



Antibakteriální a antiprotozoární účinek nanočástic interkalovaných ve fylosilikátech

E. Pazdziora, K. Matějová, **ZÚ Ostrava**

M. Valášková, S. Holešová, M. Hundáková,

Centrum nanotechnologií, VŠB-TU Ostrava

Antimikrobiální účinnost

- Antibiotika
- Chemoterapeutika
- Antiseptika
- Fyzikálně chemické jevy
- Dezinfekční prostředky
- **Nanočástice kovů**
- **Zásadní rozdíly**

Antibiotika x dezinfekční prostředky (DP)

- Dezinfekční prostředky nejsou svým původem produkty přírody, nýbrž výrobky člověka
- Nepůsobí na svůj cíl specificky, ale zasahují všechny dosažitelné struktury mikroorganismů svým působením formou denaturace, fixace, oxidace, chlorace, alkylace apod.
- **Výrobce předepsané koncentrace DP jsou až 10 000 krát vyšší nežli jsou zjištěné hodnoty minimální inhibiční koncentrace**

Ve kterých činnostech bychom potřebovali uplatnit nanotechnologie

- Čisté prostory ve zdravotnictví – podlahy a stěny operačních a zákrových sálů, JIP
- Vzduchotechnika, filtry
- Iontové stříbro k čištění vody v potrubních systémech
- Operační oděvy, krycí operační roušky
- Ústní roušky, polomasky a masky
- Katétry, chirurgický šicí materiál, kloubní náhrady
- Odstraňování biofilmů a zabránění jejich tvorby
- **Zdravotní riziko z nanočástic**

Jaké jsou antimikrobiální účinky nanočástic kovů?

Obvazy a krytí se stříbrem:

Actisorb plus (J + J)
Actisorb Silver 220 – J+J
Acticoat - Aura
Aquacel Ag (Convatec)
Arglaes - Unomedical / Medline
Atrauman Ag (Hartmann)
Biatain Ag (Coloplast)
Calgitrol Ag (B-Braun)
Contreet Foam - Coloplast
Contreet Hydrocolloid - Coloplast
Silvercel (J+J)
Silverlon - Argentum Medical
SilvaSorb - Medline
Urgotul SSD - Laboratoires Urgo
(Parema)



Krytí a obvazy obsahující stříbro

Název	Obsah Ag (mg/100 cm ²)
Silverlon	546
Calgitrol Ag	141
Acticoat	105
Contreet Foam	85
Contreet Hydrocolloid	32
Aquacel Ag	8.3
SilvaSorb	5.3
Actisorb Silver 220	2.7
Urgotul SSD obsahuje 3.75%	-

Proč právě stříbro?

Ag (0) = kov / elementární stříbro má 47 protonů – 47 elektronů

Neutrální náboj – žádný antimikrobiální efekt

Ag (+) = ionizované/kationt stříbra má 47 protonů a 46 elektronů

Pozitivní náboj – antimikrobiální efekt

Bakterie nezískávají rezistenci vůči stříbru

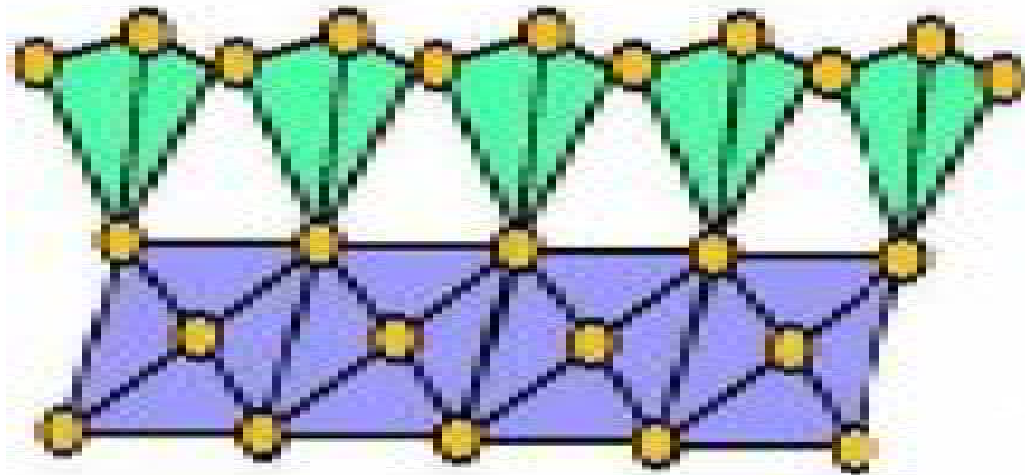
Hlavní otázky, na které hledáme odpověď

- Jaké jsou antimikrobiální účinky nanočástic kovů
- Jak stanovit a hodnotit toxicitu nanočástic
- Jaké jsou krátkodobé a dlouhodobé vlivy materiálů a výrobků s obsahem nanočástic na zdraví

