

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra fyzikální chemie**



**Studium antibakteriální a antivirotické aktivity  
nanočástic stříbra**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Autor: Bc. Kateřina Dědková**

Studijní program: N1407

Studijní obor: Učitelství chemie pro SŠ – Učitelství biologie pro SŠ

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.**

Termín odevzdání: duben 2011

**Olomouc 2011**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a s použitím uvedené literatury.

Souhlasím, aby moje diplomová práce byla volně přístupná v knihovně Univerzity Palackého.

V Olomouci dne 22.4.2011

Bc. Kateřina Dědková

### *Poděkování*

*Děkuji svému školiteli RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky při sepisování práce. Děkuji také doc. RNDr. Liboru Kvítkovi, CSc. za zprostředkování výzkumné stáže ve Španělsku a RNDr. Robertu Pruckovi, Ph.D. za přípravu koloidního stříbra.*

*I would like to thank to my Spanish supervisors Virginia Aragón Fernández and Xavier Abad Morejón de Girón for their leadership, advices and very nice friendly working atmosphere in their research groups.*

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Bc. Kateřina Dědková  
Název práce: Studium antibakteriální a antivirotické aktivity nanočástic stříbra  
Typ práce: Diplomová  
Pracoviště: Katedra fyzikální chemie  
Vedoucí práce: RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.  
Rok obhajoby práce: 2011

**Abstrakt:** Cílem diplomové práce bylo studium antibakteriální a antivirotické aktivity nanočástic stříbra. K testování antibakteriální aktivity bylo zvoleno 10 kmenů bakterií, z toho 2 kmeny ze sbírkové kultury a 8 kmenů izolovaných z nemocných zvířat. K testování antivirotické aktivity byl zvolen virus prasečí chřipky H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>.

Byly připraveny dvě disperze nanočástice stříbra. Jedna disperze s částicemi o velikosti 30 nm byla připravena metodou redukce diammin stříbrného komplexu D-maltosou v přítomnosti roztoku hydroxidu sodného. Druhá disperze s částicemi o velikosti 20 nm byla připravena redukcí dusičnanu stříbrného tetrahydroboritanem sodným v přítomnosti sodné soli kyseliny polyakrylové. První koloid interagoval s růstovým médiem, proto bylo třeba jej stabilizovat proti agregaci. Jako nejvhodnější stabilizátor byla zvolena želatina.

Antibakteriální aktivita disperzí koloidního stříbra byla testována standardní mikrodiluční metodou v BHI médiu a Müller-Hinton médiu vedoucí k určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) látky. Antivirotická aktivita byla testována na buněčné linii MDCK. Kvantitativním vyhodnocením antivirotické aktivity bylo stanovení titru viru.

Výsledky testování MIC ukázaly vyšší antibakteriální aktivitu částic o velikosti 20 nm. Zároveň byla pozorována vyšší antibakteriální aktivita vůči respirační bakterii oproti intestinálním bakteriím. Antivirotická aktivita nebyla za daných podmínek pozorována.

**Klíčová slova:** nanočástice stříbra, bakterie, viry, antibakteriální aktivita, antivirotická aktivita

**Počet stran:** 62

**Jazyk:** Český

## **Bibliographical information:**

Autor's first name and surname: Bc. Kateřina Dědková

Title: Study of Antibacterial and Antiviral Activity of Silver Nanoparticles

Type of thesis: Master

Department: Department of Physical Chemistry

Supervisor: RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

The year of presentation: 2011

Abstract: The aim of this master thesis is the study of antibacterial and antiviral activity of silver nanoparticles. For testing of the antibacterial activity, there were chosen 10 bacterial strains. 2 strains were from the culture collection and 8 strains were isolated from diseased animals. For testing of the antiviral activity, swine influenza H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> virus was chosen.

Two dispersions of silver nanoparticles were prepared. First dispersion with 30nm sized particles was prepared via reduction of the complex cation [Ag(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> with D-maltose in the presence of sodium hydroxide solution. Second dispersion with 20nm sized particles was prepared via reduction of AgNO<sub>3</sub> by NaBH<sub>4</sub> in the presence of sodium salt of polyacrylic acid. First colloid interacted with growth medium, therefore it was necessary to stabilize it against the aggregation. Gelatine was chosen as the most useful stabilizer.

The antibacterial activity of dispersions of colloid silver was tested by a standard microdilution method in BHI growth medium and Müller-Hinton growth medium to determinate the minimum inhibitory concentration (MIC). The antiviral activity was tested on MDCK cell line. The determination of virus titre was the quantitative evaluation of antiviral activity.

The results of testing MIC showed higher antibacterial activity of nanoparticles with average size of 20nm. Higher antibacterial activity was also observed against respiratory bacteria in comparison to intestinal bacteria. Antiviral activity wasn't observed under these conditions.

Keywords: silver nanoparticles, bacteria, virus, antibacterial activity, antiviral activity

Number of pages: 62

Language: Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>DISPERZNÍ SOUSTAVY</b> .....	<b>2</b>
2.1	KOLOIDNĚ DISPERZNÍ SOUSTAVY .....	2
2.1.1	<i>Klasifikace koloidních soustav</i> .....	2
2.2	VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV .....	4
2.2.1	<i>Optické vlastnosti</i> .....	4
2.2.2	<i>Elektrické vlastnosti</i> .....	5
2.2.3	<i>Kinetické vlastnosti</i> .....	6
<b>3</b>	<b>VIRY</b> .....	<b>8</b>
3.1	STRUKTURA VIRŮ .....	8
3.2	GENOVÁ DIVERZITA VIRŮ .....	11
3.3	PRŮBĚH VIROVÉ INFEKCE .....	12
3.4	VIROVÁ ONEMOCNĚNÍ .....	14
3.5	LÉČBA VIROVÉ INFEKCE .....	15
<b>4</b>	<b>BAKTERIE</b> .....	<b>18</b>
4.1	MORFOLOGIE BAKTERÍ .....	19
4.2	BUNĚČNÉ STRUKTURY .....	20
4.3	METABOLISMUS .....	22
4.3.1	<i>Růst bakterií</i> .....	23
4.4	INTERAKCE S JINÝMI ORGANISMY .....	24
4.4.1	<i>Predátoři</i> .....	24
4.4.2	<i>Mutualisté</i> .....	24
4.4.3	<i>Parazitě</i> .....	25
4.5	LÉČBA BAKTERIÁLNÍCH ONEMOCNĚNÍ .....	26
4.6	PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ BAKTERÍ .....	30
<b>5</b>	<b>KOLOIDNÍ STŘÍBRO</b> .....	<b>31</b>
5.1	METODY PŘÍPRAVY KOLOIDNÍHO STŘÍBRA .....	31
5.1.1	<i>Příprava koloidního stříbra redukcí anorganickými látkami</i> .....	32
5.1.2	<i>Příprava koloidního stříbra redukcí organickými látkami</i> .....	32
5.2	APLIKACE NANOČÁSTIC STŘÍBRA .....	33
5.2.1	<i>Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)</i> .....	33
5.2.2	<i>Katalyzátory</i> .....	33
5.2.3	<i>Antibakteriální, fungicidní a antivirotická aktivita</i> .....	33
<b>6</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>37</b>
6.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	37
6.2	POUŽITÉ MIKROORGANISMY .....	37
6.3	PŘÍPRAVA KOLOIDNÍHO STŘÍBRA .....	38
6.4	LABORATORNÍ VYBAVENÍ .....	38
6.5	METODY A ZPRACOVÁNÍ .....	39
6.5.1	<i>Studium antibakteriální aktivity nanočástic stříbra</i> .....	39
6.5.2	<i>Studium antivirotické aktivity nanočástic stříbra</i> .....	40

<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>42</b>
7.1	ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITA .....	42
7.2	ANTIVIROTICKÁ AKTIVITA .....	54
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>60</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>62</b>

# 1 ÚVOD

---

Nanochemie je podoblast chemie studující vlastnosti, přípravu a použití nanostruktur. Díky svým unikátním optickým, elektrickým, katalytickým i biologickým vlastnostem nacházejí nanostruktury široké spektrum použití v mnoha oblastech. Hovoříme-li o nanočásticích, pohybujeme se v oblasti 1 – 100nm[1].

V posledních několika letech vystupuje do popředí výzkum související s přípravou nanočástic stříbra a s jejich aplikací. Příprava nanočástic stříbra je relativně jednoduchý a levný proces. Našly uplatnění jako katalyzátory, senzory, užívají se v Ramanově spektroskopii či v medicíně a farmacii[2].

Antibakteriální vlastnosti nanočástic stříbra jsou známy již dlouho. V současné době je trendem kontrolovaná příprava nanočástic stříbra, protože velikost, tvar a stabilita částic hrají důležitou roli v jejich antibakteriálním účinku[2].

Díky zbytečnému nadužívání antibiotik ve druhé polovině 20. století nyní lidstvo čelí narůstajícímu počtu rezistentních a multirezistentních kmenů bakterií, se kterými neumí účinně bojovat. Proto se výzkumné skupiny po celém světě snaží objevit nové antibakteriální látky. Mezi potenciální adepty na nová léčiva mohou patřit i nanočástice stříbra, proti nimž zatím nebyla zjištěna jakákoliv získaná rezistence [3].

V souvislosti s antibakteriální aktivitou vyvstane na mysli otázka, zda nemohou nanočástice stříbra působit i na viry. Studií popisujících antivirotickou aktivitu není mnoho, toto odvětví zdaleka ještě není úplně probádané a nabízí výzvu se tomuto tématu věnovat.

Proto se ve své diplomové práci věnuji studiu antibakteriální a potenciální antivirotické aktivity nanočástic stříbra. Značná část experimentální práce byla realizovaná ve výzkumném institutu Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA) při Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona (Španělsko).



## 2 DISPERZNÍ SOUSTAVY

---

Disperzní systém je soustava složená ze dvou či více částí. Jedna tvoří disperzní prostředí (dispergens), druhá disperzní fázi (disperzní podíl, dispersum). Disperzní prostředí tvoří spojitou část disperzní soustavy, v níž je rovnoměrně rozptýlena disperzní fáze. Jednou z důležitých charakteristik disperzních soustav je velikost a tvar dispergovaných částic. Soustavy obsahující částice o stejné velikosti nazýváme monodisperzní. Pokud se však v soustavě vyskytují částice odlišné velikosti, hovoříme o soustavách polydisperzních. Heterodisperzní soustavy obsahují částice různého tvaru, v homodisperzních soustavách se nacházejí pouze částice stejného tvaru[1].

Disperzní soustavy lze dělit dle různých kritérií např. dle velikosti či tvaru částic, dle skupenství disperzního prostředí atd. Velikost částic vyjadřujeme pomocí stupně disperzity, což je převrácená hodnota lineárního rozměru částice. Dle stupně disperzity dělíme disperzní soustavy na hrubé disperze (velikost částic  $>10^{-6}\text{m}$ ), koloidní disperze (velikost částic  $10^{-6} - 10^{-9}\text{m}$ ) a analyticky disperzní (velikost částic  $<10^{-9}\text{m}$ ). Dle tvaru dispergovaných částic dělíme disperzní soustavy na korpuskulárně disperzní, laminárně disperzní a fibrilárně disperzní[4].

Korpuskulární částice jsou ve všech směrech mikrodisperzní. Laminární částice mají tvar destiček či lamel, dva směry jsou mikrodisperzní. Fibrilární částice mají tvar vláken nebo tyčinek, mají pouze jeden směr mikrodisperzní. Tvar dispergovaných částic má zásadní vliv na mechanické a optické vlastnosti disperzních soustav[1,5].

### 2.1 Koloidně disperzní soustavy

Koloidně disperzní soustavy obsahují částice o velikosti  $10^{-6} - 10^{-9}\text{m}$ . Vykazují unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti díky velké ploše fázového rozhraní. S klesající velikostí částic dochází ke zvětšování plochy mezi disperzní fází a disperzním prostředím.

#### 2.1.1 Klasifikace koloidních soustav

Podle skupenského stavu disperzní fáze a disperzního prostředí můžeme koloidní soustavy rozdělit do 8 skupin viz tabulka 1.

**Tabulka 1** Klasifikace koloidních soustav dle skupenského složení

<b>označení koloidu</b>	<b>disperzní prostředí</b>	<b>disperzní fáze</b>
netvoří koloid	plynné	plynný
aerosoly		kapalný
aerosoly		pevný
pěny	kapalné	plynný
emulze		kapalný
lyosoly		pevný
tuhé pěny	pevné	plynný
tuhé emulze		kapalný
tuhé soly		pevný

Lyosoly lze dále klasifikovat podle fázového rozhraní na lyofobní, lyofilní a asociativní. Lyofobní soustavy mají ostře vymezené fázové rozhraní a rozpustnost disperzní fáze v disperzním prostředí je nízká. Tvoří heterogenní, termodynamicky nestabilní disperze, které nevznikají samovolně. Je nutné je stabilizovat proti koagulaci. Po koagulaci se nevracejí do původní formy, označují se proto jako ireverzibilní. Vytvářejí je především anorganické látky např. Au, Ag apod.

Lyofilní koloidní soustavy jsou většinou tvořeny makromolekulárními látkami a vznikají samovolným rozpuštěním. Jsou termodynamicky stabilní. Změnou termodynamických podmínek (teplota, tlak) dochází ke koagulaci, která je po obnovení původních podmínek až na výjimky vždy vratná. Lyofilní koloidy tedy označujeme jako reverzibilní a zahrnují především pravé roztoky makromolekulárních látek např. bílkovin.

Asociativní koloidní soustavy vznikají spojováním molekul povrchově aktivních látek v útvary koloidní velikosti. Nemají pevně definované fázové rozhraní, protože dochází k neustálé výměně molekul povrchově aktivní látky mezi disperzním prostředím a koloidní částí.

Zvláštním případem koloidních soustav jsou tzv. gely. Mají schopnost přecházet z kapalné formy do pevného stavu. Vytvářet gely mohou některé lyofobní a řada lyofilních koloidů, jejichž částice mají za určitých podmínek schopnost spojovat se a vytvářet pevné trojrozměrné sítě[1,6].

## 2.2 Vlastnosti koloidních soustav

### 2.2.1 Optické vlastnosti

Při dopadu elektromagnetického záření na koloidní soustavu dochází současně k absorpci a rozptylu dopadajícího záření. V závislosti na velikosti částic a chemickém složení koloidní disperze jeden z těchto jevů převládá[5].

Při absorpci záření dochází ke změně energetických stavů vazebných i valenčních elektronů následkem pohlcení kvanta energie. Absorpcí tedy dochází ke zvýšení vnitřní energie molekul systému, která se přemění v energii tepelnou. Lambert-Beerův zákon popisuje množství absorbovaného světla látkou[1].

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon cd$$

kde  $I$  je intenzita prošlého záření látkou,  $I_0$  je intenzita dopadajícího světla na látku,  $\varepsilon$  je absorpční koeficient,  $c$  je koncentrace látky a  $d$  je tloušťka vrstvy, kterou prochází paprsek.

Rozptyl záření lze pozorovat pouze v případě, že se jedná o systém s různými indexy lomu dispergovaných částic a disperzního prostředí. U rozptylu záření dochází k vyzáření pohlceného kvanta energie všemi směry beze změny vlnové délky. Jedná se vlastně o elastický odraz fotonu od částice. Intenzita rozptýleného záření je měřitelná fotometricky. Ví se, že u pravých roztoků je menší než v případě koloidních disperzí[4].

První teorie rozptylu světelného záření na koloidních částicích byla publikována roku 1871 a jejím autorem je Rayleigh. Podle této teorie je intenzita rozptýleného záření úměrná polarizabilitě částice  $\alpha$  a nepřímo úměrná čtvrté mocnině vlnové délky dopadajícího záření. Tato teorie se však vztahuje pouze na malé kulové částice ( $d \leq \lambda / 20$ ), které jsou od sebe dostatečně vzdáleny a neabsorbují světlo.

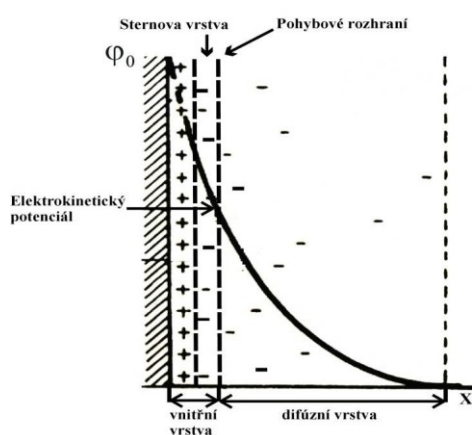
Množství světelné energie, které se rozptýlí při průchodu disperzním prostředím nazýváme turbidita. Turbidita je značně závislá na stupni disperzity, na vlnové délce dopadajícího záření a na optických vlastnostech koloidní soustavy. Měřením intenzity rozptýleného záření dostáváme informace o velikosti disperzních částic a jejich koncentraci.

Je-li běžný zdroj záření nahrazen laserem, dochází k interferenčnímu zesílení intenzity rozptýleného záření, které je ovlivněno difúzním pohybem částic, který způsobuje kolísání intenzity rozptýleného záření v čase okolo průměrné hodnoty. Jedná se o tzv. dynamický rozptyl světla (DLS – Dynamic Light Scattering), na jehož principu pracuje řada přístrojů. Lze takto například určit velikost distribuce koloidních částic. Rozměr částice, která rozptyluje záření lze určit z rychlosti pohybu částice. Tuto rychlost můžeme změřit z časového průběhu kolísání intenzity rozptýleného záření. Nefelometrie využívá přímého měření intenzity rozptýleného světla. U turbidimetrie se sleduje nerozptýlené světlo a platí, že čím je koncentrace disperze menší, tím více světla projde. [1].

### 2.2.2 Elektrické vlastnosti

Elektrický náboj na povrchu koloidních částic ovlivňuje stabilitu koloidů, tím i koagulaci a v neposlední řadě i chování nabitých částic v elektrickém poli. Elektrický náboj na fázovém rozhraní může vznikat několika způsoby. Nejdůležitějšími z nich je ionizace povrchových vrstev, přednostní rozpouštění některého z iontů mřížky krystalů málo rozpustných solí ve styku s vodou, preferenční adsorpce jednoho druhu iontů nebo rozštěpení krystalu[5].

Přítomnost elektrického náboje na povrchu koloidních částic vede ke vzniku elektrického pole, jehož vlivem dochází k uspořádání opačně nabitých částic v těsné blízkosti (tzv. protiiontů). Vzniklý útvar složený ze dvou opačně nabitých vrstev se nazývá elektrická dvojvrstva.



**Obr. 1** Schéma upořádání elektrické dvojvrstvy

Zdroj: <http://fch.upol.cz/skripta/kol/properties.pdf>

Mezi nabitým povrchem a objemovou fází roztoku se vytvoří rozdíl elektrických potenciálů  $\phi$ . K první vrstvě iontů elektrické dvojvrstvy, která určuje povrchový náboj a nazývá se vnitřní vrstva, je poutáno pouze omezené množství protiiontů. Druhá vrstva opačně nabitých iontů tvoří vnější difúzní vrstvu. Jestliže se částice pohybuje disperzním prostředím, dochází ke vzniku elektrokinetického potenciálu na pohybovém rozhraní ozn.  $\zeta$ -potenciál. Je to rozhraní mezi difúzně rozptýlenými ionty v roztoku a tenkou vrstvou protiiontů, která je poutána k povrchu částice. Jaká bude velikost tohoto potenciálu, závisí na rychlosti relativního pohybu částic vůči prostředí, teplotě soustavy, iontové síle roztoku a množství adsorbovaných iontů.

Při snížení hodnoty potenciálu dochází i ke snížení stability koloidů. Vlivem tohoto potenciálu lze pozorovat elektrokinetické jevy jako elektroforéza, elektroosmóza, sedimentační potenciál a potenciál proudění. U elektroforézy a elektroosmózy se částice pohybují vlivem vnějšího elektrického pole, zatímco u zbylých dvou jevů jde o opačnou situaci, kdy pohyb částic vyvolává elektrické pole[1,6].

