

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

**Antimikrobní účinek fotokatalyticky účinných sloučenin
kovů.**

(diplomová práce)

Hradec Králové, 2009

Peter Lupták

Karlová Univerzita v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd

**Antimikrobiální účinek fotokatalyticky účinných zlúčenín
kovov.**

(diplomová práce)

Hradec Králové, 2009

Peter Ľupták

Prehlásenie autora.

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom a všetky myšlienky, dáta a ích zdroje, z nich som pre zpracovanie čerpal, riadne citujem:

V Hradci Králové dňa 1. 5. 2009

Peter Ľupták

Podakovanie.

Ďakujem svojmu školiteľovi PharmDr Petrovi Jílkovi, PhD za ochotu, trpezlivosť a venovaný čas, ktorý so mnou strávil ako školiteľ diplomovej práce. Ďalej ďakujem pani Ide Dufkovej za ochotu, trpezlivosť a čas, ktorý so mnou strávila v mikrobiologickom laboratóriu v priebehu testovania. Podakovanie patrí tiež pani Ing. Libuše Hochmanovej, PhD z firmy SYNPO a.s. za vzorky náterov, poskytnuté odborné materiály a konzultácie.

Peter Ľupták

Obsah

1	Abstrakt.....	- 6 -
2	Abstract.....	- 7 -
3	Úvod.	- 8 -
4	Cieľ práce.	- 9 -
5	Teoretická časť	- 10 -
	5.1 Nátery s antimikrobiálnou aktivitou.	- 10 -
	5.2 Fotokatalytický jav a jeho účinky	- 11 -
	5.3 Metódy testovania náterov s AA.	- 13 -
6	Experimentálna časť.	- 15 -
	6.1 Materiál.	- 15 -
	6.1.1 Mikroorganizmy.	- 15 -
	6.1.2 Roztoky, kultivačné pôdy, testované náterové hmoty s AA. .	- 15 -
	6.1.3 Pomôcky a prístroje.	- 15 -
	6.2 Pracovný postup.	- 16 -
	6.2.1 Postup prípravy kultivačných pôd.....	- 16 -
	6.2.2 Postup prípravy suspenzie testovaného mikroorganizmu.....	- 16 -
	6.2.3 Postup prípravy kontroly.	- 16 -
	6.2.4 Popis postupov práce pri jednotlivých metódach testovania náterov s AA.....	- 16 -
	6.2.4.1 Metoda napred ožiarených náterov s AA po dobu troch hodín.....	16
	6.2.4.2 Metoda ožarovania náterov spolu s nanesenou suspenziou.....	17
	6.2.4.3 Metoda napred ožarovania náterov s AA rôznu dobu.....	17
	6.2.5 Kultivácia a odčítanie výsledkov.	- 17 -
6.3	Vyjadrenie výsledkov.	- 18 -
	6.3.1 Vyjadrenie výsledkov k metóde napred ožiarených náterov s AA.	- 18 -
	6.3.2 Vyjadrenie výsledkov k metóde ožarovania náterov s AA spolu s nanesenou suspenziou.	- 19 -
	6.3.3 Vyjadrenie výsledkov k metóde napred ožarovania náterov s AA rôznu dobu.	- 19 -
7	Výsledky.	- 20 -
	7.1 Výsledky k metóde napred ožiarených náterov s AA po dobu troch hodín.....	- 20 -
	7.2 Výsledky k metóde ožarovania náterov s AA spolu s nanesenou suspenziou.....	- 24 -
	7.3 Výsledky k metóde napred ožarovania náterov s AA rôznu dobu. ...	- 32 -
8	Diskusia.	- 40 -
9	Záver.....	- 45 -
10	Použité skratky.	- 46 -
11	Literatúra.....	- 47 -

1 Abstrakt.

ĽUPTÁK, P. *Antimikrobiálny účinok fotokatalyticky účinných sloučenin kovů*. Diplomová práca, Farmaceutická fakulta v Hradci králové, Univerzita Karlova, 2009. Studijní obor: Farmacie,

Cieľ práce Práca je zameraná na testovanie náterových hmôt s antimikrobiálnou aktivitou na základe fotokatalytického javu nanočasíc oxidov kovov. V testovaných náteroch boli použité aktívne nanočastice oxidu titaničitého samotne alebo s prídavkom oxidu zinočnatého.

Metódy V práci bola vypracovaná metodika, ktorá je zhrnutá v experimentálnej časti. Metodika zahŕňa tri spôsoby, v ktorých boli nátery porovnávané navzájom s aktiváciou alebo bez aktivácie UV-VIS žiarenia:

- Metoda napred ožiarovaných náterov s antimikrobiálnou aktivitou po dobu troch hodín.
- Metoda ožarovania náterov s antimikrobiálnou aktivitou spolu s nanosenou suspenziou.
- Metoda napred ožarovania náterov s antimikrobiálnou aktivitou rôznu dobu.

Účinnosť bola testovaná na piatich mikroorganizmoch: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* a na reprezentante eukariotických organizmov *Candida albicans*.

Výsledky Vo všetkých metódach boli G- mikroorganizmy citlivejšie, ktoré vykazovali citlivosť aj bez UV-VIS žiarenia. Po dlhších kontaktných časoch boli dobre citlivé aj G+ mikroorganizmy. Pri nízkych kontaktných časoch sa u *Candida albicans* objavila negatívna účinnosť, ktorá časom výrazne narastala.

Záver Všeobecne lepšia citlivosť G- mikroorganizmov, predurčuje nátery s antimikrobiálnou aktivitou pre priestory s rizikom výskytu *Pseudomonas aeruginosa*. Citlivosť *Candida albicans* môže znamenať dobrú citlivosť náterov proti plesniam. Nátery doporučujeme používať spolu so zdrojom UV.

Kľúčové slová: Fotokatalytický jav- nátery s antimikrobiálnou aktivitou- oxid titaničitý- oxid zinočnatý.

2 Abstract.

ĽUPTÁK, P. *Antimicrobial effect of photocatalytic effective compounds of metals*. Diploma work. Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, 2009. Field of study: Pharmacy,

Background This diploma work is aimed at testing antimicrobial activity coatings on the basis of photocatalytic effect of nano particles of metal dioxides. In the coats tested active nano particles of titanium dioxide alone or with zinc oxide were used.

Methods In this work we have developed a methodology, which is in the experimental part. The methodology contains three ways, in which the coats have been mutually compared on the basis of activation of UV-VIS radiation:

- A method of in advance irradiated coats with antimicrobial activity for three hours.
- A method of radiation of the coats with antimicrobial activity with applied suspension.
- A method of radiation of coats in advance with microbial activity for various time periods.

The effectiveness have been tested on five microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans* as the representative of eukaryotic organisms.

Results At all methods G- microorganisms were more sensitive, which showed the sensitivity even without UV-VIS radiation. After longer time periods of contact G+ organisms were well sensitive too. At short time periods of contact a negative effectiveness was showed with *Candida albicans*, which was raised later on.

Conclusions Generally better sensitivity of G- organisms predetermines the coats with antimicrobial activity for spaces with the risk of occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. The sensitivity of *Candida albicans* may mean a good sensitivity of the coats against moulds. We advise the coats to be used with UV source.

Key words: Photocatalytic effect- antimicrobial activity coatings- titanium dioxide- zinc oxide.

3 Úvod.

Od čias kedy Antonie van Leeuwenhoek objavil svet mikroorganizmov, si tieto malé tvory vynucujú našu pozornosť stále viac. Trvalo takmer dvesto rokov kým sa preukázala ich možná patogenita a tak bádatelia pochopili, že riešením takto spôsobených ochorení môže byť zamedzenie styku patogénna s organizmom alebo jeho eradikácia z organizmu. Vývojom dezinfekcií a antibiotík sa tak otvorila radostná nová kapitola v infekčnej medicíne. Vzhľadom k veľkej prispôsobivosti mikroorganizmov a neustálím vytváraním si rezistencie voči „naším zbraniam“, toto nadšenie upadlo, a tak musí tento vývoj napredovať rýchlejšie ako prispôsobivosť patogénov. Situácia je sťažená aj novými sociálnymi podmienkami, ktoré niektorým patogénom pomáhajú v šírení, no naopak niektoré sa dostali na pokraj. Zbytočným nadužívaním antibiotík sa čoraz častejšie stretávame s rezistentnými patogénnymi mikroorganizmami, ktoré spôsobujú závažné ťažko liečiteľné choroby. Nozokomiálne infekcie nielenže strpčujú životy pacientov v zdravotníckych zariadeniach, ale si vyžadujú aj vysoké finančné náklady.

Pravidlo, ktoré hovorí, že najlepšou starostlivosťou je prevencia sa ukazuje ako stále aktuálne. Vedecká obec sa preto snaží vyvinúť prostriedky, ktoré by mohli zamedziť šíreniu infekcií. Fotokalytický jav, ako moderná technológia, sa javí aj v tejto oblasti ako veľmi perspektívny. Navyše nešpecifickosť biocídneho mechanizmu fotokatalytického javu predpokladá vznik rezistencie v malej miere, ak sa vôbec nejaká objaví.

4 Cieľ práce.

Práca je zameraná na vypracovanie metodiky testovania náterov s antimikrobiálnou aktivitou a ich následne vyhodnotenie. Snažili sme sa modifikovať už existujúce metódy, tak aby čo najviac vyhovovali daným náterom.

Aby metodiky odzrkadľovali realnosť budúceho použitia náterov, sme vyvinuli tri rôzne modelové metódy. Snažili sme sa zistiť ochranu ponúkanú náterovými hmotami priamo aktivovanými UV-VIS žiarením alebo pri kontakte mikroorganizmov po aktivácii náterov.

Mikroorganizmy sú tvorené rôznorodou skupinou organizmov, ktoré majú rôznu citlivosť k fotokatalytickému efektu, ponúkaný nátermi s antimikrobiálnou aktivitou. Mikrobicídnosť náterov sme testovali na širšej palete mikroorganizmov než je doporučené Japonským štandardom.

5 Teoretická časť

5.1 Nátery s antimikrobiálnou aktivitou.

V náteroch s antimikrobiálnou aktivitou (ďalej nátery s AA) sú zabudované aktívne súčasti, ktoré pomáhajú odstrániť alebo deaktivovať biokontamináciu. Sú v nich zastúpené technológie fotokatalyzujúcich štruktúr nanočastíc, dendrimérov, fluorovaných derivátov a fluorosilikónových komponent. Musia byť vyvinuté tak, aby zabezpečili ľahké čistenie povrchov. Práve nátery s AA môžu mať dôležitú úlohu v obmedzení šírenia mikrobiologickej kontaminácií (JONS, K. 2003).

Použitie náterov s AA sa sústreďuje na podlahy, steny a špáry obkladov stien. Čiastkové používanie je nedostatočné na zaistenie účinnej ochrany a preto je potrebné uplatnenie v čo najširšom rozsahu v celom zariadení.

Súčasná a potenciálna možnosť využitia (MORRISON, S.):

- Príprava, preprava potravín
- Nemocnice, iné zdravotnícke zariadenia
- Výrobné v čistých priestoroch (farmaceutické, elektrotechnické, testovacie laboratória...)
- Zdravotnícke pomôcky, kde je ale dôležitá aj biokompatibilita
- Dodávky pitnej vody
- Klimatizačné zariadenia
- Verejné priestranstvá s vysokou hustotou ľudí
- Prostriedky verejnej dopravy
- Hygienické zariadenia
- Priestory s vysokým rizikom kontaminácie

Ako výborným prostriedkom sa javia, k zabráneniu „sick buildings syndromu“, ktorý sa prezentuje očnými, nosnými, krčnými iritáciami, bolesťami hlavy, letargiou, zníženou koncentráciou až niekedy závratom, nevoľnosťou a s inými symptómami. Tento syndróm je pripisovaný budovám obsadenými vlastnou špecifickou mikroflórou a iných negatívnych zložiek recyklujúcich v ovzduší (APTER, A. et al. 1994).

Komplexné podnety trvale rastúcich požiadavkou na používanie náterov s AA sa dá nájsť v týchto sociologických javoch modernej spoločnosti (HOCHMANOVÁ, L., FERENČÍK, I. **2005**):

- rýchly rast populácie a jej sústredovanie do veľkých mestských aglomerácií
- starnutie populácie v kultúrne vyspelých štátoch a rast náchylnosti k chorobám
- rýchly rast celosvetovej migrácie obyvateľstva
- rozširovanie rýchleho občerstvenia a stravovanie v jedálňach
- rezistencia k rastúcemu používaniu antibiotík

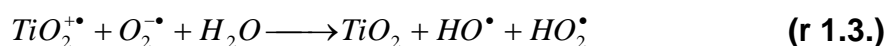
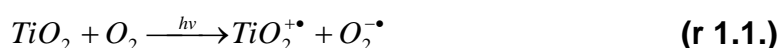
5.2 Fotokatalytický jav a jeho účinky.