Druhy jílových minerálů (fylosilikátů)

• Typ vrstvy	• Skupiny	Typ oktaedrické sítě
• 1:1	• Serpentin – kaolinit	di-
• 2:1	• Smektity – montmorillonit	tri- di-
• 2:1	• Vermikulity	tri-, di-
• 2:1	• Slídy – illit	tri-, di-

Jílové minerály



Vrstva čtyřstěňů

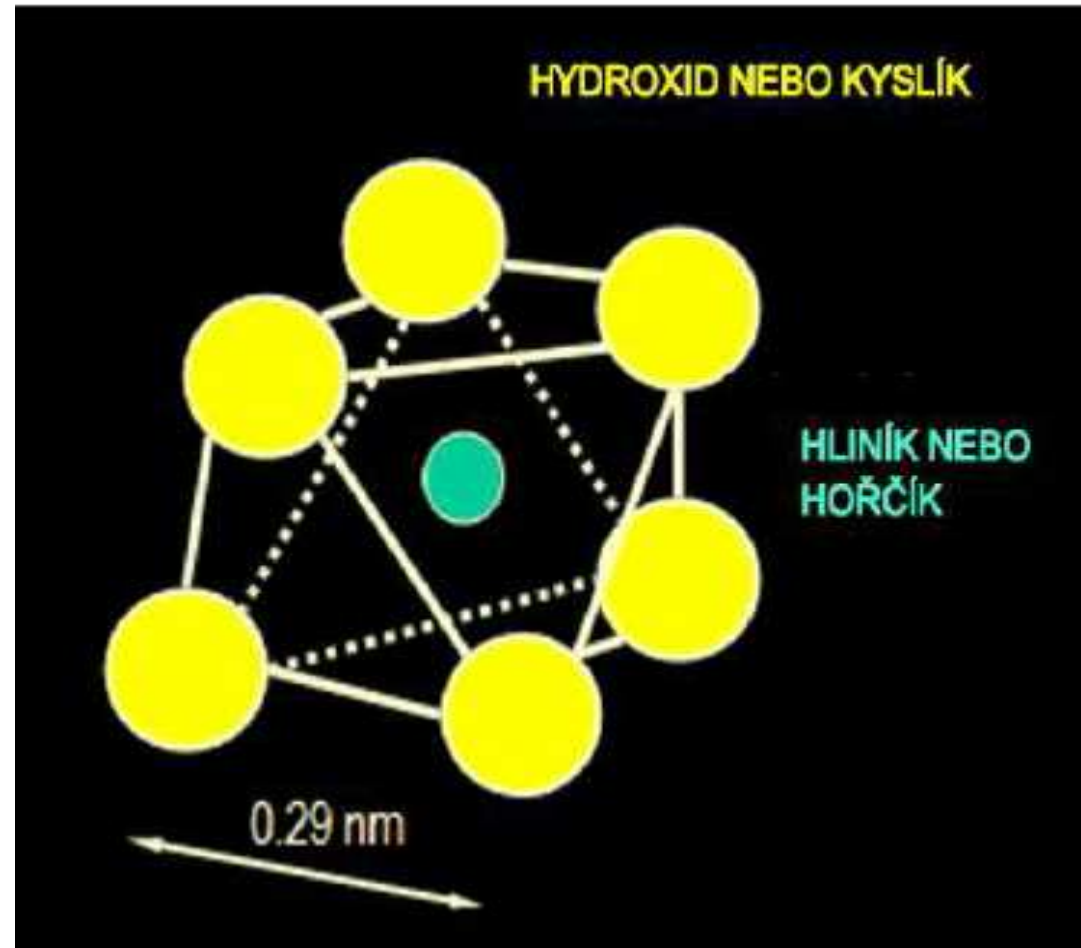
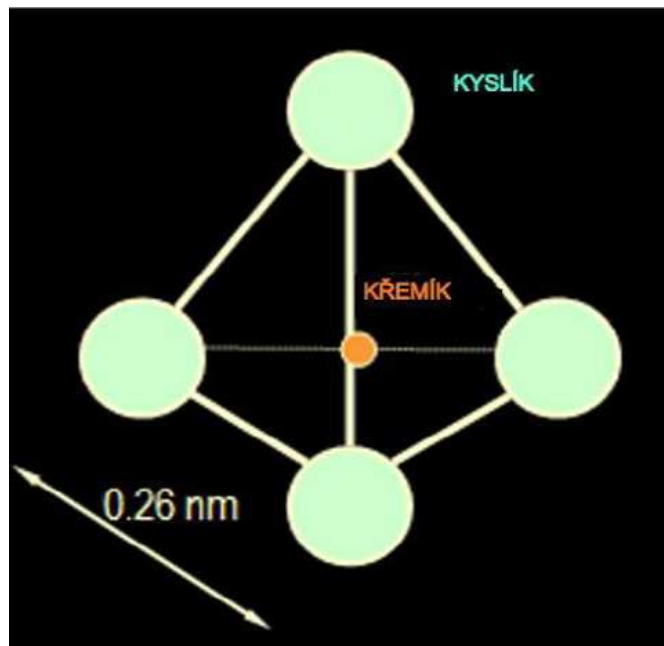
Vrstva osmistěňů

