášení kyslíkem bylo hlavním deaktivujícím procesem, a uvolněná energie při zhášení fotosenzitizéru musí být dostatečná pro excitace kyslíku. Jejich zhášení rozpuštěným kyslíkem probíhá přenosem energie z excitovaného senzitivátoru na kyslík a vede ke vzniku  $^1\text{O}_2$  ve dvou singletových stavech označovaných jako  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  a  $\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ . Zhášení senzitivátoru kyslíkem může rovněž probíhat přenosem elektronu za vzniku superoxidového anionradikálu  $\text{O}_2^-$ . Přenos energie nebo elektronu na kyslík jsou kompetitivní reakční cesty a záleží na fyzikálně-chemických a fotofyzikálních vlastnostech senzitivátoru, která z nich převládá. Fotosenzitizéry s absorpčním maximem ve viditelné a blízké ultrafialové oblasti podporují vznik  $^1\Sigma_g$  stavu kyslíku, zatímco barviva s absorpcí v dlouhovlnné oblasti poskytují převážně  $^1\Delta_g$  stav.  $^1\Delta_g$  je látka diamagnetická, neboť dodáním excitační energie kyslíku v základním stavu dochází ke spárování valenčních elektronů a doba života v plynné fázi je 3000 sekund, jedná se tedy o stabilnější formu singletového kyslíku. Jeho reaktivita spočívá v jeho elektrofilní povaze. Singletový kyslík reaguje se sloučeninami bohatými na elektrony, jako jsou například nenasycené sloučeniny (s dvojnými nebo trojnými vazbami), tak aby se elektrony doplnil jeho volný molekulový orbital.  $^1\Sigma_g$  stav má dva nepárové elektrony opačného spinu v odlišných orbitalech, zde je doba života v plynné fázi 7 – 12 sekund, jedná se o energeticky bohatší a méně stabilní formu singletového kyslíku, je tak reaktivní, že nepřechází přechod do základního stavu. Ve vodě se doba života obou stavů liší, je nižší. Prodloužit ji lze záměnou vodíku za deuterium, eliminací OH skupin v rozpouštědle nebo přidáním surfaktantu do roztoku. Doba života singletního kyslíku se zvyšuje také v přítomnosti detergentu. Účinky reakcí generujících  $^1\text{O}_2$ , označované souhrnně historickým termínem fotodynamický efekt, nalézají široké uplatnění ve fotobiologii a ve fotomedicině při léčení rakoviny (fotodynamická terapie, PDT), při inaktivaci bakterií a virů a v nových insekticidech a herbicidech. [9, 10, 12]

## 2.4 Detekce singletového kyslíku

Detekce a určení množství singletového kyslíku jsou velmi důležité aspekty pro dokonalé porozumění mechanismů spojených s jeho vznikem. Charakteristické reakce  $^1\text{O}_2$  lze využít pro jeho detekci a určení generovaného množství. Vzhledem k velké reaktivitě singletového kyslíku existuje pouze několik přímých metod detekce  $^1\text{O}_2$ . K přímé detekci patří detekce luminiscence (v tomto případě hovoříme o fosforescenci) singletového kyslíku na vlnové délce 1 270 nm. K nepřímým metodám lze zařadit spektrofotometrické, fluorescenční nebo chemiluminescenční metody detekce.



Detekce singletového kyslíku v reakci se provádí ve většině případů nepřímo přidáním určitých specifických chemických sloučenin. Těmito látkami bývají takzvané vychytávače – scavengery. Obecně se scavengery přidávají do reakcí proto, aby vychytávaly a odstraňovaly nebo deaktivovaly nežádoucí produkty či nečistoty v reakcích. V případě singletového kyslíku se využívají k jeho detekci a měření kvantového výtěžku produkce singletového kyslíku. Vychytávače tvoří se singletovým kyslíkem typické produkty, především endoperoxidy, které jsou poté detekovány pomocí vhodných metod. [25, 26, 27]

#### **2.4.1 Chemické metody**

Vychází se z důkladné znalosti reakce s daným substrátem, pak je možné přítomnost i množství  $^1\text{O}_2$  určit na základě tvorby charakteristických primárních či sekundárních produktů fotooxidace. Zatímco většina termických oxidací kyslíkem je teplotně závislá, oxidace singletovým kyslíkem na teplotě takřka nezávisí a často probíhají stereospecificky. Výhodou chemických metod je jednoduchost experimentálního provedení. [9, 28]

##### **2.4.1.1 Odbarvovací metody**

Odbarvovací metody jsou založeny na skutečnosti, že během reakce s  $^1\text{O}_2$  se absorpční pásy reaktantu snižují úměrně množství generovaného  $^1\text{O}_2$ . Reakci lze tak velmi snadno sledovat fluorescenčně nebo spektrofotometricky. Reaktanty bývají většinou tvořeny konjugovaným systémem dvojných vazeb, se kterými singletový kyslík reaguje za vzniku endoperoxidů či hydroperoxidů. Tyto metody bývají velmi citlivé a jednoduché, neboť singletový kyslík dokáže působit destruktivně na chromofory molekul reaktantu. Na druhou stranu je nutné zdůraznit několik důležitých podmínek: fotosenzibilizátor a reaktant se nesmí příliš lišit polaritou, musejí být navzájem zcela indiferentní a jejich absorpční pásy se nesmějí překrývat.

Pro stanovení singletového kyslíku v organických rozpouštědlech se doporučuje použití reakce 1,3-difenyliisobenzofuranu sledované poklesem absorbance při 440 nm. Ve vodném prostředí lze například použít draselné soli tryptofanu či kyseliny močové, kde odbarvování nastává při  $\lambda = 292$  nm. [9, 28]

##### **2.4.1.2 Elektronová paramagnetická rezonance (EPR)**

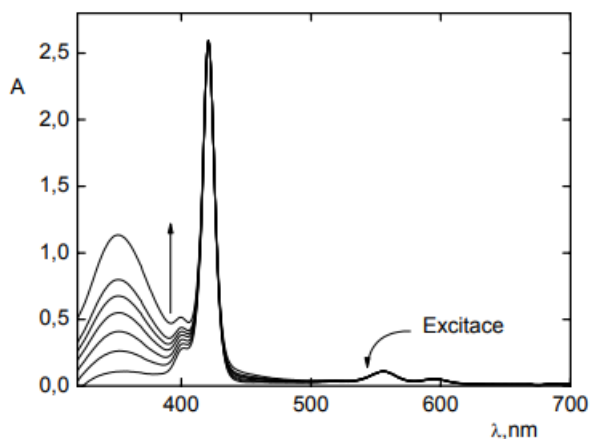
Elegantní metoda, i když poměrně instrumentálně náročná. Metoda nepřímé detekce  $^1\text{O}_2$ , která je založena na reakci  $^1\text{O}_2$  s neradikálovou sloučeninou za vzniku stabilního radikálového produktu. Metoda se nazývá spinový záchyt. Na stanovení  $^1\text{O}_2$  se nejčastěji používá 2,2,6,6-tetramethylpiperidin a jeho deriváty. Vznikající nitroxidový radikál je charakteristický třemi liniemi v EPR spektru. Intenzita daných linií je úměrná koncentraci singletového kyslíku v roztoku. [9, 28]

##### **2.4.1.3 Vznik specifických produktů**

Fluorescenční činidla slouží k detekci  $^1\text{O}_2$  pomocí změn ve fluorescenčních vlastnostech. Změna intenzity fluorescence, vlnové délky, doby života nebo kvantového výtěžku). Příkladem vhodných fluorescenčních činidel jsou sloučeniny odvozené od fluoresceinu. Vhodným komerčním činidlem je 1-((E)-2-methoxyvinyl)pyren, který reakcí se singletovým kyslíkem tvoří dioxetanový meziprodukt rozkládající se na pyren-1-karbaldehyd spolu s chemiluminiscencí při 465 nm, která se detekuje. [9, 28]

#### 2.4.1.4 Reakce s anorganickými látkami (jodidová metoda)

Jodidová metoda je založena na reakci singletového kyslíku s jodidovým anionem ve vodném prostředí v přítomnosti katalyzátoru  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ , přičemž vzniká trijodidový anion ( $\text{I}_3^-$ ), jehož množství je přímo úměrné singletovému kyslíku. Trijodidový anion absorbuje v blízké ultrafialové oblasti, koncentraci vznikajícího ( $\text{I}_3^-$ ), lze sledovat spektrofotometricky v jeho absorpčním pásu při 351 nm. Nevýhodou metody je její nízká specifita, naopak výhodou je její jednoduchost a vysoká citlivost. [9, 28]



*Obrázek 6: Absorpční spektrum Zn-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyriu v jodidovém detekčním činidle po 0, 2, 4, 6, 8, 10, 16 min (směr šipky) ozařování He-Ne laserem (543 nm) [9]*

#### 2.4.2 Fyzikální metody

K fyzikálním metodám patří zejména přímá detekce luminiscence  $^1\text{O}_2$ , vybrané fototermální techniky a časově rozlišitelná absorpce  $^1\text{O}_2$  v IR oblasti. K výhodám těchto metod patří jednoznačně přímá detekce  $^1\text{O}_2$  – odpadá vliv sekundárních reakcí s chemickými činidly. Na straně druhé je nutné podotknout, že fyzikální metody jsou jak časově, tak i finančně náročné a vyžadují použití speciálních světelných zdrojů (nejčastěji lasery) a speciálně konstruovaných detektorů. [9, 28]

##### 2.4.2.1 Fototermální metody

Excitovaná molekula uvolňuje absorbovanou energii radiačními nebo neradiačními procesy. Průběh neradiačních procesů je spojen se vznikem částic s vysokým obsahem energie nebo s disipací tepla do okolí. Teplo uvolněné během neradiačních procesů excitované molekuly do okolního rozpouštědla způsobuje změny indexu lomu (metoda TRTL) a vznik tlakového rázu (metoda LIOAS). Při použití metody LIOAS jsou tlakové vlny převedeny na elektrický signál piezoelektrickým čidlem, která je umístěno na vnější stěně kyvety nejčastěji ve směru kolmém na dopadající laserový puls, při použití metody TRTL se měří změna indexu lomu indukovaná lokálním uvolněním tepla v souvislosti se vznikem a reakcemi  $^1\text{O}_2$ . Protože jsou tyto techniky kalorimetrické, je důležité vzít v úvahu energetickou bilanci fotosenzitizovaného procesu, uvážit časové intervaly, ve kterých probíhají konkrétní procesy disipace absorbované energie, a dát je do souvislosti s časovým rozlišením měřením. [9, 28]

### 2.4.2.2 Měření absorpce

Analogicky k měření fluorescence přechodu  $O_2(^1\Sigma_g) \rightarrow O_2(^1\Delta_g)$  je možno také měřit opačný jev, tj. absorpci  $O_2(^1\Sigma_g)$  v infračervené oblasti. Poloha maxima absorpčního pásu  $O_2(^1\Delta_g)$  značně závisí na druhu použitého rozpouštědla. [9, 28]

### 2.4.2.3 Měření luminiscence $^1O_2$

Přímé měření singletového kyslíku jak v prvním, tak ve druhém excitovaném stavu je založeno na monitorování odpovídajících radiačních přechodů. Nejpoužívanější je časově rozlišená detekce fosforescence  $O_2(^1\Delta_g)$  při 1 270 nm. Vzorek je umístěn v běžné fluorescenční kyvetě a je excitován pulsním laserem o vhodné vlnové délce. Kvantový výtěžek fosforescence je velmi malý, proto musí být nároky na citlivost detekčního systému poměrně vysoké. [9, 28]

## 2.5 Antimikrobiální jev

Jako mikroorganismy se označují živé organismy o mikroskopických rozměrech. Řadí se mezi ně mikroskopické vláknité houby, řasy, bakterie, prvoci a viry. Ačkoli patogenních mikroorganismů je menšina, představují největší hrozbu pro lidský organismus. Proti těmto zástupcům lidstvo začalo již dávno bojovat antimikrobiálními prostředky, které mají za úkol nebezpečné mikroby hubit a zamezit tak interakci jejich buněk a metabolických produktů s organismem. Antimikrobiální látky působí různými způsoby na buňky a jednotlivé chemické sloučeniny, které jsou součástí stavby mikrobů. Antimikrobiální nátěry by měly snížit riziko šíření infekcí ve zdravotnických zařízeních, ale i v dalších objektech navštěvovaných veřejností a měly by být účinné po dobu několika let. První zmínky o jejich účelnosti se objevily asi před 15 lety. Aditiva s antimikrobiálním účinkem jsou např. organické biocidy, koloidní částice nebo nanočástice stříbra, organické polymery s reaktivními antibakteriálními skupinami a také fotokatalytické oxidy. [39]