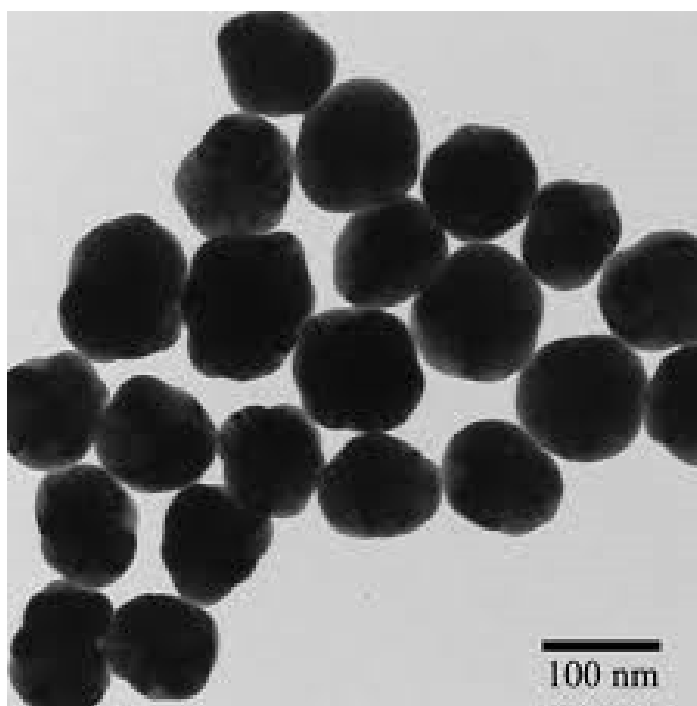
### **2.2.3 Kinetické vlastnosti**

Vlivem tepelného pohybu molekuly disperzního prostředí narážejí do koloidních částic a tyto nárazy mají za následek pohyb koloidních částic. Tento pohyb byl objeven roku 1827 Robertem Brownem při pozorování pylových zrn ve vodě. Podle objevitele nazýváme tento jev Brownův pohyb. Tento pohyb je tím intenzivnější, čím je vyšší teplota a čím nižší jsou částice. V souvislosti s tímto pohybem můžeme u koloidních soustav pozorovat i osmózu a difúzi.

Difúze je projevem Brownova pohybu a hnací silou je koncentrační gradient. Směr difúze je vždy ve směru koncentračního gradientu tzn. z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o nižší koncentraci ve snaze vyrovnat koncentraci v systému. Čím je rozdíl dispergovaného podílu v disperzním prostředí mezi dvěma vzdálenými místy vyšší, tím vyšší je i rychlost difúze[1,6].

Osmóza je děj, kdy dochází k pronikání molekul rozpouštědla přes polopropustnou membránu do roztoku. Nastává tehdy, když jsou v roztoku nestejně koncentrace, přičemž je roztok oddělen polopropustnou membránou. Hnací silou je osmotický tlak. Velikost osmotického tlaku klesá s rostoucí velikostí disperzních částic. Osmózy využívají separační metody dialýza, elektrodialýza či ultrafiltrace.

Vlivem působení gravitačního pole nebo silového pole centrifugy na koloidní částice dochází k jejich sedimentaci. Pohyb částic v gravitačním poli závisí na jejich hmotnosti, tvaru, hustotě. Závisí také na vlastnostech prostředí, ve kterém se částice pohybuje. Výsledkem sedimentace je nahromadění koloidních částic na jedné straně nádoby a jejich absence na druhé straně. Dochází tak k vytvoření koncentračního rozdílu, což vyvolá difúzi částic proti sedimentačnímu pohybu. Je-li rychlost sedimentace stejná jako rychlost difúze, nastane sedimentační rovnováha v gravitačním poli. V odstředivém poli centrifugy se sedimentační rovnováha ustavuje daleko rychleji díky působení větších sil. [1,4].



**Obr. 2 Mikrofotografie nanočástic stříbra**

Zdroj: <http://www.nanocomposix.com/product-silver/nanoxact-silver.html>

## 3 VIRY

---

Viry jsou nebuněčné organismy schopné rozmnožování pouze uvnitř živé hostitelské buňky. Viry jsou nitrobuněční parazité. Většina virů je příliš malá na to, aby bylo možné je pozorovat světelným mikroskopem.

Vzhledem k parazitické formě života se jeví viry jako patogeny ve vztahu k hostitelským buňkám. Nákazy způsobené těmito patogeny mohou být bez příznaků, které se i přes přítomnost virů výrazněji neprojeví nebo se zjevnými příznaky, které přecházejí ve virové onemocnění. Zjevné nákazy můžeme rozlišit na akutní (chřipka), chronické (opar) a pomalé (kuru). Virus může infikovat organismus několika cestami. Nejběžnější je vstup přes respirační trakt, trávicí soustavu či přenos z nemocného jedince na zdravého pomocí přenašeče. Šíření virové infekce se děje horizontálně či vertikálně. Horizontální přenos zahrnuje přímý kontakt s nemocným jedincem. Vertikální přenos je přenos z rodičů na potomky. U člověka je možných celkem 6 způsobů nákazy. První možností je respiračně či ústy (chřipka). Fekálně-orální cestou se přenášejí enteroviry a rotaviry, sexuálním kontaktem se přenáší řada virů (HIV, Herpes,...). Zdrojem virové infekce mohou být obratlovci (vzteklina). Jako vektory šíření mohou sloužit členovci (žlutá zimnice) či obratlovci (většina arbovirových infekcí)[7].

Priony jsou považovány za infekční proteiny, které neobsahují nukleové kyseliny. Tyto proteiny se dostanou do buňky a v ní mění konformaci stejného buněčného proteinu, což odstartuje řetězec dalších a dalších změn konformací proteinů. Celý průběh nemoci je odlišný od klasické virové infekce. U napadené nervové buňky dochází ke změně přenášení nervového vzruchu, jehož následkem je nekoordinovaný pohyb jedince. Dále dochází k vakuolizaci buněk, což působí demenci a následnou smrt. Priony jsou původci nemoci scrapie u ovcí a nemoci šílených krav u hovězího dobytka. U lidí priony způsobují nemoc kuru a Creutzfeld-Jacobovu nemoc. Prionová onemocnění nelze léčit[8].

### 3.1 Struktura virů

Jednotlivá částice viru, která je schopná infikovat hostitelskou buňku a množit se v ní, se nazývá virion. Skládá se z nukleové kyseliny, kterou obklopuje ochranná vrstva tvořená bílkoviny. Tato vrstva se nazývá kapsid a je tvořena z podjednotek bílkovin označovaných

jako kapsomery. Struktura kapsidu je geometricky pravidelná. Některé viriony mohou mít okolo kapsidu membránový obal tvořený fosfolipidy a bílkovinami (tzv. lipidovou "obálku"). Fosfolipidová membrána je většinou buněčného původu a obaluje kapsid při průchodu nově vytvořených virionů před membránu hostitelské buňky[7].

Nukleoproteiny jsou proteiny asociované s nukleovou kyselinou. Asociace bílkovin kapsidu s nukleovou kyselinou označujeme jako nukleokapsid. Kapsid a celkovou strukturu virové částice můžeme pozorovat (atomic force microscopy). V zásadě rozlišujeme 3 hlavní možnosti struktury viru:

**1.Helical** – Kapsidy s helikální strukturou jsou sestaveny do tvaru šroubovice. Mohou mít tvar tyčinek nebo vláken a skládají se z bílkovinných podjednotek, které jsou spirálovitě uspořádané. U viru tabákové mozaiky tvoří strukturální jednotky ploché kotouče, které jsou spojené a uspořádané v šroubovitě uspořádanou tyčinku. Uprostřed této tyčinky je volný kanálek, ve kterém je spirálovitě uložena molekula RNA[7,9].

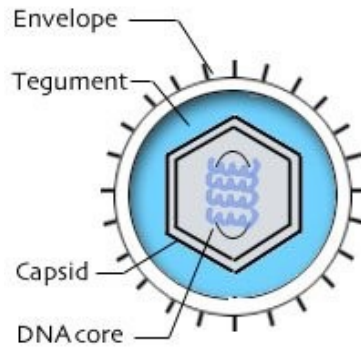


**Obr. 3** Helikální struktura viru

Zdroj:<http://www.tutornext.com/help/tobacco-mosaic-virus-structure>

**2.Icosahedral** – Typ struktury představující mnohostěn s pravidelnými rozměry podél ortogonální osy. Na stěnách představujících rovnostranné trojúhelníky jsou rozloženy kapsomery obsahující 6 podjednotek (hexamer). Každý z vrcholů mnohostěnu bývá obsazen kapsomerou, skládající se z 5 podjednotek (pentamer) [7,9].

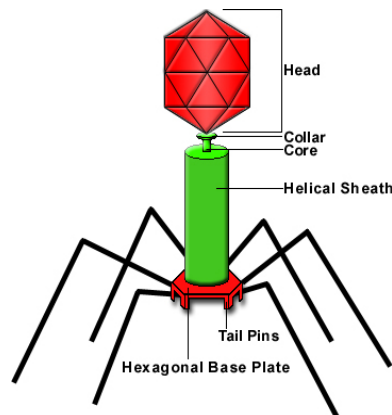




**Obr.4** Icosahedrální struktura viru s obálkou

Zdroj:<http://microbdass.blogspot.com/>

**3. Komplexní struktura** – viry mající komplexní strukturu mohou nabývat mnoha různých tvarů a obsahovat různé struktury. Tato struktura je typická pro bakteriofágy. Hlavovou část tvoří zpravidla mnohostěn s icosahedrální strukturou. Na něj se prostřednictvím límečku váže krček s helikální strukturou. Ten je zakončen bazální destičkou, ze které vycházejí vlákna bičíku. Tato struktura funguje jako injekční stříkačka, díky které může bakteriofág vstříknout svou nukleovou kyselinu do nitra hostitelské buňky[7,9].



**Obr.5** Bakteriofág

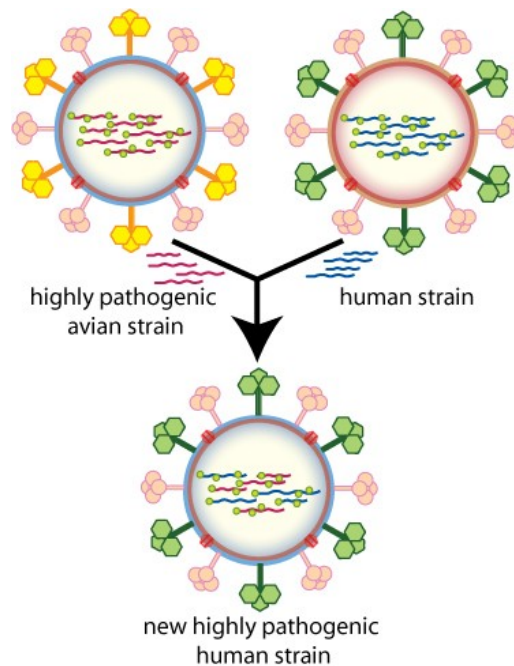
Zdroj:[http://research.nmsu.edu/molbio/bioinfo/tutorials/clip\\_art/index.html](http://research.nmsu.edu/molbio/bioinfo/tutorials/clip_art/index.html)

## 3.2 Genová diverzita virů

Na rozdíl od eukaryotních organismů jsou virové nukleové kyseliny daleko rozmanitější. Funkci genomu zde může plnit jak DNA tak RNA. Jejich molekuly mohou být dvouvláknové nebo jednovláknové, lineární či kruhové, případně fragmentované. Lineární dvouvláknová DNA se vyskytuje u mnoha živočišných virů a bakteriofágů. Kruhová dvouvláknová DNA je kovalentně uzavřená molekula. Lineární forma snáze proniká do hostitelské buňky, kdežto kruhová forma se rychleji replikuje a může se včleňovat do hostitelské DNA. Lineární jednovláknovou DNA obsahuje malá skupina rostlinných virů[9].

Dvouvláknová RNA se vyskytuje u bakteriofágů a některých živočišných virů. Zvláštností virů s dvouvláknovou RNA je segmentace genomu. Jednovláknová RNA se vyskytuje u řady rostlinných i živočišných virů a u některých bakteriofágů. V tomto případě je relativně časná segmentace genomu. U živočišných virů mají tyto segmenty společný kapsid (monoviry), u rostlinných virů jsou tyto segmenty umístěny ve vlastních kapsidech[9].

Vlivem přirozené selekce dochází ke změnám v nukleových kyselinách virů. Nejvíce se uplatňují mutace a intramolekulární rekombinace. V menší míře se uplatňují i další mechanismy, zejména tzv. reassortment (znovuuspořádání genomu). Tento proces je za daných podmínek výrazným zdrojem genetické variability u virů se segmentovaným genomem. Děje-li se toto s chřipkovými viry, mohou vznikat pandemické kmeny. Viry chřipky jsou klasifikovány do skupin podle přítomnosti povrchových antigenů, hemaglutininu (H) a neuraminidázy (N) do 13 skupin. Antigenní variabilita chřipkových virů vychází z vlastností povrchových glykoproteinů H a N, které mohou podléhat změnám. Pokud nastane antigenní drift, dochází k bodovým mutacím, které vedou k tvorbě nových kmenů chřipky, protože jsou získávány geny pro nový glykoprotein H nebo N. Tyto nové kmeny se výrazně liší od původního viru, který se vyskytoval v populaci[7].



**Obr.6** Schéma vzniku pandemického kmene chřipky

Zdroj:<http://library.kiwix.org:4201/A/Virus.html>

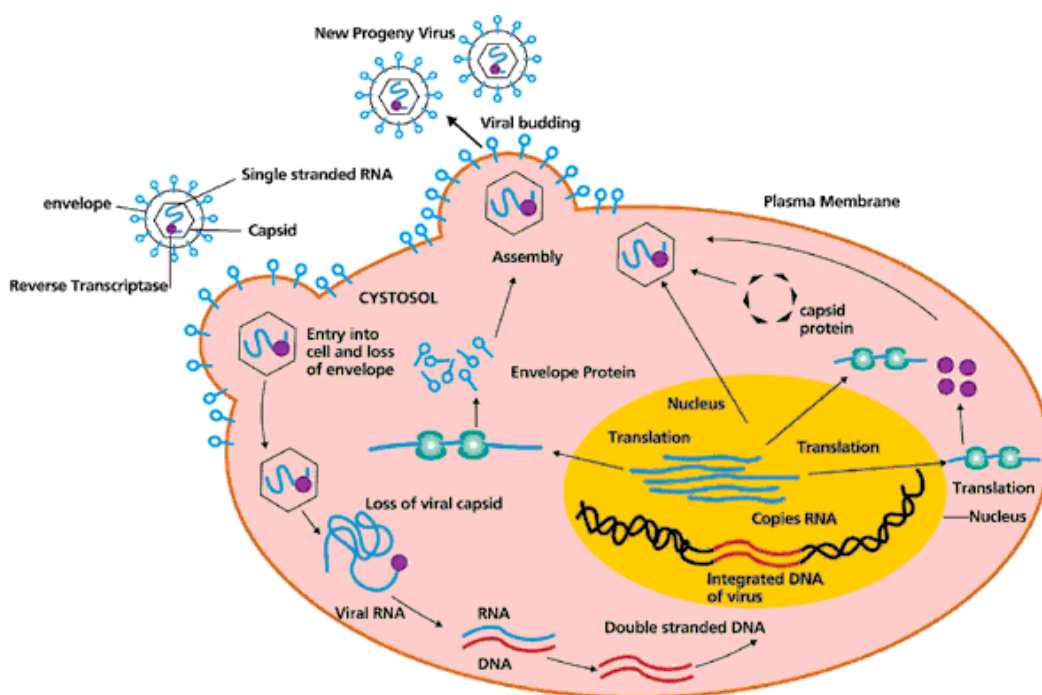
### 3.3 Průběh virové infekce

Průběh virové infekce se může lišit s ohledem na konkrétní druh viru. Můžeme však sledovat několik kroků, které jsou společné pro všechny viry.

1. *Přilnutí* viru na povrchu buňky. Tento proces je specifický. Aby se virus mohl přichytit na danou hostitelskou buňku, musí mít hostitelská buňka na svém povrchu specifické receptory, být vnímavá pro daný virus. Kapsid viru či membránový obal je nositelem antigeny. Některé viry, zejména rostlinné, však mohou proniknout do buňky i nespecificky (mechanicky).
2. *Průnik* a vstup viru do hostitelské buňky pomocí endocytózy či membránové fúze. Buď vniká do hostitelské buňky celý virus (živočišné viry) nebo jen jeho nukleová kyselina (bakteriofág). Membránový obal a kapsid viru je rozložen hydrolytickým enzymem buňky.
3. *Replikace* podle genetických informací obsažených v nukleové kyselině viru. Dochází k syntéze enzymů a proteinů.
4. Následně dochází ke zrání virálních částic (post-translační úpravy virálních proteinů, skládání proteinů).
5. *Uvolnění* virionů do prostředí pomocí lýze hostitelské buňky (lytický cyklus). Nukleové kyseliny některých virů se včleňují do nukleových kyselin hostitelských buněk (lyzogenní

cyklus). Virový chromozom je předáván jako tzv. provirus dceřiným buňkám. Za určitých podmínek může provirus způsobovat změnu vlastností, buňka se může stát např. nádorovou.

Podle druhu viru dochází k replikaci nukleových kyselin virů v jádře, případně v cytoplasmě hostitelské buňky. Některé viry využívají při replikaci svého genomu enzymu reverzní transkriptázy, kdy DNA přepíší do RNA, případně naopak. Tímto způsobem se například retroviry mohou integrovat do hostitelské DNA[9].



**Obr. 7** Schéma životního cyklu viru

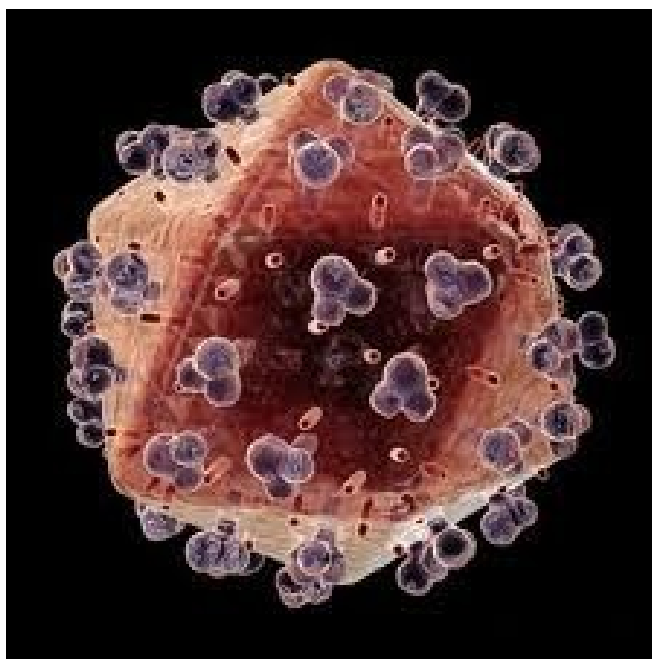
Zdroj: [http://www.clontech.com/support/tools.asp?product\\_tool\\_id=54271&tool\\_id=154906](http://www.clontech.com/support/tools.asp?product_tool_id=54271&tool_id=154906)

Souhrn strukturálních a biochemických efektů, kterými virus působí na hostitelskou buňku, nazýváme cytopatický efekt (změny mikrofibril a mikrotubulů, přestavba membrán endoplazmatického retikula, jádra a cytoplazmatické membrány). Výsledkem většiny virálních infekcí je buněčná smrt hostitelské buňky (imunitní cytolýza). Některé viry mohou v hostitelských buňkách setrávat v latentní podobě řadu let aniž by vyvolaly nějaké viditelné onemocnění či poškození dané buňky. Toto je velmi časté u viru Herpes. Některé viry však mohou časem způsobovat transformaci hostitelských buněk, která vede k nekontrolované proliferaci způsobující vznik nádorů a rakoviny[10].

### 3.4 Virová onemocnění

Pro vznik choroby jsou důležité 3 faktory: náchylný hostitel, virulentní patogen a příznivé vnější podmínky. Patogeneze virové infekce je proces vyjadřující komplex interakcí mezi virem a hostitelem, jehož výsledkem je nemoc. Viry jsou původci mnoha onemocnění. Zmíním se o nejběžnějších, nejčastějších či o nejzávažnějších chorobách, které jsou způsobeny viry[8].