Vrstvy čtyřstěňů a osmistěňů tvoří jednotlivé jílové minerály, jejich vazby ovlivňují chování jílu

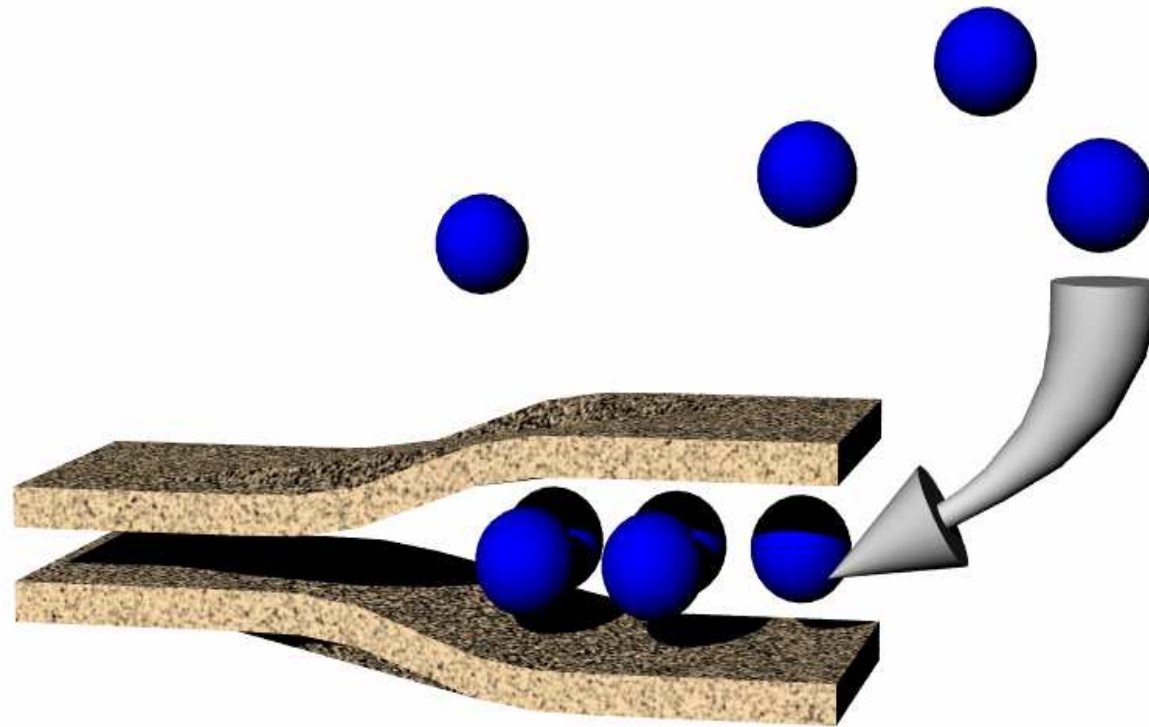
Složení jílových minerálů

Osmistěn hliníku

Čtyřstěn křemíku



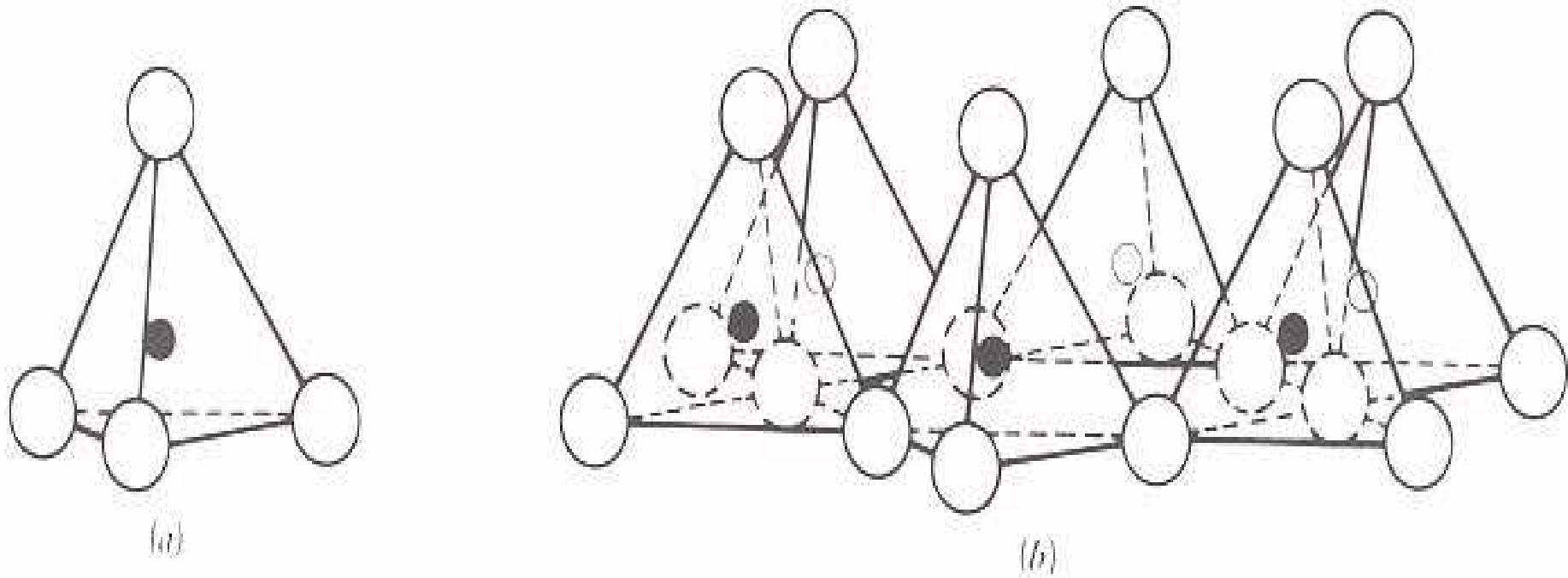
Interkalace - vstup mobilních neutrálních molekul, bezvodých nebo solvatovaných iontů do mezivrstevního prostoru ve vrstevnaté struktuře hosta