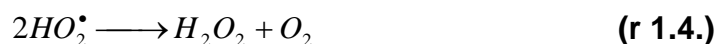
Heterogénna fotokatalýza bola prvý krát popísaná už v 30. rokoch minulého storočia Plotnikovom v Berlíne (PLOTNIKOV, J. **1936**). Neskôr boli objavené fotokatalytické procesy vody monokryštalického TiO₂ (FUJISIMA, A. HONDA, K. **1972**), ktoré sa stali záujmom environmentálnych technológií.

Na základe polovodičovej štruktúry sú elektróny a diery valenčného pásu oxidu titaničitého generované svetelnou energiou ($h\nu \geq E_g = 3,2 \text{ eV}$, tzn. $\lambda \leq 387 \text{ nm}$), to znamená väčšou než je energia zakázaného pásu polovodiča (HOFFMANN, M. R. et al. **1995**).

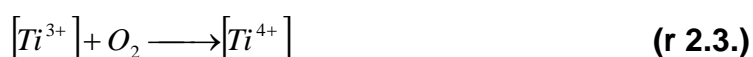
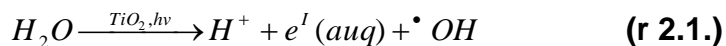
Podľa aktuálnych poznatkov sa predpokladá niekoľko mechanizmov fotokatalýzy sprostredkovanej oxidom titaničitým (NORMANN, S.A. et al **2005**).

1) Prenosom elektrónu z fotoexcitovanej molekuly oxidu titaničitého na molekulárny kyslík, vzniká kyslíkový aniont-radikál a z pôvodného oxidu titaničitého vzniká kationt-radikál (r 1.1.). Je zjavné, že tieto dve častice sú značne nestabilné a tak spolu zreagujú, pričom dôjde k preskupeniu elektrónov v elektrónovom obale kyslíka za vzniku aktívneho singletového kyslíka (r 1.2.). Za účasti vody vzniká hydroxylový a peroxidový radikál (r 1.3.), ktorý sa rozpadne na peroxid vodíka a kyslík (r 1.4.).

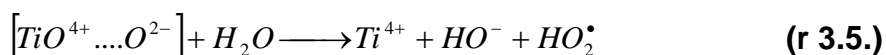




2) V kontakte vody s fotoexcitovaným oxidom titaničitým vzniká hydroxidový radikál.(r 2.1.). V rovniciach (r 2.2.) a (r 2.3.) je znázornená reoxidácia do oxidačného stavu 4 pre uzavretie cyklu.



3) Ožiarenie oxidu titaničitého ho uvedie do excitovaného stavu (p) (r 3.1.), ktorý reaguje s hydroxylovým aniónom na radikál (r 3.2.). Komplex kyslíku a oxidu titaničitého produkuje aktívny peroxidový radikál (r 3.3.) (r 3.4.) (r 3.5.).



Pri fotokatalytickom jave vznikajú teda voľné radikály ako hydroxylový a peroxidový a silne reaktívny singletový kyslík. Tieto aktívne látky pôsobia primárne na biologicky dôležité makromolekuly, hlavne na lipidy, bielkoviny a nukleové kyseliny, čoho dôsledkom je zmena vo fluidite membrán (z hľadiska citlivosti sú najzraniteľnejšie membránové štruktúry), strata enzymatickej aktivity bielkovín, strata informácií v DNA (LÁZNIČKOVÁ, A. et al **2000**). Podrobne o deštrukcii DNA voľnými radikálmi pojednáva Gogniat a Dukan (GOGNIAT, G., DUKAN, S., **2007**). Tieto mechanizmy zabezpečujú biocidnosť materiálu.

Oxid titaničitý existuje v dvoch morfológických kryštalických formách anatasu a rutilu, ktoré majú rôznu UV hranicu fotoaktivity. Hranica anatasu je 340 nm a hranica rutilu je 370 nm (NORMANN, S. A. et al **2005**). Ožiarenie anatasovej formy oxidu titaničitého produkuje viac radikálov ako rutilovej. Veľkosť

kryštálov má dôležitú rolu v generácii radikálov ale optimálna veľkosť sa v oboch formách líši (UCHINO, T., et al **2002**). Rutilový prášok ma väčšie častice ako antasový, lebo je pripravený za vyššej teploty (HABIBI, M., VOSOOGHIAN, H. **2005**).

Ďalšími perspektívnymi nanočasticami sú častice oxidu zinočnatého, ktorý má však nižšiu degradabilnú schopnosť porovnaní s oxidom titaničitým. Avšak oxid zinočnatý absorbuje väčšiu časť UV svetla a viac svetelných kvánt (HABIBI, M., VOSOOGHIAN, H. **2005**). A tak sa rozšírenie pôsobenia svetelného žiarenia do oblasti denného svetla 400-600 nm podarilo dopovaním častíc oxidu titaničitého oxidom zinočnatým vo forme oxidu-sulfidu zinočnatého (SHI-JUN LIAO et al **2004**).

5.3 Metódy testovania náterov s AA.

Pre objektívne hodnotenie boli vypracované metódy z nich najčastejšie používané sú Japonský štandard JIS Z 2801 a Americký štandard ASTM E 2149-01. Prípustne sú aj ich obmeny pričom je možné využiť ich vyhodnocovacie metódy.

My sme využili modifikáciu Japonského štandardu pre kratší expozičný čas.

Princípom japonského (PAGELLA, C. et al **2007**) štandardu JIS Z2801 je hodnotiť antimikrobiálnu aktivitu ako rozdiel počtu baktérií, ktoré prežili po kontakte s „upraveným“ a s „neupraveným“ povrchom počas definovanej doby. Za „neupravený“ povrch sa považuje povrch bez biocidných častíc. V prípade, že „neupravený“ povrch vykazuje antibakteriálnu aktivitu, môže byť znečistený rezíduami rozpúšťadiel a monomérov, a je potrebné použiť povrch bez vplyvu ako napríklad polypropylén.

Účinnosť sa vyjadruje podľa logaritmu redukcie živých baktérií:

$$R = \log \frac{B}{A} - \log \frac{C}{A} = \log \frac{B}{C} \quad (\text{r 4.1.})$$

Kde:

R: účinnosť antimikrobiálnej efektivity.

A: počet žijúcich buniek hneď po inokulácii na neupravený povrch.

B: počet žijúcich buniek na neupravenom povrchu po štandardnom kontaktnom čase.

C: počet žijúcich buniek na upravenom povrchu po štandardnom kontaktnom čase.

Štandardný kontaktný čas pre JIS Z 2801 je 24 hodín. Pre špecifické aplikované metódy je možné použiť aj kratšie časy, avšak pre kontaktný čas menej ako jedna hodina je toto vyjadrenie v rozpore.

V prípade, že R sa rovná alebo je vyššie ako 2, je produkt hodnotený ako antimikrobiálny.

Alternatívnou možnosťou vyjadrenia účinnosti je pomocou % vzorcom:

$$Pokles(\%) = \frac{M_b - M_c}{M_b} * 100 \quad (\text{r 4.2.})$$

Kde:

M_b : počet žijúcich baktérií na neupravenom povrchu.

M_c : počet žijúcich baktérií na upravenom povrchu

Toto vyjadrenie je možné aplikovať aj v Americkom štandarde ASTM E2149-01 a taktiež s inými druhmi a rôznymi kontaktnými metódami.

Tento vzťah je daný vzorcom:

$$Pokles(\%) = (1 - 10^{-R}) * 100 \quad (\text{r 4.3.})$$

Japonska metóda odporúča ako modelové mikroorganizmy používať na testovanie *Escherichia coli* ako zástupcu G- a *Staphylococcus aureus* ako zástupcu G+ mikroorganizmov.

6 Experimentálna časť.

6.1 Materiál.

6.1.1 Mikroorganizmy.

Escherichia coli A (EC) ATCC 8739

Staphylococcus aureus (SA) ATCC 6538

Pseudomonas aeruginosa (PsA) ATCC 9027

Bacillus subtilis (BacS) ATCC 6633

Candida albicans (CA) ATCC 10231

6.1.2 Roztoky, kultivačné pôdy, testované náterové hmoty s AA.

- Mueller-Hintonov agar na Petriho miskách Gamedium o priemere 9,5 cm
- Fyziologický roztok (0,9% Sodium chloridum in water for injection “Fresenius“)
- Podložné mikrobiologické sklíčka s nanosenými silikátovými fasádnyimi nátermi s AA s nanočasticami Pretiox RG 15 na sklíčku označenom P-41 a s nanočasticami Pretox RG 15 v kombinácii s nanočasticami Zano 30 HS na sklíčku označenom P-55. Sklíčka P-41 a P-55 s nátermi s AA boli poskytnuté firmou Synpo a.s. v Pradubiciach.

6.1.3 Pomôcky a prístroje.

- Sterilné skúmavky
- Sterilné 250 ml Erlenmeyerové banky
- Sterilné L-hokejky
- Sterilný odmerný valec 100 ml
- McFarlandova škála
- Mikrobiologická kľučka
- Kahan
- Mikropipety Biohit 50µl; 100-1000µl s príslušnými špičkami
- Trepačka MS2 Minishaker IKA
- Zdroj dlhovlnného UV a viditeľného žiarenia: UV-VIS Hyundai Sun 60W
- Meradlo intenzity UV SUV 10 Sencor
- Počítadlo kolónií Colony Counter (IUL)

- Termostat Binder
- Autokláv PS20

6.2 Pracovný postup.

6.2.1 Postup prípravy kultivačných pôd.

Roztok Mueller-Hintonovho agaru o koncentrácii 35g v jednom litri vody sme autoklávovali 15 minút pri 121°C v autokláve PS20. Potom sme z tohto roztoku naliali do potrebného počtu Petriho misiek o priemere 9,5 cm asi vrstvu 3 mm a nechali vychladnúť.

6.2.2 Postup prípravy suspenzie testovaného mikroorganizmu.

Suspenziu sme pripravili z kolónií napred vypestovaných mikroorganizmov podľa prvej skúmavky o denzite McFarlandovej škály 4×10^6 /ml. Pri jednotlivých pokusoch sme si vystačili s 2 ml takto pripravenej suspenzie.

6.2.3 Postup prípravy kontroly.

Kontrolu sme pripravovali pri každej metóde rovnako. 50 µl suspenzie mikroorganizmov sme pipetovali priamo do 100 ml fyziologického roztoku.

6.2.4 Popis postupov práce pri jednotlivých metódach testovania náterov s AA

6.2.4.1 Metoda napred ožiarených náterov s AA po dobu troch hodín.

Štyri sklíčka P-41 a štyri P-55 sme vopred ožiarili pomocou zdroju UV Hyundai Sun asi vo vzdialnosti 8 cm po dobu troch hodín. Intenzita pomocou meradla UV SUV 10 Sencor bola 3,1 jednotiek. Potom sme na ne inokulovali 50 µl suspenzie mikroorganizmov a roztreli sterilnou L-hokejkou po celom povrchu. Pre porovnanie sme identicky pripravili aj štyri sklíčka P-41 a štyri P-55, ktoré sme uchovávali v tme v modrom papieri a v hliníkovej fólií. Po rôznych časoch expozície mikroorganizmami (5; 15; 30; 60 minút) sme sklíčka ľahko pretrepali v 100 ml fyziologického roztoku, aby sa mikroorganizmy dostali do vodnej fáze.

Touto metódou sme skúšali nátery s AA na mikróboch *Staphylococcus aureus* (SA) ATCC 6538 a *Escherichia coli* A (EC) ATCC 8739.

6.2.4.2 Metoda ožarovania náterov s AA spolu s nanesenou suspenziou.

Po 50 µl suspenzie mikroorganizmov sme naniesli na štyri sklíčka P-41 a štyri P-55. Sklíčka sme ožarovali UV-VIS 60W Hyunday Sun už spolu s inokulovanými mikróbmami. Doba expozície bola 0,5; 2; 5; 10 minút, po ktorej sme jednotlivé sklíčka s nátermi pretrepali v 100 ml fyziologického roztoku. Pre porovnanie sme tento postup urobili aj bez ožiarovania, kedy inokulované sklíčka sme uchovávali v tme. Vzhľadom na to, že sme očakávali vplyv samotného emitovaného UV na mikróby, sme nechali exponovať UV žiarením aj štyri čisté sterilné podložné sklíčka, na ktoré sme inokulovali a roztreli hokejkou rovnako 50 µl suspenzie. Doba expozície bola rovnaká ako pri sklíčkach s nátermi s AA.

Antimikrobiálnu aktivitu náterov sme touto metódou skúšali na mikroboch *Staphylococcus aureus* (SA) ATCC 6538, *Escherichia coli* A (EC) ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* (PsA) ATCC 9027, *Bacillus subtilis* (BacS) ATCC 6633, *Candida albicans* (CA) ATCC 10231.

6.2.4.3 Metoda napred ožarovania náterov s AA rôznu dobu.

Štyri sklíčka P-41 a štyri P-55 sme nechali ožarovať pod UV zdrojom Hyunday SUN 60W rôzne dlhú dobu (5; 15; 30; 60 minút). Následne sme ich inokulovali suspenziou mikroorganizmov a expozícia trvala päť minút v tme. Pre porovnanie sme taktiež pripravili rovnakým spôsobom aj sklíčka neožiarené.