- Lidé – běžná nachlazení, chřipka, plané neštovice, opary, ebola, AIDS, SARS, žloutenka, dětská mozková obrna, příušnice, zarděnky, spalničky, klíšťová encefalitida, mononukleóza,...
- Živočichové – vzteklna, bovinní virová diarea, chikungunya, myxomatóza, ptačí chřipka, slintavka a kulhavka, virózy včel, vzteklna, psinka, parvoviróza, klasický/africký mor prasat,...
- Rostliny – tabáková mozaika, šárka na švestkách, sterilní zakrslost ovsa



**Obr. 8** 3D model viru HIV

Zdroj: [http://www.3dscience.com/3D\\_Models/Biology/Viral/HIV.php](http://www.3dscience.com/3D_Models/Biology/Viral/HIV.php)

V souvislosti s virovou infekcí hovoříme o virulenci a patogenitě. Virulence porovnává sílu chorob vyvolaných různými kmeny téhož mikroorganismu. Patogenita

porovnává sílu chorob vyvolaných různými mikroorganismy (např. virus vztekliny je více patogenní než virus spalniček)[8].

### 3.5 Léčba virové infekce

Každý organismus má vytvořen systém specifických i nespecifických obranných mechanismů jako obranu proti virové infekci. Mezi nespecifické obranné mechanismy patří zánět, fagocytóza, komplement a jiné. Mezi specifické obranné mechanismy řadíme imunitní systém a protilátkovou-humorální buněčnou obranu.

Vzniku řady virových onemocnění lze efektivně předcházet pomocí imunizace. Imunizace může být dvojího typu: aktivní nebo pasivní[8].

Pasivní imunizace - zde se podává již **hotová protilátka** (imunoglobulin) buď zvířecí, nebo lidská. Důvod je časový - aktivní imunizace již nemocného nebo bezprostředně ohroženého by nebyla možná. Jsou to tzv. léčebná séra. Léčbě se říká též séroterapie. Má okamžitý, ale krátkodobý účinek, nevýhodou je i možnost senzibilizace a příslušných nepříznivých reakcí na cizorodou bílkovinu (sérová nemoc, anafylaktický šok). K dispozici jsou imunoglobuliny proti toxinu *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, klostridiím plynaté sněti, proti různým živočišným jedům, proti viru vztekliny a klíšťové encefalitidy. Poslední dvě mají omezený význam, slouží pouze jako součást prevence po styku se zdrojem nákazy[21].

Aktivní imunizace slouží k prevenci případného onemocnění a provádí se zpravidla před expozicí nákazy. Provádí se podáním očkovací látky (vakcíny - z lat. *vacca* = *kráva*), která vyprovokuje tvorbu ochranných protilátek proti původci. Očkovací látka tedy musí být připravena tak, aby vznikající protilátky skutečně chránily, tedy musí obsahovat tytéž antigeny, které se rozhodujícím způsobem uplatňují i při rozvoji příslušné nemoci (protektivní antigen, upravený toxin apod.)[21].

Typy očkovacích látek:

**1. Tradiční očkovací látky** - inaktivované vakcíny se připravují usmrcením příslušného vyvolavatele chemicky nebo teplem. Výhodou je stabilita (často se nemusí uchovávat v ledničce), nemohou revertovat zpět do virulentní podoby. Nevýhodou je relativně slabá

imunitní odpověď - musí být podávána několikrát. U bakterií jde o tzv. bakteriny. Příklad: buněčná vakcína proti pertussi (černý kašel), vakcína proti chřipce.

Živé oslabené (atenuované) vakcíny - kmen vyvolavatele musí být kultivován tak, aby ztratil svou virulenci. Výhodou je dobrá imunitní odpověď i po jedné dávce - po určité omezenou dobu očkovací látka perzistuje a množí se v organismu očkované osoby. Nevýhodou jsou vyšší nároky na skladování a teoretická možnost zpětné mutace do virulentní formy. Zbytková virulence je příčinou, proč se tyto typy vakcín nepodávají osobám s podstatně sníženou obranyschopností. Příklady: vakcína proti tuberkulóze, proti spalničkám, zarděnkám, příušnicím.

Toxoidy (anatoxin) jsou inaktivované toxiny. K inaktivaci se obvykle používá formalin. Použití: očkování proti toxinózám (tetanu a záškrtu).

**2. Moderní vakcíny** - Konjugované vakcíny - imunitní systém dětí do 2 let nereaguje na polysacharidové antigeny. Jde o T-independntní antigeny. Tudiž by nebylo možné je očkovat proti *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* či *Neisseria meningitidis*, kde protektivním antigenem mikroba je pouzderný polysacharid. Ale pokud bude tento polysacharid svázán (konjugován) s proteinem, pak se stane T-dependentním antigenem a protilátky se i u dětí vytvoří. Jako proteinový nosič se používá nejčastěji tetanický nebo difterický toxoid. Příklad: očkovací látka proti *Haemophilus influenzae b*.

Subjednotkové vakcíny - příslušný antigen, ze kterého se vakcína vyrábí fyzicky nepochází z původce, ale produkují jej např. geneticky modifikované kvasinky. Výhodou je jednodušší výroba, lépe definované podmínky a bezpečnost. Příklad: očkovací látka proti heptitis B.

Vektorové vakcíny (Recombinant Vector Vaccines) - gen pro příslušný antigen vyvolavatele se inkorporuje do genomu nosičského neškodného mikroorganismu. Jím se očkuje, nosič exprimuje kromě svých antigenů i antigeny odpovídající vnesenému genu. Vznikne imunita proti vyvolavateli. Nosičem genu může být např. vakcinální virus, poliovirus nebo nepatogenní salmonela. Zatím v pokusném stadiu.

**3. Vakcíny budoucnosti** - DNA vakcíny - jde vlastně o obdobu vektorové vakcíny s tím, že nosičem je holá DNA - obdoba plazmidu. Buňka očkované osoby, kde se vnesená informace exprimuje, poslouží jako zdroj antigenu pro imunitní systém. Výhodou má být

dlouhodobý efekt - antigen budou zasažené buňky produkovat snad celoživotně. Plazmid by se do tkáně očkované osoby vpravoval parenterálně, ale také např. v buňkách geneticky modifikovaných banánů. To by mělo dalekosáhlé důsledky zvláště v rozvojových zemích[21].

Nepodaří-li se vzniku onemocnění předejít očkováním, je nutno přistoupit k léčbě. Terapie virových onemocnění cíleně působí na určité kroky v životním cyklu viru[20].

#### Terapie virových infekcí

- Inhibice adsorpce viru na vnímavou buňku
- Zábрана uvolnění virové nukleové kyseliny
- Interference s transkripcí a translací virových genů (Acyklovir)
- Inhibitory DNA polymeráz
- Inhibitory RNA polymeráz (Ribavirin)
- Inhibitory reverzní transkriptázy (Zidovudin, Didanosin)
- Interferon alfa

Je však nutno zmínit, že neexistuje účinná vakcinace a antivirotika na všechny původce onemocnění zvířat či člověka. Na celém světě například pracuje mnoho výzkumných týmů na vývoji nových léčiv, které by cíleně působily na virus HIV.



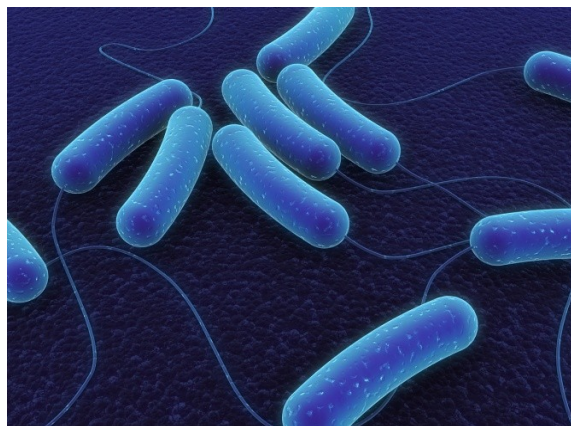
## 4 BAKTERIE

---

Bakterie jsou jednobuněčné organismy spadající do domény Bacteria. Tvar a uspořádání bakteriálních buněk jsou dány příslušností k danému druhu a jsou důležitým taxonomickým znakem. Bakterie jsou všudypřítomné, obsazují všechny biotopy na Zemi, jsou nedílnou součástí životních cyklů v přírodě, pomáhají rozkládat či fixovat vzdušný dusík[9].

Bakteriologie je věda zkoumající vlastnosti bakterií, jejich odlišnosti a zařazení do systému. Bakteriologie je odvětvím mikrobiologie. Vně i uvnitř lidského těla se nachází velké množství různých druhů bakterií, zejména na kůži, ve vlasech a v intestinálním traktu. Většina bakterií v lidském těle je neškodná díky ochraně našeho imunitního systému a některé bakterie jsou pro člověka dokonce prospěšné. Bohužel existují také patogenní bakterie způsobující onemocnění jako je například cholera, syfilis, anthrax, lepra atd. [11].

Přestože má mnoho lidí bakterie spojené pouze s onemocněním, jsou rovněž důležitou součástí mnoha výrobních procesů jako je například výroba sýrů či jogurtů, biotechnologie vedoucí k výrobě antibiotik a jiných chemických látek[12].



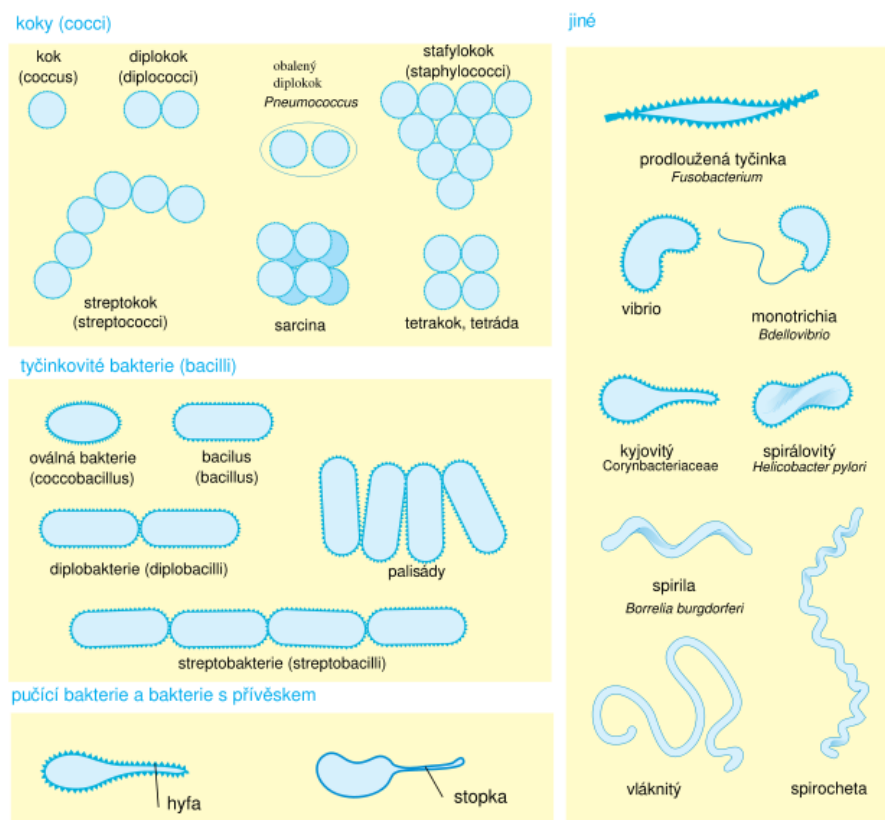
**Obr.9** *Escherichia coli*

Zdroj: [http://www.washingtoninjuryattorneyblog.com/2008/03/ap\\_reports\\_foodborne\\_illness.html](http://www.washingtoninjuryattorneyblog.com/2008/03/ap_reports_foodborne_illness.html)

## 4.1 Morfologie bakterií

Velikost bakteriální buňky může značně kolísat podle rodu, druhu či stáří kultury a kultivačních podmínek. Obecně lze říci, že mladé buňky jsou větší a silnější než ty starší. Velikost se pohybuje v rozmezí jednotek až stovek  $\mu\text{m}$ [11].

Podle tvaru bakteriální buněk obecně rozlišujeme bakterie do několika skupin. Bakterie mající kulovitý tvar nazýváme koky, pokud mají protáhlý tvar hovoříme o bacilech případně o tyčinkách nebo tyčkách. Bakterie však mohou mít zakřivený tvar např. spirily, spirochéty nebo vibria. Bakteriální buňky mohou mít také tvar dlouhých tenkých vláken. Některé bakterie mohou vytvářet charakteristická seskupení např. diplokoky, streptokoky aj. [11].



Obr.10 Tvary bakteriálních buněk

Zdroj: <http://viry-bakterie.wz.cz/bakterie.htm>

## 4.2 Buněčné struktury

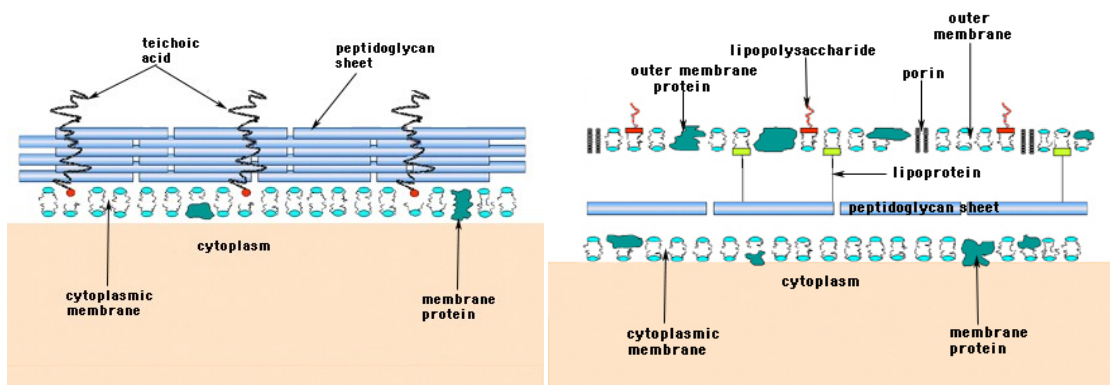
Plazmatická membrána tvořená fosfolipidovou dvojvrstvou obaluje bakteriální buňku. Obsahuje globulární bílkoviny, specifické enzymy a cytochromy. Funguje jako osmotická bariéra. Z cytoplazmatické membrány se mohou vchlipováním vytvářet mesozómy či chromatofory, mající funkci analogickou k chloroplastům v rostlinných buňkách[11].

Bakteriální buňka neobsahuje jádro, mitochondrie, chloroplasty a jiné podobné orgány vyskytující se v eukaryotické buňce jako je Golgiho aparát či endoplasmatické retikulum[9]. Genetická informace bakteriální buňky je uložena v kruhově stočené molekule DNA označované jako nukleoid. Doplnkovým zdrojem genetické informace mohou být plazmidy, které nesou informace pro doplňkové vlastnosti. Plazmidy se replikují nezávisle na nukleoidu. Dále buňka obsahuje ribozómy, ve kterých dochází k produkci proteinů. Struktura bakteriálního ribozómu se liší od ribozómu eukaryotní buňky[9,11].

V cytoplazmě některých bakterií můžeme nalézt inkluze, nejčastěji v podobě granul. Zpravidla jsou tvořeny zásobními látkami (polysacharidy, tukové látky, polyfosfáty aj.)[11].

Na základě Gramovy reakce se bakterie dělí do dvou skupin: grampozitivní a gramnegativní. Rozdíl mezi těmito skupinami je v tom, že grampozitivní bakterie po obarvení trifenylmethanovým barvivem (krystalová violet) a následným mořením roztokem jodidu draselného zadržují komplex krystalové violeti a jodidu draselného v buněčné stěně a neodbarvuje se organickými rozpouštědly. U gramnegativních bakterií je tento komplex z buněčné stěny ethanolem či acetonem vymýván. Použije-li se po odbarvovacím procesu druhé barvivo, nejčastěji je to safranin, zbarví se gramnegativní bakterie červeně a grampozitivní bakterie zůstanou zbarveny fialově[13].

Buněčnou stěnu grampozitivních bakterií tvoří peptidoglykeny a teikoové kyseliny. Tato buněčná stěna je relativně silná. Buněčná stěna gramnegativních bakterií je výrazně tenčí a má složitější strukturu. Tvoří ji tenká vrstva peptidoglykanu, která je obklopena druhou lipidovou membránou, která obsahuje lipopolysacharidy a lipoproteiny. Většina bakterií má gramnegativní buněčnou stěnu. Rozdílnost ve struktuře buněčné stěny může mít vliv na rozdílnou vnímavost vůči antibiotikům[12].



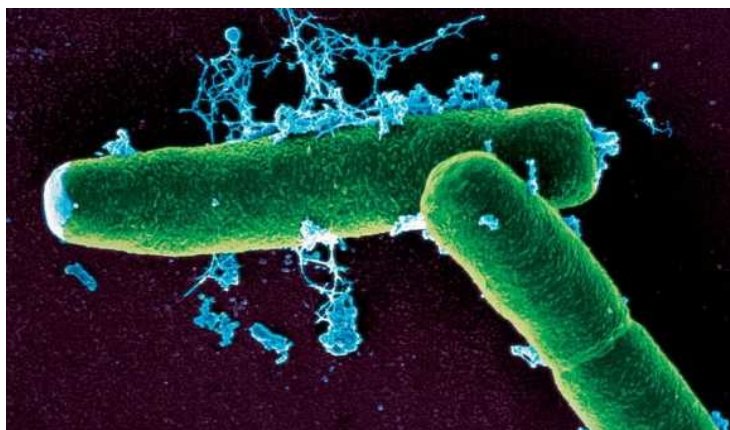
**Obr.11** Schéma Grampozitivní a Gramnegativní buněčné stěny

Zdroj: [http://pathmicro.med.sc.edu/fox/cell\\_envelope.htm](http://pathmicro.med.sc.edu/fox/cell_envelope.htm)

Mnohé bakterie mají schopnost se aktivně pohybovat. Aktivní pohyb jim umožňují bičíky, které mohou být umístěny na jednom konci buňky, na obou koncích nebo na celém povrchu buňky. Bičíky jsou dlouhé zhruba 3 - 12 $\mu$ m a skládají se z bílkovinných podjednotek, tzv. flagelinů. Kromě bičíků se mohou na povrchu některých bakterií vyskytovat vláknité výběžky označované jako fimbrie nebo pilusy. V porovnání s bičíky jsou kratší a tenčí. Fimbrie umožňují snazší přilnutí bakterie na hostitelskou buňku. Některé pilusy mohou být funkčně odlišeny a mohou se uplatňovat při výměně genetického materiálu mezi bakteriálními buňkami. Tento proces nazýváme konjugace[11].

Mnoho bakteriálních buněk vytváří silně hydratovanou vrstvu vně plazmatické membrány, která je označována jako kapsula nebo slizové pouzdro. Tato struktura může zvyšovat rezistenci vůči fágům či může chránit před pohlcením eukaryotní buňkou např. makrofágem[11].

Některé grampozitivní bakterie jako např. *Bacillus*, *Clostridium* za určitých podmínek vytvářejí endospory, které jsou odolné vůči různým vnějším faktorům, zejména chemickým. Endospora je tvořena protoplastem, který obklopuje cytoplazmatická membrána, na kterou těsně přiléhá vnitřní tuhá blána tvořená peptidoglykanem, na niž navazuje kortex a obal spory. Některé bakterie navíc obsahují pouzdro (exosporium). Endospory mohou vyvolávat onemocnění např. anthrax může být způsoben vdechováním endospor bakterie *Bacillus anthracis* nebo zanesení spor bakterie *Clostridium tetani* do ran způsobí tetanus[11,12].



**Obr.12** *Bacillus anthracis*

Zdroj: <http://www.nature.com/news/2009/090225/full/news.2009.120.html>

### 4.3 Metabolismus

Podle způsobu získávání energie můžeme bakterie rozdělit do několika skupin.