Vlastnosti jílových minerálů

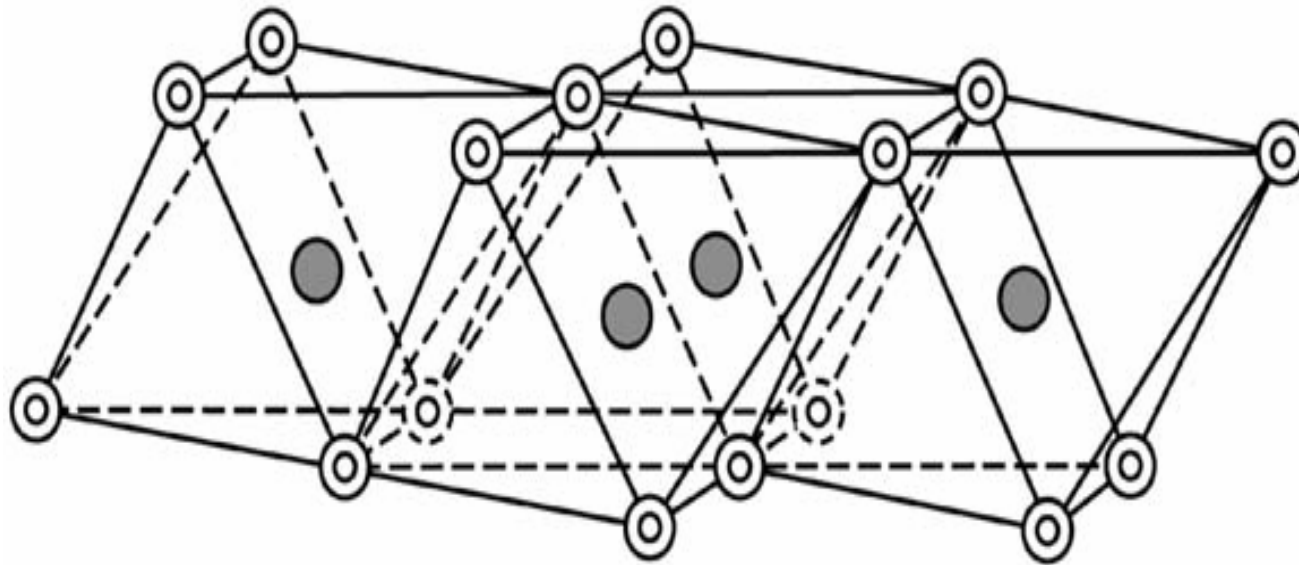
- Schopnost sorpce a iontové výměny.
Vyměnitelné kationty K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ , H_3O^+ , NH_4^+
- Schopnost vázat vodu – jako H_2O nebo OH^-
- Při zahřívání dehydratace, dehydroxylace
- Reakce s organickými látkami