Antimikrobiálnu aktivitu náterov sme touto metódou skúšali na mikroboch *Staphylococcus aureus* (SA) ATCC 6538, *Escherichia coli* A (EC) ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* (PsA) ATCC 9027, *Bacillus subtilis* (BacS) ATCC 6633, *Candida albicans* (CA) ATCC 10231.

6.2.5 Kultivácia a odčítanie výsledkov.

0,5 ml z fyziologického roztoku pretrepaného s exponovanými sklíčkami a aj z 0,5 ml kontroly sme kultivovali na kultivačné pôdy a pravidelne roztreli s L-hokejkami po celom povrchu. Tieto kultivačné pôdy sme kultivovali v termostate Binder po dobu 24 hodín pri 37°C aerobne. Po kultivácii sme odčítali počet kolónií pomocou počítadla Colony Counter a zaznamenali do tabuliek.

6.3 Vyjadrenie výsledkov.

6.3.1 Vyjadrenie výsledkov k metóde napred ožiarených náterov s AA.

Výsledky sme zapisovali do tabuliek pre každý mikroorganizmus zvlášť. Počet CFU sme vyjadrili vzhľadom na čas expozície suspenzie, typ antimikrobiálneho náteru a ožiarenia resp. neožiarenia UV-VIS svetlom. Pokles CFU sme vyjadrili aj graficky.

Tab. 4.1. Vzorová tabuľka.

Mikroorganizmus				
Vzorky	P-41		P-55	
kontakt baktérií s náterom ožiareným 3 hodiny	CFU			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.				
15 min.				
30 min.				
60 min.				

Účinnosť vzorku.

Účinnosť vzorku sme vyjadrili podľa spôsobu v japonskej metóde JIS Z2801 ako percentuálny pokles CFU pomocou rovnice (r 4.2.). Keďže obyčajné sterilné sklíčko bez náteru s AA nemá biocídny a ani adhezívny vplyv, mohli sme ho považovať za neupravený povrch. Počet CFU na tomto povrchu sa rovná kontrole.

V každej metóde sme porovnali aj účinnosť na jednotlivé mikroorganizmy graficky.

6.3.2 Vyjadrenie výsledkov k metóde ožarovania náterov s AA spolu s nanesenou suspenziou.

Výsledky sme zapisovali do tabuliek pre každý mikroorganizmus zvlášť. Počet CFU sme vyjadrili vzhľadom na čas expozície suspenzie, typ náteru s AA a súčasného ožarovania resp. neožarovania UV-VIS svetlom.

Tab. 4.2. Vzorová tabuľka.

Mikroorganizmus					
Vzorky	P-41		P-55		Obyčajné. sklíčko
Expozícia povrchu náteru s baktériami	CFU				
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno
0,5 min.					
2 min.					
10 min.					
30 min.					

Účinnosť vzorku.

V prípade, že sme chceli vyjadriť účinnosť (r 4.2.) pri súčasnom ožarení sme ako referenčný povrch museli vziať sklíčko bez náteru s AA so suspenziou, vystavené UV rovnakú dobu.

6.3.3 Vyjadrenie výsledkov k metóde napred ožarovania náterov s AA rôznu dobu.

Počet CFU a účinnosť sme zapísali rovnako ako v prvej metóde napred ožarených sklíčok.

7 Výsledky.

Výsledky sú spracované v rámci metód podľa mikroorganizmov.

7.1 Výsledky k metóde napred ožiarených náterov s AA po dobu troch hodín.

Escherichia coli

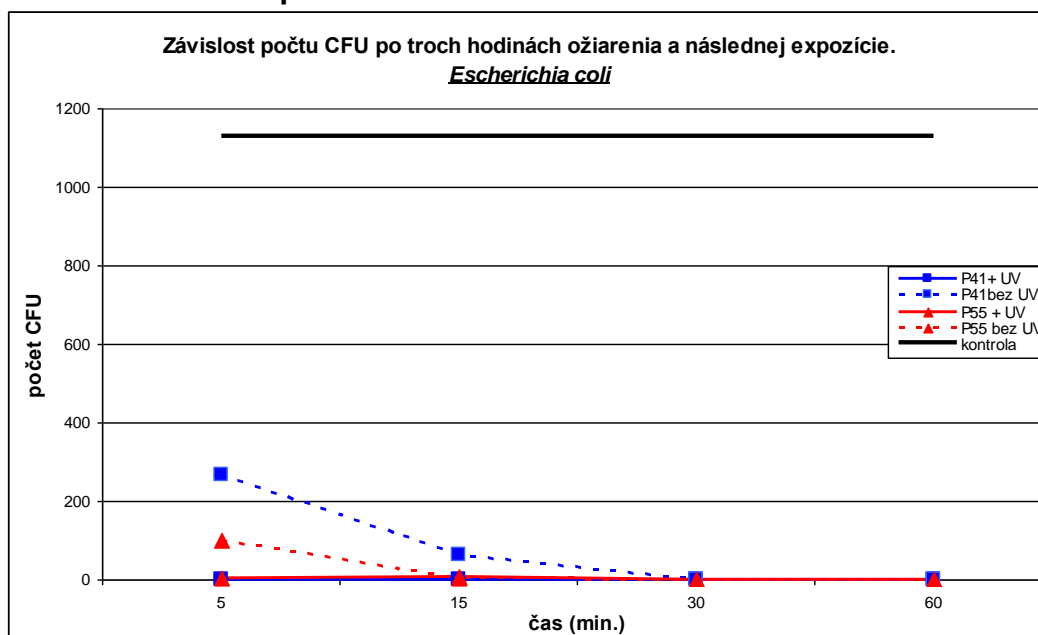
Tab. 1.1.1. Počet CFU pri pokuse prvou metódou.

<i>Escherichia coli</i>				
vzorky	P-41		P-55	
kontakt baktérií s náterom ožiareným 3 hodiny	CFU			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	0	266	2	100
15 min.	0	62	8	2
30 min.	1	0	0	0
60 min.	0	0	0	0

Počet inokulovaných baktérií odpovedá 1129 CFU na sklíčko.

Z grafu 1.1.2. je zrejماً vysoká citlivosť *E. coli* k náterom za obidvoch podmienok. Po ožiarení UV-VIS prejavoval vyššiu aktivitu náter P-41 ale bez ožiarenia UV bol náter P-55 aktívnejší. Pre vysokú citlivosť *E. coli* boli rozdiely vo výsledkoch menej pozorovateľné.

Graf 1.1.2. Závislosť počtu CFU na kontaktnom čase.



Staphylococcus aureus

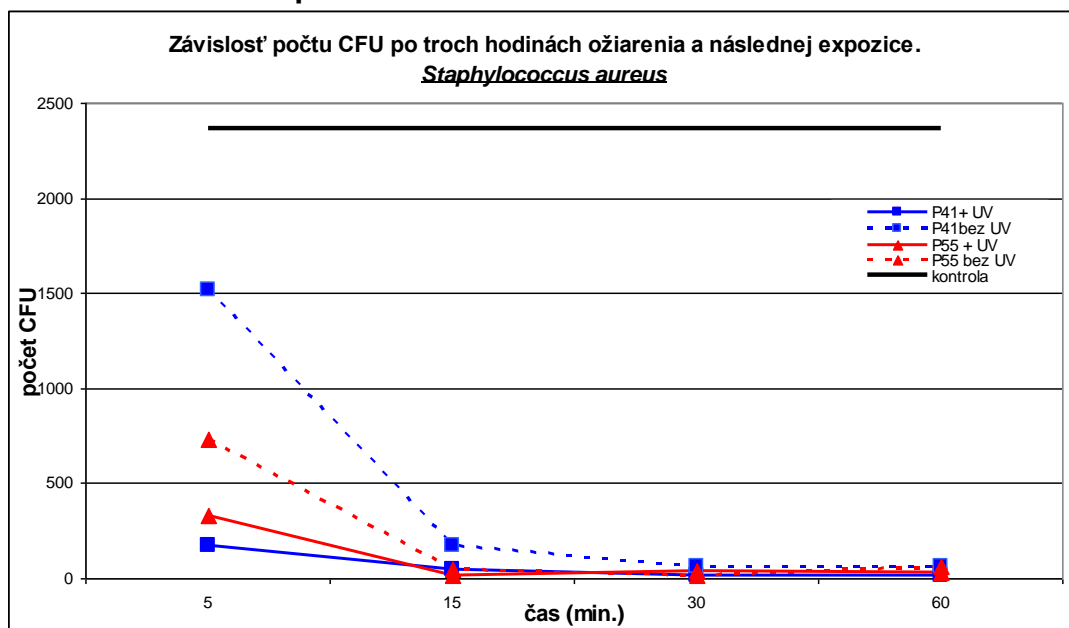
Tab. 1.2.1. Počet CFU pri pokuse prvou metódou.

<i>Staphylococcus aureus</i>				
vzorky	P-41		P-55	
kontakt baktérií s náte- rom ožiareným 3 hodiny	CFU			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	176	1520	332	732
15 min.	46	170	18	48
30 min.	18	63	40	16
60 min.	18	59	35	60

Počet inokulovaných baktérií odpovedá 2368 CFU na sklíčko.

S. aureus sa ukázal ako odolnejší voči fotokatalytickému javu a ani po jednej hodine expozície neklesol počet CFU na nulu. Po ožiarení sa taktiež javili náter P-41 ako účinnejší pričom bez UV-VIS ožiarenia bol účinnejší náter P-55 (viz Graf 1.2.2.)

Graf 1.2.2. Závislosť počtu CFU na kontaktnom čase.



Účinnosť.

Z tabuľky 1.3.1. je vidieť, že pokles bol už po 30 minútach sto percentný.

Vzhľadom ku kontrole sú poklesy aj o dva rády.

Tab. 1.3.1. Účinnosť náterov.

<i>Escherichia coli</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
kontakt baktérií s náterom ožiareným 3 hodiny	Pokles [%]			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	100,0	76,4	99,8	91,1
15 min.	99,9	94,5	99,3	99,8
30 min.	100,0	100,0	100,0	100,0
60 min.	100,0	100,0	100,0	100,0

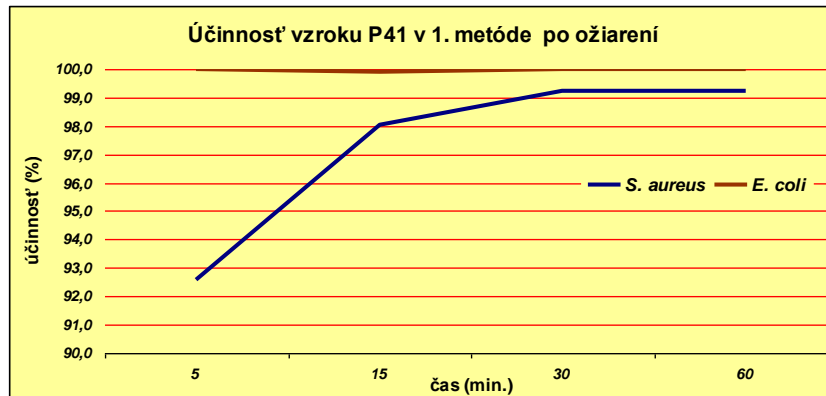
Tab. 1.3.2. Účinnosť náterov.

<i>Staphylococcus aureus</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
kontakt baktérií s náterom ožiareným 3 hodiny	Pokles [%]			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	92,6	35,8	86,0	69,1
15 min.	98,1	92,8	99,2	98,0
30 min.	99,2	97,3	98,3	99,3
60 min.	99,2	97,5	98,5	97,5

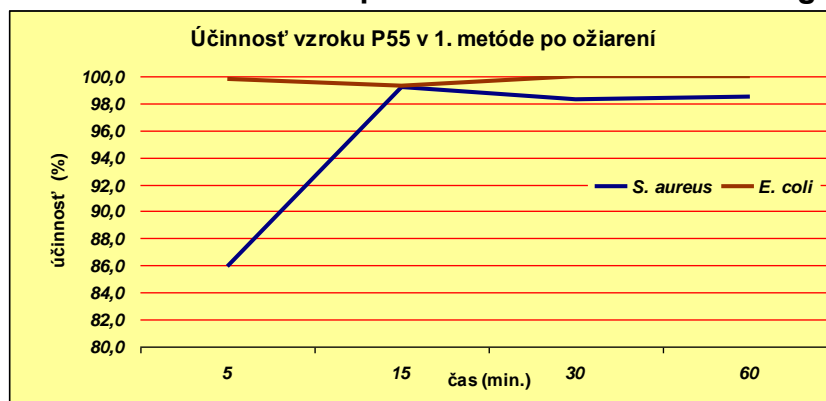
V každom prípade bol *S.aureus*, ako reprezentant G+ baktérií, odolnejší naproti *E. coli*.(viz Tab 1.3.1. a 1.3.2.) Z grafov 1.4.1. až 1.4.4. vyplýva, že pri oboch mikroorganizmoch bol vplyv UV-VIS žiarenia vysoký.