- **Fototrofní bakterie** – získávají energii ze slunečního záření a přeměňují ji na energii vazeb ATP. Zdrojem uhlíku jsou organické látky (fotoorganotrofní bakterie) nebo fixují uhlík (fotolitotrofní bakterie). např. Cyanobakterie
- **Chemotrofní bakterie** – získávají energii z anorganických či organických látek. Zdrojem uhlíku organické látky (chemoorganotrofní bakterie) nebo uhlík fixují (chemolitotrofní bakterie). např. *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*

Podle vztahu bakterií k molekulárnímu kyslíku můžeme bakterie rozdělit do 3 skupin. První skupinou jsou obligátní aerobové, kteří mohou energii získávat pouze aerobní respirací. Naproti tomu obligátní anaerobové rostou výhradně v prostředí bez přítomnosti vzdušného kyslíku a již malá koncentrace  $O_2$  v prostředí je pro ně toxická. Poslední skupinu tvoří fakultativní anaerobové, kteří mohou růst jak v přítomnosti tak v nepřítomnosti  $O_2$ . Vytvářejí enzymy, které jim umožňují volit rozdílné metabolické dráhy v závislosti na prostředí. Do této skupiny spadají i aerotolerantní bakterie, které mohou tolerovat přítomnost vzdušného kyslíku, ale nemohou jej pro svůj metabolismus využívat. energii získávají kvašením sacharidů[9,11].

Kvašení je metabolický proces, při kterém vzniká ATP bez přítomnosti  $O_2$ . Jako akceptory elektronů slouží meziproducty štěpení substrátu. Při kvašení vznikají různé konečné producty, které jsou pro dané kvašení typické. Hovoříme proto o kvašení mléčném,

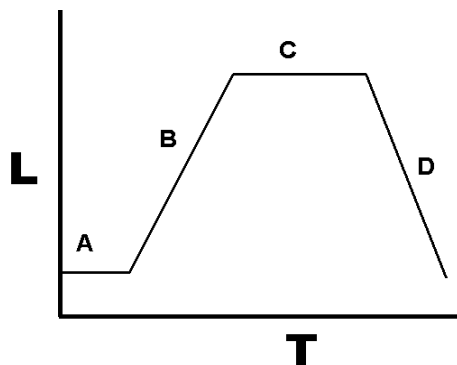
alkoholovém, máselném aj. Z energetického pohledu je tato metabolická dráha nevýhodná. Vzniká malé množství ATP a proto musí být metabolizováno velké množství substrátu. Účastní-li se kvašení glukosa, je odbourávána Emden-Meyerhof-Parnasovou dráhou (anaerobní glykolýza) na kyselinu pyrohroznovou. Tato metabolická dráha má důležité postavení v procesu kvašení, vznikají díky ní 2 ATP z každého molu glukosy[9,11].

Je-li v prostředí přítomen vzdušný kyslík, může docházet k aerobní respiraci, kdy dochází k oxidaci substrátu na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . V porovnání s anaerobní glykolýzou je tento proces výrazně účinnější. V tomto procesu vzniká kyselina pyrohroznová, která dále vstupuje do Krebsova cyklu. Tímto procesem vzniká 12 ATP na jeden mol glukosy. Zároveň vznikají jako vedlejší produkty látky, které se mohou podílet na biosyntetických pochodech jako prekurzory[9,11].

Kromě toho, že mohou fixovat oxid uhličitý pomocí fotosyntézy, mohou některé bakterie fixovat plynný dusík s využitím enzymu nitrogenasy. Dále mohou některé bakterie redukovat dusičnany na dusitany či redukovat sírany na sulfan. Tyto procesy jsou ekologicky významná a často se uplatňují např. v metabolismu rostlin[9,11].

#### **4.3.1 Růst bakterií**

Bakterie mohou v daném prostředí růst a množit se dokud mají dostatek živin a další vhodné podmínky. Grafickým vyjádřením růstu bakterií je růstová křivka, která je charakteristická růstovými fázemi (viz.obr 13). Jakmile se populace bakterií dostane do kontaktu s prostředím bohatým na živiny, které jim umožňuje růst, buňky se potřebují adaptovat na toto nové prostředí. Tato první fáze růstu se nazývá lag fáze (A), období pomalého růstu s vysokou biosyntetickou aktivitou, kdy jsou produkovány proteiny potřebné k rychlému růstu. Druhou fází je fáze logaritmického růstu zvaná někdy také log fáze či exponenciální fáze (B). Log fáze se vyznačuje rychlým exponenciálním růstem. V průběhu log fáze jsou živiny metabolizovány maximální rychlostí dokud se jedna z živin nevyčerpá, což má za následek limit růstu. Třetí růstovou fází je fáze stacionární (C) a je způsobená vyčerpáním živin. Buňky redukují svou metabolickou aktivitu a konzumují neesenciální buněčné proteiny. Poslední fází je fáze odumírání (D), kdy převyšuje počet odumřelých buněk nad počtem nově vzniklých buněk[10,12].



**Obr.13** Základní křivka růstu bakteriální populace: na ose y je vynesena počet bakterií v kolonii, na ose x je čas. Písmena (A, B, C, D) symbolizují jednotlivé fáze růstu.

## 4.4 Interakce s jinými organismy

Vztahy bakterií s jinými organismy můžeme rozdělit do tří skupin: na parazitismus, mutualismus a komenzálismus. Komenzální bakterie jsou všudypřítomné a rostou stejně na zvířatech i na rostlinách. Růst bakterií na povrchu lidského těla, zejména v místech s potními žlázami způsobuje charakteristický lidský zápach, protože dochází k rozkladu potu za vzniku těkavých aromatických látek.

### 4.4.1 Predátoři

Predací rozumíme usmrcení a požívání jednoho druhu druhem jiným. Někdy je obtížné stanovit přesnou hranici mezi predací a parazitismem. Bakterie bývají konzumovány některými druhy mykobakterií, myxomycet a některými prvoky, pro něž jsou obvyklým a typickým zdrojem potravy[11].

### 4.4.2 Mutualisté

Mutualismus je druh symbiotického vztahu, který je prospěšný pro všechny účastníky. Možným způsobem mutualismu je výměna živin. Například *Lactobacillus plantarum* produkuje kyselinu listovou, kterou ke svému životu vyžaduje *Streptococcus faecalis*. Ten produkuje fenylalanin, který naopak potřebuje *L.plantarum*. Jiným příkladem může být smíšená kultura *Escherichia coli* a *Streptococcus faecalis*, která může přeměňovat arginin na putrescin. Této přeměny však není schopná ani jedna z kultur samostatně[11].

### 4.4.3 Parazité

Vztah mezi organismy, ve kterém jeden žije na úkor druhého, označujeme jako parazitismus. Parazit se může živit na úrovni buněk, tkání či tekutin hostitelského organismu. Parazit je přímo závislý na hostiteli, žije s ním v těsném kontaktu. Jako parazity můžeme označit původce onemocnění, patogeny[11].

Každý patogen má charakteristické spektrum interakcí s jejich hostiteli. Některé organismy mohou způsobovat onemocnění kůže, plic, meningitidu, tuberkulózu či kompletní sepsi, systémové selhání a následnou smrt. Tyto organismy jsou ale také součástí normální lidské mikroflóry a běžně se vyskytují na kůži či v nosní dutině, aniž by způsobily jakékoliv onemocnění[9,11].

Bakteriální onemocnění se nejčastěji léčí pomocí antibiotik. Existuje velké množství antibiotik, přičemž každá skupina působí na jiné patogeny. Základem mechanismu působení antibiotik je narušení metabolických procesů buňky (inhibice metabolismu, narušení syntézy buněčné stěny, narušení proteosyntézy aj.). Antibiotika se neužívají jen k potlačení bakteriálních nemocí, ale také v zemědělském průmyslu ke zvýšení produkce. Zbytečné nadužívání antibiotik má za následek vznik bakteriální rezistence vůči antibiotikům[12].

Infekcím lze předcházet pomocí očkování, desinfekčních opatření, jako je například důkladné mytí rukou, aplikace desinfekčních prostředků na kůži před použitím injekčních jehel či důkladná péče o katétry zavedené do těla. Chirurgické a zubařské nástroje jsou také sterilizovány jako prevence před kontaminací bakteriemi. V domácnostech jsou běžně užívané desinfekční prostředky, které mají za úkol hubit mikroorganismy[12].



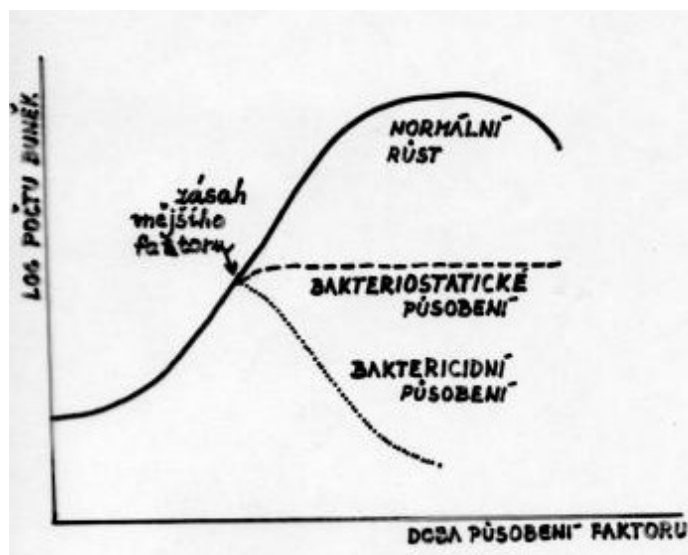


**Obr.14** Barevně upravená mikrofotografie bakterie *Salmonella typhimurium*

Zdroj: <http://www.flickr.com/photos/ajc1/2365748591/>

## 4.5 Léčba bakteriálních onemocnění

V současné době se k léčbě bakteriálních onemocnění nejčastěji používají antibiotika. Jsou to látky původně mikrobiálního původu používané k léčbě infekčních chorob. Obvykle působí selektivně. Jejich účinek je buď baktericidní nebo bakteriostatický. Látky s bakteriostatickým účinkem způsobují zastavení buněčného růstu. Počet buněk se dále nezvyšuje, nedochází k buněčnému dělení. Látky s baktericidním účinkem zastavují buněčný cyklus, dochází ke ztrátě životaschopnosti buněk a jejich odumírání dle logaritmické křivky[14].



**Obr.15** Schéma působení látek s antimikrobiální aktivitou na růst bakteriální kolonie

Zdroj: <http://botany.upol.cz/>

### Mechanismus účinku látek s antimikrobiální aktivitou

Narušení životně důležitých systémů a funkcí buňky

#### **Mechanismy účinku:**

- narušení syntézy buněčné stěny(peptidoglykanu)

penicilin, cefalosporiny, bacitracin, vankomycin

- poškození funkce cytoplazmatické membrány

polymyxin – vazba na fosfolipidy prokaryot

- inhibice syntézy proteinů (ovlivňují ribozomy)

aminoglykosidy, erythromycin, tetracykliny, chloramfenikol

- inhibice metabolismu

sulfosloučeniny - inhibice syntézy kyseliny listové

trimetoprim, pyrimetamin – inhibice reductasy dihydrofolátu

- destrukce nukleových kyselin...

rifampin - inhibice syntézy mRNA - transkripce,

chinolony - replikace DNA

Látky s antimikrobiální aktivitou můžeme rozdělit do 11 velkých skupin. První velkou a významnou skupinou jsou  $\beta$ -laktamy ( $\beta$ -laktamový kruh v molekule), mezi něž patří peniciliny a cefalosporiny. Penicilinů existuje velká řada. Penicilin G (přírozený) je účinný na pyogenní koky, na anaerobní bakterie (mimo *Bacteroides fragilis*), na *Treponema pallium* a aktinomycey. Peniciliny rezistentní k  $\beta$ -laktamázám jako například meticilin a oxacilin působí na stafylokoky produkující penicilinázu. Semisyntetické aminopeniciliny (peniciliny druhé generace)-ampicilin, amoxicilin jsou účinné na enterokoky, hemofily, listerie, G- tyčky (*E.coli*, *Proteus mirabilis*), salmonely a shigelly. Neúčinné jsou na *Pseudomonas aeruginosa*. Carbenicilin a tikarcilin (peniciliny třetí generace) účinkují na *Pseudomonas aeruginosa* i *Proteus mirabilis*. Azlocilin, mezlocilin a piperacilin (peniciliny čtvrté generace) jsou účinné na pseudomonády, klebsiely, anaerobní *Bacteroides fragilis*[14].

Cefalosporiny jsou látky obsahující  $\beta$ -laktamový kruh se šestičlenným dihydrothiazinovým cyklem. Mají různě široké spektrum účinnosti na G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakterie. Cefalosporiny první generace – cefalotin, cefazolin, cefalexin mají úzké spektrum účinnosti. Jsou účinné na stafylokoky, streptokoky, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, klebsiely. Cefalosporiny druhé generace - cefaklor, cefuroxim, cefoxitin mají rozšířené spektrum účinnosti. Jsou účinné na hemofily, neisserie, *E.coli*, *Protweus mirabilis*, klebsiely, enterobakterie, serratie a další. Cefalosporiny třetí generace – cefotaxim, cefriaxon, moxalaktam mají také rozšířené spektrum účinnosti na G<sup>-</sup> bakterie, většinu enterokoků a serratií. Dále monolaktamy např. aztreonam, který je účinný na G<sup>-</sup> aerobní bakterie. A karbapenemy např. imipenem, meropenem mají široké spektrum účinnosti i na *Pseudomonas aeruginosa*[14].

Dalšími skupinami látek s antimikrobiální aktivitou jsou aminoglykosidy, makrolidy, linkosamidy, glykopeptidy, polypeptidy, Chloramfenikol, Rifampicin, fluorochinolony, sulfonamidy a tetracykliny. Mezi tetracykliny patří streptomycin, který je účinný na *Mycobacterium tuberculosis*, gentamicin, tobramycin, netilmicin a amikacin účinkující na G<sup>+</sup> i aerobní G<sup>-</sup> bakterie, účinné na G<sup>+</sup> koky, korynebakteria, listerie, bacily, účinné na G<sup>-</sup> legionely, meningokoky, gonokoky, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Borrelia burgdorferi*, chlamydie, mycoplasmy, účinné na anaerobní bakterie (sporující i nesporující), stafylokoky, streptokoky. Dále vankomycin a teicoplanin, které účinkují na G<sup>+</sup> koky (enterokoky, stafylokoky). V neposlední řadě také oxytetracyklin, chlortetracyklin, doxycyklin, minocyklin, což jsou širokospektrá, bakteriostatická antibiotika, účinná na G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> bakterie, (brucely, rickettsie, chlamydie, mykoplasmata, aktinomycey) [14].

Poslední velkou a významnou skupinou látek s antibakteriální aktivitou jsou antimykotika mezi něž řadíme kolistin a polymyxin B, látky účinné na *Pseudomonas aeruginosa*, rezistentní vůči *Proteus* a *Serratia*, širokospektré, bakteriostatické antibiotikum, účinnost na rickettsie, *Salmonella typhi*, hemofily a další. Ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin, norfloxacin účinkují na Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, hemofily, stafylokoky, chlamydie, mykoplasmata, méně na streptokoky. Dále sulfametoxazol a sulfonamid působící na G- tyčky (*E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*), *Streptococcus pyogenes*, *Nocardia asteroides*, *Chlamydia pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*/. Amphotericin B, flucytosin a azoly - flukonazol, ketonazol a itrakonazol jsou látky působící na kandidy, aspergily a dermatofyty[14].

Antimikrobiální vlastnosti určité látky lze testovat několika způsoby. Nejjednodušší je diskový difúzní test, kdy se na růstový agar pokládají papírové disky napuštěné příslušnou látkou. Po inkubaci se měří inhibiční zóna dané látky. Další možností je diluční test na mikrotitrační destičce, kdy se připraví série koncentrací testované látky ve vhodném médiu. Do této směsi je následně přidána bakteriální suspenze. Po inkubaci lze stanovit minimální inhibiční koncentraci (MIC) – nejnižší koncentrace dané látky, která zabrání viditelnému růstu bakterie. Případně lze stanovit minimální baktericidní koncentraci (MBC) – nejnižší koncentrace dané látky, která usmrtí nejméně 99,9% buněk[14].

Problémem při léčbě bakteriálních onemocnění je rezistence bakterií vůči antibiotikům. V prostředí se vyskytují přirozeně rezistentní kmeny, které jsou takto adaptovány k přežití. Jejich počet se zvyšuje nadměrným užíváním antibiotik. Tato rezistence nevymizí ani po vysazení antibiotika. Existují také nové rezistentní kmeny, které mohou rezistenci předávat i jiným druhům. Toto se může dít jak u patogenních, tak u nepatogenních kmenů. Rezistence pomalu mizí po ukončení používání antibiotika[14].

Geny rezistence se mohou nacházet jak na chromozomech tak na plazmidech. Rezistence může vznikat náhodným procesem mutace (např. rezistence *Mycobacterium tuberculosis*). Geny rezistence si mohou bakterie předávat konjugací (např. penicilin-rezistentní kmeny kapavky). V neposlední řadě mohou získat geny rezistence transformací[14].

Nadužívání antibiotik v druhé polovině minulého století vedlo k masivnímu rozvoji rezistence. Proto se v dnešní době ustupuje od léčby pomocí antibiotik a hledají se nová řešení

a nové léky, které by tuto rezistenci nevyvolávaly. U nanočástic stříbra byla prokázána antimikrobiální aktivita bez tendencí vytvářet rezistenci, což je možným příslibem do budoucna.

## 4.6 Průmyslové využití bakterií

Průmyslová mikrobiologie využívá mikroorganismů k produkci řady látek. Bakterie *Lactobacillus* a *Lactococcus* se využívají pro přípravu fermentovaných potravin jako jsou sýry, kvašené okurky, sojová omáčka, kysané zelí, vinný ocet, víno či jogurty[10,12].

Schopnosti rozkládat rozličné organické látky se využívá při zpracování odpadů a biodegradaci, ať už při kompostování na zahradách, tak při biodegradaci průmyslových odpadů[10]. Chemický průmysl také využívá bakterie k produkci enzymů, velmi čistých chemikálií, které dále zpracovává například farmaceutický průmysl[12].

Díky snadné práci a kultivaci bakterií s nimi lze manipulovat a využívat těchto manipulací v biotechnologiích. Genom řady bakterií je plně sekvenován, což umožňuje vyvolávat záměrné mutace a manipulace. Prováděním záměrných mutací DNA a následným zkoumáním fenotypu lze určovat funkčnost jednotlivých genů, enzymů a metabolických procesů v bakteriích. Tyto znalosti poté mohou být využity k aplikaci na složitější organismy, k produkci vakcín, hormonů, enzymů. Cílem je porozumět biochemickým procesům buňky[12].

## 5 KOLOIDNÍ STŘÍBRO

---

Příprava a studium nanočástic kovů je velmi důležité jak z výzkumného, tak z technologického hlediska. Všechny unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti se odvíjí od velikosti nanočástic. Z toho potom plyne jejich využití v oblasti biosenzorů, chemických senzorů, elektro-optických součástek nebo jejich použití v povrchově zesílené Ramanově spektroskopii[2].

### 5.1 Metody přípravy koloidního stříbra

Obecně lze metody přípravy koloidního stříbra rozdělit do dvou skupin na metody dispergační a kondenzační. Dispergační metoda je založena na získání koloidů z makroskopických látek za pomoci fyzikálních, chemických a mechanických postupů. Kondenzační metodou získáváme koloid z analytických disperzních soustav pomocí chemických reakcí nebo fyzikálních postupů. V praxi se s ohledem na finanční a materiální stránku více používají kondenzační metody[2].

Mezi dispergační metody patří metoda laserové ablace, kterou lze připravit relativně malé nanočástice. Velikost takto připravených nanočástic závisí na vlnové délce, délce trvání ozařování, přítomnosti přísad (např. chloridů), intenzitě laseru a na použitém rozpouštědle. Takto připravené nanočástice se vyznačují vysokou čistotou a proto nacházejí uplatnění v povrchu zesílené Ramanově spektroskopii (SERS - Surface Enhanced Raman Spectroscopy) [2].