Tetraedr a tetraedrická síť



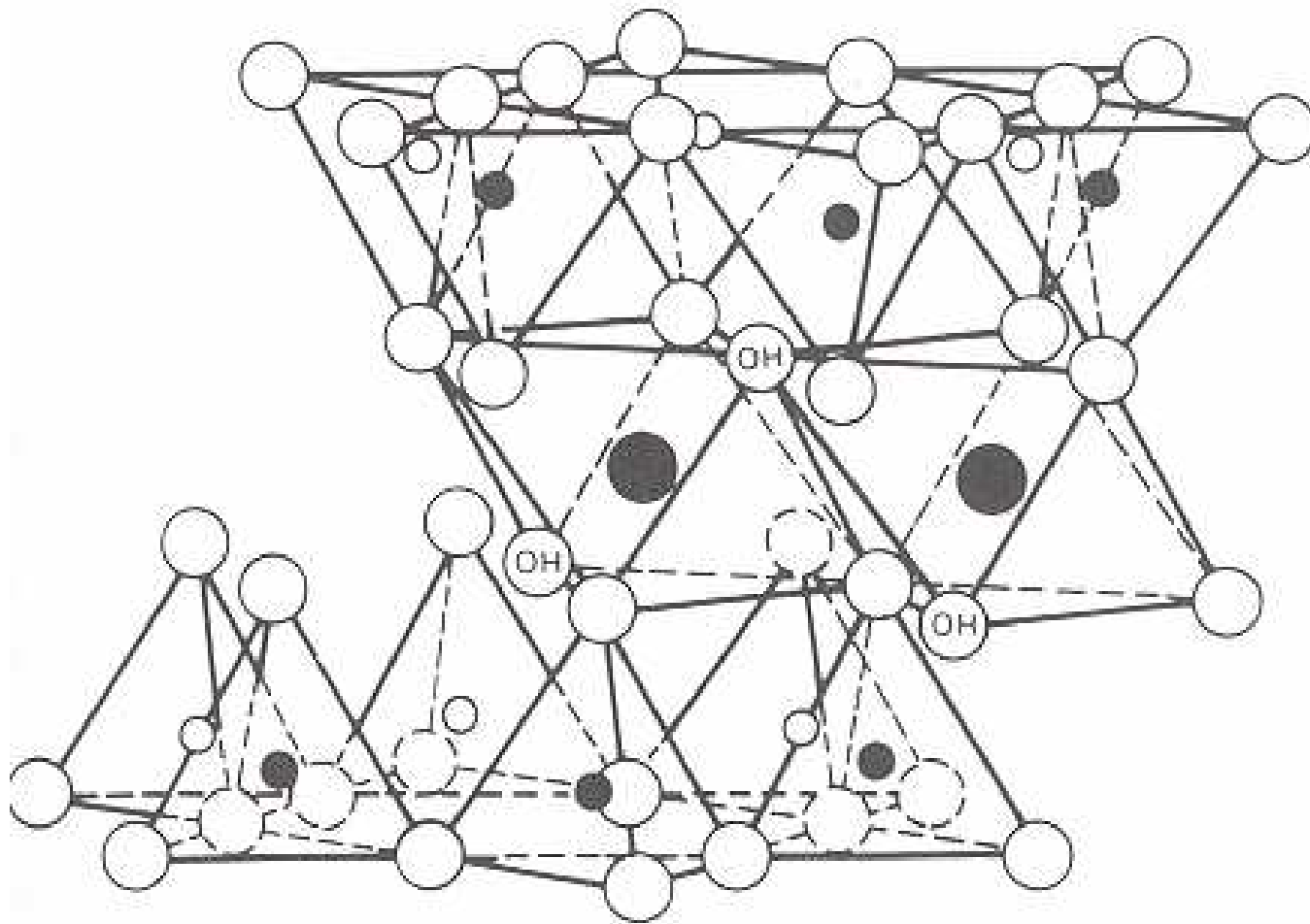
○ and ○ Oxygens ○ and ● Silicons

Oktaedrická síť

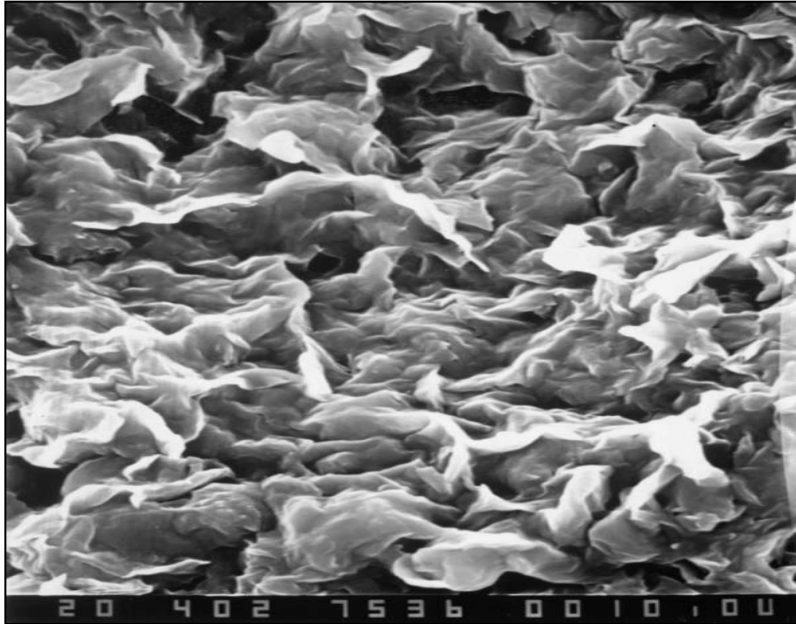


- Oxygens
- ⊙ Hydroxyls
- Aluminum

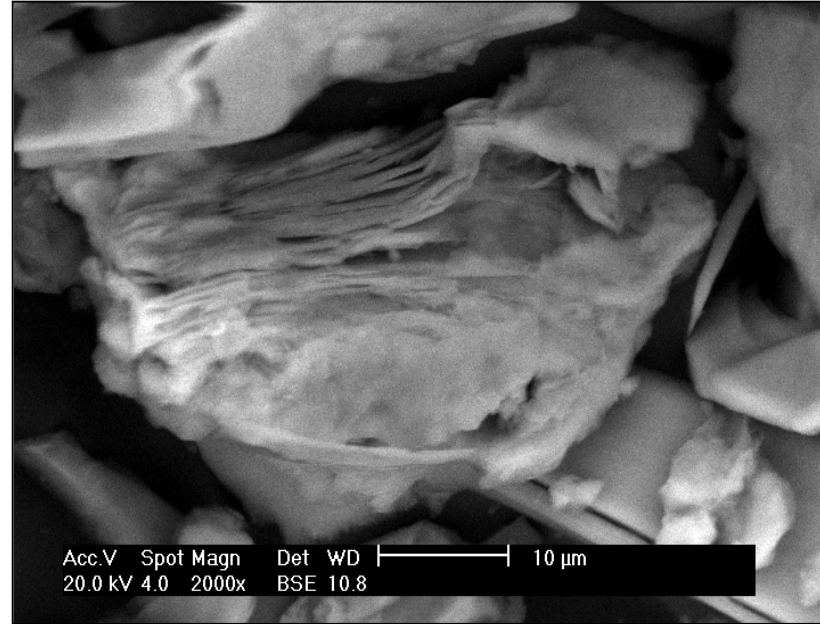
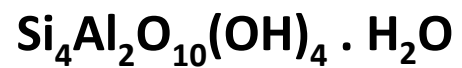
Jílové minerály s typem vrstev 2:1 montmorillonit a vermikulit



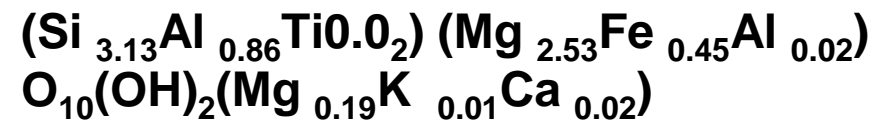
Montmorillonit, vermikulit



Montmorillonit



Vermikulit



- Ve své struktuře jsou jíly schopny provádět rozsáhlé substituce, protože **mají výrazný záporný náboj na plochách krystalitu.**
- Náboj je kompenzován přítomností kationtů Na, Ca, Mg a K v mezivrství krystalitů.
- Na mezivrství nejsou kationty fixované, ale mají **vlastnosti výměnných kationtů** - při změně prostředí, kde je vysoká koncentrace jiných kationtů, dochází k výměně.
- Přednostně se do struktury dostávají kationty s malým poloměrem a s malou hydratační energií.