Grafické porovnanie účinnosti náterov na testované mikroorganizmy.

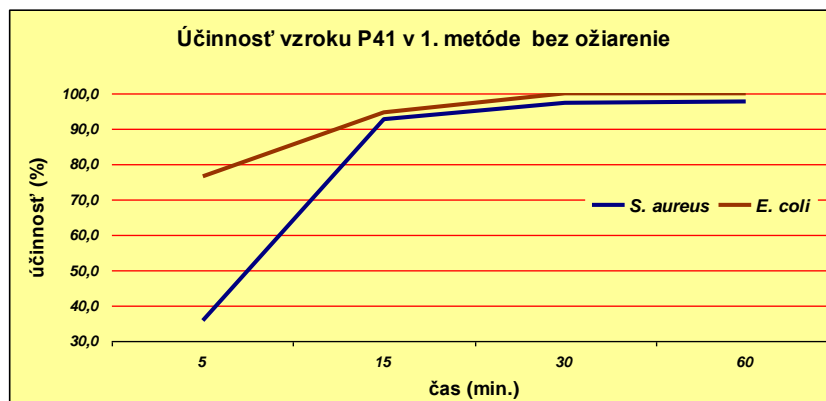
Graf 1.4.1. Účinnosť vzorku P-41 po ožiarení na rôzne mikroorganizmy.



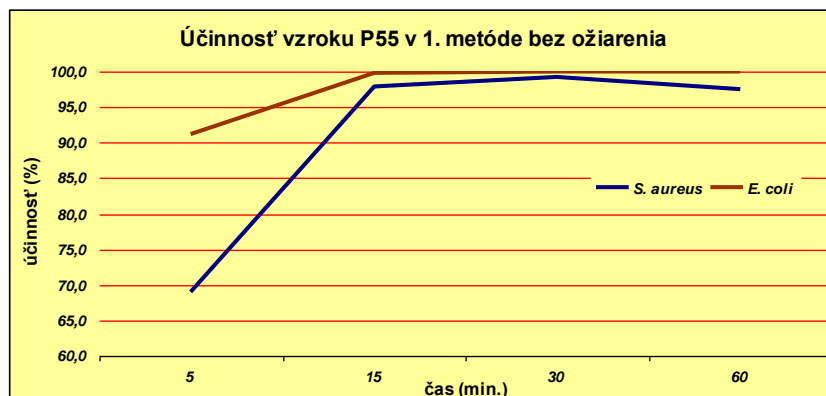
Graf 1.4.2. Účinnosť vzorku P-55 po ožiarení na rôzne mikroorganizmy.



Graf 1.4.3. Účinnosť vzorku P-41 bez ožiarenia na rôzne mikroorganizmy.



Graf 1.4.4. Účinnosť vzorku P-55 bez ožiarenia na rôzne mikroorganizmy.



7.2 Výsledky k metóde ožarovania náterov s AA spolu s nanesenou suspenziou.

Escherichia coli

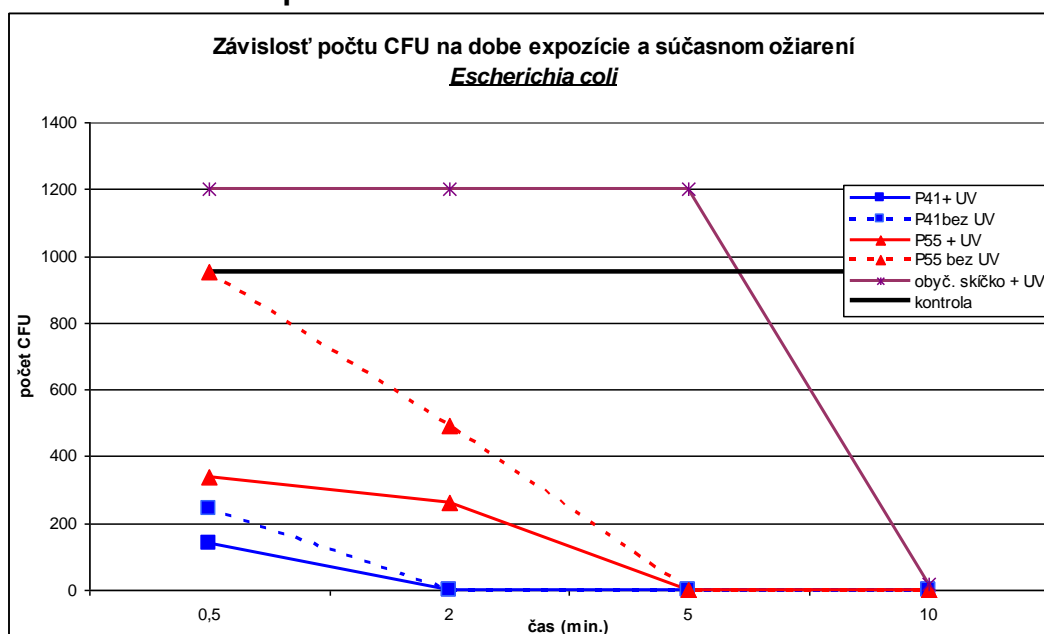
Tab. 2.1.1. Počet CFU pri pokuse druhou metódou..

<i>Escherichia coli</i>					
Vzorky	P-41		P-55		Obyčajné sklíčko
expozícia povrchu náteru s baktériami	CFU				
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno
0,5 min.	139	245	338	932	> 1200
2 min.	0	0	261	494	> 1200
5 min.	0	0	0	0	> 1200
10 min.	0	0	0	0	18

Počet inokulovaných baktérií odpovedá 952 CFU na sklíčko.

Pri súčasnom ožarovaní bol náter P-41 vysoko účinný na *E. coli*. Fialová čiara v grafe 2.1.2. znázorňuje vplyv samotného UV-VIS žiarenia, ktoré do piatich minút nemalo takmer žiadny efekt na suspenziu na obyčajnom sklíčku ale po 30 minútach došlo k zahubeniu, čo mohlo spôsobiť vysychanie a vyššia teplota.

Graf 2.1.2. Závislosť počtu CFU na kontaktom čase.



Staphylococcus aureus

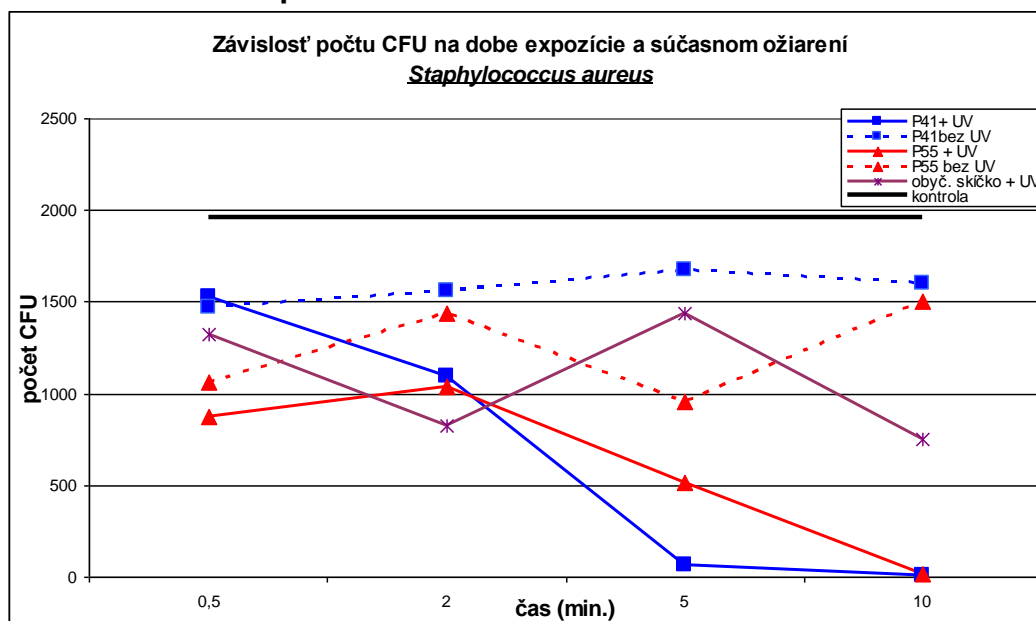
Tab. 2.2.1. Počet CFU pri pokuse druhou metódou.

<i>Staphylococcus aureus</i>					
Vzorky	P-41		P-55		Obyčajné sklíčko
expozícia povrchu náteru s baktériami	CFU				UV-VIS Áno
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	
0,5 min.	1524	1472	876	1060	1326
2 min.	1092	1560	1034	1440	828
5 min.	69	1672	516	956	1536
10 min.	10	1604	16	1504	748

Počet inokulovaných baktérií odpovedá 1968 CFU na sklíčko.

Graf 2.2.2. znázorňuje, že ani pri 30 minútovom ožarovaní nedošlo k úplnému zahubeniu *S. aureus* na žiadnom sklíčku ale ožarovanie UV-VIS malo zásadný vplyv na pokles CFU. Náter P-55 javil určité známky biocídности aj bez ožiarovania UV-VIS. Samotné UV-VIS žiarenie na obyčajné sklíčko malo minimálny vplyv.

Graf 2.2.2. Závislosť počtu CFU na kontaktnom čase.



Pseudomonas aeruginosa

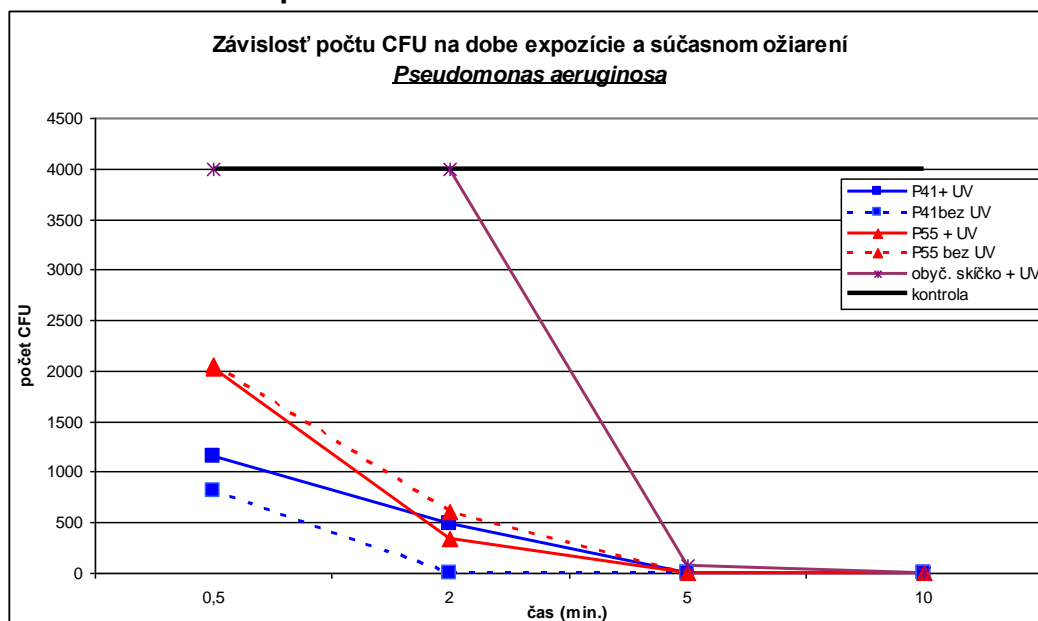
Tab. 2.3.1. Počet CFU pri pokuse druhou metódou.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
Vzorky	P-41		P-55		Obyčajné sklíčko
expozícia povrchu náteru s baktériami	CFU				
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno
0,5 min.	1160	820	2028	2054	4000
2 min.	490	0	346	600	4000
5 min.	0	0	0	0	69
10 min.	0	0	0	0	0

Počet inokulovaných baktérií odpovedá 4000 CFU na sklíčko.

Z grafu 2.3.2. je zrejmé, že *P. aeruginosa* bola vysoko citlivá na fotokatalýzu na obidvoch náteroch asi rovnako. UV-VIS žiarenie na suspenziu na obyčajnom sklíčku zahubilo všetky mikroorganizmy až pri expozícii 30 minút, čo vzhľadom na veľké rozpätie grafu 2.3.2 je lepšie badateľné z tabuľky 2.3.1.

Graf 2.3.2. Závislosť počtu CFU na kontaktnom čase.



Bacillus subtilis

Tab. 2.4.1. Počet CFU pri pokuse druhou metódou.