Antimikrobiální účinky většiny chemických látek nejsou stoprocentní, nefungují na endospory, nebo zapříčiní sice úhyn buněk mikrobů, které však mohou dále působit toxickými látkami v organismu. Mimo organismus na antimikrobiálních substrátech může vzniklý biofilm s uhynulými buňkami poskytovat vhodný mezisubstrát pro nové mikroby a blokovat germicidní účinek materiálu. Tyto problémy by měly být řešitelné použitím fotokatalýzy. Antimikrobiální účinek se rozšíří o úplný rozklad mikrobiálních buněk na základní netoxické látky. Vznik superoxidového radikálu v důsledku fotoaktivace polovodičového materiálů, může při interakci s mikrobiologickým materiálem způsobit buněčnou smrt. Ta nastává po částečné degradaci buněčné stěny a následným průnikem volných radikálů, které napadají cytoplazmatickou membránu. Rozpad membrány peroxidací lipidů vede k možnému následnému úniku cytoplazmy do okolí a ztrátě životaschopnosti buňky. Rychlost usmrcení závisí na typu buňky (bakterie, viry, houby atd.) a především na tloušťce a struktuře buněčné stěny. [29, 30, 31]

### 2.5.1 Bakterie

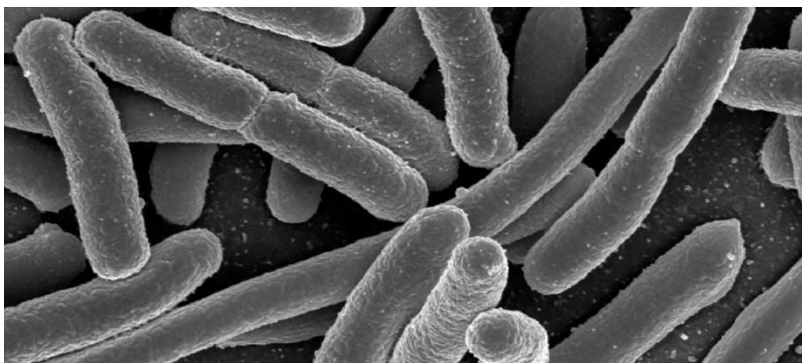
Bakterie patří mezi jednobuněčné prokaryotické organismy a tvoří největší skupinu živých organismů na Zemi. Mívají kokovitý nebo tyčinkovitý tvar, podle struktury buněčné stěny můžeme bakterie rozdělit dle Gramova barvení na grampozitivní a gramnegativní, zpravidla dosahují velikosti v řádu několika mikrometrů, lze je pozorovat ve světelném mikroskopu [42]. Koky jsou buď jednotlivé, nebo v typických uspořádáních, a to v řetězcích, shlucích či hroznech, dvojicích (diplokoky), čtveřicích (tetrády) nebo větších útvarech. Tyčinky mohou být krátké až vláknité,

rohlíkovitě zahnuté, spirálovité nebo jejich konec může být kyjovitě rozšířen. Uspořádaný mohou být např. do palisád. Bakterie tvarem na rozhraní mezi koky a tyčinkami se nazývají kokobacily. Prostřednictvím jednoduché stavby je usnadněna látková výměna s okolním prostředím, transport látek, metabolické reakce i reprodukce. Bakteriální buňky se rozmnožují binárním dělením (nepohlavní proces), kterému předchází replikace bakteriálního chromozomu. Ve vhodném prostředí se může bakterie množit velmi rychle, ať už je to v přirozeném prostředí nebo v laboratorní kultuře. *E. coli* se může za optimálních podmínek rozdělit každých 20 minut. Bakteriální buňka obsahuje cytoplazmu, cytoplazmatickou membránu, nukleoid (kruhová molekula DNA), plazmidy a ribozomy. Na povrchu je kryta buněčnou stěnou z peptidoglykanu, případně dalšími vrstvami (glykokalyx, slizová pochva), někdy se vyskytují fimbrie [31, 40]. Hlavní funkcí bakterií je tvorba biomasy tím, že metabolizují organické materiály na anorganické sloučeniny, které pak mohou být opět použity jinými organismy pro jejich růst a vývoj [41]. V praktické části byla použita bakterie *Escherichia coli*.

### 2.5.1.1 *Escherichia coli*

Bakterie *Escherichia coli* byla poprvé popsána v roce 1885 německým vědcem Theodorem Escherichem. Jedná se o gramnegativní fakultativně anaerobní bakterii z čeledi *Enterobacteriaceae*. Má tyčinkovitý tvar a je jednou z nejznámějších a nejvíce prozkoumaných bakterií osídlujících člověka, slouží také jako modelový organismus pro genové a klinické studie. Nevyskytuje se však pouze u člověka, běžně ji lze nalézt i v intestinálním traktu většiny teplokrevných živočichů, kde je součástí normální mikroflóry. Pomáhá udržovat rovnováhu ve střevě, jelikož produkuje koliciny, které brání růstu jiných bakterií. Tvoří také některé stimulační látky, vitamín K a vitamín B 12. Nachází se také v půdě a ve vodě. V současnosti jsou popsány tři velké skupiny různých kmenů *E. coli*. Jedná se konkrétně o nepatogenní kmeny (komezální kmeny), které osídlují organismus bez toho, aby jej napadaly, či jinak poškozovaly a patogenní kmeny intestinální a extraintestinální. Jako kmen se v mikrobiologii označuje kultura mikroorganismu, která je většinou izolovaná z jedné kolonie, to jest prakticky z jedné buňky. V roce 1947 americký molekulární mikrobiolog Joshua Lederberg jako první pozoroval a popsal u bakterie *E. coli* výměnu genetického materiálu tzv. konjugací. Za tento objev získal v roce 1958 Nobelovu cenu. Na bakterii *E. coli* byly také popsány procesy metabolismu dusíku u bakterií, biosyntéza L-tryptofanu z indolu a L-serinu a další. V oblasti biotechnologií se *E. coli* používá také pro produkci rekombinantních proteinů, například byla použita pro produkci inzulínu. [31, 46]

Zatímco mnoho kmenů je neškodných, některé kmeny mohou být patogenní a mohou vyvolávat průjemová a infekční onemocnění. Jedním z nejznámějších kmenů způsobujícím nebezpečné epidemie je enterohemoragický kmen serotypu *E. coli* O157:H7. Na základě serologické (antigenní) charakterizace označuje O v tomto názvu typ kmenového O-antigenu (somatického, tělového antigenu, lipopolysacharidu), kterého je u druhu *E. coli* v současnosti popsáno přibližně 170 typů. H v názvu kmene označuje typ jeho H-antigeny (bičíkový antigen, flagelární protein). Virulentním faktorem, typickým pro kmen *E. coli* O157:H7, je Shiga toxin, který má enterotoxické, neurotoxické a cytotoxické účinky a výsledkem infekce jeho producentem je poškození enterocytů (buněk sliznice střeva). Často byly zdrojem epidemie hamburgery, a v USA se proto užívá pro označení infekce způsobené kmenem *E. coli* O157:H7 pojmu „hamburgerová nemoc“. [46]



Obrázek 7: *Escherichia coli* (*E. coli*) [45]

### 2.5.2 Viry

Viry jsou nebuněčné parazitické organismy. Samy o sobě jsou neaktivní a k rozmnožování potřebují hostitelskou buňku, nemají vlastní proteosyntetický aparát. Často způsobí smrt napadené buňky. Stavba viru je velmi jednoduchá. Základní část tvoří nukleová kyselina DNA nebo RNA a okolo ní je bílkovinný obal – kapsida. Dále mají některé viry ještě membránový obal, jeden nebo více bičků (např. některé bakteriofágy) nebo si v kapsidě přinášejí některé enzymy, potřebné pro rozmnožení viru (např. reverzní transkriptáza u retrovirů). Důležité jsou povrchové glykoproteiny viru, díky kterým se virová částice může vázat na specifické receptory buněk. [31]

### 2.5.3 Plísně

Mikroskopické vláknité houby jsou mnohobuněčné organismy, patřící mezi houby, které pokrývají povrch substrátu jemným bílým nebo barevným myceliem. Mezi plísně patří fytofungy (pravé plísně) s rody *Absidia*, *Mucor* (plíseň hlavičková) a *Rhizopus*, vřeckaté houby. Plísně jsou většinou saprofytické, mohou být užitečné, produkují-li antibiotika, organické kyseliny, případně enzymy v průmyslovém měřítku, nebo škodlivé působící mykózy lidí, zvířat i rostlin, tvořící mykotoxiny, rozkládající potraviny a krmivo, dřevo, kůži nebo papír. [31]

## 2.6 Hodnocení antibakteriální účinnosti

Obecně antibakteriální testy slouží ke zjištění míry toxicity pro zástupce různých skupin bakterií. Různé druhy bakterií mohou mít jinou odezvu na testovaný materiál, a proto se testují vybrané bakterie vhodné pro danou aplikaci. Rozdílná odezva (vitalita buněk) se očekává u bakterií G+ a G- vzhledem k rozdílné stavbě jejich buněčné stěny. [32, 33] Pro komerční výrobky typu samočisticích skel, betonů, materiálů pro čištění vody a vzduchu jsou zavedeny ISO normy. Ty slouží ke standardizaci testování funkčnosti těchto materiálů. [34] Při testování fotoaktivních povrchů je zapotřebí UV záření. Norma ISO 27447:2019 je vhodná pro testování fotoaktivních povrchů včetně tenkých vrstev (tedy nátěrů) a současně též pro textilní materiály. [35] Norma zahrnuje dvě metody: metodu adheze filmu (pro tvrdé povrchy) a metodu adheze skla (pro textilie). U první metody se testují kmeny *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*, u druhé také kmen *Staphylococcus aureus* a *Klebsiella pneumoniae*. Z vybraného kmene se připraví inokulum (po kultivaci při 37 °C) a stanoví se koncentrace bakterií buď optickým mikroskopem (počítání) nebo měřením optické hustoty (takzvané měření zákalu pomocí densitometru). Roztok je zředěn přidáním živného média na koncentraci. Vzorky o rozměrech 5 × 5 cm a tloušťce max. 1 cm jsou sterilizovány a umístěny do Petriho misek s navlhčeným filtračním papírem zajišťujícím dostatečnou vlhkost vzorku při osvětlení (zabraňující vysychání buněk), inokulovány připravenou suspenzí daného bakteriálního kmene, zakryty UV