Jiná metoda využívá k přípravě nanočástic ultrazvuk. Ultrazvuk rozkládá molekulu vody na vodíkový a hydroxylový radikál. Tyto radikály jsou schopné vystupovat jako redukční činidla. Za použití frekvence 200kHz byly připraveny nanočástice o velikosti kolem 13nm[2].

Nanočástice stříbra lze také připravit redukcí UV zářením. Jako zdroj UV záření se využívá rtuťová výbojka. K roztoku stříbrné soli společně se stabilizátorem se ještě navíc přidávají organické látky, které interagují s UV zářením za vzniku radikálů, které redukují stříbrné ionty[2].

### **5.1.1 Příprava koloidního stříbra redukcí anorganickými látkami**

K přípravě nanočástic stříbra redukcí anorganickými látkami se nejčastěji používá tetrahydroboritan sodný ( $\text{NaBH}_4$ ). Tato metoda je založena na redukcí dusičnanu stříbrného ( $\text{AgNO}_3$ ) o koncentraci  $10^{-3}\text{mol/l}$  tetrahydroboritanem sodným o koncentraci  $2 \cdot 10^{-3}\text{mol/l}$  v poměru 2:6 za stálého míchání při teplotě  $2^\circ\text{C}$ [2].

Jiný možný postup také využívá tetrahydroboritan sodný. V prvním kroku se připraví malé částice stříbra a v druhém kroku se použije kyselina askorbová a již připravené částice jako zárodečná centra pro růst větších částic. Tímto způsobem lze připravit částice až do velikosti 173nm[2].

### **5.1.2 Příprava koloidního stříbra redukcí organickými látkami**

Lee a Meiselův postup využívá citrát sodný. Postup přípravy spočívá v tom, že se přidává 10 ml 1 % citrátu sodného k 500 ml vroucího roztoku, který obsahuje 90 ml  $\text{AgNO}_3$ . Směs se dále hodinu vaří. Takto lze připravit částice o velikosti 60 – 80 nm[2].

Univerzální metodou pro přípravu nanočástic stříbra je modifikovaný Tollensův postup, který je založen na redukcí diamminstříbrného komplexu  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  aldehydem nebo redukcí sacharidem (např. glukosou, galaktosou, maltosou, laktosou aj.). Pro zahájení a urychlení reakce se do reakční směsi přidává roztok hydroxidu sodného ( $\text{NaOH}$ ). Tímto způsobem lze připravit částice o velikosti 25 – 450nm v závislosti na koncentraci amoniaku a použitým redukčním činidlem[2].

V posledních několika letech se do popředí dostávají metody přípravy využívající biologické zdroje jako např. rostliny a rostlinné produkty, řasy, houby, bakterie aj. Jejich extrakty obsahují směs makromolekul, jako jsou např. enzymy, bílkoviny, vitaminy. Tyto směsi jsou schopné redukovat iontové stříbro. Metody se rozvíjí tímto směrem, protože jsou snahy produkovat nanočástice, nejen stříbra, ekologicky šetrnými postupy, při nichž by nevznikaly toxické vedlejší produkty[15].

## 5.2 Aplikace nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra nacházejí praktické uplatnění v mnoha oblastech díky jedinečným fyzikálně-chemickým vlastnostem. Důležitou roli hraje velikost částic, jejich tvar a míra stability. Mezi nejvýznamnější vlastnosti nanočástic stříbra, které se uplatňují při jejich aplikaci, se řadí optické a elektrické vlastnosti, katalytická a antimikrobiální aktivita.

### 5.2.1 *Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)*

Povrchem zesílený Ramanův rozptyl a povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl jsou velmi citlivé analytické metody, které našly uplatnění v mnoha oblastech diagnostiky i výzkumu. Adsorpcí molekul analytu na povrch koloidní částice dochází k povrchovému zesílení signálu molekuly. Z dosavadního zkoumání plyne, že k zesílení signálu dochází pomocí 2 mechanismů: chemickým a elektromagnetickým. Chemický mechanismus je založen na přenosu náboje mezi adsorbovanou molekulou a povrchem kovu. Elektromagnetický mechanismus předpokládá zesílení elektromagnetické pole v okolí částic. Aplikací nanočástic stříbra lze dosáhnout zesílení signálu více než  $10^7$ krát[2].

### 5.2.2 *Katalyzátory*

Nanočástice ušlechtilých kovů se používají jako katalyzátory oxidace. Nanočástice stříbra se používají například při přípravě ethylenoxidu oxidací ethylenu. Katalytická aktivita je umožněna velkou plochou fázového rozhraní a je závislá na velikosti jednotlivých částic[2].

### 5.2.3 *Antibakteriální, fungicidní a antivirotická aktivita*

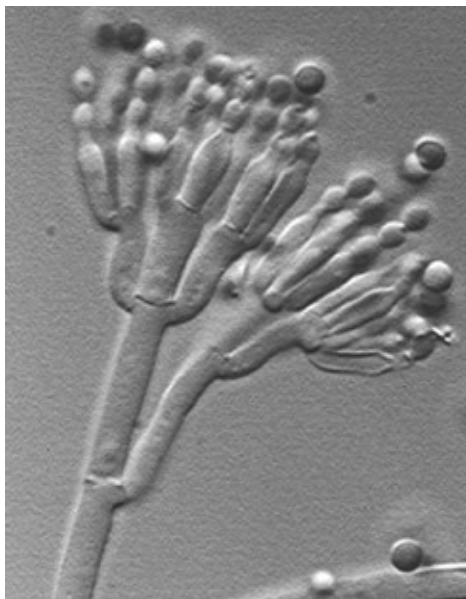
Antibakteriální aktivita stříbra je známa již po staletí. Od dob antického Řecka a Říma se používaly stříbrné nádoby na uchovávání a konzervaci vody i jiných tekutin, protože zajišťovaly jejich zdravotní nezávadnost. Elementární stříbro není toxické, ale při delším užívání sloučenin stříbra dochází k rozvoji argyrie tj. k nevratnému ukládání stříbra v orgánech, především v kůži a sliznicích, což způsobuje jejich šedé zbarvení[2].

Od 19. do počátku 20. století bylo koloidní stříbro používáno v mikrobiologii a v lékařství. S objevem penicilinu roku 1928 sirem A. Flemingem ustupuje do pozadí, protože výroba penicilinu byla značně levnější a množství potřebné k léčbě bylo několikanásobně nižší. Navíc bylo možné penicilin pohodlně a přesně dávkovat v tabletách.



Po objevu antibiotik tedy nebylo třeba dále se věnovat výzkumu a aplikaci nanočástic stříbra proti bakteriím[2].

Hojné užívání antibiotik v druhé polovině 20. století přineslo i jeden významný negativní aspekt, a sice vznik rezistence bakterií na tato antibiotika. Proto se opět výzkum obrací k nanočásticím stříbra, protože u nich zatím nebyla objevena jakákoliv získaná rezistence patogenní bakterií.



**Obr. 16** *Penicillium*

Zdroj: <http://library.thinkquest.org/C005271F/Penicillin.html>

Zároveň bylo zjištěno, že antibakteriální aktivita úzce souvisí s velikostí nanočástic. Malé částice mají větší povrch, a proto vykazují vyšší antibakteriální aktivitu. Největšího antibakteriálního efektu dosahovaly částice s velikostí 25nm připravené modifikovaným Tollensovým procesem s použitím maltosy jako redukčního činidla. Antibakteriální aktivita byla testována na G-pozitivních i G-negativních bakteriích zahrnujících i multirezistentní kmeny jako je např. methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*[16].

Z dosavadních výzkumů také plyne, že na antibakteriální aktivitu nanočástic stříbra má vliv i tvar částic. Nanočástice stříbra různých tvarů mají na bakteriální buňku různý vliv. Nanočástice trojúhelníkového tvaru vykazují inhibici bakteriálního růstu již při obsahu 1  $\mu\text{g}$  stříbra, zatímco nanočástice kulovitého tvaru vykazují inhibici růstu bakterií až při obsahu 12.5  $\mu\text{g}$  stříbra a nanočástice tyčinkovitého tvaru vykazují inhibiční vlastnosti dokonce až při 50 to 100  $\mu\text{g}$  obsahu stříbra[17].

Byly také provedeny studie zkoumající antibakteriální vlastnosti stříbra v kombinaci s antibiotiky. Kombinací působení nanočástic stříbra spolu s antibiotiky bylo dosaženo zvýšené účinnosti antibiotik (Ampicillin, Kanamycin, Erythromycin, Chloramphenicol). Získané hodnoty MIC nanočástic stříbra byly 30, 35, 80 a 65 ( $\mu\text{g/ml}$ ) pro *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus*[18].

Praktických aplikací antibakteriální aktivity nanočástic stříbra existuje velká řada. Běžně na trhu jsou dostupné tkaniny, ať už přírodní nebo syntetické, které mají ve své struktuře zakomponované nanočástice stříbra. Můžete si tak koupit tričko nebo ponožky s antibakteriální úpravou. V medicínské oblasti našly uplatnění obvazy či náplasti používané při léčbě popálenin[19].

Další možností využití nanočástic stříbra v lékařství je tvorba biofilmů na bázi sloučenin stříbra a nanočástic stříbra. Těmito filmy jsou poté potaženy například katetry, kanyly nebo protézy, které se následně používají například na jednotkách intenzivní péče ke snížení rizika komplikací spojených s bakteriální infekcí[20].

Fungicidní aktivita nanočástic stříbra byla prokázána proti plísni *Candida spp.* Tato plíseň je původcem plísňových infekcí, které mohou způsobovat otravu krve. Fungistatická aktivita nestabilizovaných nanočástic stříbra o velikosti 25nm byla prokázána v koncentraci 0,21 $\mu\text{g/ml}$  až 1,69 $\mu\text{g/ml}$  v závislosti na druhu *Candida*. U nanočástic stabilizovaných surfaktanty a polymery byla fungistatická koncentrace výrazně nižší, než u nestabilizovaných částic. Pohybovala se v rozmezí 0,054 – 0,84 $\mu\text{g/ml}$  v závislosti na druhu[21].

V jiné studii byly použity nanočástice Ag-SiO<sub>2</sub> pro zkoumání fungicidní aktivity. Jako testovaný organismus byla zvolena plíseň *Botrytis cinerea* způsobující značné škody na vinicích či v ovocných školkách. Při koncentracích 10, 50 a 100ppm byla zjištěna účinnost 65.0, 99.9 a 99.9%[22].

Studii zkoumajících antivirotickou aktivitu nanočástic stříbra nebylo publikováno mnoho. Těžko soudit, zda proto, že se tomu tématu nevěnuje příliš mnoho výzkumných skupin, nebo protože nebyl prokázán antivirotický efekt nanočástic stříbra. Roku 2005 byl

publikován první článek popisující studium interakce nanočástic stříbra s virem HIV-1. V této studii byly použity nanočástice o velikosti 1-10nm. Prostorové uspořádání nanočástic, vzdálenost jednotlivých částic od sebe a fakt, že se navázaly na zbytky glykoproteinů v místě s rezidui síry dává možnost předpokládat, že nanočástice stříbra reagují s virem HIV-1 pomocí glykoproteinových zbytků gp120. Díky této interakci mohou nanočástice stříbra inhibovat vazbu viru na hostitelskou buňku. Tato domněnka byla prokázána v *in vitro* testu[23].

Pět let po této studii byl publikován další článek věnující se interakci nanočástic stříbra s virem HIV-1. Zároveň byla studována i cytotoxicita nanočástic stříbra na buněčných liniích HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal, MT-2 a PBMC. Pro tyto buněčné linie byla stanovena 50% cytotoxická koncentrace ( $CC_{50}$ )  $3.9 \pm 1.6$ mg/ml pro HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal,  $1.11 \pm 0.32$ mg/ml pro PBMC a  $1.3 \pm 0.58$ mg/ml pro MT-2. Velikost použitých částic byla 30-50nm. Koncentrace nanočástic stříbra, které inhibují infekci v 50% ( $IC_{50}$ ) se pohybovala v rozmezí 0.44 - 0,91mg/ml. Mechanismus účinku byl navržen stejný, jako ve výše uvedené studii tzn. vazba na gp120-CD4 receptor a inhibice vazby na hostitelskou buňku[24].

Dále byla zkoumána interakce nanočástic stříbra s virem hepatitis B. Pro tato zkoumání byly použity částice o velikosti 10 a 50nm a buněčná linie HepAD38. Dle získaných výsledků byla vyslovena hypotéza, že nanočástice stříbra mohou zabránit transkripci virální RNA přímou vazbou nebo interakcí s HBV (hepatitis B virus) dvouvláknová DNA, která slouží jako templát pro syntézu RNA. Zároveň byla prokázána schopnost nanočástic dobře se vázat na viriony[25].

Jiná studie zkoumala inhibiční efekt nanočástic stříbra na virus chřipky A/H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>. Schopnost nanočástic stříbra inhibovat virus chřipky byla určena na buněčné linii MDCK.  $CC_{50}$  byla stanovena 1 $\mu$ g/ml a efektivní minimální inhibiční cytotoxická koncentrace, při které byl nejvíce patrný cytopatický efekt buněk byla 0.5 $\mu$ g/ml. Z experimentů plyne, že nanočástice stříbra mohou do určité míry inhibovat interakci glykoproteinových zbytků na povrchu viru a protilátek. Díky tomu lze předpokládat případné užití nanočástic stříbra jako složku desinfekčních prostředků stejně tak jako antiseptik sloužících jako prevence virových onemocnění[26].

## 6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

---

### 6.1 Použité chemikálie

Pro přípravu koloidního stříbra byly použity tyto chemikálie: hydroxid sodný (p.a., Lach-Ner s.r.o.), amoniak (p.a., vodný roztok, min. 25 % (v/v), (Lach-Ner s.r.o.), dusičnan stříbrný (p.a., Tamda a.s.), D(+) - maltosa monohydrát (p.a., Riedel-de Haën), destilovaná voda, sodná sůl polyakrylové kyseliny (35% roztok, mol.hmotnost 1200, p.a., Sigma-Aldrich), tetrahydroboritan sodný, (p.a., Sigma-Aldrich)

Použité stabilizátory: želatina (p.a., Lachner), sodium-dodecyl-sulfát (p.a., Sigma-Aldrich), polyvinylpyrrolidon s molekulovou hmotností 360000 (p.a., Sigma-Aldrich), kyselina polyakrylová s molekulovou hmotností 100000 (p.a., Sigma-Aldrich), Kasein (p.a., Sigma-Aldrich), Tween 80 (p.a., Sigma-Aldrich).

Pro experimenty s bakteriemi byly použity tyto chemikálie: médium Brain heart infusion (Merck), médium Müller-Hinton (Oxoid Merck), fyziologický roztok (0.9% roztok NaCl, B Braun), fosfátový pufr (Sigma), čokoládový agar (Biomérieux)

Pro experimenty s viry byly použity tyto chemikálie: růstové médium DMEM s 4,5g/l glukosy (Lonza), glutamin L-9 (Lonza), trypsin (Lonza), hydrolizado (Lonza), bicarbonate (Lonza), pyruvate (Lonza), antibiotika L-7 (Lonza)

### 6.2 Použité mikroorganismy

Pro experimenty s bakteriemi byly použity tyto mikroorganismy:

*Salmonella enteritis* LT2 – komerční kultura, referenční kmen (Difco), *Staphylococcus aureus* – komerční kultura, referenční kmen (Biomérieux), *Salmonella enteritis* GN2303 – pták, *Salmonella typhimurium* GN0448 – prase, *Streptococcus dysagalatae* GP1019 – kráva, *Enterococcus faecalis* GP1001 – králík, *Streptococcus uberis* GP1037 – kráva, *Escherichia coli* GN2482 – kravské mléko, *Escherichia coli eae*<sup>+</sup> GN2514 – králík, *Haemophilus parasuis* CT175L – prase, *Haemophilus parasuis* ER-GP, *Haemophilus parasuis* PC4-GP, *Haemophilus parasuis* Naga – referenční kmen virulentní, *Haemophilus parasuis* SW114 – referenční kmen, *Haemophilus parasuis* F9

Pro experimenty s viry byl použit virus: prasečí chřipka H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> SF32.112C koncentrace 500 000 buněk/ml

Pro experimenty s viry byla použita buněčná linie: MDCK (*Madin Darby canine kidney*) 9.10<sup>6</sup> buněk

### 6.3 Příprava koloidního stříbra

Disperze koloidního stříbra o koncentraci 108 μg/ml byla připravena metodou redukce diamminstříbrného komplexu maltosou v přítomnosti roztoku hydroxidu sodného[27]. Za stálého míchání bylo k 20ml 0,005M roztoku AgNO<sub>3</sub> přidáno 5ml 0,1M roztoku NH<sub>3</sub>, 51ml destilované vody, 4ml 0,24M roztoku NaOH a 20ml 0,05M roztoku maltosy. Velikost takto připravených nanočástic byla 30nm.

Dále jsem měla k dispozici disperzi koloidního stříbra o koncentraci 1080 μg/ml stříbra, která byla připravena rychlým přidavkem 50ml 62,5mM roztoku NaBH<sub>4</sub> za stálého míchání ke 200ml 12,5mM roztoku AgNO<sub>3</sub> obsahujícího sodnou sůl kyseliny polyakrylové o molekulové hmotnosti 1200. Finální molární poměr monomerních jednotek použitého polymeru a iontů stříbra byl 1:2. Velikost takto připravených částic byla 20nm.

Připravené koloidní stříbro s částicemi o velikosti 30nm bylo stabilizováno proti agregaci, ke které docházelo při interakci s růstovým médiem. Jako stabilizátory byly použity želatina (G), kasein (KAS), sodium dodecylsulfát (SDS), polyvinylpyrrolidon (PVP), kyselina polyakrylová (PAC) a Tween 80 (TW) o výsledné koncentraci 1% (w/w). Stabilizace byla provedena smícháním zásobních roztoků stabilizátorů s připraveným roztokem koloidního stříbra.

### 6.4 Laboratorní vybavení

Velikost připravených nanočástic stříbra byla měřena na přístroji Zeta Potential Analyzer Zeta Plus (Brookhaven Instr. Co., USA).

Při práci s mikroorganismy byly použity sterilní jednorázové plastové zkumavky (Falcon), Petriho misky, očkovací kličky (VWR International), eppendorfky (Eppendorf) a automatické pipety 10 - 1000 μl (Gilson). Koncentrace inokula byla určována dle McFahrlanda (Vitek colorimeter). Pro sterilizaci kultivačních médií a laboratorního vybavení byl použit autokláv (Steam Sterilizer , Raypa). Ke stanovení minimální inhibiční koncentrace

byly použity mikrotitrační destičky (Nunc). Kultivace mikroorganismů probíhala v inkubátoru HERA cell 150 (Thermo electron corporation). Veškeré experimenty byly prováděny za sterilních podmínek v kabině Telstar (Biostar). Inkubace mikrotitračních destiček s bakteriální suspenzí pro stanovení MIC probíhala v inkubátoru s možností třepání (Innova 4300 incubator shaker, New Brunswick Scientific.)

Minimální inhibiční koncentrace byly stanovovány jak vizuálně tak pomocí spektrofotometru (Power Wave XS, Bio-Tek). Při experimentech s viry byl použit mikroskop Nikon eclipse TS 1000 a fotoaparát Nikon Coolpix 5-400.

## **6.5 Metody a zpracování**

### **6.5.1 *Studium antibakteriální aktivity nanočástic stříbra***

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla zvolena standardní diluční mikrometoda, která je standardní metodou k vyšetření kvantitativní citlivosti bakterií k antibiotikům.

Pevné kultivační a pomnožovací médium (čokoládový agar) bylo použito komerčně dodávané. Nebyla třeba jakákoliv další úprava. Tekutá média BHI a Müller-Hinton byla připravena dle návodu od výrobce a následně sterilizována v autoklávu. Tekutá média se uchovávala v lednici při teplotě zhruba 5°C.