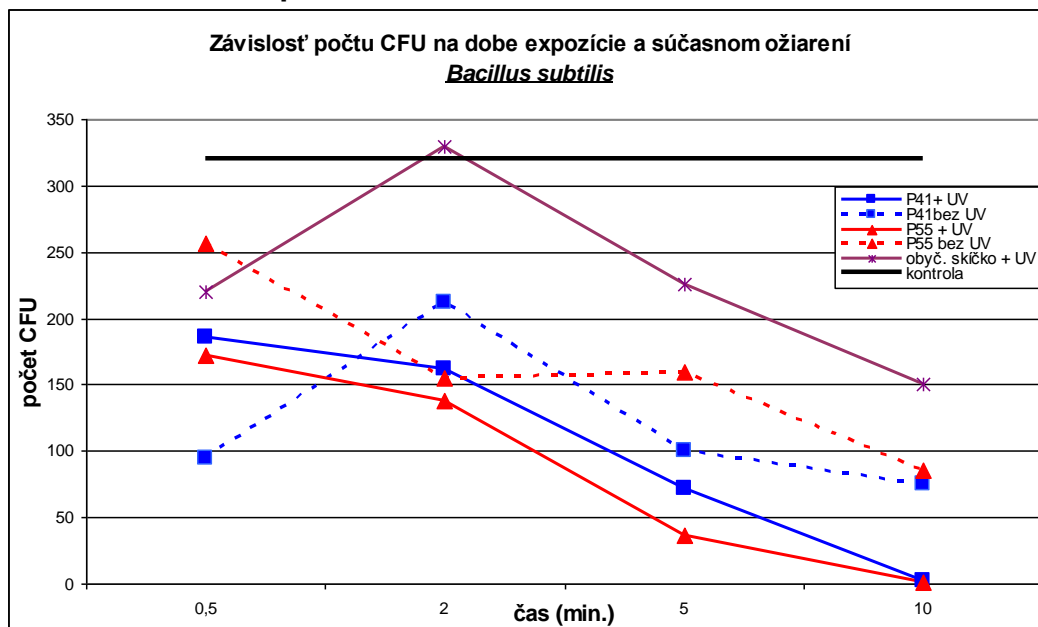
<i>Bacillus subtilis</i>					
Vzorky	P-41		P-55		Obyčajné sklíčko
expozícia povrchu náteru s baktériami	CFU				
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno
0,5 min.	186	95	172	256	220
2 min.	162	212	138	155	330
5 min.	72	100	37	160	226
10 min.	2	75	0	85	150

Počet inokulovaných baktérií odpovedá 320 CFU na sklíčko.

Mikroorganizmus *B. subtilis* bol voči fotokatalýze odolnejší a k úplnému zahubeniu bolo potrebné 30 minútové ožarovanie UV-VIS a to len na nátere P-55, čo odzrkadľuje tabuľka 2.4.1.

Samotné UV-VIS žiarenie na obyčajnom sklíčku vyvolalo len pokles CFU aj po 30 minútach. Na ožarovaných náteroch znázorňuje graf 2.4.2. lineárny pokles.

Graf 2.4.2. Závislosť počtu CFU na kontaktnom čase.



Candida albicans:

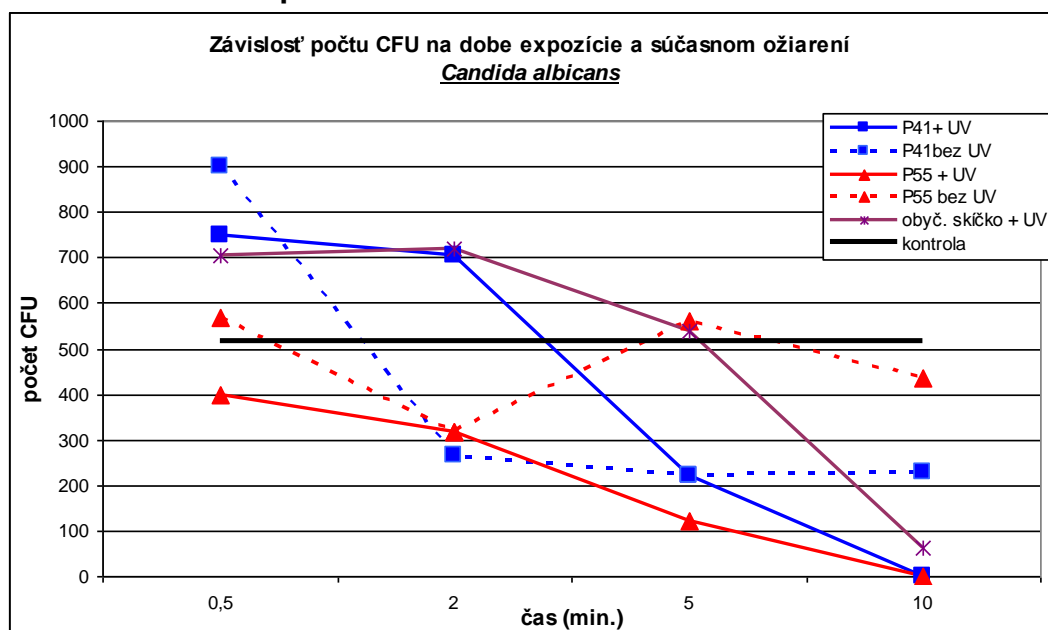
Tab. 2.5.1. Počet CFU pri pokuse druhou metódou..

<i>Candida albicans</i>					
Vzorky	P-41		P-55		Obyčajné sklíčko
expozícia povrchu náteru s baktériami	CFU				
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno
0,5 min.	750	900	400	568	704
2 min.	704	264	316	316	720
5 min.	220	220	122	560	540
10 min.	1	230	1	436	62

Počet inokulovaných húb odpovedá 516 CFU na sklíčko.

Z grafu 2.5.2. je vidieť, že počet CFU bol do dvoch minút vyšší ako v kontrole na ožarovaných vzorkách. Badateľný pokles bol pri ožarovaní UV kde po desiatich minútach bol takmer sto percent. UV-VIS na obyčajne sklíčko malo výrazný vplyv na suspenziu len po desiatich minútach.

Graf 2.5.2. Závislosť počtu CFU na kontaktnom čase.



Účinnosť.

Tabuľky znázorňujú účinnosť náterov P-41 a P-55 s ožiarením a bez ožiarovania.

Tabuľka 2.6.1. znázorňuje sto percentný pokles pri nátere P-41 už po dvoch minútach ožarovania.

Tab. 2.6.1. Účinnosť náterov.

<i>Escherichia coli</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia povrchu náteru s baktériami	Pokles [%]			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
0,5 min.	88,4	74,3	71,8	0,0
2 min.	100,0	100,0	78,3	48,1
5 min.	100,0	100,0	100,0	100,0
10 min.	100,0	100,0	100,0	100,0

Záporný pokles v tabuľke 2.6.2. voči obyčajnému sklíčku môže byť spôsobený väčšou adhéziou mikroorganizmov k povrchu náteru.

Po dlhšej dobe ožiarovania sa pri oboch náteroch blížil pokles k sto percentám.

Tab. 2.6.2. Účinnosť náterov.

<i>Staphylococcus aureus</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia povrchu náteru s baktériami	Pokles [%]			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
0,5 min.	-14,9	25,0	33,9	46,0
2 min.	-31,9	20,5	-24,9	26,6
5 min.	95,2	14,8	64,1	51,3
10 min.	98,7	18,2	97,9	23,3

Pokles CFU v tabuľke 2.6.3. bol už po dvoch minútach veľmi výrazný.

Tab. 2.6.3. Účinnosť náterov.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia povrchu náteru s baktériami	Pokles [%]			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
0,5 min.	71,0	79,5	49,3	48,7
2 min.	87,8	100,0	91,4	85,0
5 min.	100,0	100,0	100,0	100,0
10 min.	100,0	100,0	100,0	100,0

Tab. 2.6.4. Účinnosť náterov.

<i>Bacillus subtilis</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia povrchu náteru s baktériami	Pokles [%]			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
0,5 min.	15,5	70,3	21,8	20,0
2 min.	50,9	33,8	58,2	51,6
5 min.	68,1	68,8	83,6	50,0
10 min.	98,7	76,6	100,0	73,4

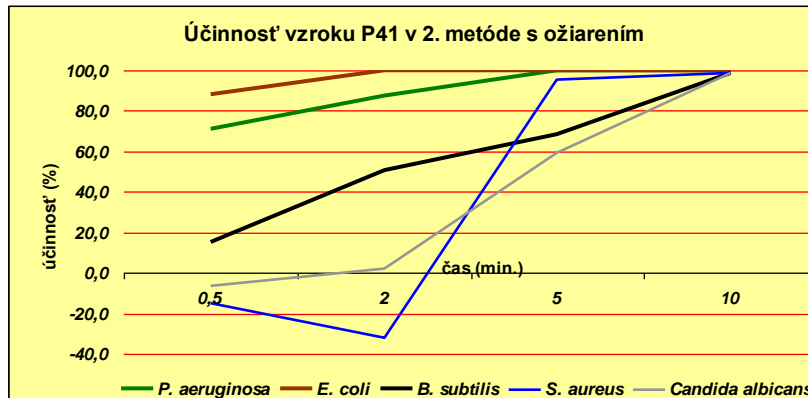
Tab. 2.6.5. Účinnosť náterov.

<i>Candida albicans</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia povrchu náteru s baktériami	Pokles [%]			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
0,5 min.	-6,5	-74,4	43,2	-10,1
2 min.	2,2	48,8	56,1	38,8
5 min.	59,3	57,4	77,4	-8,5
10 min.	98,4	55,4	98,4	15,5

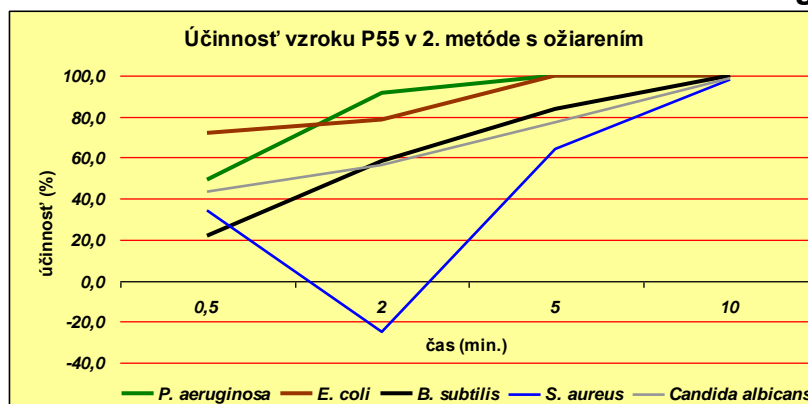
Grafy 2.7.3. a 2.7.4. Bez ožiarovania znázorňujú na mikroorganizmy *S. aureus*, *B. subtilis* a *C. albicans* vplyv menší. Na ožarovaných sklíčkach grafov 2.7.1. a 2.7.2. po desiatich minútach bol pri všetkých mikroorganizmoch pokles stopercentný, pričom G- mali sto percentný pokles už po piatich minútach.

Grafické porovnanie účinnosti náterov na testované mikroorganizmy.

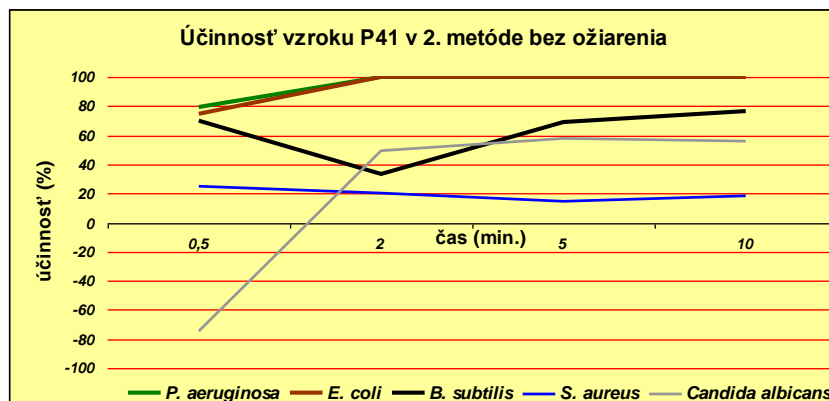
Graf 2.7.1. Účinnosť vzorku P-41 s ožiarením na rôzne mikroorganizmy.



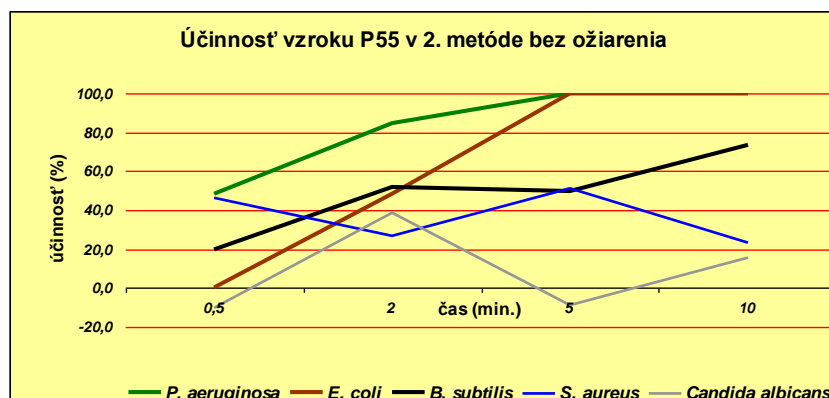
Graf 2.7.2. Účinnosť vzorku P-55 s ožiarením na rôzne mikroorganizmy.