propustným víkem a umístěny do fotoreaktoru. Pro metodu adheze filmu je inokulovaný vzorek, před umístěním do TK, ještě zakryt propustnou folií, která zajišťuje rovnoměrnou distribuci bakterií. Pro metodu adheze skla je naopak vzorek textilie (příp. podobného materiálu) umístěn nejprve na podložní sklo. Vzorky jsou vystaveny UV záření několik hodin o intenzitě světla dle požadované aplikace (max.  $0,25 \text{ mW/cm}^2$ ). Část vzorků je umístěna do temného prostředí bez přístupu UV (slouží jako kontroly fotokatalytického účinku) a část vzorků je ihned dále zpracovaná metodou přímého oplachu. Oplach u všech vzorků probíhá pomocí oplachového roztoku v sáčku, ve kterém je vzorek promnut tak, aby celá biomasa přešla do suspenze. Počet vitálních bakterií se zjistí prostřednictvím diluční metody v agaru. Oplachová suspenze se odebere, přesně rozředí desetinnou řadou a zalije agarem v petriho miskách, které jsou následně inkubovány 24 hodin. Narostlé bakterie jsou automaticky či manuálně počítány v jednotkách CFU. Metoda je kvantitativní a výsledky mají tendenci být reprodukovatelné za předpokladu, že inokulum po pokrytí tenkým filmem nebo sklem nevyteče z cílové oblasti. Metoda testuje bakteriostatické (růst inhibující) a baktericidní (usmrcení bakterií) vlastnosti. Mikrobiální koncentrace jsou standardizovány a bakterie jsou během inkubační doby zásobovány živinami, což jim poskytuje dostatečnou příležitost k růstu, pokud povrchy nejsou dostatečně antimikrobiální. To je v rozporu s některými jinými antimikrobiálními testy, kde jsou mikroby „inkubovány“ v nevyživných suspenzích, což samo o sobě může být po dlouhou dobu stresující. Metoda stanoví trojnásobné experimentování, které pomáhá vědcům odhadnout přesnost jednotlivých testů a zvyšuje celkovou experimentální přesnost. Téměř stejný postup je aplikován u metody ISO 17094:2014 popisující stanovení antibakteriální účinnosti polovodičů při pokojovém osvětlení. [36] Rozdíl je především ve zdroji záření (je navíc použit filtr pohlcující UV vlnové délky specifikovaný v normě ISO 14605:2013). [37] Testovací metoda pro určení fotokatalytické aktivity povrchů ve vodných roztocích pomocí degradace methylenové modři. Methylenová modř  $\text{MB}^+$  se řadí mezi velice oblíbené testovací polutanty vodných roztoků v polovodičové fotokatalýze. Jeho popularita tkví v jednoduchosti stanovení, jelikož vše, co je potřeba k měření rychlosti fotokatalytického bělení  $\text{MB}^+$  ve vodném roztoku je UV/VIS spektrofotometrie. Samotné měření probíhá v objemu 35 ml roztoku  $\text{MB}^+$  o koncentraci  $10^{-5} \text{ M}$ , celý systém je ozařován zdrojem UVA záření o intenzitě  $1,0 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  a každých 20 minut je roztok promícháván. Změna koncentrace  $\text{MB}^+$ , jež je funkcí doby ozáření, je sledována spektrofotometricky přímo nebo odběrem vzorků. Pro tento test je adekvátní teplota laboratoře  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 5,5 a vysoká čistota barviva. Z rychlosti odbarvení methylenové modři (jednotky:  $\text{molekuly}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a UVA záření v jednotkách (počet fotonů  $\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) lze určit procentuální fotonickou účinnost aktivního vzorku. [34] Norma ISO 22196 je navržena tak, aby kvantitativně testovala schopnost plastů inhibovat růst mikroorganismů (bakteriostatické) nebo je zabít (baktericidní) po dobu 24 hodin. Je to relativně citlivý test, což znamená, že dokáže detekovat nízkourovňové antimikrobiální účinky vyvíjené po dlouhou dobu. Testovaný mikroorganismus se připravuje obvykle růstem v kapalném kultivačním médiu. Podle metody jsou specifikovány dva reprezentativní mikroorganismy, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Suspenze testovaného mikroorganismu se standardizuje zředěním v živném bujónu (to umožňuje mikroorganismům růst během testu). Kontrolní a testovací povrchy se naočkují mikroorganismy, v triplicátech, a poté se mikrobiální inokulum překryje tenkým sterilním filmem. Zakrytím se inokulum rozšíří, zabrání jeho odpařování a zajistí těsný kontakt s antimikrobiálním povrchem. Mikrobiální koncentrace se stanoví v "čase nula" elucí následovanou zředěním a nanesením na plotny. Provede se kontrola, aby se ověřilo, že metoda neutralizace/eluce účinně neutralizuje antimikrobiální činidlo na testovaném antimikrobiálním povrchu. Naočkované, zakryté kontrolní a antimikrobiální testovací povrchy se nechají nerušeně inkubovat ve vlhkém prostředí po dobu 24 hodin. Po inkubaci se stanoví mikrobiální koncentrace. Vypočte se redukce mikroorganismů vzhledem k počátečním koncentracím a kontrolnímu povrchu. [38]

## 3 Experimentální část

### 3.1 Laboratorní pomůcky

- Radiometr, Irradiance Meter X 97 LED 2700 K (400 – 800 nm)
- Termostat
- Plastové Petriho misky
- Erlenmayerovy baňky
- Pipety (skleněné, automatické)
- Zkumavky
- Krycí sklička (20 × 20 mm)
- Autokláv Vaposteri BMT, Brno
- LED svítidlo s teplotou chromatičnosti 3100 K
- Laboratorní zdroj s nastavitelným napětím 0 – 30 V, Basetech BT-305 A
- Laboratorní zdroj s nastavitelným napětím 0 – 50 V, Joy-it JT-DPS5005
- Laboratorní váhy KERN 440–47N
- Testovací komora
- Plastové vzorkovnice s uzávěrem
- Spektrofotometr Thermo Spectronic Helios
- Minitřepačka MS 3 basic
- Fólie č. 14 obsahující 200 mg PyrZn na kg sušiny laku a fotoaktivní vrstvu (PyrZn + CX–70), VUT–2021–14
- Fólie č. 17 obsahující 50 mg PyrZn na kg sušiny laku a fotoaktivní vrstvu (PyrZn + CX–70), VUT–2022–17
- Fólie č. 13 bez obsahu PyrZn obsahující pouze fotoaktivní vrstvu, VUT–2021–13

### 3.2 Chemikálie

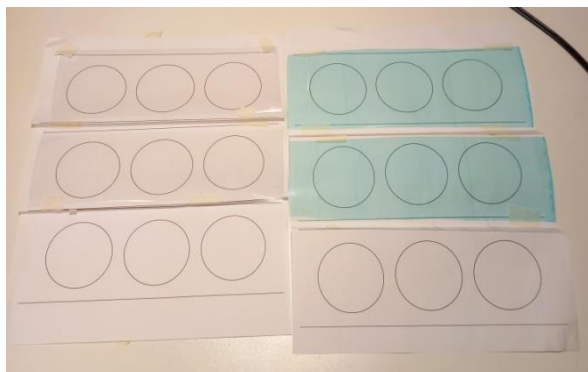
- Ethanol 96 %, PENTA
- Sterilní destilovaná voda
- Sterilní voda s bujónem (zředěné živné médium)
- Plate Count agar (PCA) Himedia, ref. M091–500G
- Bujón Nutrient Broth (w/1 % pepton)
- Fyziologický roztok

### 3.3 Použitá bakterie

Pro testování antibakteriální aktivity fotoaktivních povrchů byla použita bakterie *E. coli* CCM 3988 z České sbírky mikroorganismů v Brně.

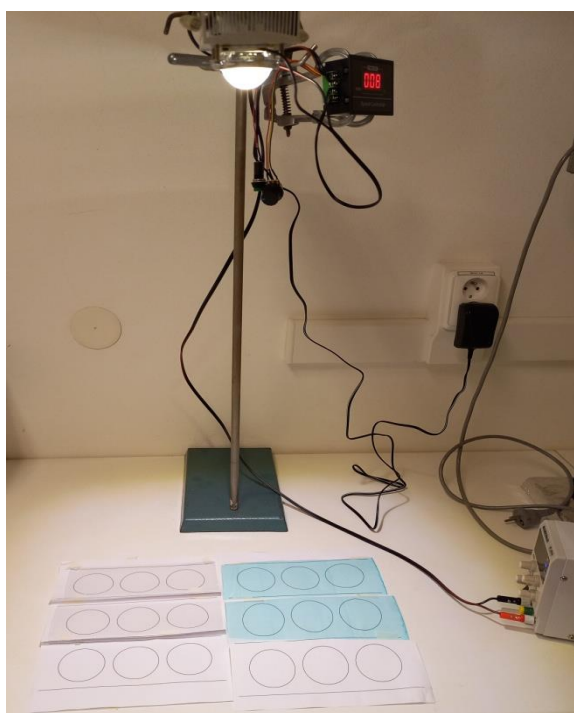
### 3.4 Otisková metoda pro stanovení antibakteriální účinnosti

Jako první metoda pro stanovení antibakteriální aktivity fotoaktivních povrchů jednotlivých fólií, byla použita otisková metoda.



*Obrázek 8: Papírová předloha se srovnávací a fotoaktivní fólií pro testování*

V závislosti na papírové předloze byly jednotlivé fólie s fotoaktivním nátěrem a srovnávací čistá fólie nastříhány a přilepeny na předlohu tak, aby byla pokrytá kolečka na jednotlivé otisky, viz **obr. 8**. Otisky byly pořízeny otisknutím prstů minimálně patnácti osob z řad studentů a pedagogů přítomných na fakultě chemické VUT v Brně na předem vydesinfikovanou fólii 70% ethanolem. Po otisknutí fólií na všech vyznačených místech (kolečka na papírové předloze) byly takto připravené fólie uloženy na 4 hodiny do tmy a na světlo při intenzitě ozáření  $0,25 \text{ mW/cm}^2$ .

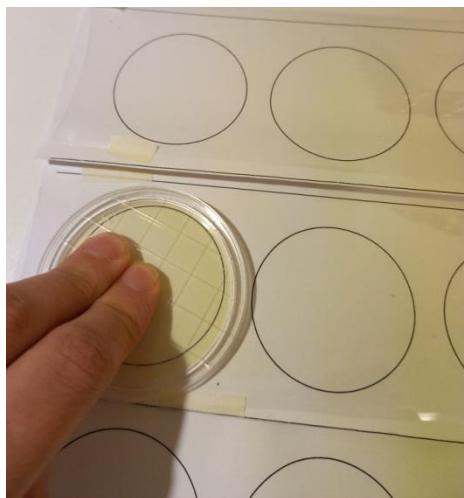


*Obrázek 9: Aparatura pro osvětlování fólií*

Mezitím byl připraven roztok kultivačního média navážením 3,5 g PCA agarů do Erlenmayerovy baňky, který byl rozpuštěn ve 150 ml sterilní vody. Živné médium bylo poté sterilizováno v autoklávu po dobu 15 minut. Po vysterilizování bylo médium nalito do sterilních plastových Petriho misek. Po



ztuhnutí živného média a uplynutí 4 h nepřetržitého ozařování a ponechání fólií ve tmě byly Petriho misky otisknuty na jednotlivá vyznačená kolečka testovaných fólií, poté byly uloženy do termostatu na týden při teplotě 26 °C. Po týdenní kultivaci byly všechny narostlé kolonie bakterií spočítány a vyhodnoceny.



*Obrázek 10: Otisk Petriho misky na povrch fólie*

### **3.5 Stanovení antibakteriální účinnosti fotoaktivních povrchů dle ISO 27447:2019**

Jako druhá metoda pro stanovení antibakteriální aktivity fotoaktivních vrstev byla použita metoda adheze filmu dle ISO normy 27447:2019, jako testovací kmen byla použita již zmíněna gramnegativní bakterie *E. coli*.

Sterilní živné médium (bujón Nutrient Broth) o objemu 50 ml bylo naočkováno kulturou *E. coli* CCM 3988 (jeden želatinový plátek) a uložené do termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 h. Do experimentu byla použita 24 hodinová kultura.

Po kultivaci byla kultura vyjmuta z termostatu a byla změřena absorbance na jednopaprskovém spektrofotometru při vlnové délce 600 nm v 1 cm kyvetě. Výsledná absorbance se při jednotlivých experimentech pohybovala v rozmezí od 0,957–1,063. Suspenze byla ředěna zředěným živným roztokem (1:500) promícháním 3 ml suspenze s 6 ml zředěného živného roztoku na absorbanci přibližně 0,5 při 600 nm, odpovídající přibližně  $2 \cdot 10^8$  CFU/ml, například: 100  $\mu$ l suspenze do 9,9 ml zředěného živného roztoku (1:500). Experiment probíhal při laboratorní teplotě 24 °C.