Ze z hluboce zmrazené bakteriální kultury byly bakteriální buňky očkovací kličkou naneseny na čokoládový agar (křížový roztěr). Takto naočkované médium bylo uloženo do inkubátoru v obrácené poloze tzn. víčkem na podložce, z důvodu zamezení stékání zkondenzovaných par na bakteriální kulturu. Inkubátor byl nastaven na 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Inkubační doba byla 24 - 48h v závislosti na bakteriální kultuře.

Inokulum bylo připraveno z pomnožené bakteriální kultury vyrostlé na čokoládovém agaru. Kolonie buněk byly z agaru přeneseny do zkumavky s fyziologickým roztokem vyžíhanou očkovací kličkou. Buňky byly do fyziologického roztoku uvolňovány otíráním kličky o střenu zkumavky v kapce roztoku. Následně bylo inokulum důkladně promícháno.

Přibližný počet buněk v inokulu byl stanoven nepřímou metodou měření zákalu vytvořeného buňkami v tekutém médiu, který odpovídá jejich koncentraci dle stupnice

McFarland. Připravené inokulum obsahovalo přibližně  $15 \times 10^8$  buněk/ml. Pro stanovení MIC bylo toto inokulum zředěno 1:50.

Standardní mikrodiluční metodou byl testován vliv nestabilizovaného a různými stabilizátory stabilizovaného koloidního stříbra o výchozí koncentraci 1080  $\mu\text{g/ml}$  a 108  $\mu\text{g/ml}$  na různé bakteriální kmeny.

- Do eppendorfek bylo napipetováno 200  $\mu\text{l}$  růstového média (BHI nebo Müller-Hinton v závislosti na bakterii). Do první eppendorfky bylo napipetováno 200  $\mu\text{l}$  roztoku nanočástic stříbra/nanočástic stříbra stabilizovaných 1%(w/w) stabilizátoru/slepého roztoku neobsahujícího NPs. Směs v eppendorfce byla důkladně promíchána a z této směsi bylo odpipetováno 200  $\mu\text{l}$  do v pořadí druhé eppendorfky. Tímto způsobem byla připravena série zředění od 1:2 po 1:32.
- Z každé eppendorfky bylo napipetováno 180  $\mu\text{l}$  směsi do jamky na řádně označené mikrotitrační destičce. Jako pozitivní kontrola bylo použito čisté růstové médium, také 180  $\mu\text{l}$ .
- Do každé jamky bylo napipetováno 20  $\mu\text{l}$  bakteriální suspenze.
- Mikrotitrační destička byla vložena do uzavratelného igelitového sáčku s kouskem navlhčeného ubrousku a vložena do třepačky. Teplota byla nastavena na 37°C a rychlost 220rpm.
- Následujícího dne byl vyhodnocen růst bakterie vizuálně a spektrofotometricky na základě optické hustoty vzorku.

### **6.5.2 Studium antivirotické aktivity nanočástic stříbra**

První fází experimentu byla příprava buněčné linie MDCK. Připravené a pomnožené buňky se za přísně sterilních podmínek napipetují do jamek mikrotitrační destičky. Následně se přidá růstové médium a mikrotitrační destička se uloží do inkubátoru nastaveného na 37°C a 5%  $\text{CO}_2$ . Přibližně 2-3 dny se buňky dělí a vytvářejí jednovrstevný film na dně jamek mikrotitračních destiček. Po uplynulé době je třeba stav buněk zhodnotit vizuálně s použitím mikroskopu. Je-li vrstva souvislá, je možné buněčnou kulturu použít pro experiment.

- Z mikrotitračních destiček byl vyhozen přebytek média a každá buňka na destičce byla promyta PBS. V ideálním případě se nechává PBS v mikrotitrační destičce i několik hodin a promytí se opakuje 2-3x

- ředění roztoků nanočástic stříbra- 10,8μg/ml+1% želatina, 10,8μg/ml+0,1% želatina, 5,4μg/ml+1% želatina, 5,4μg/ml+0,1% želatina. Negativní kontrola-1% želatina, 0,1% želatina.
- Ředění trypsinu- 1:10 na finální koncentraci 1μg/ml(900μl PBS+9 μl trypsinu)
- Ředění viru- původní koncentrace viru byla 500 000buněk/ml a toto bylo naředěno do 6 zkumavek s PBS a trypsinem. Do 1. Bylo napipetováno 300μl viru, směs byla důkladně promíchána. Z této směsi bylo odpipetováno 300μl do 2.zkumavky a směs byla opět důkladně promíchána. Takto se postupovalo až k 6.zkumavce. Byly získány roztoky o koncentraci viru -1,-2,-3,-4,-5 a -6. Zkumavky s takto naředěným virem byly uloženy do inkubátoru nastaveného na teplotu 37°C po dobu 30min
- Do označených mikrotitračních destiček byly napipetovány připravené disperze nanočástic stříbra. Do každé jamky 20μl disperze nanočástic stříbra a 20μl roztoku viru. Takto připravené mikrotitrační destičky byly uloženy do inkubátoru nastaveného na teplotu 37°C po dobu 60min.
- Po uplynulé době bylo do každé jamky napipetováno 150μl postinfekčního media DMEM obsahující glutamin, antibiotika a trypsin(2μg/ml).
- Inkubace 7 dní při teplotě 37°C, čekání na průběh virové infekce
- Po uplynutí 7 dní vyhodnocení pokusu s použitím mikroskopu. Výsledkem je pozorování cytopatického efektu, kvantitavní vyhodnocení (titr viru) [28]



## 7 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 7.1 Antibakteriální aktivita

Při smíchání koloidu stříbra s roztokem růstového média byla pozorována změna barvy z oranžovohnědé na šedou. Tato změna barvy byla způsobena agregací nanočástic stříbra. Proto bylo nutné zabránit této agregaci použitím stabilizátoru. V prvních fázích experimentů bylo třeba zjistit, který z dostupných stabilizátorů je vhodný pro použití. V tabulce 2 jsou shrnuty hodnoty absorbance bakteriální suspenze. V levé části jsou disperze nanočástic stříbra obsahující stabilizátor o koncentraci 1%(w/w), v pravé části jsou roztoky stabilizátorů v destilované vodě. Ve spodním řádku jsou hodnoty absorbance bakteriální suspenze v růstovém médiu(Müller-Hinton) jako pozitivní kontrola růstu bakterií.

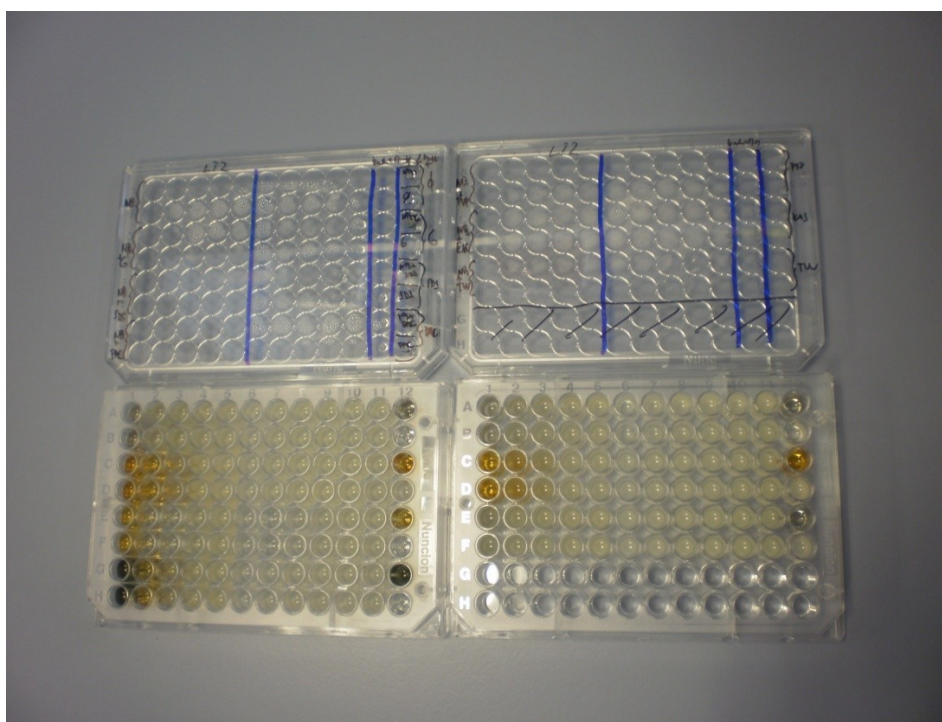
**Tab. 2** Hodnoty absorbance pro bakteriální suspenzi *Salmonella enteritis* LT2 s použitím různých stabilizátorů a s použitím koloidu o koncentraci 108 $\mu$ g/ml

	koncentrace koloidu v $\mu$ g/ml						koncentrace stabilizátoru (w/w)				
	54	27	13,5	6,75	3,375		0,5	0,25	0,125	0,062	0,031
<b>NPs</b>	0,282	1,106	1,181	1,092	1,051	<b>BLANK</b>	0,794	1,042	1,042	1,028	1,010
	0,243	1,144	1,102	1,089	1,088		0,968	1,062	1,053	1,116	0,984
<b>NPs+G</b>	0,101	0,081	1,041	1,090	1,097	<b>G</b>	0,849	1,099	1,189	1,164	1,163
	0,094	0,087	1,014	1,195	1,088		0,817	1,094	1,224	1,288	1,247
<b>NPs+SDS</b>	0,081	0,382	0,266	0,655	1,111	<b>SDS</b>	0,275	0,146	0,626	0,806	1,138
	0,131	0,131	0,239	0,660	1,150		0,161	0,101	0,599	0,821	1,187
<b>NPs+PAC</b>	0,701	0,084	0,791	0,894	0,985	<b>PAC</b>	0,435	0,840	0,945	1,111	1,005
	0,659	0,077	0,801	0,989	1,036		0,430	0,804	1,032	1,038	1,048
<b>NPs+PVP</b>	0,439	0,938	1,064	1,087	1,045	<b>PVP</b>	0,575	0,872	1,032	1,147	1,123
	0,231	0,900	1,015	1,073	1,145		0,646	0,899	1,007	1,183	1,052
<b>NPs+KAS</b>	0,094	0,797	0,864	0,869	1,030	<b>KAS</b>	1,049	1,160	1,233	1,138	1,172
	0,102	0,962	0,950	0,932	0,895		0,942	1,126	1,171	1,200	1,150
<b>NPs+TW</b>	1,025	1,257	1,255	1,230	1,247	<b>TW</b>	1,097	1,195	1,198	1,195	1,166
	1,377	1,274	1,255	1,221	1,279		1,092	1,165	1,195	1,192	1,201
bakt.+med.	0,988	1,041	0,986	0,990	0,995	1,083	1,036	1,276	1,061	1,177	1,093

Antibakteriální aktivita nanočástic stříbra stabilizovaných výše uvedenými stabilizátory i antibakteriální efekt samotných stabilizátorů byl hodnocen jak vizuálně tak spektrofotometricky. Pokud naměříme absorbanci do hodnoty zhruba 0,200 lze říci, že v dané jamce žádné bakterie nerostou. Vše se však musí porovnat s pozitivní kontrolou, protože každá bakterie roste v daných podmínkách různě a výsledek je tedy relativní a je třeba ho

podpořit vizuálním zhodnocením. Z výše uvedených čísel plyne že želatina, sodium-dodecylsulfát, kyselina polyakrylová, polyvinylpyrrolidon i kasein stabilizují nanočástice, nebyla pozorována agregace a antibakteriální efekt je patrný. U nestabilizovaných nanočástic antibakteriální efekt je, ale ne tak výrazný díky agregaci, která byla pozorována. Tween 80 však nestabilizuje úplně ideálně, byla pozorována agregace. Porovnáme-li hodnoty z levé části tabulky s hodnotami v části pravé, můžeme vidět, že roztoky SDS, PAC i PVP v destilované vodě hubí více či méně bakterie samy o sobě. Při naředění na koncentraci 0,25% se projevovává částečná inhibice růstu bakterií. U SDS byl pozorován mírný antibakteriální efekt při koncentraci 0,062%. Při těchto a vyšších koncentracích nelze odlišit antibakteriální efekt nanočástic stříbra od antibakteriálního efektu stabilizátoru a tyto stabilizátory nejsou optimální pro další použití.

Pro další experimenty je tedy vhodné použít pouze želatinu nebo kasein, protože samy o sobě nemají antibakteriální efekt a zamezují agregaci.



**Obr. 17** Mikrotitrační destička s bakteriální suspenzí a výše uvedenými stabilizátory (vlastní foto)

V další části je použito několik zkratk. NPs je nestabilizovaný koloid o koncentraci 108 $\mu$ g/ml a s velikostí částic 30 nm, NPs+G je koloid o koncentraci 108 $\mu$ g/ml a s velikostí částic 30 nm stabilizovaný želatinou. NPs1080 je koloid o koncentraci 1080 $\mu$ g/ml a

s velikostí nanočástic 20 nm stabilizovaný sodnou solí polyakrylové kyseliny. NPs108 je koloid o koncentraci 1080 $\mu$ g/ml stabilizovaný sodnou solí polyakrylové kyseliny (velikost nanočástic 20 nm), který byl naředěn destilovanou vodou před použitím na koncentraci 108  $\mu$ g/ml. 4 sloupce pro každý roztok znamenají opakování experimentu.

Jako pozitivní kontrola stability připraveného koloidu byla použita bakterie *Salmonella enteritis* LT2 z kultury. Použité médium pro tuto bakterii bylo Müller-Hinton. Byly provedeny experimenty i s médiem BHI se stejným výsledkem. MIC pro nestabilizované nanočástice je 54 $\mu$ g/ml (v tabulce podbarveno modře). Pro částice stabilizované želatinou je MIC 13,5 $\mu$ g/ml (v tabulce podbarveno fialově, viz. Tab.3). Je to proto, že po smíchání roztoku nanočástic stříbra s růstovým médiem byla pozorována agregace. Jakmile byly částice stabilizovány, agregace pozorována nebyla a antibakteriální efekt byl vyšší (viz. Tab. 2).

**Tab. 3** Hodnoty absorbance pro bakteriální suspenzi *Salmonella enteritis* LT2

Salmonella enteritis LT2								
$\mu$ g/ml	NPs	NPs	NPs	NPs	NPs+G	NPs+G	NPs+G	NPs+G
54	0,950	0,955	0,518	0,601	0,124	0,136	0,113	0,114
27	1,049	1,045	0,832	0,924	0,085	0,086	0,086	0,101
13,5	0,967	1,042	0,774	0,808	0,078	0,671	0,096	0,093
6,75	1,008	0,931	0,813	0,811	0,896	1,006	1,057	1,070
3,375	0,986	1,007	0,843	1,077	0,995	1,072	1,052	1,089
bakt.+medium	1,204	1,077	1,132	1,095	0,811	0,847	0,741	1,095

Jako druhá pozitivní kontrola byl použit *Staphylococcus aureus*. Použité médium pro tuto bakterii bylo Müller-Hinton. Nestabilizované částice neměly na tuto bakterii žádný vliv, tudíž není stanovena MIC resp. je vyšší než 54 $\mu$ g/ml. Pro částice stabilizované želatinou je MIC 6,75 $\mu$ g/ml (v tabulce podbarveno fialově). Kvantitativní vyhodnocení bylo podpořeno vizuálním, proto je zvolena jako MIC hodnota 6,75 a ne 3,375  $\mu$ g/ml (viz. Tab. 4)

**Tab.4** Hodnoty absorbance pro bakteriální suspenzi *Staphylococcus aureus*

<b>Staphylococcus aureus</b>								
µg/ml	NPs	NPs	NPs	NPs	NPs+G	NPs+G	NPs+G	NPs+G
54	1,188	1,208	1,061	0,893	0,105	0,105	0,132	0,129
27	1,254	1,227	1,148	1,165	0,106	0,084	0,091	0,097
13,5	1,277	1,226	1,112	0,970	0,093	0,097	0,082	0,095
6,75	1,195	1,232	1,200	0,948	0,079	0,077	0,069	0,062
3,375	1,213	1,230	0,957	0,933	0,088	0,888	0,100	0,642
bakt.+medium	1,265	1,269	1,238	1,258	1,272	1,252	1,112	1,118

Další experimenty probíhaly s „divokými“ kmeny bakterií, které byly technickými pracovníky institutu izolovány z živočišného materiálu. U každého kmene uvádím, ze kterého organismu byl izolován.

Použité médium pro bakterii *Salmonella enteritis* GN2303 bylo Müller-Hinton. Nestabilizované částice neměly na tuto bakterii žádný vliv, tudíž není stanovena MIC resp. je vyšší než 54µg/ml. Pro částice stabilizované želatinou je MIC 54µg/ml (v tabulce podbarveno fialově, viz. Tab.5). MIC pro druhý koloid byla stanovena na 33,27 resp. 27µg/ml za stejných podmínek (viz. Tab.6)

**Tab.5** Hodnoty absorbance pro bakteriální suspenzi *Salmonella enteritis* GN2303

<b>Salmonella enteritis GN2303 pták</b>								
µg/ml	NPs	NPs	NPs	NPs	NPs+G	NPs+G	NPs+G	NPs+G
54	0,904	1,079	1,071	1,179	0,094	0,098	0,105	0,125
27	0,439	0,616	1,078	1,066	1,006	1,200	1,299	1,251
13,5	0,618	0,641	1,009	0,970	1,180	1,198	1,202	1,207
6,75	0,629	0,527	0,936	0,998	1,173	1,172	1,189	1,146
3,375	0,740	0,873	0,938	0,961	1,141	1,151	1,156	1,132
bakt.+medium	0,819	0,860	0,964	1,000	1,126	1,064	1,097	1,094

**Tab.6** Hodnoty absorbance pro bakteriální suspenzi *Salmonella enteritis* GN2303

Salmonella enteritis GN2303 pták									
µg/ml	NPs1080	NPs1080	NPs1080	NPs1080	µg/ml	NPs108	NPs108	NPs108	NPs108
540	0,459	0,466	0,611	0,599	54	0,110	0,118	0,121	0,121
270	0,358	0,361	0,406	0,423	27	0,103	0,105	0,102	0,106
135	0,225	0,219	0,347	0,334	13,5	0,465	0,591	0,503	0,598
67,5	0,168	0,179	0,177	0,187	6,75	0,547	0,770	0,621	0,639
33,75	0,128	0,127	0,128	0,141	3,375	0,616	0,789	0,805	1,004
16,88	0,448	0,447	0,526	0,881	1,69	0,707	0,719	0,799	0,844
8,44	0,701	0,678	0,970	0,944	0,84	0,804	0,803	0,785	0,776
4,22	0,781	0,763	0,737	1,084	0,42	0,837	0,981	1,073	1,186
2,11	0,879	0,809	0,824	1,162	0,21	0,779	0,821	0,805	0,996
bakt.+med.	0,949	0,901	0,905	0,825	bakt.+med.	0,956	0,834	0,844	0,994

Použité médium pro bakterii *Salmonella typhimurium* GN0448 bylo Müller-Hinton. Nestabilizované částice neměly na tuto bakterii žádný vliv, tudíž není stanovena MIC resp. je vyšší než 54µg/ml. Pro částice stabilizované želatinou je MIC 54µg/ml (v tabulce podbarveno fialově, viz. Tab.7). MIC pro druhý koloid byla stanovena na 33,27 resp. 27µg/ml za stejných podmínek. Absorbance při koncentracích 540µg/ml je vyšší, protože je koloid koncentrovaný a částice pohlcují záření. Absorbance koloidu o koncentraci 540µg/ml smíchaného s médiem byla 0,418. Proto je MIC stanovena 33,27µg/ml (viz. Tab.8).