Graf 2.7.3. Účinnosť vzorku P-41 bez ožiarovania na rôzne mikroorganizmy.



Graf 2.7.4. Účinnosť vzorku P-55 bez ožiarovania na rôzne mikroorganizmy.



7.3 Výsledky k metóde napred ožarovania náterov s AA rôznu dobu.

Escherichia coli

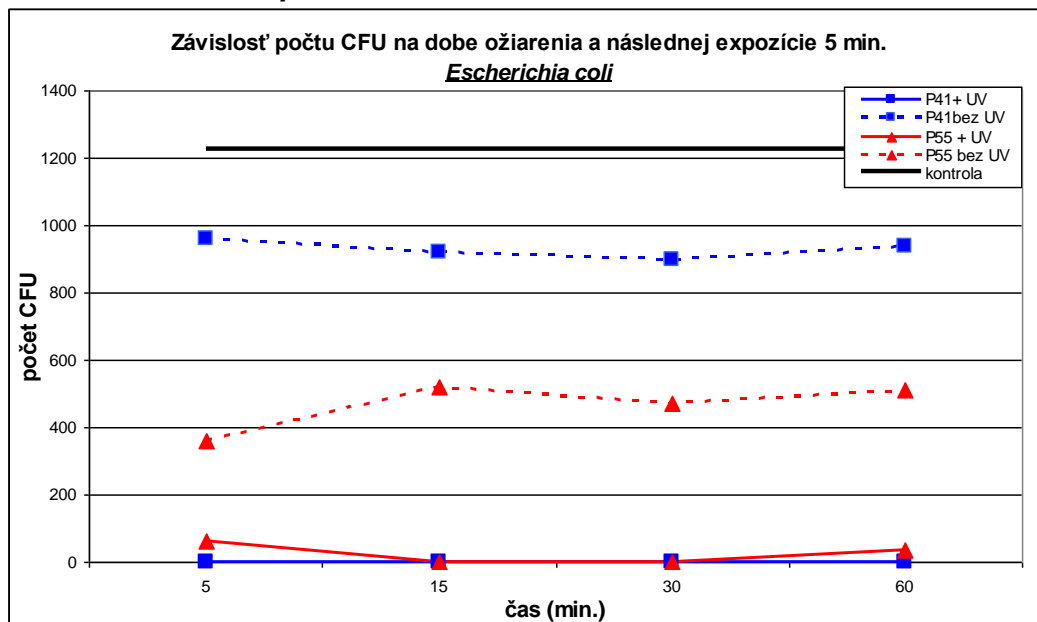
Tab. 3.1.1. Počet CFU pri pokuse tret'ou metódou.

<i>Escherichia coli</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia náteru	CFU			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	0	960	63	360
15 min.	0	920	0	520
30 min.	0	900	0	470
60 min.	0	940	35	510

Počet inokulovaných baktérií odpovedá 1227 CFU na sklíčko.

Graf 3.1.2. znázorňuje takmer nezávislý pokles na dobe ožarovania klíčka bez suspenzie. Na ožarovných sklíčkach bol od prvých piatich minút takmer stopercentný pričom pri neožarovných sa pohyboval celú dobu na úrovni 25 % pri P-41 resp 60% pri P-55.

Graf 3.1.2. Závislosť počtu CFU na kontaktom čase.



Staphylococcus aureus

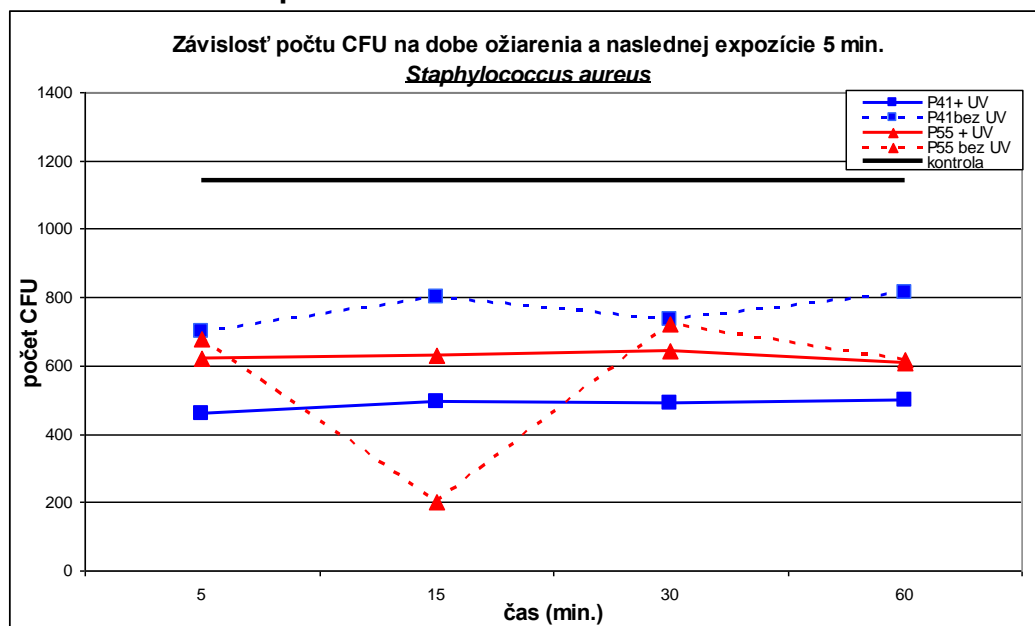
Tab. 3.2.1. Počet CFU pri pokuse tret'ou metódou.

<i>Staphylococcus aureus</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia náteru	CFU			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	458	700	620	680
15 min.	496	800	632	200
30 min.	488	734	644	720
60 min.	500	812	608	618

Počet inokulovaných baktérií odpovedá 1144 CFU na sklíčko.

V grafe 3.2.2. bol pokles taktiež takmer nezávislý na dobe ožarovania. Pri nátere P-41 po ožarovaní bol celú dobu pokles asi 60% a pri nátere P-55 asi 45%. Bez ožarovania sa zdá byť náter P-55 účinnejší.

Graf 3.2.2. Závislosť počtu CFU na kontaktnom čase.



Pseudomonas aeruginosa

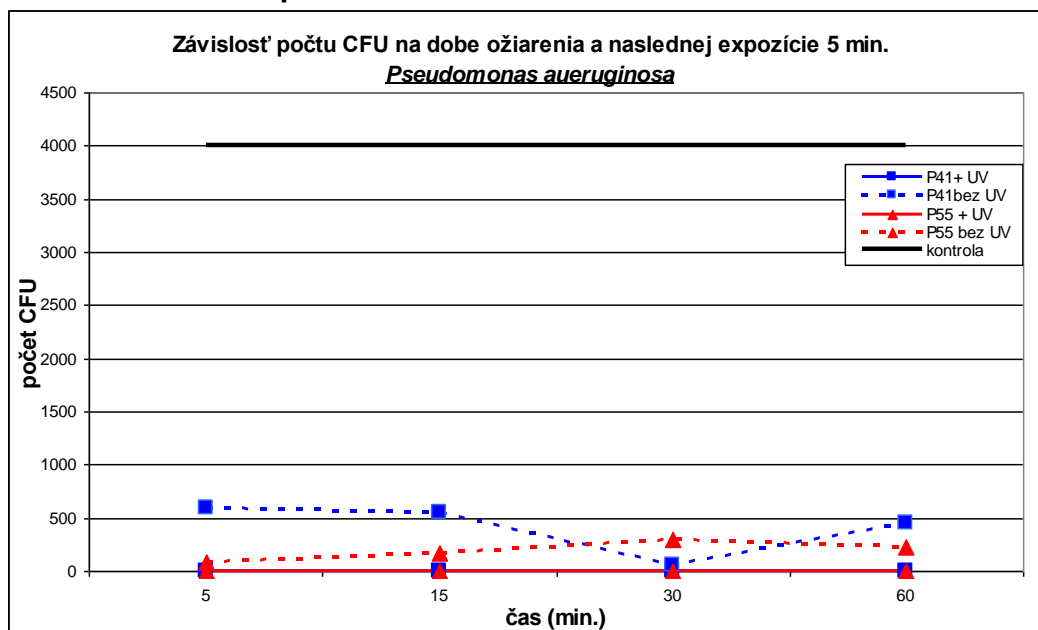
Tab. 3.3.1. Počet CFU pri pokuse tret'ou metódou.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia náteru	CFU			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	0	600	0	79
15 min.	0	556	0	170
30 min.	0	60	0	300
60 min.	0	450	0	230

Počet inokulovaných baktérií odpovedá 4000 CFU na sklíčko.

Pokles v grafe 3.2.2. bol taktiež takmer nezávislý na dobe ožarovania. Na vopred ožarovaných náteroch kultivovateľný bol počet mikroorganizmov nula. Bez ožarovania sa javil náter P-55 účinnejší asi o desať percent.

Graf 3.2.2. Závislosť počtu CFU na kontaktom čase.



Bacillus subtilis

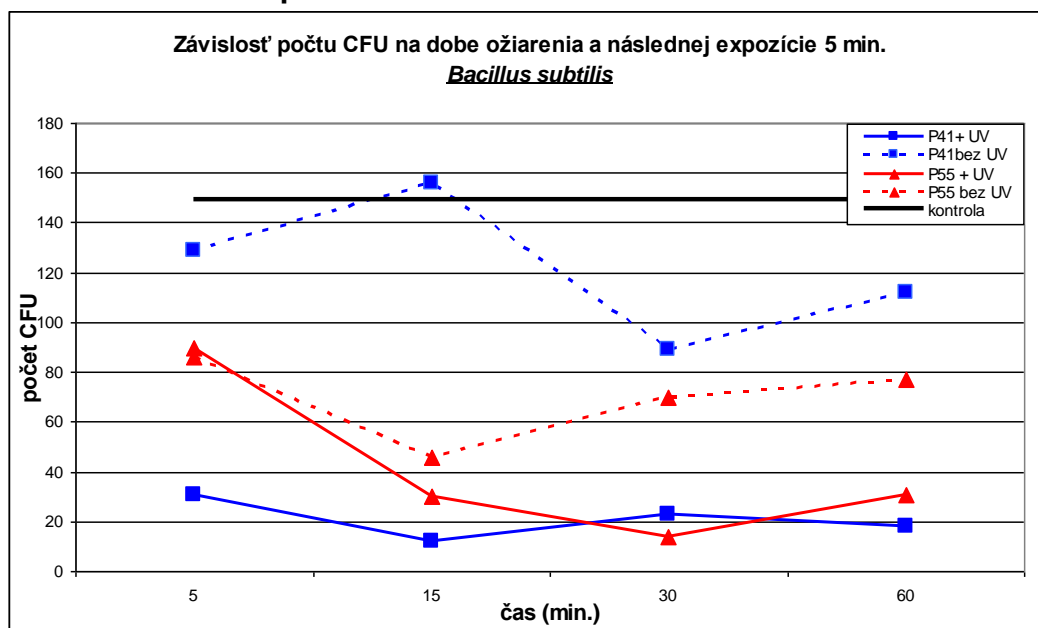
Tab. 3.4.1. Počet CFU pri pokuse tret'ou metódou.

<i>Bacillus subtilis</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia náteru	CFU			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	31	129	90	86
15 min.	12	156	30	46
30 min.	23	89	14	70
60 min.	18	112	31	77

Počet inokulovaných baktérií odpovedá 149 CFU na sklíčko.

Pokles výrazne stúpol len u napred ožiarených náteroch, kde však ani pri jednom nedosiahol sto percent. Bez ožarovania sa náter P-55 ukazoval ako účinnejší, avšak pri ožarovaní bol naopak účinnejší náter P-41.

Graf 3.4.2. Závislosť počtu CFU na kontaktnom čase.



Candida albicans

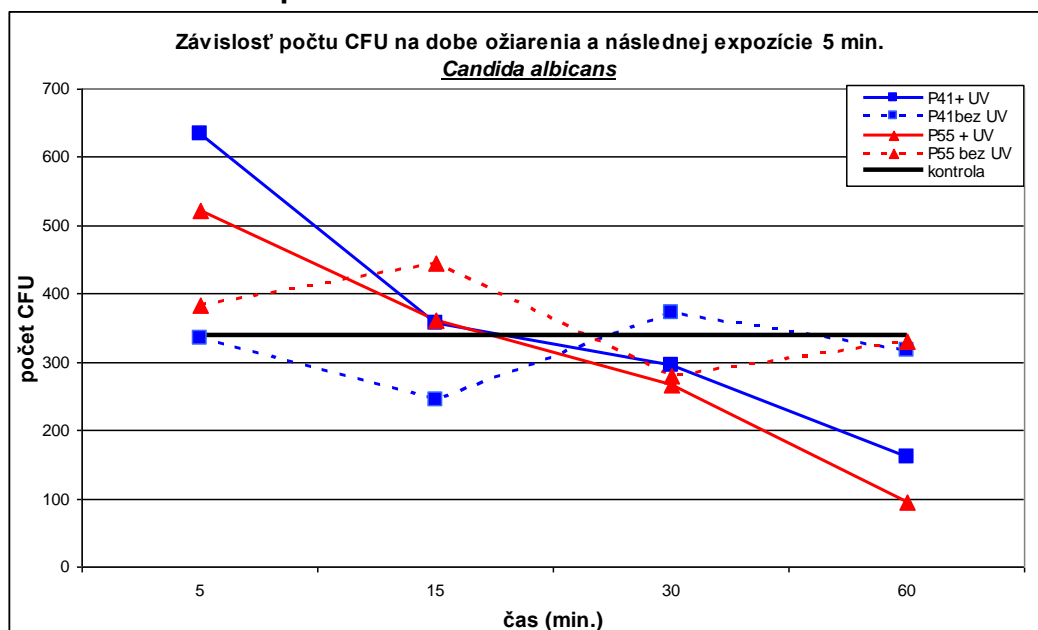
Tab. 3.5.1. Počet CFU pri pokuse tret'ou metódou.