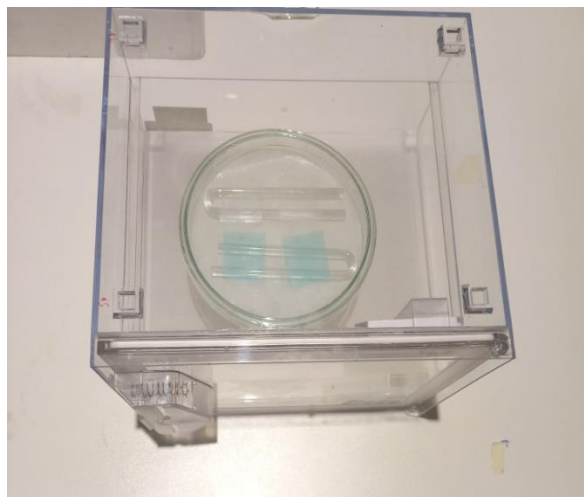
Předem nastříhané srovnávací čisté fólie a fólie s fotoaktivním nátěrem do tvaru čtverečků (3×3 cm) byly vydesinfikovány 70 % ethanolem a osušeny, poté byly umístěny na zahnuté skleněné tyčinky do dvou Petriho misek, na jejichž dno byl umístěn filtrační papír, který byl zalit 5 ml sterilní vody, aby nedocházelo k vysychání buněk a byla udržena dostatečná vlhkost vzorku. Na jednotlivé testovací a srovnávací fólie bylo z výsledně naředěné suspenze odpipetováno po 24  $\mu$ l a suspenze byla přikryta krycím sklíčkem 20×20 mm, které zajišťuje rovnoměrnou distribuci buněk. Při každém experimentu byly do obou Petriho misek s navlhčeným filtračním papírem vloženy dvě srovnávací fólie (2 vzorky porovnávací) a dvě fólie s fotoaktivním nátěrem (2 vzorky s aktivní vrstvou) v závislosti na testované fólii. Dále byly dvě srovnávací fólie a dvě fólie s fotoaktivním nátěrem vloženy do čtyř prázdných menších Petriho misek (v každé Petriho misce jedna fólie) pro okamžité

testování výtěžnosti „Recovery test“, na které bylo opět odpipetováno po 24  $\mu$ l suspenze a ta byla přikryta krycím sklíčkem.

Po uzavření Petriho misky skleněným víkem byla jedna uložena na 4 hodiny do tmy a druhá na 4 hodiny do testovací komory při intenzitě ozáření 0,25  $\text{mW}/\text{cm}^2$  LED svítidlem s teplotou chromatičnosti 3100 K za podmínek 26,8 V, 0,5 A a 14, 3 W.



**Obrázek 11:** Aparatura pro osvětlování fólií v testovací komoře



**Obrázek 12:** Uložení Petriho misky do testovací komory během ozařování

Petriho misky pro stanovení výtěžnosti byly ihned zpracovávány. Do plastové vzorkovnice o objemu 50 ml s víčkem bylo odpipetováno 15 ml fyziologického roztoku a pomocí pinzety do ní byla vložena fólie s krycím sklíčkem. Takto připravená vzorkovnice byla důkladně uzavřena víčkem a protřepávána po dobu 1 minuty aby se bakteriální suspenze *E. coli* uvolnila do roztoku. Po uplynutí

této doby byl odpipetován 1 ml roztoku obsahující bakteriální kmen *E. coli* do zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku, zkumavka byla pár sekund důkladně promíchána na minitřepačce a z toho roztoku byl dále odpipetován 1 ml do zkumavky s obsahem 9 ml fyziologického roztoku (zředěno 100×). Takto zředěný roztok vzorku byl po 1 ml odpipetován do třech Petriho misek. (Stejná příprava vzorku se stejným ředěním byla opakována pro další tři fólie). Roztok vzorku byl zalit připraveným živným médiem, které bylo sterilizováno v autoklávu po dobu 15 minut a ochlazeno na laboratorní teplotu, po ztuhnutí byla nalita druhá vrstva živného média. Po ztuhnutí i druhé vrstvy živného média byly Petriho misky převráceny dnem vzhůru a uloženy do termostatu na 48 h ke kultivaci za teploty 37 °C. Po provedení testu výtěžnosti bylo připraveno ředění vzorku 10<sup>7</sup> testovací kultury *E. coli*, které bylo připraveno ředěním výchozího inokula do za sebou jdoucích sedmi zkumavek s obsahem 9 ml fyziologického roztoku. Do první zkumavky byl napipetován 1 ml výchozího inokula *E. coli*, ta byla řádně promíchána na minitřepačce, z takto připraveného roztoku vzorku byl odpipetován 1 ml do druhé zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku, ta byla opět promíchána a takto bylo pokračováno až do přípravy zkumavky číslo 7. Z té byl poté odpipetován 1 ml roztoku vzorku do třech Petriho misek, které byly zality připraveným živným médiem ve dvou vrstvách a uloženy do termostatu na 48 h za teploty 37 °C.

Po uplynutí 4 hodin expozice ve tmě a na viditelném světle byly srovnávací fólie a fólie s fotoaktivní vrstvou zpracovány obdobným způsobem jako fólie pro stanovení testu výtěžnosti s rozdílem ředění připraveného vzorku, viz výsledky jednotlivých experimentů.

Po 48 hodinové kultivaci byly všechny narostlé kolonie bakterie *E. coli* spočítány pomocí lupy na černém podkladu a vyhodnoceny. Maximální počet kolonií na misce u všech vzorků nesmí být větší než 300.

## 4 Výsledky a diskuse

Byla stanovena antibakteriální aktivita u jednotlivých fólií Lotus s rozdílným obsahem PyrZn s fotoaktivní vrstvou a to u fólie č. 13, 17 a 14. Jednotlivé fólie obsahovaly rozdílné množství pyrrithionu zinečnatého, který vykazuje antibakteriální účinek a fotoaktivní části. Byly pozorovány rozdílné výsledky nárůstu bakteriálních kolonií při ponechání jednotlivých fólií na viditelném světle, aby se potvrdil fotoaktivní účinek či ve tmě.

### 4.1 Výsledky stanovení antibakteriální účinnosti metodou otisku

Antibakteriální aktivita byla jako první stanovena metodou otisku Petriho misek na fólie s fotoaktivní vrstvou a srovnávací fólie, kde byly provedeny celkem tři experimenty s fólií č. 14, kde bylo použito 24 Petriho misek k otisknutí testovaných fólií na každý experiment (12 osvětlení, 12 tma), jeden experiment s fólií č. 13 za použití 23 Petriho misek, jelikož jedna Petriho miska po otisknutí srovnávací fólie byla znehodnocena a jeden experiment s fólií č. 17, také za použití 24 Petriho misek. Výsledné počty jednotlivých bakteriálních kolonií u testovaných fólií Lotus jsou si velice podobné.

#### 4.1.1 Experimenty s fólií č. 14

V **tab. 1** jsou vyhodnoceny výsledky přítomných kolonií na jednotlivých otisknutých Petriho miskách u prvního experimentu s fólií č. 14 v závislosti, zda se po dobu 4 hodinové expozice vyskytovaly pod viditelným zářením či ve tmě. Na **obr. 13** je viditelný menší nárůst bakterií na fólii č. 14 oproti srovnávací fólii. Lze také pozorovat nepatrně menší nárůst bakterií na fólii č. 14 po ozařování.

**Tabulka 1: Počet kolonií stanovených metodou otisku při prvním experimentu s fólií č. 14**

Otisková metoda, první experiment s fólií č. 14 – počet osob 12								
Tma/4h						Aritmetický průměr ( $\bar{x}$ )	Směrodatná odchylka výběrová (s)	
Srovnávací fólie	57	54	51	62	31	48	51	10,7
Fólie č. 14	40	28	42	39	38	11	33	11,8
Osvětlení/4h						Aritmetický průměr ( $\bar{x}$ )	Směrodatná odchylka výběrová (s)	
Srovnávací fólie	64	70	68	74	61	73	68	5,1
Fólie č. 14	54	49	55	51	63	56	55	4,8

V **tab. 2** jsou vyhodnoceny výsledky přítomných kolonií na jednotlivých otisknutých Petriho miskách u druhého experimentu s fólií č. 14 v závislosti, zda se po dobu 4 hodinové expozice vyskytovaly pod viditelným zářením či ve tmě. Na **obr. 13** je viditelný menší nárůst bakterií na fólii č. 14 oproti srovnávací fólii. Lze také pozorovat nepatrně menší nárůst bakterií na fólii č. 14 po ozařování, stejně jako u prvního experimentu.

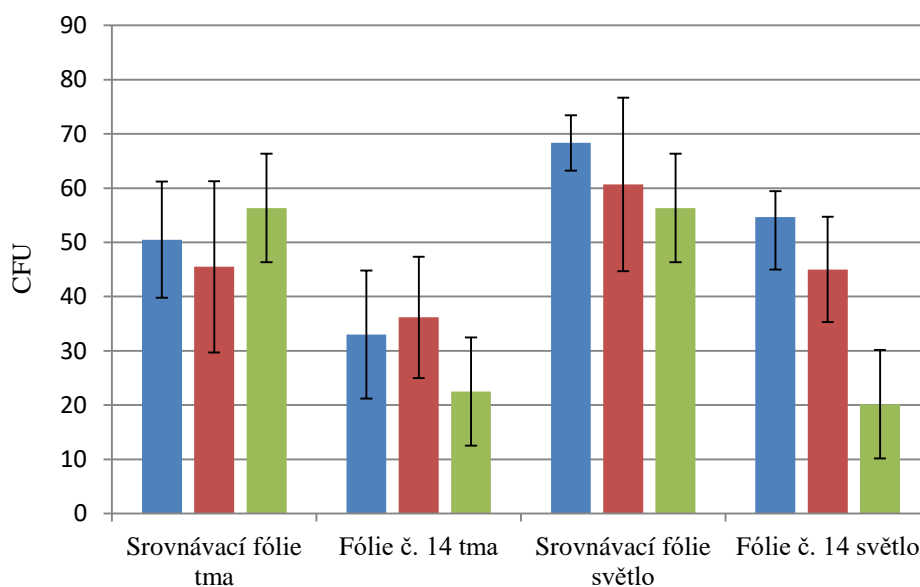
**Tabulka 2: Počet kolonií stanovených metodou otisku při druhém experimentu s fólií č. 14**

Otisková metoda, druhý experiment s fólií č. 14 – počet osob 15								
Tma/4h						Aritmetický průměr ( $\bar{x}$ )	Směrodatná odchylka výběrová (s)	
Srovnávací fólie	71	27	52	38	34	51	46	15,8
Fólie č. 14	22	48	43	28	47	29	36	11,2
Osvětlení/4h						Aritmetický průměr ( $\bar{x}$ )	Směrodatná odchylka výběrová (s)	
Srovnávací fólie	81	62	72	62	52	35	61	16,0
Fólie č. 14	56	46	36	53	31	48	45	9,7

V **tab. 3** jsou vyhodnoceny výsledky přítomných kolonií na jednotlivých otisknutých Petriho miskách u třetího experimentu s fólií č. 14 v závislosti, zda se po dobu 4 hodinové expozice vyskytovaly pod viditelným zářením či ve tmě. Na **obr. 13** je viditelný zřetelně menší nárůst bakterií na fólii č. 14 oproti srovnávací fólii. Lze také pozorovat nepatrně menší nárůst bakterií na fólii č. 14 po ozařování, stejně jako u prvního a druhého experimentu.