**Tab.7** Hodnoty absorbance bakteriální suspenze *Salmonella typhimurium* GN0448

Salmonella typhimurium GN0448 prase								
µg/ml	NPs	NPs	NPs	NPs	NPs+G	NPs+G	NPs+G	NPs+G
54	0,768	0,916	0,973	1,03	0,095	0,128	0,123	0,199
27	0,625	0,695	1,124	1,058	0,622	0,768	1,178	1,110
13,5	0,698	0,745	1,102	1,076	0,754	0,709	1,069	1,098
6,75	0,786	0,772	1,101	1,078	0,764	0,910	1,150	1,343
3,375	0,963	0,585	1,092	1,105	0,888	0,885	1,335	1,355
bakt.+medium	1,169	1,219	1,185	1,109	1,169	1,219	1,185	1,109

**Tab.8** Hodnoty absorbance bakteriální suspenze *Salmonella typhimurium* GN0448

**Salmonella typhimurium GN0448 prase**

µg/ml	NPs1080	NPs1080	NPs1080	NPs1080	µg/ml	NPs108	NPs108	NPs108	NPs108
540	0,462	0,487	0,584	0,557	54	0,110	0,118	0,118	0,142
270	0,339	0,356	0,398	0,399	27	0,101	0,107	0,102	0,127
135	0,220	0,230	0,224	0,277	13,5	0,468	0,532	0,073	0,847
67,5	0,160	0,181	0,170	0,176	6,75	0,577	0,632	0,939	0,943
33,75	0,121	0,122	0,122	0,128	3,375	0,581	0,554	1,098	1,087
16,88	0,430	0,624	0,855	0,933	1,69	0,737	0,749	0,925	1,190
8,44	0,483	0,635	0,599	0,940	0,84	0,824	0,818	1,146	1,200
4,22	0,595	0,633	0,769	0,996	0,42	0,870	0,868	1,099	1,188
2,11	0,708	0,773	1,288	1,208	0,21	0,868	0,909	1,213	1,014
bakt.+med.	0,986	0,962	1,030	1,173	bakt.+med.	0,928	0,976	1,228	1,349

První použité médium pro bakterii *Streptococcus dysagalatae* bylo Müller-Hinton (v tabulce podbarveno zeleně), ale protože bakterie v těchto podmínkách nerostla dobře, rozhodla jsem se vyměnit médium a pro další experimenty bylo použito BHI (v tabulce podbarveno šedě). Nestabilizované částice neměly na tuto bakterii žádný vliv, tudíž není stanovena MIC resp. je vyšší než 54µg/ml. Pro částice stabilizované želatinou je MIC 54µg/ml (v tabulce podbarveno fialově, viz. Tab.9). MIC pro koloid druhý koloid byla stanovena na 16,88 resp. 13,5µg/ml za stejných podmínek (viz. Tab.10).

**Tab.9** Hodnoty absorbance bakteriální suspenze *Streptococcus dysagalatae* GP1019

**Streptococcus dysagalatae GP1019 kráva**

µg/ml	NPs	NPs	NPs	NPs	NPs+G	NPs+G	NPs+G	NPs+G
54	0,361	0,318	0,448	0,624	0,093	0,099	0,093	0,100
27	0,277	0,278	0,583	0,382	0,544	0,538	0,609	0,455
13,5	0,225	0,239	0,368	0,356	0,311	0,326	0,362	0,349
6,75	0,193	0,198	0,352	0,333	0,238	0,271	0,262	0,242
3,375	0,138	0,121	0,349	0,376	0,262	0,242	0,288	0,257
bakt.+medium	0,225	0,139	0,293	0,319	0,301	0,239	0,285	0,357

**Tab.10** Hodnoty absorpance bakteriální suspenze *Streptococcus dysgalatiae* GP1019

Streptococcus dysgalatiae GP1019 kráva									
µg/ml	NPs1080	NPs1080	NPs1080	NPs1080	µg/ml	NPs108	NPs108	NPs108	NPs108
540	0,508	0,498	0,512	0,512	54	0,110	0,110	0,108	0,108
270	0,334	0,409	0,331	0,338	27	0,091	0,092	0,093	0,092
135	0,239	0,240	0,245	0,237	13,5	0,067	0,070	0,609	0,068
67,5	0,154	0,154	0,152	0,155	6,75	0,403	0,389	0,425	0,380
33,75	0,116	0,119	0,120	0,117	3,375	0,342	0,309	0,397	0,365
16,88	0,084	0,084	0,084	0,083	1,69	0,285	0,338	0,343	0,441
8,44	0,291	0,182	0,753	0,262	0,84	0,254	0,283	0,288	0,356
4,22	0,361	0,351	0,631	0,437	0,42	0,773	0,309	0,305	0,300
2,11	0,366	0,292	0,431	0,410	0,21	0,259	0,237	0,334	0,446
bakt.+med.	0,273	0,237	0,292	0,273	bakt.+med.	0,290	0,254	0,430	0,275

První použité médium pro bakterii *Enterococcus faecalis* bylo Müller-Hinton (v tabulce podbarveno zeleně), ale protože bakterie v těchto podmínkách nerostla dobře, rozhodla jsem se vyměnit médium a pro další experimenty bylo použito BHI (v tabulce podbarveno šedě). Nestabilizované částice neměly na tuto bakterii žádný vliv, tudíž není stanovena MIC resp. je vyšší než 54µg/ml. Pro částice stabilizované želatinou je MIC 54µg/ml (v tabulce podbarveno fialově, viz.Tab.11). MIC pro koloid druhý koloid byla stanovena na 16,88 resp. 13,5µg/ml za stejných podmínek (viz.Tab.12)

**Tab.11** Hodnoty absorpance bakteriální suspenze *Enterococcus faecalis* GP1001

Enterococcus faecalis GP1001 králík									
µg/ml	NPs	NPs	NPs	NPs	NPs+G	NPs+G	NPs+G	NPs+G	NPs+G
54	0,436	0,488	0,646	0,617	0,090	0,090	0,090	0,096	0,096
27	0,457	0,473	0,814	0,792	0,485	0,446	0,438	0,461	0,461
13,5	0,410	0,402	0,813	0,770	0,661	0,646	0,578	0,589	0,589
6,75	0,383	0,350	0,712	0,815	0,560	0,603	0,579	0,622	0,622
3,375	0,336	0,297	0,782	0,779	0,526	0,577	0,551	0,520	0,520
bakt.+medium	0,228	0,242	0,792	0,834	0,652	0,557	0,620	0,664	0,664

**Tab.12** Hodnoty absorbance bakteriální suspenze *Enterococcus faecalis* GP1001

Enterococcus faecalis GP1001 králík									
µg/ml	NPs1080	NPs1080	NPs1080	NPs1080	µg/ml	NPs108	NPs108	NPs108	NPs108
540	0,401	0,425	0,454	0,465	54	0,111	0,117	0,119	0,121
270	0,293	0,303	0,324	0,324	27	0,096	0,099	0,098	0,104
135	0,198	0,209	0,221	0,218	13,5	0,071	0,078	0,073	0,076
67,5	0,149	0,154	0,151	0,155	6,75	0,677	0,689	0,600	0,602
33,75	0,114	0,118	0,115	0,120	3,375	0,624	0,607	0,641	0,586
16,88	0,080	0,084	0,082	0,085	1,69	0,782	0,722	0,643	0,659
8,44	0,633	0,720	0,517	0,612	0,84	0,739	0,692	0,630	0,637
4,22	0,679	0,772	0,512	0,625	0,42	0,590	0,677	0,654	0,583
2,11	0,790	0,808	0,469	0,583	0,21	0,717	0,711	0,655	0,644
bakt.+med.	0,602	0,604	0,419	0,414	bakt.+med.	0,661	0,645	0,420	0,458

První použité médium pro bakterii *Streptococcus uberis* bylo Müller-Hinton (v tabulce podbarveno zeleně), ale protože bakterie v těchto podmínkách nerostla dobře, rozhodla jsem se vyměnit médium a pro další experimenty bylo použito BHI (v tabulce podbarveno šedě). Jak nestabilizované tak stabilizované částice nevykazovaly antibakteriální aktivitu, tudíž není stanovena MIC resp. Je vyšší než 54µg/ml (viz.Tab.13). MIC pro koloid druhý koloid byla stanovena na 33,75 resp.27µg/ml za stejných podmínek (viz.Tab.14).

**Tab. 13** Hodnoty absorbance bakteriální suspenze *Streptococcus uberis* GP1037

Streptococcus uberis GP1037 – kráva								
µg/ml	NPs	NPs	NPs	NPs	NPs+G	NPs+G	NPs+G	NPs+G
54	0,441	0,442	0,630	0,640	1,175	0,895	0,844	1,095
27	0,457	0,504	0,722	0,734	0,927	0,874	1,138	1,212
13,5	0,489	0,585	0,806	0,783	0,870	0,914	1,129	1,066
6,75	0,642	0,647	0,830	0,805	0,913	0,901	1,092	1,008
3,375	0,799	0,722	0,794	0,796	1,022	0,950	0,920	0,881
bakt.+medium	0,696	0,557	0,826	0,908	0,931	0,899	0,974	0,993



**Tab. 14** Hodnoty absorbance bakteriální suspenze *Streptococcus uberis* GP1037

Streptococcus uberis GP1037 – kráva									
µg/ml	NPs1080	NPs1080	NPs1080	NPs1080	µg/ml	NPs108	NPs108	NPs108	NPs108
540	0,434	0,430	0,457	0,473	54	0,118	0,119	0,118	0,139
270	0,303	0,311	0,319	0,320	27	0,097	0,141	0,102	0,123
135	0,208	0,209	0,215	0,217	13,5	0,965	0,951	0,882	0,885
67,5	0,156	0,154	0,153	0,157	6,75	0,868	0,917	0,957	0,879
33,75	0,118	0,126	0,126	0,183	3,375	0,803	0,777	0,954	0,880
16,88	1,055	1,033	1,050	1,120	1,69	0,982	0,987	0,932	0,972
8,44	1,023	1,023	1,051	0,812	0,84	0,938	0,936	0,926	0,975
4,22	0,896	1,030	0,974	0,998	0,42	0,938	0,893	0,946	0,974
2,11	0,954	0,937	1,018	0,908	0,21	0,952	0,825	0,883	0,881
bakt.+med.	0,922	1,012	0,796	0,840	bakt.+med.	0,949	0,998	0,913	0,737

Použité médium pro bakterii *Escherichia coli* bylo Müller-Hinton. Nestabilizované částice neměly na tuto bakterii žádný vliv, tudíž není stanovena MIC resp. je vyšší než 54µg/ml. Pro částice stabilizované želatinou je MIC 27µg/ml (v tabulce podbarveno fialově, viz. Tab.15). MIC pro koloid druhý koloid byla stanovena na 33,75 resp. 27µg/ml za stejných podmínek (viz. Tab.16).

**Tab. 15** Hodnoty absorbance bakteriální suspenze *Escherichia coli* GN2482

Escherichia coli GN2482 kravské mléko								
µg/ml	NPs	NPs	NPs	NPs	NPs+G	NPs+G	NPs+G	NPs+G
54	0,949	1,069	1,330	1,241	0,105	0,103	0,141	0,117
27	1,411	1,433	1,411	1,419	0,087	0,085	0,090	0,123
13,5	1,342	1,416	1,383	1,464	1,360	1,196	1,302	1,297
6,75	1,460	1,407	1,395	1,327	1,309	1,305	1,300	1,298
3,375	1,354	1,469	1,353	1,432	1,270	1,330	1,300	1,318
bakt.+medium	1,514	1,497	1,494	1,465	1,509	1,349	1,339	1,352

**Tab. 16** Hodnoty absorbance bakteriální suspenze *Escherichia coli* GN2482

Escherichia coli GN2482 kravské mléko									
µg/ml	NPs1080	NPs1080	NPs1080	NPs1080	µg/ml	NPs108	NPs108	NPs108	NPs108
540	0,530	0,534	0,591	0,612	54	0,113	0,114	0,120	0,125
270	0,341	0,355	0,408	0,406	27	0,103	0,104	0,103	0,107
135	0,265	0,212	0,232	0,304	13,5	0,078	0,554	0,078	0,768
67,5	0,166	0,166	0,177	0,179	6,75	0,841	0,051	0,581	0,947
33,75	0,124	0,126	0,123	0,129	3,375	1,024	1,147	1,005	1,132
16,88	0,898	0,908	0,091	0,719	1,69	1,174	1,321	1,284	1,226
8,44	0,922	0,898	0,904	1,009	0,84	1,308	1,323	1,258	1,321
4,22	1,028	1,079	1,030	1,048	0,42	1,322	1,365	1,307	1,428
2,11	1,119	1,195	1,282	1,164	0,21	1,292	1,344	1,314	1,369
bakt.+med.	1,396	1,392	1,418	1,460	bakt.+med.	1,427	1,393	1,492	1,462

Použité médium pro bakterii *Escherichia coli eae<sup>+</sup>* bylo Müller-Hinton. Nestabilizované částice neměly na tuto bakterii žádný vliv, tudíž není stanovena MIC resp. je vyšší než 54µg/ml. Pro částice stabilizované želatinou je MIC 13,5µg/ml (v tabulce podbarveno fialově, viz.Tab.17). MIC pro druhý koloid byla stanovena na 8,44 resp.6,75µg/ml za stejných podmínek (viz.Tab.18).

**Tab. 17** Hodnoty absorbance bakteriální suspenze *Escherichia coli eae<sup>+</sup>* GN2514

Escherichia coli eae <sup>+</sup> GN2514 králík								
µg/ml	NPs+G	NPs	NPs	NPs	NPs+G	NPs+G	NPs+G	NPs+G
54	1,104	1,097	0,84	0,649	0,124	0,994	0,117	0,129
27	0,922	0,914	0,888	0,992	0,085	0,994	0,084	0,089
13,5	0,950	0,798	0,990	0,956	0,129	0,488	0,082	0,626
6,75	0,881	0,881	0,904	0,865	0,821	1,208	0,964	0,928
3,375	0,844	0,883	0,935	0,996	1,070	0,051	1,029	1,150
bakt.+medium	1,126	1,047	1,028	0,866	1,179	1,199	0,973	1,039

**Tab. 18** Hodnoty absorbance bakteriální suspenze *Escherichia coli eae*<sup>+</sup> GN2514

Escherichia coli eae <sup>+</sup> GN2514 králík									
µg/ml	NPs1080	NPs1080	NPs1080	NPs1080	µg/ml	NPs108	NPs108	NPs108	NPs108
540	0,493	0,509	0,555	0,551	54	0,110	0,118	0,120	0,125
270	0,345	0,353	0,390	0,407	27	0,101	0,103	0,103	0,108
135	0,233	0,256	0,294	0,266	13,5	0,077	0,078	0,080	0,083
67,5	0,166	0,172	0,174	0,175	6,75	0,071	0,057	0,055	0,056
33,75	0,119	0,124	0,121	0,125	3,375	0,595	0,772	0,742	0,935
16,88	0,087	0,090	0,088	0,088	1,69	0,936	0,872	1,058	1,079
8,44	0,060	0,061	0,056	0,055	0,84	1,012	0,893	1,136	0,914
4,22	0,046	0,293	0,723	0,863	0,42	0,933	0,977	0,948	1,164
2,11	0,689	0,846	0,963	0,978	0,21	0,902	0,976	1,151	0,971
bakt.+med.	0,990	0,948	0,863	0,942	bakt.+med.	0,964	0,944	1,100	0,791

Všechny výše uvedené bakterie jsou bakterie kolonizující trávicí trakt. Všechny více méně dobře rostly v daných podmínkách. Dále jsem měla k dispozici bakterii *Haemophilus parasuis*, což je bakterie napadající dýchací trakt prasat a pro svoji existenci potřebuje z části odlišné podmínky.

Použité médium pro tuto bakterii bylo BHI obohacené o NAD (nikotinamid adenin dinukleotid). Koncentrace NAD v BHI byla 20µg/ml. Bez NAD by bakterie nemohla růst. MIC nestabilizovaných částic byla stanovena na 13,5µg/ml, pro stabilizované částice je MIC 3,375µg/ml (viz.Tab.19).

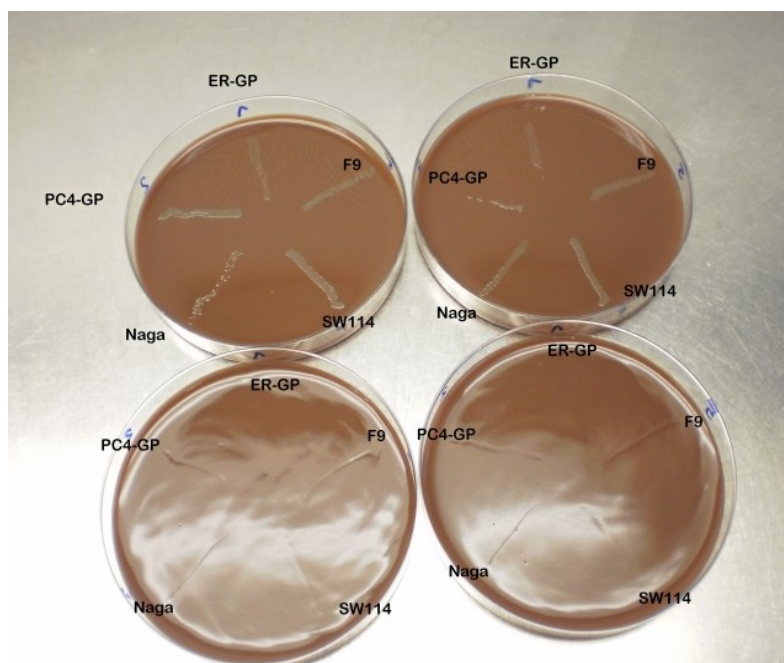
**Tab. 19** Hodnoty absorbance bakteriální suspenze *Haemophilus parasuis* CT175L

Haemophilus parasuis CT175L								
µg/ml	NPs	NPs	NPs	NPs	NPs+G	NPs+G	NPs+G	NPs+G
54	0,111	0,117	0,115	0,116	0,105	0,117	0,119	0,112
27	0,124	0,122	0,123	0,117	0,078	0,086	0,080	0,084
13,5	0,099	0,095	0,097	0,094	0,061	0,069	0,064	0,070
6,75	0,233	0,227	0,286	0,314	0,057	0,062	0,061	0,059
3,375	0,400	0,441	0,400	0,412	0,053	0,071	0,065	0,125
bakt+medium	0,348	0,369	0,406	0,453	0,291	0,334	0,289	0,279

Zároveň byl při všech experimentech pozorován zvýšený růst bakterií v „blank“ roztoku, který obsahoval vše jako disperze nanočástic stříbra, kromě nanočástic. Tento jev lze

vysvětlit přítomností maltosy v tomto roztoku. Maltosa slouží jako zdroj potravy a proto bakterie rostou lépe, než v živném médiu, kde nemají tolik potravy.

*Haemophilus parasuis* potřebuje pro optimální růst dostatek prostoru. Růst v jamkách mikrotitrační destičky nebyl příliš dobrý, proto jsem se rozhodla upravit podmínky experimentu a ověřit platnost získaných dat. Do čokoládového agaru byly absorbovány disperze nanočástic stříbra o příslušné koncentraci. Na tento agar byla nanесena bakteriální suspenze. Toto bylo vloženo do inkubátoru na 24h. Výsledkem byla inhibice růstu u všech 5 použitých kmenů při koncentraci 3,375 $\mu$ g/ml. Toto potvrdilo předchozí výsledky. Výsledek experimentu dokumentuje obr.18.



**Obr.18** Čokoládový agar s pěti kmeny bakterie *Haemophilus parasuis* (vlastní foto)

V horní části fotografie jsou čokoládové agary s 5 kmeny bakterie *Haemophilus parasuis*, ve spodní části fotografie jsou čokoládové agary které absorbovaly disperzi nanočástic stříbra stabilizovaných želatinou o koncentraci 3,375 $\mu$ g/ml naočkované stejnými kmeny. Je patrné že v místě nanесení bakteriální kultury nedošlo k jejímu růstu a množení. Takto byla potvrzena hodnota MIC získaná standardní mikrodiluční metodou.

Všechny použité kmeny jsou typické svým výskytem ve Španělsku. ER-GP, PC4-GP a Naga jsou kmeny virulentní, Naga se používá jako referentní kmen. SW114 a F9 jsou nevirulentní kmeny, přičemž SW114 se používá jako referentní kmen.