<i>Candida albicans</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
Expozícia náte- ru	CFU			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	634	334	522	382
15 min.	356	244	360	444
30 min.	294	372	266	280
60 min.	160	318	95	330

Počet inokulovaných húb odpovedá 340 CFU na sklíčko.

Výraznejší pokles v grafe 3.5.2. bol len pri dlhšom expozičnom čase a to len pri ožarovaných náteroch, Pri neožarovaných náteroch sa účinnosť takmer nemenila ani s expozičným časom bez rozdielu v náteroch.

Graf 3.5.2. Závislosť počtu CFU na kontaktnom čase.



Účinnosť:

Tabuľky 3.6.1. až 3.6.5. znázorňujú, že doba ožarovania samotných sklíčok nemala takmer žiadny vplyv na biocidnosť. V prípade citlivosti postačovalo už päť minútové ožiarenie.

G- mikroorganizmy v tabuľkách 3.6.1. a 3.6.3. sú omnoho citlivejšie v tejto metóde a to už pri nízkej dobe expozície.

Tab. 3.6.1. Účinnosť náterov.

<i>Escherichia coli</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia náteru	Pokles [%]			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	100,0	21,8	94,9	70,7
15 min.	100,0	25,0	100,0	57,6
30 min.	100,0	26,7	100,0	61,7
60 min.	100,0	23,4	97,1	58,4

Tab. 3.6.2. Účinnosť náterov.

<i>Staphylococcus aureus</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia náteru	Pokles [%]			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	60,0	38,8	45,8	40,6
15 min.	56,6	30,1	44,8	82,5
30 min.	57,3	35,8	43,7	37,1
60 min.	56,3	29,0	46,9	46,0

Tab. 3.6.3. Účinnosť náterov.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia náteru	Pokles [%]			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	100,0	85,0	100,0	98,0
15 min.	100,0	86,1	100,0	95,8
30 min.	100,0	98,5	100,0	92,5
60 min.	100,0	88,8	100,0	94,3

Záporné čísla účinnosti v tabuľkách 3.6.4. a 3.6.5. môžu byť spôsobené inou vzájomnou adhéziou buniek v inom prostredí.

Tab. 3.6.4. Účinnosť náterov.

<i>Bacillus subtilis</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia náteru	Pokles [%]			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	79,2	13,4	39,6	42,3
15 min.	91,9	-4,7	79,9	69,1
30 min.	84,6	40,3	90,6	53,0
60 min.	87,9	24,8	79,2	48,3

Poklesy boli výraznejšie so vzrastajúcim časom expozície len pri *C. albicans* v tabuľke 3.6.5.

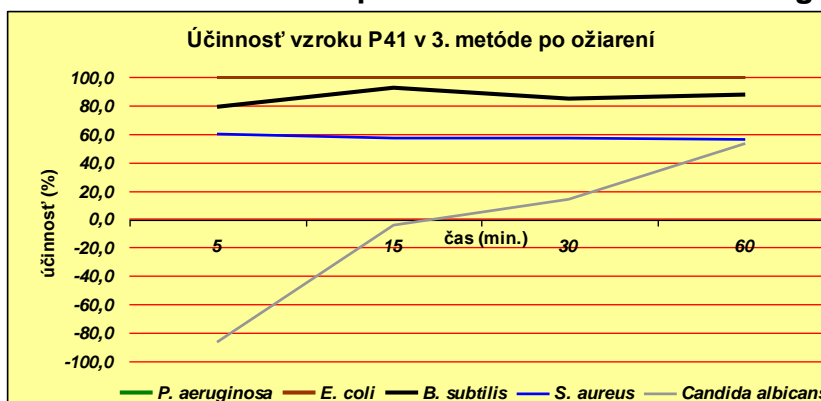
Tab. 3.6.5. Účinnosť náterov.

<i>Candida albicans</i>				
Vzorky	P-41		P-55	
expozícia náteru	Pokles [%]			
	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie	UV-VIS Áno	UV-VIS Nie
5 min.	-86,5	1,8	-53,5	-12,4
15 min.	-4,7	28,2	-5,9	-30,6
30 min.	13,5	-9,4	21,8	17,6
60 min.	52,9	6,5	72,1	2,9

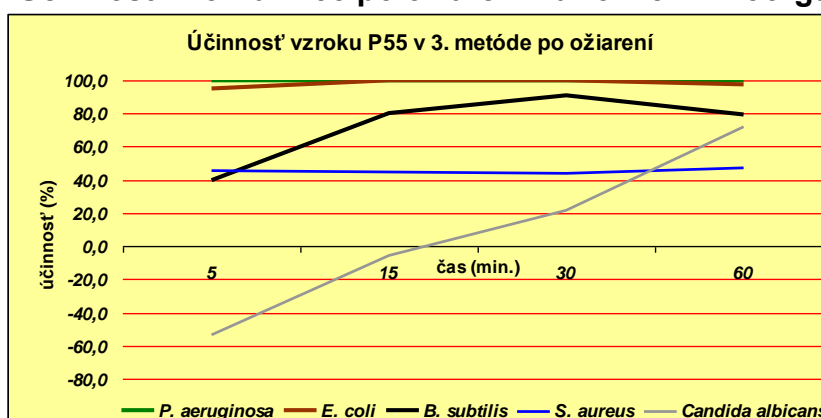
Grafy 3.7.1. a 3.7.2. znázorňujú účinnosť po ožiarení, ktorá mala stúpajúcu tendenciu s časom len u *C. albicans*. G- organizmy boli citlivejšie. V grafoch 3.7.3. a 3.7.4. nebola u žiadneho mikroorganizmu tendencia vzrastajúcej účinnosti.

Grafické porovnanie účinnosti náterov na testované mikroorganizmy.

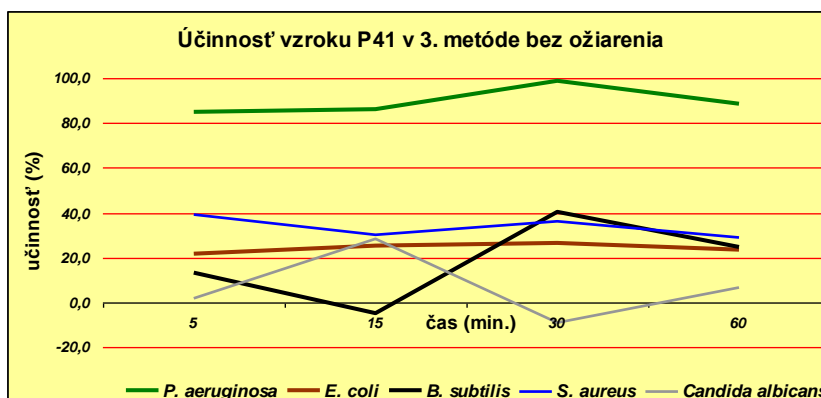
Graf 3.7.1. Účinnosť vzorku P-41 po ožiarení na rôzne mikroorganizmy.



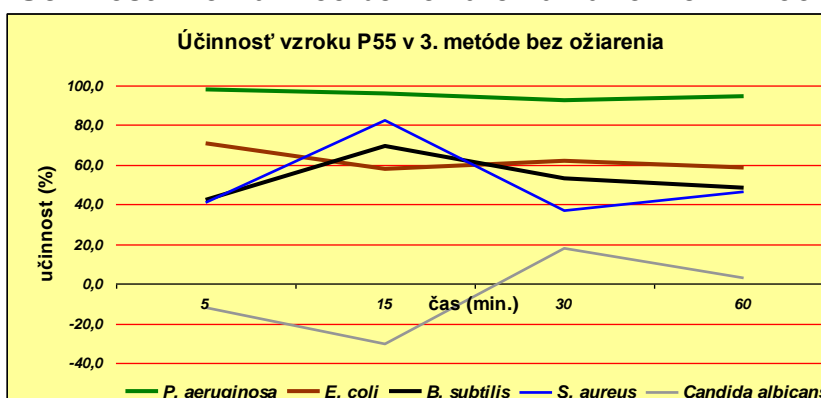
Graf 3.7.2. Účinnosť vzorku P-55 po ožiarení na rôzne mikroorganizmy.



Graf 3.7.3. Účinnosť vzorku P-41 bez ožiarovania na rôzne mikroorganizmy.



Graf 3.7.4. Účinnosť vzorku P-55 bez ožiarovania na rôzne mikroorganizmy.



8 Diskusia.

Vypracovali sme metodiku pre testovanie antimikrobiálnej aktivity (AA) náterových hmôt, kde sme vyvinuli tri rôzne modelové situácie, v ktorých sme ako výsledok uvažovali počet prežívajúcich zárodkov schopných tvoriť kolónie, ktorý sa uvoľnil z povrchu náteru premývaním vo fyziologickom roztoku a po kultivácii nám poskytol počet CFU. Tak nemôžeme vylúčiť, že nedošlo k určitej silnejšej adhézii mikroorganizmov na povrch. Predpokladáme však, že aj pri takejto adhézii by došlo k usmrteniu mikroorganizmov aj keď by to trvalo dlhšiu dobu, lebo citlivosť vykazovali všetky testované mikroorganizmy. Otázka adhézie mikroorganizmov a iných nečistôt hrá významnú rolu pri vývoji náterov s AA. Je to problematika mnohých iných súčastí náterových hmôt, ako sú disperzačné aditívna, silikátové alebo silikónové zložky, plnivá, pigmenty, odpeňovače či iné. Tieto zložky pre nás neboli známe, lebo sú záujmom vývoja firmy Synpo a.s..

Na úvod metodiky, bolo potrebné aby sme pripravili suspenziu o správnej denzite mikroorganizmov. V prípade príliš malej denzity suspenzie boli rozdiely malé a tak aj nepatrná nehomogenita suspenzie alebo nežiaduca kontaminácia mohli negatívne ovplyvniť objektivitu výsledku. Pri vysokej hustote bola naopak možnosť relatívnej nízkej koncentrácie aktívnych látok alebo vrstveniu mikroorganizmov na ploche náteru, čo mohlo viesť k nedostatočnému kontaktu s aktívnymi mikrobicidnými látkami. Vysokú hustotu nebolo možné odčítať na ploche Petriho misiek o priemere 9,5 cm. Kontaminácia tak vysokou koncentráciou mikroorganizmov na jednotku plochy sa v reálnom používaní ani nepredpokladá.

Štandardné testovacie metódy požadujú testovanie na baktériách *Escherichia coli*, ako referenčného zástupcu G- baktérií a *Staphylococcus aureus*, ako zástupcu G+ baktérií. My sme pre lepšie zrovnanie štruktúry a účinku v dvoch metódach zvolili testovanie so *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* a ako zástupcu zcela odlišných eukaryotických mikroorganizmov *Candida albicans*.

Potreba účinnosti u *Staphylococcus aureus* je odôvodnená aj čoraz častejším výskytom MRSA (methicilin-resistant *S. aureus*), pre ktorý už v 90-tých rokoch Blumberg popísal aj rýchly vývoj rezistencie na ciprofloxacín. (BLUMBERG, H. M. et al., 1991). *P. aeruginosa* si vyžiadala našu pozornosť aj dôvodu., že čoraz častejšie tvorí tzv. MDRP kmene (multidrug-resistant *Pseudomo-*

nonas aeruginosa). MDRP sa stáva rozšíreným pôvodcom nozokomiálnych infekcií najmä v klimatizovaných priestoroch nemocníc s častým užívaním karbapenémov. (CAO, B. et al **2004**). Mikroorganizmy rodu *Bacillus* so svojou schopnosťou tvoriť spóry, patria medzi najčastejšie kontaminanty vzduchu, povrchov, kultivačných pôd, čím znehodnocujú laboratórne výsledky a produkciou toxínov sú pôvodcami vážnych infekcií. *C. albicans* bola zvolená pre jej rozličnú morfológickú štruktúru a jej predpokladané iné správanie sa na náteroch s AA, čo sa aj potvrdilo (viz Graf 2.5.2. a 3.5.2.).