**Tabulka 3: Počet kolonií stanovených metodou otisku při třetím experimentu s fólií č. 14**

Otisková metoda, třetí experiment s fólií č. 14 – počet osob 20								
Tma/4h						Aritmetický průměr ( $\bar{x}$ )	Směrodatná odchylka výběrová (s)	
Srovnávací fólie	65	43	58	46	73	53	56	11,4
Fólie č. 14	22	48	25	13	15	12	23	13,5
Osvětlení/4h						Aritmetický průměr ( $\bar{x}$ )	Směrodatná odchylka výběrová (s)	
Srovnávací fólie	51	56	61	67	55	48	56	6,9
Fólie č. 14	12	27	26	18	7	2	20	19,5



**Obrázek 13: Grafické znázornění průměrného počtu kolonií na testované fólii č. 14 a srovnávací fólii po expozici ve tmě a pod osvětlením při prováděných experimentech**

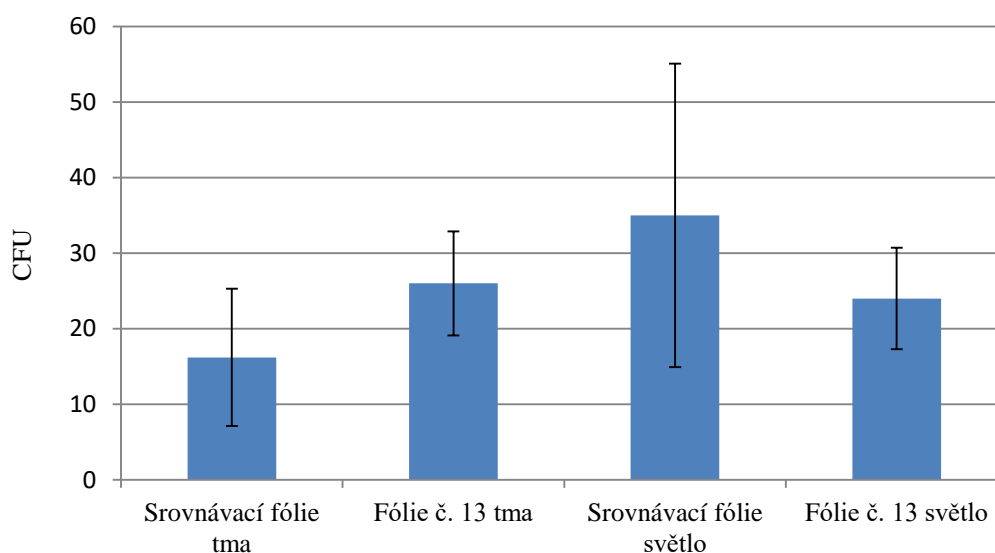
#### 4.1.2 Experiment s fólií č. 13

V **tab. 4** jsou vyhodnoceny výsledky přítomných kolonií na jednotlivých otisknutých Petriho miskách u experimentu s fólií č. 13 v závislosti, zda se po dobu 4 hodinové expozice vyskytovaly pod viditelným zářením či ve tmě. Na **obr. 14** lze pozorovat téměř totožný nárůst bakterií na fólii č. 13 a na srovnávací fólii. Poslední Petriho miska při otisknutí srovnávací fólie po expozici ve tmě byla

znehodnocena a namohla být dále použita pro daný experiment. Lze také pozorovat totožný nárůst bakterií na fólii č. 13 po ozařování i po expozici ve tmě.

**Tabulka 4: Počet kolonií stanovených metodou otisku při experimentu s fólií č. 13**

Otisková metoda – počet osob 21								
Tma/4h						Aritmetický průměr ( $\bar{x}$ )	Směrodatná odchylka výběrová (s)	
Srovnávací fólie	25	11	7	27	11	-	16	9,1
Fólie č. 13	23	33	27	35	22	17	26	6,9
Osvětlení/4h						Aritmetický průměr ( $\bar{x}$ )	Směrodatná odchylka výběrová (s)	
Srovnávací fólie	16	24	62	59	26	23	35	20,1
Fólie č. 13	23	22	28	15	35	22	24	6,7



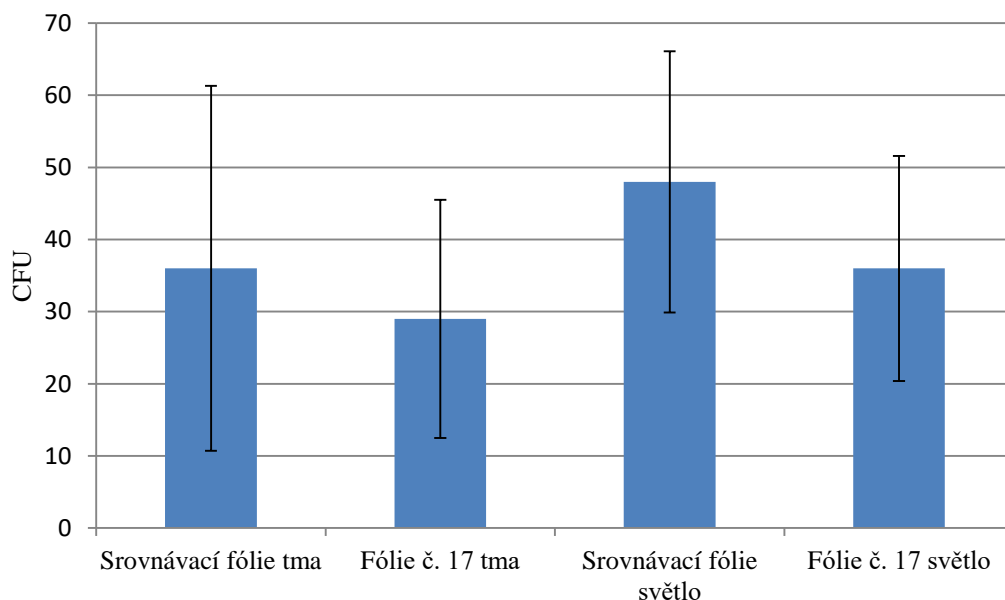
**Obrázek 14: Grafické znázornění průměrného počtu kolonií na testované fólii č. 13 a srovnávací fólii po expozici ve tmě a pod osvětlením**

#### 4.1.3 Experiment s fólií č. 17

V **tab. 5** jsou vyhodnoceny výsledky přítomných kolonií na jednotlivých otisknutých Petriho miskách u experimentu s fólií č. 17 v závislosti, zda se po dobu 4 hodinové expozice vyskytovaly pod viditelným zářením či ve tmě. Na **obr. 15** lze pozorovat téměř totožný nárůst bakterií na fólii č. 17 a na srovnávací fólii při expozici 4h ve tmě. Po 4h ozařování lze pozorovat nepatrně menší nárůst bakterií na fólii č. 17 v porovnání se srovnávací fólií bez fotoaktivního nátěru.

Tabulka 5: Počet kolonií stanovených metodou otisku při experimentu s fólií č. 17

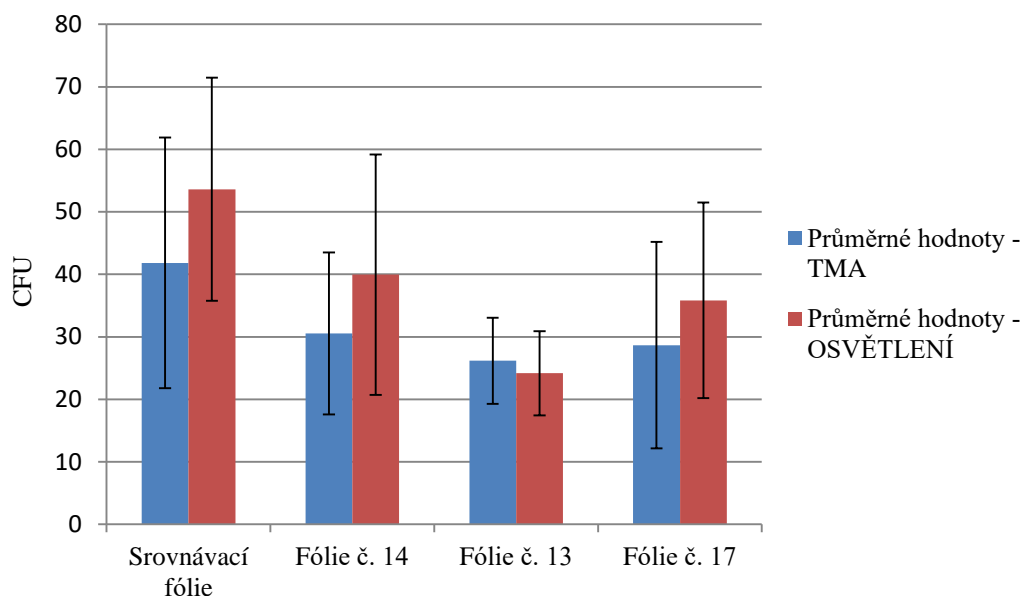
Otisková metoda – počet osob 20								
Tma/4h						Aritmetický průměr ( $\bar{x}$ )	Směrodatná odchylka výběrová (s)	
Srovnávací fólie	8	66	45	39	56	4	36	25,3
Fólie č. 17	44	20	22	34	4	48	29	16,5
Osvětlení/4h						Aritmetický průměr ( $\bar{x}$ )	Směrodatná odchylka výběrová (s)	
Srovnávací fólie	27	56	78	49	42	34	48	18,1
Fólie č. 17	35	20	23	39	64	34	36	15,6



Obrázek 15: Grafické znázornění průměrného počtu kolonií na testované fólii č. 17 a srovnávací fólii po expozici ve tmě a pod osvětlením

Tabulka 6: Průměrné výsledky experimentů s jednotlivými fóliemi metodou otisku

Celkové vyhodnocení experimentů					
	TMA		OSVĚTLENÍ		
	Počet bakteriálních kolonií (CFU)	Směrodatná odchylka výběrová (s)		Počet bakteriálních kolonií (CFU)	Směrodatná odchylka výběrová (s)
Srovnávací fólie	42	20,1	Srovnávací fólie	54	17,8
Fólie č. 14	31	12,9	Fólie č. 14	38	19,2
Fólie č. 13	26	6,9	Fólie č. 13	24	6,7
Fólie č. 17	29	16,5	Fólie č. 17	36	15,6



**Obrázek 16: Celkové grafické znázornění počtu kolonií na všech testovaných fóliích po 4h expozici ve tmě a pod osvětlením**

Výsledky byly pozorovány po vypočítání průměrného obsahu zjištěného počtu bakterií na živném médiu, kde lze pozorovat největší nárůst bakterií na srovnávací fólii a to jak za tmy, tak za světla, která nevykazuje fotoaktivní účinnost ani schopnost inhibovat růst bakterií (bakteriostatický účinek) či je hubit (baktericidní účinek). Co se týče jednotlivých testovaných fólií Lotus s fotoaktivním nátěrem, při vyhodnocení výsledků za tmy, lze pozorovat téměř totožné výsledky nárůstu bakterií u všech tří typů fólií, při porovnání s osvětlením prostřednictvím LED svítidla je počet bakterií nepatrně vyšší, čímž byl prokázán fotoaktivní účinek. U fólie č. 13 byl napočítán nejmenší počet bakteriálních kolonií, které byly ale velkého vzrůstu a pokrývaly téměř celou Petriho misku, u této testované fólie, byl fotoaktivní účinek pozorován jako nejmenší.

## 4.2 Výsledky stanovení antibakteriální účinnosti dle ISO normy 27447:2019

Antibakteriální aktivita byla dále stanovena dle ISO normy 27447:2019, kde byly provedeny celkem dva experimenty s fólií č. 17, dva experimenty s fólií č. 13 a tři experimenty s fólií č. 14. Při vyhodnocení výsledků antibakteriální účinnosti testovaných fólií lze konstatovat, že největší fotoaktivní schopnost vykazuje fólie č. 17 s obsahem 50 mg PyrZn + fotoaktivní nátěr a fólie č. 14 s obsahem 200 mg PyrZn + fotoaktivní nátěr, jelikož při ozařování UV světlem zde byl stanoven nejmenší počet kolonií bakterie *E. coli*. Za tmy byl nepatrně menší počet kolonií stanoven u fólie č. 13.



#### 4.2.1 Experimenty s fólií č. 14

V **tab. 7** jsou vyhodnoceny výsledky přítomné bakterie *E. coli* na jednotlivých Petriho miskách u prvního experimentu s fólií č. 14 dle ISO 27447:2019 v závislosti, zda se po dobu 4 hodinové expozice vyskytovaly pod osvětlením či ve tmě.