**Tab.20** Souhrn stanovených MIC, symbol – označuje, že nebyla pozorována antibakteriální aktivita

	NPs	NPs+G	NPs1080	NPs108
<b>Salmonella enteritis LT2</b>	54	13,5	netestováno	
<b>Staphylococcus aureus</b>	–	6,76	netestováno	
<b>Salmonella enteritis GN2303 pták</b>	–	54	33,75	27
<b>Salmonella typhimurium GN0448 prase</b>	–	54	33,75	27
<b>Streptococcus dysgalatiae GP1019 kráva</b>	–	54	16,6	13,5
<b>Enterococcus faecalis GP1001 králík</b>	–	54	16,6	13,5
<b>Streptococcus uberis GP1037 kráva</b>	–	–	33,75	27
<b>Escherichia coli GN2482 kravské mléko</b>	–	27	33,75	27
<b>Escherichia coli eae<sup>+</sup> GN2514 králík</b>	–	13,5	8,4	6,75
<b>Haemophilus parasuis CT175L prase</b>	13,5	3,375	netestováno	

U většiny bakterií nebyla stanovena MIC pro nestabilizovaný koloid, protože došlo k agregaci nanočástic stříbra při smíchání disperze s růstovým médiem. Pro stabilizovaný koloid byla MIC stanovena pro všechny bakterie. Nejnižší MIC byla stanovena pro bakterii *Haemophilus parasuis*. Relativně výrazný rozdíl ve stanovených hodnotách MIC mezi touto bakterií a těmi ostatními je pravděpodobně proto, že *Haemophilus parasuis* je bakterie kolonizující respirační trakt prasete, ostatní bakterie kolonizují intestinální trakt. Důsledkem rozdílných nároků na optimální prostředí k životu je i rozdílná citlivost na nanočástice stříbra.

V jiných studiích zkoumajících antibakteriální efekt nanočástic stříbra byla stanovena MIC nižší pro stejné bakterie. Pro *Enterococcus faecalis* byla stanovena MIC 3,38 $\mu$ g/ml, pro *Escherichia coli* 1,69 $\mu$ g/ml a pro *Staphylococcus aureus* 1,69 $\mu$ g/ml. Všechny tyto bakterie pocházely z komerční kultury[16,29]. Bakterie, které jsem měla k dispozici byly izolovány z infikovaných zvířat kromě bakterií *Salmonella enteritis* LT2 a *Staphylococcus aureus*, které byly z komerční kultury. Vyšší hodnoty MIC pro izolované bakterie byly pravděpodobně proto, že jednalo o divoké patogenní kmeny, které mohou být rezistentnější než kmeny z kultury.

## 7.2 Antivirotická aktivita

Stejně jako u experimentů s bakteriemi bylo nutné vybrat vhodný stabilizátor částic, protože po smíchání s médiem docházelo k agregaci nanočástic stříbra. S ohledem na buněčnou linii a zkušenosti s experimenty s bakteriemi padla volba opět na želatinu, protože má dobré

stabilizační schopnosti. Zároveň bylo potřeba upravit pH koloidu, protože pH 11,5 by samo o sobě zahubilo virus a nebylo by možné odlišit antivirotický efekt nanočástic stříbra od efektu pH. Zkoušela jsem ředit koloid v poměru 1/10, 1/20 a 1/50 destilovanou vodou, PBS a DMEM médiem. Z výsledků měření pH vyplynulo, že nejlepší bude použít k ředění a úpravě pH PBS pufr (viz. Tab.21).

**Tab.21** Hodnoty pH při ředění koloidu různými rozpouštědly

	poměr	pH
destilovaná voda	1/10	9,72
	1/20	9,56
	1/50	9,19
PBS	1/10	7,64
	1/20	7,56
	1/50	7,50
DMEM	1/10	7,33
	1/20	7,21
	1/50	7,24

Kromě úpravy bylo třeba disperzi nanočástic stříbra ředit, protože koncentrace nanočástic stříbra 108 $\mu$ g/ml by byla toxická pro buňky. Bylo také třeba vyhodnotit, jakou koncentraci želatiny jako stabilizátoru je možné použít, aniž by působila cytotoxicky na buňky. Z provedených experimentů vyšlo, že cytotoxicky působily roztoky želatiny o koncentraci 0,5% (w/w) a vyšší. Koncentrace 0,25% (w/w) nepůsobí přímo cytotoxicky, ale buňky jsou stresované. Z toho plyne, že koncentrace 0,125% (w/w) je nejvyšší použitelná pro stabilizaci nanočástic stříbra. Proto jsem v samotném experimentu pracovala s koncentrací 0,1% (w/w) želatiny v koloidu.

Zároveň byla testována cytotoxicita tohoto roztoku na buněčnou kulturu. Výsledkem je pozorování cytotoxicity při koncentraci 21,6 $\mu$ g/ml. Při koncentracích 2.7, 5.4 a 10.9 $\mu$ g/ml byly pozorovány abnormality a buňky byly stresované.

Výsledkem experimentů s viry je pozorování cytopatického efektu pod mikroskopem a následné kvantitativní vyhodnocení titru viru.

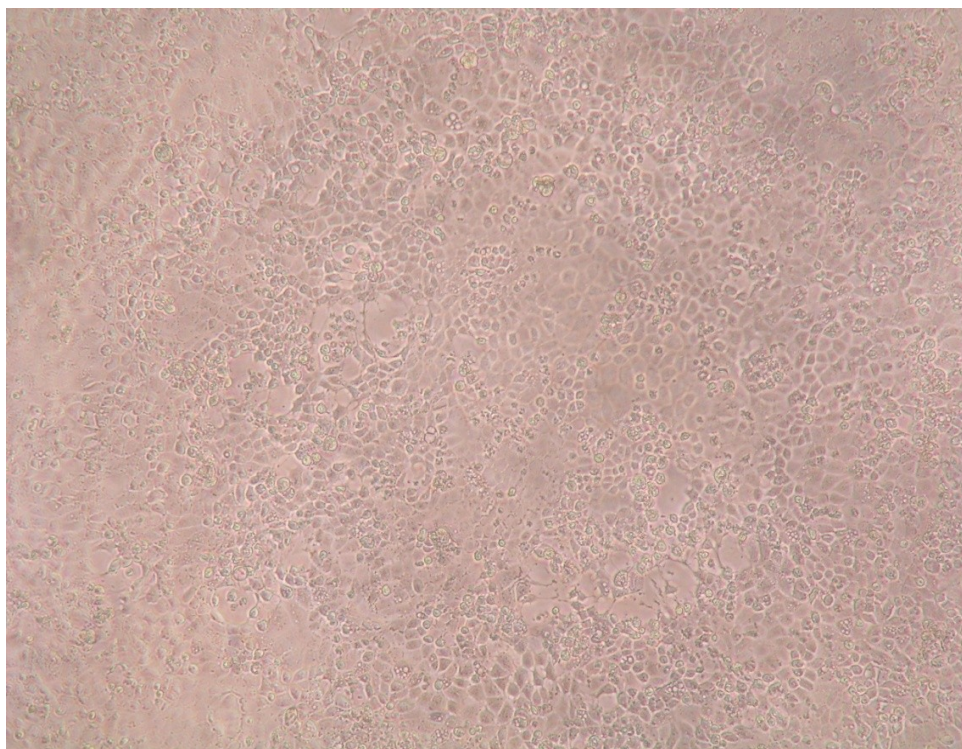
**Tab.22** Kvantitativní vyhodnocení antivirotické aktivity nanočástic stříbra

Prasečí chřipka H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml

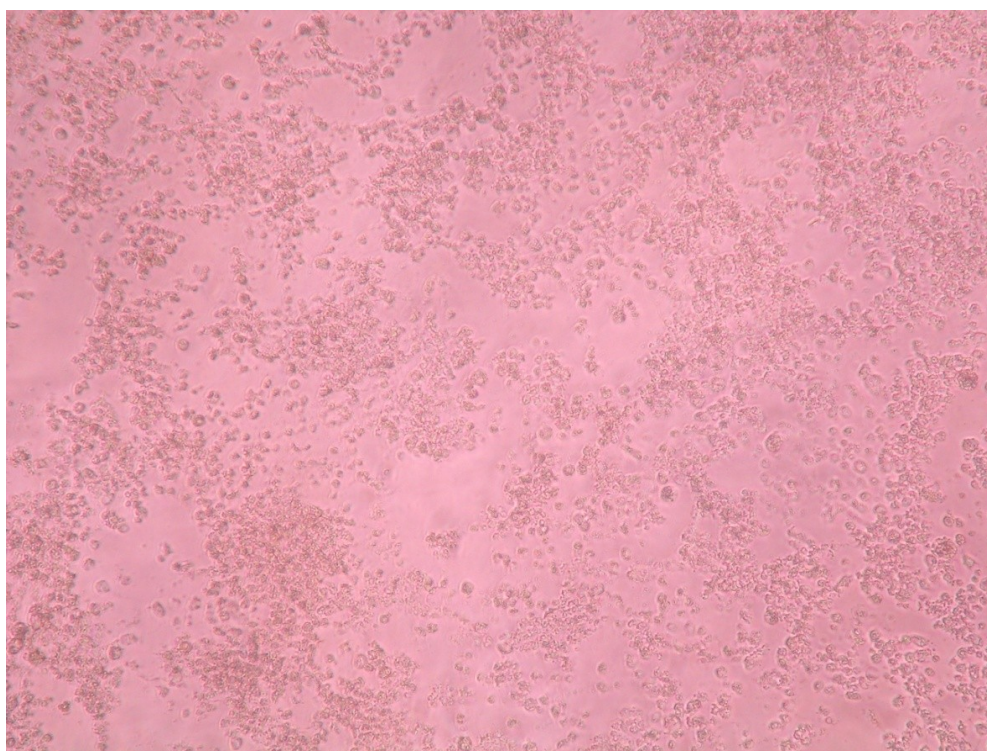
<b>5,4µg/ml + 0,1% želatina</b>	12.11.	5,450	<b>5,679</b>
	12.11.	5,700	
	12.11.	5,575	
	12.11.	5,825	
	5.11.	5,450	
	5.11.	6,075	
<b>10,8µg/ml + 0,1% želatina</b>	12.11.	5,725	<b>5,613</b>
	12.11.	5,825	
	5.11.	5,325	
	5.11.	5,575	
<b>virus</b>	5.11.	5,325	<b>5,706</b>
	5.11.	6,075	
	12.11.	5,700	
	12.11.	5,725	
<b>0,1% želatina</b>	5.11.	6,075	<b>6,075</b>
	5.11.	6,075	

Z tabulky je patrné, že titr viru je zhruba stejný u čisté buněčné linie jako u buněčné linie obsahující nanočástice stříbra stabilizované želatinou. Nanočástice stříbra nemají vliv na průběh virové infekce prasečí chřipky H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>.





**Obr. 19** Mikrofotografie buněčné kultury-normální podmínky, zvětšení 10x10 (vlastní foto)



**Obr. 20** Mikrofotografie buněčné kultury-cytopatický efekt viru, zvětšení 10x10 (vlastní foto)



## 8 ZÁVĚR

---

Diplomová práce byla zaměřena na zkoumání antibakteriální a antivirotické aktivity nanočástic stříbra. Značná část experimentální práce byla realizovaná ve výzkumném institutu Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA) při Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona (Španělsko).

Pro testování antibakteriální aktivity bylo zvoleno 10 druhů bakterií (*Salmonella enteritis* LT2, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus dysagalatae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli eae*<sup>+</sup> a *Haemophilus parasuis*).

Antibakteriální aktivita byla testována standardní mikrodiluční metodou s použitím média BHI nebo Müller-Hinton v závislosti na druhu bakterie, vedoucí ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) testovaných látek. Tato metoda umožnila stanovit MIC jak pro částice nestabilizované, tak pro částice stabilizované.

Mimo jiné bylo třeba zjistit, který z možných stabilizátorů je vhodné použít. Proto proběhl experiment se standardním kmenem *Salmonella enteritis* LT2 a sérií stabilizátorů. Jako nejvhodnější se jevila želatina a kasein, které dobře stabilizovaly nanočástice a samy o sobě neměly vliv na růst bakteriální kolonie. Toto se nedá říct o SDS, který skvěle nanočástice stříbra stabilizuje, ale sám o sobě ničí bakterie do koncentrace 0,25%. PAC a PVP nestabilizují disperzi nanočástic stříbra ideálně, byla pozorována agregace. Mají také nepatrný vliv na růst bakterií. Tween 80 také nestabilizuje nanočástice stříbra ideálně, za to však nemá vliv na růst bakterií.

Nejnižší hodnota MIC byla stanovena pro bakterii *Haemophilus parasuis* 3,375µg/ml pro koloid stabilizovaný želatinou a s velikostí částic 30nm. Z intestinálních bakterií nejlépe na nanočástice reagovaly bakterie *Escherichia coli eae*<sup>+</sup> s MIC 6,75µg/ml koloidu stabilizovaného sodnou solí polyakrylové kyseliny a s velikostí částic 20 nm. Pro bakterie *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus dysagalatae* byla stanovena MIC 13,5µg/ml, pro *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritis* a *Streptococcus uberis* byla stanovena MIC 27µg/ml taktéž pro částice stříbra stabilizované sodnou solí polyakrylové kyseliny a s velikostí 20nm.

Ze stanovených hodnot MIC také plyne, že větší antibakteriální aktivitu vykazoval koloid s velikostí částic stříbra 20nm, což koresponduje s řadou publikovaných článků.

Antivirotická aktivita nanočástic stříbra s velikostí 30 nm byla testována na viru prasečí chřipky H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> s použitím buněčné linie MDCK. Zároveň byla testována cytotoxicita této disperze na buněčnou kulturu. Výsledkem je pozorování cytotoxicity při koncentraci 21,6μg/ml stříbra. Při koncentracích 2,7 μg/ml; 5,4 μg/ml a 10.9 μg/ml byl na buňkách pozorován stres a abnormality. V prováděných experimentech se bohužel nepodařilo prokázat antivirotickou aktivitu nanočástic stříbra. Z části možná i proto, že i přes použití stabilizátoru byla pozorována agregace po smísení s růstovým médiem. Předmětem úspěchu by mohla být modifikace experimentu ve snaze zamezit agregaci.

S ohledem na získané výsledky zejména v oblasti antibakteriální aktivity se otevírá otázka dalšího a hlubšího studia antibakteriální a antivirotické aktivity nanočástic stříbra s ohledem na potenciální aplikace.

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

---

1. L. Kvítek, A. Panáček: *Základy koloidní chemie*, Univerzita Palackého v Olomouci, 2007.
2. R.PRUCEK, L.KVÍTEK, J.HRBÁČ: SILVER COLLOIDS -METHODS OF PREPARATION AND UTILIZATION. *FACULTAS RERUM NATURALIUM (2004): CHEMICA 43*. 2004, vol. 43
3. F.Walsh, S. Amyes: *Curr Opin Microbiol* **7** (5): 439–44,2004
4. J. Pouchý: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 2001
5. L.Bartovská, M.Šišková: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*, Vydavatelství VŠCHT Praha, 2005
6. Komers, K.; *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1996.
7. K.Hodák, M.Němec: *Virologie*, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Brno 1987
8. Výukové materiály předmětu Obecná virologie, volně přístupné na <http://genetika.upol.cz/index.php?page=predmet&zkratka=31>
9. M.Němec, D.Horáková: *Základy mikrobiologie pro učitelské studium*, Masarykova Univerzita v Brně, Brno, 1993
10. E.W.Nester, C.E.Roberts, M.T.Nester: *Microbiology A human perspective*,USA, 1995
11. S.Rozsypal, K.Hodák, T.Martinec, M.Kocur: *Obecná bakteriologie*, Praha 1981
12. M.T.Madigan, J.M.Martinko, P.V.Dunlap, D.P.Clark: *Brock Biology of Microorganisms*, Twelfth edition, Pearson Internation Edition,USA, 2009
13. H.C.Gram: *Fortschr Med* **2**: 185–189, 1884
14. Výukové materiály předmětu Mikrobiologie, volně ke stažení na <http://botany.upol.cz/>
15. K.N.Thakkar, S.S.Mhatre, R.Y.Parikh: *Nanomedicine: NBM*;**6**:257-262, 2010
16. A.Panáček, L.Kvítek, R.Prucek, M.Kolář, R.Večeřová, N.Pizúrová, K.S.Virender, T.Nevěčná, R.Zbořil: *J Phys Chem B* 2006,110, 16248-16252, 2006
17. S. Pal, Y. K. Tak, J. M. Song: *Appl EnViron Microbiol* **73**, 1712, 2007
18. A.M. Fayaz, K.Balaji, M.Girilal, R.Yadav, P.T.Kalaichelvan, R.Venketesan: *Nanomedicine: NBM* **6**:103-109, 2010
19. X. Chen, H.J. Schluesener: *Toxicology Letters* **176**:1–12, 2008

20. D.Roe, B.Karandikar, N.Bonn-Savage, B.Gibbins and J.-B.Roulet: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**:869–876, 2008
21. A. Panáček, M. Kolář, R. Večeřová, R. Pucek, J. Soukupová, V. Kryštof, P. Hamal, R. Zbořil, L. Kvítek: *Biomaterials* **30**:6333–6340, 2009
22. O. Seong-Dae, L. Seungho, C. Seong-Ho, L. In-Soo, L. Yun-Mi, C. Jong-Han, P. Hae-Jun: *Physicochem Eng Aspects* **275**:228–233, 2006
23. J.L. Elechiguerra, J.L. Burt, J.R. Morones, A.C.-Bragado, X. Gao, H.H. Lara and M.J. Yacamán: *Journal of Nanobiotechnology* **3**:6, 2005
24. H.H. Lara, N.V. Ayala-Núñez, L. Ixtapan-Turrent and C. Rodríguez-Padilla: *Journal of Nanobiotechnology* **8**:1, 2010
25. L. Lei, W.-Y. S. Raymond, C. Rong, H. Chee-Kin, H. Chi-Ming, M.L. John, K.K.L. George, C. Chi-Ming: *Antiviral Therapy* **13**:253-262, 2008
26. P. Mehrbod, N. Montamed, M. Tabatabaian, R. Soleimani Estyar, E. Amini, M. Shahidi, M.T. Kheiri: *DARU* **17**:2, 2009
27. L. Kvítek, R. Pucek, A. Panáček: *J Mat Chem* **15**, 1099-1105, 2005
28. G. Kärber: *Arch Exp Path Pharm* **162**: pp. 480–483, 1931
29. L. Kvítek, A. Panáček, J. Soukupová, M. Kolář, R. Večeřová, R. Pucek, M. Holecová and R. Zbořil: *J Phys Chem C* **112**:5825-5834, 2008

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

---

- CReSA – Centre de Recerca en Sanitat Animal
- DLS – Dynamic Light Scattering, dynamický rozptyl světla
- DNA – Deoxyribonukleová kyselina
- RNA – Ribonukleová kyselina
- AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome, syndrom získaného selhání imunity
- SARS – Severe Acute Respiratory Syndrom, syndrom náhlého selhání dýchání
- HIV – Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti
- ATP – Adenosintrifosfát
- MIC – minimální inhibiční koncentrace
- MBC – minimální baktericidní koncentrace
- SERS – Surface Enhanced Raman Spectroskopy, povrchem zesílená Ramanova spektroskopie
- HBV – hepatitis B virus
- BHI – Brain heart infusion, médium s výtažky mozku a srdce
- PBS – fosfátový pufr
- MDCK – Madin Darby canine kidney, buněčná kultura z psích ledvinných buněk
- G – želatina
- KAS – kasein
- SDS - sodium dodecylsulfát
- PVP – polyvinylpyrrolidon
- PAC – kyselina polyakrylová
- TW – Tween 80
- NPs – nestabilizovaný koloid o koncentraci 108 $\mu$ g/ml s částicemi o velikosti 30nm
- NPs+G – koloid o koncentraci 108 $\mu$ g/ml s částicemi o velikosti 30nm stabilizovaný želatinou
- NPs1080 – koloid o koncentraci 1080 $\mu$ g/ml s částicemi o velikosti 20nm stabilizovaný sodnou solí kyseliny polyakrylové
- NPs108 - koloid o koncentraci 1080  $\mu$ g/ml s částicemi o velikosti 20nm stabilizovaný sodnou solí kyseliny polyakrylové, který byl před použitím naředěn destilovanou vodou na koncentraci 108 $\mu$ g/ml
- NAD – nikotinamid adenin dinukleotid