V metóde, kedy sme napred ožarovali sklíčka s nátermi po dobu troch hodín ešte pred nanosením suspenzie, sme zistili dobrú mikrobicídnu vlastnosť vzhľadom na nátery neožarované. Predpokladom bolo, že sa počas ožarovania UV-VIS nanočastice v náteroch dostatočne aktivujú a vytvoria dostatok agresívnych radikálov. Toto muselo prebehnúť zo vzdušnej vlhkosti alebo vzdušného kyslíku (viz r 1.1. až 3.5.). Nátery bez ožarovania značne zaostávali v účinnosti za nátermi vopred ožarovanými a to pri oboch mikroorganizmoch (viz Tab. 1.1.1.; 1.2.1. a Graf 1.1.2.; 1.2.2.). Výrazné poklesy nastali po tridsiatich minútach, kde u *E. coli* došlo dokonca aj u neožiarených náteroch k sto percentnému poklesu (viz Tab. 3.1.). Na ožiarených náteroch bol pokles *S. aureus* už po piatich minútach väčší než deväťdesiat percent. Nemôžeme však pripomenúť, že počet inokulovaných zárodkov schopných tvoriť kolónie bol u *S. aurea* vyšší. Účinnosť po ožarovaní bola najlepšia u náteru P-41, avšak bez ožarovania javil mierne lepšiu aktivitu náter P-55. *E. coli* ako zástupca G-baktérií bol omnoho citlivejší už od krátkych kontaktných časov (viz Graf 1.4.1. až 1.4.4.). Rozdiel medzi citlivosťou sa zmenšoval dlhším kontaktným časom. Metódou sme poukázali na to, že nátery s AA nemusia byť aktivované UV-VIS žiarením celú dobu, kedy ešte poskytujú efektívnu antimikrobiálnu ochranu. Predpokladáme teda, že sú schopné si zachovávať vytvorené mikrobicídne častice na povrchu.

V metóde, kedy sme ožarovali nátery spolu so suspenziou, sme volili kratšie časy kontaktu, lebo sme predpokladali vyššiu účinnosť, čo sa aj potvrdilo. Do vyhodnotenia sme museli zahrnúť aj vplyv samotného UV-VIS žiarenia a najmä preto, lebo sa jednalo o krátku vzdialenosť medzi zdrojom a nátermi. Vplyv žiarenia bol badateľný až pri desiatich minútach, kde mohlo dôjsť k vysychaniu vzrastajúcou teplotou. Najcitlivejšia voči blízkeho UV-VIS žiareniu

bola *P. aeruginosa* (viz Tab. 2.3.1.; Graf 2.3.2.). Pokus s obyčajným sklíčkom bol potrebný aj pre vyhodnotenie výsledkov (viz r 4.2.; kapitolu 4.3.2).

K tejto metóde boli najcitlivejšie *E.coli* a *P.aeruginosa*, ktoré preukazovali výbornú citlivosť k ožarovaným povrchom. Ich citlivosť bola dobrá aj k neožarovaným povrchom, aj keď bol pokles menej výrazný (viz Tab. 2.1.1. a 2.3.1. Graf 2.1.2. a 2.3.2.). Pri G+ baktériách a *C. albicans* bol úplný pokles len na ožarovaných náteroch a to až po desiatich minútach kontaktu. Pokles na neožarovaných bol len veľmi mierny. Menší počet CFU v prvých piatich minútach voči kontrole bol pravdepodobne spôsobený adhéziou mikroorganizmov na povrch náteru, keďže bol len veľmi mierny alebo žiadny (viz Tab. 2.2.1.; 2.4.1.; 2.5.1. Graf 2.2.2.; 2.4.2., 2.5.2.). Grafy 2.7.1. až 2.7.4. znázorňujú výrazne lepšiu citlivosť G- baktérií. *C. albicans* preukazovala podobnú citlivosť ako G+ baktérie *S.aureus* a *B. subtilis*.

Je potrebné počítat' aj so zvýšenou teplotou pod zdrojom UV-VIS, ktorá mohla priaznivo ovplyvniť aj kinetiku deštruktívnych reakcií.

Ak by sa táto metóda mala prejavíť v reálnom používaní náterových hmôt s AA, odporúčame žiarenie zdroja UV-VIS. Toto je najviac použiteľné pri jednorazovej dezinfekcii priestorov.

V metóde, kedy sme náter predožarovali rôznu dobu a kontaktná doba bola rovnaká, sme sa snažili zistiť závislosť biocídity náterov na dobe predožarovania. Poklesy sa z časom predožarovania výrazne nemenili a pohybovali sa na podobnej úrovni ako v prvom čase (viz Tab. 3.1.1.; 3.2.1.; 3.3.1.; 3.4.1. a Grafy 3.1.2.; 3.2.2.; 3.3.2.; 3.4.2.).

Výnimku tvoril len pokus s *C. albicans*, kde bol pokles úmerný s dobou predožarovania (viz Tab. 3.5.1. a Graf 3.5.2.). Bez predožarovania sa poklesy ani pri *C.albicns* výrazne nemenili. U *E. coli* a *P. aeruginosa* boli takmer bez rozdielu vysoko účinné obidva predožiarené vzorky náterov pri každej kontaktnej dobe. Náter P-41 bol po predožarovaní účinnejší. Bez predožarienia bol mierne účinnejší náter P-55 (viz Tab. 3.6.1.; 3.6.3.).

G+ baktérie *S. aureus* a *B. subtilis* boli podstatne odolnejšie pričom aj v tomto prípade bol po ožiarení náter P-41 účinnejší avšak bez predožarienia bol mierne účinnejší náter P-55 (viz Tab. 3.6.2.; 3.6.4.).

Pri testoch s *C. albicans* sa objavili záporné čísla účinností a to hlavne na predožiarených náteroch v prvých kontaktných časoch v tabuľke 3.6.5., čo moh-

lo byť dôsledkom lepšieho dispergovania kvasinkových buniek vplyvom náterov s AA. Zrejme došlo k zabráneniu typickej schopnosti flokulácie kvasiniek. (JANDEROVÁ, B., BENDOVIÁ, O. 2000). Faktory, ktoré výrazne ovplyvňujú flokuláciu ako je teplota, koncentrácia iónov, obsah kyslíku a hodnota pH, sa počas fotokatalytického javu môžu zásadne meniť. Je však možné, že znížená schopnosť flokulácie je spôsobená deštrukciou mananproteinov.

Všeobecne boli G- mikroorganizmy k náterom s AA citlivejšie. Dôvodom môže byť hrubšia a hustejšia bunčná stena zložená z peptidoglykánů s polymérmí kyseliny teichoovej u G+ baktérií. U G- baktérií je vonkajšia membrána fosfolipidovej dvojvrstvy obnaženejšia bez ochrany peptidoglykánovej vrstvy a tak nenasýtené a polynenasýtené mastné kyseliny viazané vo fosfolipidoch môžu byť účinnejšie atakované vzniknutými agresívnymi radikálmi a singletovým kyslíkom. A tak po narušení bunčnej steny protoplazma osmoticky bobtná prienikom vody, až citoplazmatická membrána praskne, čo je pre bunku smrteľné.

C. albicans, ako predstaviteľ eukariotických organizmov, bola k ožiareným povrchom náterov po dlhšej kontaktnej dobe dobre citlivá, čo predurčuje použitie náterov s AA aj proti plesniam. Naskytla sa tu však otázka toxicity na vyššie živé organizmy, ktorú potreba overiť alebo vyvrátiť.

Lepšia účinnosť náteru P-41 aktivovaného UV-VIS žiarením v každej z použitých metód, môže byť zapríčinená absorpciou nanočastíc oxidu titaničitého, ktoré vyvolávajú fotokatalýzu práve v týchto vlnových dĺžkach. Pri pokusoch, kde sme sa snažili zamedziť pôsobeniu UV-VIS boli veľmi často vzorky s náterom P-55 podstatne účinnejšie. Spôsobené to mohlo byť prímiesou oxidu zinočnatého v nátere P-55, čo malo rozšíriť absorbciu pre vyvolanie fotokatalýzy do oblasti vlnových dĺžok denného svetla. Aj keď sme sa snažili robiť pokusy v tme, pri manipulácii mohlo dôjsť k aktivácii bežným viditeľným svetlom. Vylepšením metodiky by tak bolo preverenie rovnakých pokusov aktiváciou denným svetlom. Je však dôležité zohľadniť priepustnosť skla okien voči UV žiareniu.

Pre objektívnejšie vyhodnotenie výsledkov by bolo lepšie zrovnávať účinnosť s nátermi bez fotokatalyzujúcich nanočastíc, avšak takéto nátery nám neboli dodané. Viac by sa tak odzrkadlila adhezivita mikroorganizmov k náteru.

Vzhľadom na vysoký počet náterových hmôt s AA vo vývoji, odporúčame na základe týchto poznatkov metodiku skrátiť a priblížiť reálnym podmienkam budúceho využitia.

9 Záver.

V práci sa podarilo vypracovať metodiku pre vyhodnotenie náterov na antimikrobiálnu aktivitu. Vplyv UV-VIS žiarenia na účinnosti sa jednoznačne preukázal, čo predurčuje používanie spolu s UV zdrojom. Avšak perspektívne sa ukazuje aj modifikovanie pre aktiváciu fotokatalytického javu v spektre viditeľnej oblasti žiarenia. Z práce vyplynula lepšia citlivosť G- baktérií, čo môže predstavovať riešenie v priestoroch s rizikom výskytu MDRP. Za prítomnosti UV žiarenia predpokladáme aj dobrú protiplesňovú aktivitu.

10 Použité skratky.

AA	antimikrobiálna aktivita
CFU	zárodky schopné tvoriť kolónie (colony forming units)
G-	Gram-negatívne
G+	Gram-pozitívne
MDRP	multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MRSA	methicilín-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
UV-VIS	ultrafialové-viditeľné spektrum (ultraviolet-visible spectrum)

11 Literatúra.

APTER, A., BRACKER, A., HODGSON, M. et al. Epidemiology of the sick building syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1994**, 94 (2), 277-288.

BLUMBERG, H. M., RIMLAND, D., CARROLL, D. J. et al. Rapid development of ciprofloxacin resistance in methicillin-susceptible and methicillin-resistant staphylococcus-aureus. *J. Inf. dis.*, **1991**, 163 (6), 1279-1285.

CAO, B., WANG, H., SUN, H. et al. Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Hospital inf.*, **2004**, 52 (3), 112-118.

FUJISHIMA A., HONDA K.: *Nature* **1972**, 238, 37.

GOGNIAT, G., DUKAN, S. TiO₂ photocatalysis causes DNA damage via Fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2007**, 73 (23), 7740-7743.

HABIBI, M., VOSOOGHIAN, H.. Photocatalytic degradation of some organic sulfides as environmental pollutants using titanium dioxide suspension. *J. Photochem. Photobiol. A-Chemistry*, **2005**, 174 (1), 45-52.

HOFFMANN, M .R., MARTIN, S. T., CHOI W. Y., BAHNEMANN D.W.: *Chem. Rev.* **1995**, 95, 69.

HOCHMANOVÁ, L., FERENČÍK I., Hygienické nátěry na bázi fotokatalyticky působících oxidů kovů a způsoby testování. *Hygienické nátěry pro stavby a zařízení*, Pardubice, Synpo a. s., . Dec. **2005**

JANDEROVÁ, B., BENDO VÁ, O. *Úvod do biologie kvasinek*. 1st ed. Praha: Karolinum, 2000. 108 p. ISBN 80-7184-990-1.

JOHNS, K. *Surf. coat. int. part b-coatings transactions*, **2003**, 86 (2), 101-100.

LÁZNIČKOVÁ, A., ĎOBAL, S., GAŠPARIČ, J., DITTRICH, M.. *Fyzikální chemie pro posluchače farmacie II. díl*. Praha: Karolinum, **2000**. 26 p. ISBN 80-7184-447-0.

MORRISON, S. Hygienic coatings fight dirt and disease. [online]. [cit. 2009-03-20]. Available from www:

<http://www.specialchem4coatings.com/resources/articles/article.aspx?id=6481>

NORMANN, S. A., EDGE, M., SANDOVAL, G., JO VERRAN, J., STRITTON, J., MALTBY, J. Photocatalytic Coatings for Environmental Applications. *Photochem. Photobiology*, **2005**, 81, 279-290.

PAGELLA, C., MARENCO, C., SCARSI, M., MALFATTO, F., Metodi di prova per i p.v. igienici = Supporting the Claims : Test methods for hygienic coatings. *Pitture e vernici*, **2007**, 3 (3), 25-33. ISSN 0048-4245.

PLOTNIKOV J.: *Allgem. Photochem.*, 2nd ed. Walter de Gruyter, West Berlin, **1936**, 362-375.

SHIJUN LIAO, HUANG DONGGEN, DENGHUA YU, YUNLAN SU, GAO QING YUAN, Preparation and characterization of ZnO/TiO₂, SO₄²⁻/ZnO/TiO₂. *J. Photochem. Photobiol. A- Chemistry*, **2004**, 168, 7-13.

UCHINO, T., TOKUNAGA, H., ANDO, M. et al., Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO₂-UVA treatment. *Toxicol. In vitro*, **2002**, 16 (5), 629-635.