**Tabulka 7: Počet kolonií *E. coli* dle ISO 27447:2019 při prvním experimentu s fólií č. 14**

<b>1. Experiment s <i>E. coli</i> dle ISO normy 27447:2019 na fólii č. 14 obsahující 200 mg PyrZn</b>							
Absorbance nezředěného inokula v 1 cm kyvetě: A = 0,979							
Absorbance zředěného inokula v 1 cm kyvetě: A = 0,427							
Intenzita ozáření:		0,25 mW/cm <sup>2</sup> (400 – 800 nm)					
Intenzita osvětlení:		900 lx					
<b>TMA</b>				<b>OSVĚTLENÍ</b>			
Srovnávací fólie							
<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	193	186	202	<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	295	274	302
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	27	18	24	<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	297	292	285
<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	235	196	221				
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	23	30	26				
Fólie č. 14							
<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	223	212	235	<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	256	235	275
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	22	20	20	<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	28	23	20
<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	291	282	305	<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	228	226	259
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	28	42	38	<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	25	31	22
<b>Test výtěžnosti</b>							
Srovnávací fólie				Fólie č. 14			
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	52	47	49	<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	47	36	34
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	43	42	50	<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	53	48	46
<b>Výtěžnost srovnávací fólie:</b>		47,7 %		<b>Výtěžnost Lotus fólie č. 14:</b>		44,5 %	
<b>Ředění vzorku <i>E. coli</i> 10<sup>7</sup></b>	181	201	175				

**Tabulka 8: Výsledky antibakteriální aktivity fotoaktivního povrchu při prvním experimentu**

Průměrný počet živých buněk na neopracovaném vzorku okamžitě po inokulaci	$A =$	2952633
Průměrný počet živých buněk na vzorku bez aktivní vrstvy uložených v temnu po dobu ozařování vzorků	$B_D =$	1415282
Průměrný počet živých buněk na vzorku s aktivní vrstvou uložených v temnu po dobu ozařování vzorků	$C_D =$	1694373
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou L na vzorku bez aktivní vrstvy	$B_L =$	1817487
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou L na vzorku s aktivní vrstvou	$C_L =$	1178445
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení s intenzitou L	$R_L =$	0,19
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení viditelným zářením stanovená filmovou metodou	$\Delta R_L =$	0,27

Antibakteriální aktivita všech fotoaktivních povrchů byla vypočítána podle následujících vzorců, kde jednotlivé proměnné jsou vysvětleny v tabulce s výsledky antibakteriální aktivity jednotlivých testovaných fólií:

$$R_L = \left[ \log \left( \frac{B_L}{A} \right) - \log \left( \frac{C_L}{A} \right) \right] = \log \left( \frac{B_L}{C_L} \right) \quad (1)$$

$$\Delta R_L = \log \left( \frac{B_L}{C_L} \right) - \left[ \log \left( \frac{B_D}{A} \right) - \log \left( \frac{C_D}{A} \right) \right] = \log \left( \frac{B_L}{C_L} \right) - \log \left( \frac{B_D}{C_D} \right) \quad (2)$$

V **tab. 9** jsou vyhodnoceny výsledky přítomné bakterie *E. coli* na jednotlivých Petriho miskách u druhého experimentu s fólií č. 14 dle ISO 27447:2019 v závislosti, zda se po dobu 4 hodinové expozice vyskytovaly pod viditelným světlem či ve tmě.

**Tabulka 9: Počet kolonií *E. coli* dle ISO 27447:2019 při druhém experimentu s fólií č. 14**

<b>2. Experiment s <i>E. coli</i> dle ISO normy 27447:2019 na fólii č. 14 obsahující 200 mg PyrZn</b>							
Absorbance nezředěného inokula v 1 cm kyvetě: A = 0,962							
Absorbance zředěného inokula v 1 cm kyvetě: A = 0,406							
Intenzita ozáření:				0,25 mW/cm <sup>2</sup> (400 – 800 nm)			
Intenzita osvětlení:				900 lx			
<b>TMA</b>				<b>OSVĚTLENÍ</b>			
Srovnávací fólie							
<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	207	198	238	<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	252	229	202
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	28	21	22	<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	262	204	216
<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	220	201	194				
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	23	22	18				
Fólie č. 14							
<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	284	258	232	<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	204	225	195
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	33	28	30	<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	33	20	22
<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	294	271	298	<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	176	211	219
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	30	26	64	<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	21	22	18
Test výtěžnosti							
Srovnávací fólie				Fólie č. 14			
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	54	44	52	<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	31	38	46
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	38	40	51	<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	42	46	45
<b>Výtěžnost srovnávací fólie:</b>		49,6 %		<b>Výtěžnost Lotus fólie č. 14:</b>		44,1 %	
<b>Ředění vzorku <i>E. coli</i> 10<sup>7</sup></b>	184	177	167				

**Tabulka 10: Výsledky antibakteriální aktivity fotoaktivního povrchu při druhém experimentu**

Průměrný počet živých buněk na neopracovaném vzorku okamžitě po inokulaci	$A =$	2910900
Průměrný počet živých buněk na vzorku bez aktivní vrstvy uložených v temnu po dobu ozařování vzorků	$B_D =$	1355290
Průměrný počet živých buněk na vzorku s aktivní vrstvou uložených v temnu po dobu ozařování vzorků	$C_D =$	1954685
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou $L$ na vzorku bez aktivní vrstvy	$B_L =$	1424150
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou $L$ na vzorku s aktivní vrstvou	$C_L =$	959867
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení s intenzitou $L$	$R_L =$	0,17
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení viditelným zářením stanovená filmovou metodou	$\Delta R_L =$	0,33

V **tab. 11** jsou vyhodnoceny výsledky přítomné bakterie *E. coli* na jednotlivých Petriho miskách u třetího experimentu s fólií č. 14 dle ISO 27447:2019 v závislosti, zda se po dobu 4 hodinové expozice vyskytovaly pod viditelným světlem či ve tmě.

**Tabulka 11: Počet kolonií *E. coli* dle ISO 27447:2019 při třetím experimentu s fólií č. 14**

<b>3. Experiment s <i>E. coli</i> dle ISO normy 27447:2019 na fólii č. 14 obsahující 200 mg PyrZn</b>							
Absorbance nezředěného inokula v 1 cm kyvetě: A = 0,924							
Absorbance zředěného inokula v 1 cm kyvetě: A = 0,397							
Intenzita ozáření:		0,25 mW/cm <sup>2</sup> (400 – 800 nm)					
Intenzita osvětlení:		900 lx					
TMA				OSVĚTLENÍ			
Srovnávací fólie							
Fólie_1, zředěno 10×	181	164	148	Fólie_1, zředěno 10×	208	221	202
Fólie_1, zředěno 100×	14	19	23	Fólie_2, zředěno 10×	145	201	216
Fólie_2, zředěno 10×	146	162	185				
Fólie_2, zředěno 100×	19	24	18				
Fólie č. 14							
Fólie_1, zředěno 10×	247	205	238	Fólie_1, zředěno 10×	132	116	101
Fólie_1, zředěno 100×	24	21	23	Fólie_1, zředěno 100×	14	12	19
Fólie_2, zředěno 10×	264	251	228	Fólie_2, zředěno 10×	124	106	112
Fólie_2, zředěno 100×	30	27	24	Fólie_2, zředěno 100×	21	17	19
Test výtěžnosti							
Srovnávací fólie				Fólie č. 14			
Fólie_1, zředěno 100×	41	43	37	Fólie_1, zředěno 100×	42	44	42
Fólie_2, zředěno 100×	38	40	49	Fólie_2, zředěno 100×	45	46	40
<b>Výtěžnost srovnávací fólie:</b>		51,9 %		<b>Výtěžnost Lotus fólie č. 14:</b>		54,2 %	
<b>Ředění vzorku <i>E. coli</i> 10<sup>7</sup></b>	148	137	164				

**Tabulka 12: Výsledky antibakteriální aktivity fotoaktivního povrchu při třetím experimentu**

Průměrný počet živých buněk na neopracovaném vzorku okamžitě po inokulaci	$A =$	2587467
Průměrný počet živých buněk na vzorku bez aktivní vrstvy uložených v temnu po dobu ozařování vzorků	$B_D =$	1124713
Průměrný počet živých buněk na vzorku s aktivní vrstvou uložených v temnu po dobu ozařování vzorků	$C_D =$	1524832
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou L na vzorku bez aktivní vrstvy	$B_L =$	1244697
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou L na vzorku s aktivní vrstvou	$C_L =$	657822
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení s intenzitou L	$R_L =$	0,28
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení viditelným zářením stanovená filmovou metodou	$\Delta R_L =$	0,41

U všech experimentů s fólií č. 14 dle ISO 27447:2019 byla stanovena znatelná fotoaktivní účinnost. Počet jednotlivých kolonií bakterie *E. coli* byl vyšší než ve srovnání s fólií č 17, která obsahuje méně PyrZn.

#### 4.2.2 Experimenty s fólií č. 13

V **tab. 13** jsou vyhodnoceny výsledky přítomné bakterie *E. coli* na jednotlivých Petriho miskách u prvního experimentu s fólií č. 13 dle ISO 27447:2019 v závislosti, zda se po dobu 4 hodinové expozice vyskytovaly pod viditelným světlem či ve tmě.

**Tabulka 13: Počet kolonií *E. coli* dle ISO 27447:2019 při prvním experimentu s fólií č. 13**

<b>1. Experiment s <i>E. coli</i> dle ISO normy 27447:2019 na fólii č. 13 bez PyrZn</b>							
Absorbance nezředěného inokula v 1 cm kyvetě: A = 0,957							
Absorbance zředěného inokula v 1 cm kyvetě: A = 0,402							
Intenzita ozáření:		0,25 mW/cm <sup>2</sup> (400 – 800 nm)					
Intenzita osvětlení:		900 lx					
<b>TMA</b>				<b>OSVĚTLENÍ</b>			
Srovnávací fólie							
<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	205	176	221	<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	209	229	199
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	24	21	25	<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	190	205	229
<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	226	215	229				
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	28	29	32				
Fólie č. 13							
<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	263	252	269	<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	172	154	161
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	22	25	31	<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	18	12	19
<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	247	261	236	<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	149	163	152
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	19	25	23	<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	9	11	13
Test výtěžnosti							
Srovnávací fólie				Fólie č. 13			
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	41	47	59	<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	38	43	42
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	46	52	48	<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	31	38	33
<b>Výtěžnost srovnávací fólie:</b>	47,8 %			<b>Výtěžnost Lotus fólie č. 13:</b>	36,7 %		
<b>Ředění vzorku <i>E. coli</i> 10<sup>7</sup></b>	191	205	180				

**Tabulka 14: Výsledky antibakteriální aktivity fotoaktivního povrchu při prvním experimentu**

Průměrný počet živých buněk na neopracovaném vzorku okamžitě po inokulaci	$A =$	3056967
Průměrný počet živých buněk na vzorku bez aktivní vrstvy uložených v temnu po dobu ozařování vzorků	$B_D =$	1493010
Průměrný počet živých buněk na vzorku s aktivní vrstvou uložených v temnu po dobu ozařování vzorků	$C_D =$	1594213
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou $L$ na vzorku bez aktivní vrstvy	$B_L =$	1315643
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou $L$ na vzorku s aktivní vrstvou	$C_L =$	971343
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení s intenzitou $L$	$R_L =$	0,13
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení viditelným zářením stanovená filmovou metodou	$\Delta R_L =$	0,16

V **tab. 15** jsou vyhodnoceny výsledky přítomné bakterie *E. coli* na jednotlivých Petriho miskách u druhého experimentu s fólií č. 13 dle ISO 27447:2019 v závislosti, zda se po dobu 4 hodinové expozice vyskytovaly pod viditelným světlem či ve tmě.



**Tabulka 15: Počet kolonií *E. coli* dle ISO 27447:2019 při druhém experimentu s fólií č. 13**

<b>2. Experiment s <i>E. coli</i> dle ISO normy 27447:2019 na fólii č. 13 bez PyrZn</b>							
Absorbance nezředěného inokula v 1 cm kyvetě: A = 0,960							
Absorbance zředěného inokula v 1 cm kyvetě: A = 0,396							
Intenzita ozáření:		0,25 mW/cm <sup>2</sup> (400 – 800 nm)					
Intenzita osvětlení:		900 lx					
<b>TMA</b>				<b>OSVĚTLENÍ</b>			
Srovnávací fólie							
<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	266	243	231	<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	186	206	213
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	17	25	16	<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	222	205	212
<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	229	241	258				
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	31	34	28				
Fólie č. 13							
<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	270	282	258	<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	143	152	136
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	33	26	29	<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	191	153	161
<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	283	272	293				
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	32	22	34				
<b>Test výtěžnosti</b>							
Srovnávací fólie				Fólie č. 13			
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	42	45	38	<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	37	34	29
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	33	42	31	<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	40	34	39
<b>Výtěžnost srovnávací fólie:</b>	39,4 %			<b>Výtěžnost Lotus fólie č. 13:</b>	36,3 %		
<b>Ředění vzorku <i>E. coli</i> 10<sup>7</sup></b>	183	175	193				

**Tabulka 16: Výsledky antibakteriální aktivity fotoaktivního povrchu při druhém experimentu**

Průměrný počet živých buněk na neopracovaném vzorku okamžitě po inokulaci	$A =$	2410100
Průměrný počet živých buněk na vzorku bez aktivní vrstvy uložených v temnu po dobu ozařování vzorků	$B_D =$	1553523
Průměrný počet živých buněk na vzorku s aktivní vrstvou uložených v temnu po dobu ozařování vzorků	$C_D =$	1729847
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou L na vzorku bez aktivní vrstvy	$B_L =$	1297907
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou L na vzorku s aktivní vrstvou	$C_L =$	976560
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení s intenzitou L	$R_L =$	0,12
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení viditelným zářením stanovená filmovou metodou	$\Delta R_L =$	0,17

#### 4.2.3 Experimenty s fólií č. 17

V **tab. 17** jsou vyhodnoceny výsledky přítomné bakterie *E. coli* na jednotlivých Petriho miskách u prvního experimentu s fólií č. 17 dle ISO 27447:2019 v závislosti, zda se po dobu 4 hodinové expozice vyskytovaly pod viditelným světlem či ve tmě.

**Tabulka 17: Počet kolonií *E. coli* dle ISO 27447:2019 při prvním experimentu s fólií č. 17**

<b>1. Experiment s <i>E. coli</i> dle ISO normy 27447:2019 na fólii č. 17 obsahující 50 mg PyrZn</b>							
Absorbance nezředěného inokula v 1 cm kyvetě: $A = 1,063$							
Absorbance zředěného inokula v 1 cm kyvetě: $A = 0,470$							
Intenzita ozáření:		0,25 mW/cm <sup>2</sup> (400 – 800 nm)					
Intenzita osvětlení:		900 lx					
TMA				OSVĚTLENÍ			
Srovnávací fólie							
Fólie_1, zředěno 10×	252	272	266	Fólie_1, zředěno 10×	266	275	244
Fólie_1, zředěno 100×	29	38	37	Fólie_2, zředěno 10×	252	240	263
Fólie_2, zředěno 10×	274	281	275				
Fólie_2, zředěno 100×	34	37	32				
Fólie č. 17							
Fólie_1, zředěno 10×	230	239	246	Fólie_1, zředěno 10×	106	118	116
Fólie_2, zředěno 10×	238	246	256	Fólie_2, zředěno 10×	126	138	129
Test výtěžnosti							
Srovnávací fólie				Fólie č. 17			
Fólie_1, zředěno 100×	79	87	71	Fólie_1, zředěno 100×	41	50	37
Fólie_2, zředěno 100×	62	69	56	Fólie_2, zředěno 100×	31	43	44
<b>Výtěžnost srovnávací fólie:</b>		67,0 %		<b>Výtěžnost Lotus fólie č. 17:</b>		38,9 %	
<b>Ředění vzorku <i>E. coli</i> 10<sup>7</sup></b>	217	192	185				

**Tabulka 18: Výsledky antibakteriální aktivity fotoaktivního povrchu při prvním experimentu**

Průměrný počet živých buněk na neopracovaném vzorku okamžitě po inokulaci	$A =$	4423733
Průměrný počet živých buněk na vzorku bez aktivní vrstvy uložených v temnu po dobu ozařování vzorků	$B_D =$	1924950
Průměrný počet živých buněk na vzorku s aktivní vrstvou uložených v temnu po dobu ozařování vzorků	$C_D =$	1518050
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou $L$ na vzorku bez aktivní vrstvy	$B_L =$	1606733
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou $L$ na vzorku s aktivní vrstvou	$C_L =$	764763
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení s intenzitou $L$	$R_L =$	0,32
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení viditelným zářením stanovená filmovou metodou	$\Delta R_L =$	0,22

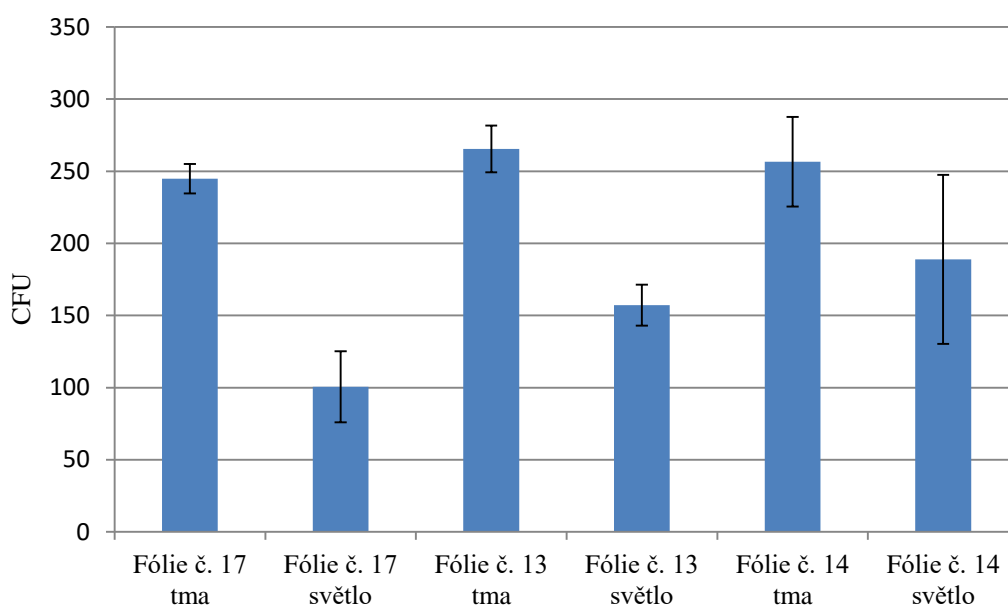
V **tab. 19** jsou vyhodnoceny výsledky přítomné bakterie *E. coli* na jednotlivých Petriho miskách u druhého experimentu s fólií č. 17 dle ISO 27447:2019 v závislosti, zda se po dobu 4 hodinové expozice vyskytovaly pod viditelným světlem či ve tmě.

**Tabulka 19: Počet kolonií *E. coli* dle ISO 27447:2019 při druhém experimentu s fólií č. 17**

<b>2. Experiment s <i>E. coli</i> dle ISO normy 27447:2019 na fólii č. 17 obsahující 50 mg PyrZn</b>							
Absorbance nezředěného inokula v 1 cm kyvetě: A = 1,019							
Absorbance zředěného inokula v 1 cm kyvetě: A = 0,442							
Intenzita ozáření:		0,25 mW/cm <sup>2</sup> (400 – 800 nm)					
Intenzita osvětlení:		900 lx					
<b>TMA</b>				<b>OSVĚTLENÍ</b>			
Srovnávací fólie							
<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	214	223	231	<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	162	208	213
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	23	26	24	<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	178	149	154
<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	209	215	232				
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	17	14	24				
Fólie č. 17							
<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	237	251	229	<b>Fólie_1, zředěno 10×</b>	73	92	83
<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	255	260	251	<b>Fólie_2, zředěno 10×</b>	68	73	85
<b>Test výtěžnosti</b>							
Srovnávací fólie				Fólie č. 17			
<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	64	55	67	<b>Fólie_1, zředěno 100×</b>	57	43	59
<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	61	56	59	<b>Fólie_2, zředěno 100×</b>	41	42	39
<b>Výtěžnost srovnávací fólie:</b>		57,2 %		<b>Výtěžnost Lotus fólie č. 17:</b>		44,4 %	
<b>Ředění vzorku <i>E. coli</i> 10<sup>7</sup></b>	217	192	185				

**Tabulka 20: Výsledky antibakteriální aktivity fotoaktivního povrchu při druhém experimentu**

Průměrný počet živých buněk na neopracovaném vzorku okamžitě po inokulaci	$A =$	3776867
Průměrný počet živých buněk na vzorku bez aktivní vrstvy uložených v temnu po dobu ozářování vzorků	$B_D =$	1381373
Průměrný počet živých buněk na vzorku s aktivní vrstvou uložených v temnu po dobu ozářování vzorků	$C_D =$	1547263
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou L na vzorku bez aktivní vrstvy	$B_L =$	1110107
Průměrný počet živých buněk po osvětlení viditelným zářením s intenzitou L na vzorku s aktivní vrstvou	$C_L =$	494540
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení s intenzitou L	$R_L =$	0,35
Antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení viditelným zářením stanovená filmovou metodou	$\Delta R_L =$	0,40



**Obrázek 17: Celkové grafické znázornění počtu kolonií na všech testovaných fóliích dle ISO 27447:2019**

## 5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vhodnou metodou stanovit antibakteriální aktivitu/účinnost na fotoaktivním povrchu testovaných fólií Lotus č. 13, 14 a 17 obsahujících odlišné množství pyrithionu zinečnatého v kombinaci s fotoaktivní vrstvou a otestovat opakovatelnost této metody pro ozářený i neozářený povrch. Jako první testovaná metoda byla použita metoda otisku Petriho misek na jednotlivé fólie. Při této testované metodě, se výsledky nárůstu jednotlivých bakterií mezi jednotlivými fóliemi výrazně nelišily. Antibakteriální účinek testovaných fólií lze vyhodnotit jako pozitivní v porovnání s nárůstem bakteriálních kolonií na srovnávací fólii. Lze pozorovat menší nárůst bakterií (snížení CFU) ve tmě, v důsledku přítomnosti antibakteriální látky PyrZn. Metoda otisku je v porovnání s metodou dle ISO normy 27447:2019 značně jednodušší na přípravu a není tak časově náročná. Nevýhoda této metody spočívá v omezení na maximálně dva řády CFU.

Dále byla použita již zmíněna metoda adheze filmu vycházející z ISO normy 27447:2019, při které byla použita bakterie *E. coli*. U fólie č. 13 byl za tmy pozorován větší nebo srovnatelný počet CFU jako u srovnávací fólie z důvodu nepřítomnosti antibakteriální látky PyrZn, po osvětlení byl počet CFU značně menší, proto lze fotoaktivní účinek této fólie považovat za pozitivní. Jako fólie s největším fotoaktivním účinkem se ukázala fólie č. 17 obsahující 50 mg PyrZn + fotoaktivní vrstvu a fólie č. 14, která obsahuje 200 mg PyrZn + fotoaktivní vrstvu, viz **tab. 21**. Nejmenší nárůst bakteriálních kolonií po osvětlení byl při prováděných experimentech pozorován u fólie č. 17. Dále byl v jednotlivých experimentech u všech fólií prokázán větší antibakteriální účinek po osvětlení než za tmy, kde při ozáření vzniká prostřednictvím fotosenzitizátoru zmíněný singletový kyslík, který hubí přítomné bakterie. Při použití této metody, nebyl v porovnání s metodou otisku pozorován menší nárůst CFU u testovaných fólií Lotus za tmy. Tato metoda používaná při experimentech pro stanovení antibakteriální aktivity fotoaktivních povrchů je značně časově náročnější a pracnější, z tohoto důvodu se autoři různých studií ve své praxi této metodě vyhýbají a využívají spíše alternativní metody. Metoda vycházející z ISO normy 27447:2019 vyžaduje laboratorní zručnost a praxi. Je používána profesionály, a proto je využívána zejména v akreditovaných laboratořích. Z **tab. 21** lze pozorovat větší hodnotu  $\Delta R_L$  než  $R_L$  u fólie č. 13 a fólie č. 14, to znamená, že průměrný počet živých buněk na vzorku s aktivní vrstvou uložených v temnu po dobu osvětlování vzorků  $C_D$  je menší než průměrný počet živých buněk na vzorku bez aktivní vrstvy uložených v temnu po dobu osvětlování vzorků  $B_D$ , tedy že zabíjení buněk je větší na čisté srovnávací fólii než na fólii s aktivním povrchem, což poukazuje na možnou chybu při prováděném experimentu a potvrzuje tak samotnou náročnost metody.

**Tabulka 21: Celkové vyhodnocení fotoaktivní účinnosti jednotlivých fólií**

Celkové vyhodnocení fotoaktivního účinku			
	Fólie č. 13 bez přítomnosti PyrZn	Fólie č. 17 obsahující 50 mg PyrZn	Fólie č. 14 obsahující 200 mg PyrZn
Průměrná antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po ozáření s intenzitou $L$ ( $R_L$ )	0,13	0,34	0,21
Průměrná antibakteriální aktivita fotoaktivního povrchu po osvětlení stanovená filmovou metodou $\Delta R_L$	0,17	0,31	0,34

## 6 Seznam literatury

- [1] RAKSHIT Ameta, MEENAKSHI S. Solanki, SURBHI Benjamin, SURESH C. Ameta. *Advanced oxidation processes for waste water treatment*, chapter 6 – photocatalysis, 2018. 135–175. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810499-6.00006-1>.
- [2] MARCI, G., PALMISANO, L. *Heterogeneous Photocatalysis: Relationships with Heterogeneous Catalysis and Perspectives*. 1. Elsevier, 2019, s. 2–6. ISBN 978-0-444- 64015-4.
- [3] MARIN, L. M., SANTOS-JUANES, L., ARQUES, A., AMAT, A. M., a MIRANDA, M. A. *Organic Photocatalysts for the Oxidation of Pollutants and Model Compounds. Chemical reviews*. 2012, 112(3), 1710–1750. DOI: [dx.doi.org/10.1021/cr2000543](https://doi.org/10.1021/cr2000543).
- [4] ANDREW, W. *Heterogeneous Nanocomposite-Photocatalysis for Water Purification*. Oxford: Elsevier, 2015, s. 4–21. ISBN 978-0-323-39310-2.
- [5] AMETA, R. a AMETA, S. C. *Photocatalysis: Principles and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2016, 1–30, 201–216. ISBN 978-1-4822-5493-8
- [6] PILLAI, S. C., ETACHERI, V., DI VALENTIN, C., SCHNEIDER, J. a BAHNEMANN, D. *Visible-light activation of TiO<sub>2</sub> photocatalysts: Advances in theory and experiments. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2015, 25, 1– 29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2015.08.003>.
- [7] GHOSH, S. *Visible-Light-Active Photocatalysis: Nanostructured Catalyst Design, Mechanisms, and Applications*. 1. John Wiley, 2018, 486–495; 505–507. ISBN 978-3- 527-80814-4.
- [8] JANOTA, Pavel, Marie DVOŘÁČKOVÁ a Ivo KUŘITKA. *Metoda pro testování fotokatalytické aktivity materiálů*. [Http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014\\_s1\\_s10-s15.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_s1_s10-s15.pdf) [online]. **2014**(108), 10-15 [cit. 2023-02-14].
- [9] LANG, K.; MOSINGER, J.; WAGNEROVÁ, D. *Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku*. Chemické listy. 2005, 99, s. 211-221.
- [10] RYCHTÁRIKOVÁ, R.; KUNCOVÁ, G. *Imobilizované fotosenzitizátory singletového kyslíku a jejich účinek na mikroorganismy*. Chemické listy. 2019, 103, s. 800-813.
- [11] KIM, H.; CHA, E.; KANG, H.; PARK, J.; PARK, H.; LEE, J. *Antibacterial application of covalently immobilized photosensitizers on a surface*. Environmental Research. 2019, 172, s. 34-42.
- [12] BAUMLER, W.; REGENSBURGER, J.; KNAK, A.; FELGENTRAGER, A.; MAISCH, T. *UVA and endogenous photosensitizers – the detection of singlet oxygen by its luminiscence*. Photochemical and Photobiological Science. 2012, 11, s. 107-117.
- [13] PIBIRI, I.; BUSCEMI, S.; PICCIONELLO, A.; PACE, A. *Photochemically produced singlet oxygen: Applications and perspectives*. CHEMPHOTOCHEM Reviews. 2018, 2, s. 535-547.
- [14] FELGENTRAGER, A.; MAISCH, T.; SPATH, A.; SCHRODER, J.; BAUMLER, W. *Singlet oxygen generation in porphyrin-doped polymeric surface rating enables antimicrobial effects on Staphylococcus aureus*. Royal society of chemistry. 2014, 16, s. 20598-20607.

- [15] ISHII, K. *Functional singlet oxygen generators based on phthalocyanines*. Coordination Chemistry Reviews [online]. 2012, roč. 256, č. 15-16, s. 1556–1568. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2012.03.022.
- [16] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J., BEZDĚKOVÁ, E., LOUČKOVÁ, P., NEKOVÁŘOVÁ, J., KARÁSKOVÁ, M., RAKUŠAN, J., ČERNÝ, J., KOŘÍNKOVÁ, R. *Využití ftalocyaninových preparátů šetrných k prostředí k ochraně okruhů chladicích vod před růstem řas a sinic*. Chemické listy. 2007, roč. 101, s. 315–322. ISSN 1213-7103.
- [17] WRIGHT J. D., *Encyclopedia of materials: Science and technology (second edition)*. 2001. s. 6987–6991. DOI: <https://doi.org/10.1016/B0-08-043152-6/01238-9>.
- [18] PALEWSKA, K., SUJKA, M., URASIŃSKA-WÓJCIK, B., SWORAKOWSKI, J., LIPÍŃSKI, J., NEŠPŮREK, S., RAKUŠAN, J., KARÁSKOVÁ, M. *Light-induced effects in sulfonated aluminum phthalocyanines — potential photosensitizers in the photodynamic therapy: Spectroscopic and kinetic study*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry [online]. 2008, roč. 197, č. 1, s. 1–12. ISSN 1010-6030. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochem.2007.11.025
- [19] ŠTÍPEK, Stanislav et al. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha: Grada Publishing, Avicenum, 2000. 314 s. ISBN: 08-7169-704-4.
- [20] STRATIL, Pavel a Vlastimil KUBÁŇ. *Reaktivní kyslíkové radikály, přírodní antioxidanty a jejich zdravotní účinky*. Český Těšín: 2 THETA, 2018. ISBN 978-80-86380-91-9.
- [21] PITERKOVÁ, J., TOMÁNKOVÁ, K., LUHOVÁ, L., PETRIVALSKÝ, M., PEC, P.: *Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu*. Chem. Listy, 2005, roč. 99, č. 7 [cit. 2012-11-11]. ISSN 0009-2770. Dostupné také z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_07\\_455-466.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_07_455-466.pdf).
- [22] RYCHTÁRIKOVÁ, R., KUNCOVÁ, G. *Imobilizované fotosensitizátory singletového kyslíku a jejich účinek na mikroorganismy*. Chemické listy. 2019, roč. 103, s. 800–813. ISSN 1213-7103.
- [23] ZHEN Z., JIANGLI F., JIANJUN D., XIAOJUN P., *Two-channel responsive luminescent chemosensors for dioxygen species: Moleculár oxygen, singlet oxygen and superoxide anion*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213575>.
- [24] KODÍČEK, M. Radikál superoxidový. *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2023-02-15]. Available from [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=radikal\\_superoxidovy>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=radikal_superoxidovy).
- [25] DeRosa, M.C. and R.J. Crutchley, *Photosensitized singlet oxygen and its applications*. Coordination Chemistry Reviews, 2002. 233-234: p. 351-371.
- [26] Packer, L. and H. Sies, *Singlet Oxygen, UV-A, and Ozone. Methods in Enzymology*, 2000. p. 3–682. Available from [www: < Methods in Enzymology | Singlet Oxygen, UV-A, and Ozone | ScienceDirect.com by Elsevier>](http://www.sciencedirect.com).
- [27] LANG, K., MOSINGER, J., WAGNEROVÁ, D. M. *Singletový kyslík v praxi - současnost a perspektiva*. Chemické listy. 2006, roč. 100, s. 196–177. ISSN 1213-710.



- [28] WU, H., SONG, Q., RAN, G., LU, X., XU, B. *Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2011, roč. 30, č. 1, Characterization, Analysis and Risks of Nanomaterials in Environmental and Food Samples, s. 133–141. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2010.08.009.
- [29] HOCHMANNOVÁ, L.; VYTRÁSOVÁ, J. *Vliv nanočástic TiO a ZnO na fotokatalitické a antimikrobiální účinky silikátových nátěrů*. *Chemické listy*. 2010, 104, s. 940-944.
- [30] G.MCEVOY, J. a Z. ZHANG. *Antimicrobial and photocatalytic disinfection mechanisms in silver-modified photocatalysts under dark and light conditions*. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* [online].
- [31] CAMPBELL, Neil A. a Jane B. REECE. *Biologie*. Brno: Computer Press, c2006. ISBN 80-251-1178-4.
- [32] SIRELKHATIM, A., S. MAHMUD, A. SEENI a kolektiv. *Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism*. *Nano-Micro Letters* [online].
- [33] MUTHUVEL, A., M. JOTHIBAS a C. MANOHARAN. *Effect of chemically synthesis compared to biosynthesized ZnO-NPs using Solanum nigrum leaf extract and 100 their photocatalytic, antibacterial and in-vitro antioxidant activity*. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2020.
- [34] Klouda P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vydání ed. Ostrava: Pavel Klouda; 2003.
- [35] ISO 27447:2019 Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials [online]. Červen 2019 [vid. 2020-05-16].
- [36] ISO 17094:2014 Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials under indoor lighting environment [online]. [vid. 2020-05-19].
- [37] ISO 14605:2013 Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Light source for testing semiconducting photocatalytic materials used under indoor lighting environment [online]. [vid. 2020-05-19].
- [38] ISO 22196:2011 Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces [online]. [vid. 2011-08-01].
- [39] SYNNOTT, D. W., M K. SEERY, S. J. HINDER a kolektiv. *Anti-bacterial activity of indoor-light activated photocatalysts*. *Applied Catalysis B-Environmental* [online]. 2013.
- [40] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [41] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.

[42] JAFARI, A., M. M. ASLANI a S. BOUZARI. Escherichia coli: A Brief Review of Diarrheogenic Pathotypes and Their Role in Diarrheal Diseases in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 2012, 4(3), 102 – 117.

[43] DRNKOVÁ, Barbora. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory*. Praha: Grada Publishing, 2019. Sestra (Grada). ISBN 978-80-271-0693-6.

[44] MIZUSEKI, Hiroshi, Rodion BELOSLUDOV, Amir FARAJIAN, et al. Molecular orbital analysis of frontier orbitals for molecular electronics: a case study of unimolecular rectifier and photovoltaic cell. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2016, 4(4), 377-382 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1468-6996. Dostupné z: doi:10.1016/S1468-6996(03)00061-5.

[45] PANKO, Ben. Scientists want to replace lab workhorse *E. coli* with the world's fastest-growing bacterium. *Science* [online]. 2016 [cit. 2023-04-03]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aag0626.

[46] Mícenková, Lenka: Bakterie Escherichia coli - od nezbytného komenzála po nebezpečného patogena. In: *Universitas : revue Masarykovy univerzity*. Roč. 49, 2016, č. 4, s. 14-22.

## 7 Seznam zkratk

<b>CFU</b>	Jednotky tvořící kolonie (CFU = Colony Forming Units)
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>EPR</b>	Elektronová paramagnetická rezonance (electron paramagnetic resonance)
<b>FAD</b>	Flavinadenindinukleotid
<b>FMN</b>	Flavinmononukleotid
<b>IR</b>	Infračervené záření (infrared)
<b>ISO</b>	Mezinárodní organizace pro normalizaci (International Organization for Standardization)
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry (mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii, organizace zabývající se chemickou nomenklaturou)
<b>LIOAS</b>	Laser-induced optoacoustic spectroscopy
<b>NAD<sup>•</sup></b>	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
<b>NADH</b>	Nikotinamidadenindinukleotid (redukováná forma)
<b>ns</b>	Nanosekunda (nanoseconds)
<b>pH</b>	Záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů (potential of hydrogen)
<b>pKa</b>	Disociační konstanta kyseliny
<b>PyrZn</b>	Pyrrithion zinku (pyrrithion zinečnatý)
<b>ROS</b>	Reaktivní sloučeniny kyslíku (reactive oxygen species)
<b>TK</b>	Testovací komora
<b>TRTL</b>	Thermal lensing
<b>UV</b>	Ultrafialové záření (ultra violet)
<b>VIS</b>	Viditelné záření (visible)