- **Tyto vlastnosti umožňují interkalaci Ag, Zn, Cu, chlorhexidinu a dalších látek**

- Smektity mají na povrchu přebytek záporných nábojů - mezi sebou vytvářejí van der Waalsovy síly (slabě přitažlivé prostředí, které je schopné adsorbovat cizí kationty z okolního prostředí).
- Vazby působí na vzdálenost asi **4 - 5 Å**.
- **Vzdálenost jílových partikulí je dána druhem navázaných kationtů.**
- **U jílu při tloušťce krystalitu 8,9 Å, mohou být tvary oddáleny od sebe až o 11,2 Å.**

Metodika

- V sedmi řadách jamek na mikrotitrační destičce je růst kultury bakterií inhibován přítomností antimikrobní látky v koncentracích 10 % až 0,014 %.
- V osmé řadě jamek je kontrola růstu bez antimikrobní látky
- Po uplynutí 24 hodin se z každé jamky přenese na povrchu jehel inokulátoru (ježka) množství 1 mikrolitru do nově připravené destičky se 100 mikrolitry bujonu v každé jamce a inkubuje v termostatu při 37 °C po dobu 24 a 48 hodin.
- **Přenášení části suspenze probíhá denně po 5 dnů.**
- **Ve všech jamkách se odečítá zákal, kterým se projevuje růst bakteriální kultury.**
- Inhibice růstu vyvolaná působením antimikrobní látky se odečítá po 24 a znovu po 48 hodinách.
- Poslední ředění vermikulitu nebo montmorillonitu, při němž dochází k inhibici růstu, představuje minimální inhibiční koncentraci (MIC) zkoumané látky na testovací bakterie.
- MIC se vyjádří v mg na litr (mg.l⁻¹).

- Bakteriální suspenze se připravuje dvacetihodinovou kultivací v glukózovém bujonu.
- K testování minimální inhibiční koncentrace byly zvoleny následující sbírkové bakteriální kmeny druhů:
 - *Staphylococcus aureus* CCM 3953
 - *Enterococcus faecalis* CCM 4224
 - *Escherichia coli* CCM 3988
 - *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415
 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960
 - **Denzita suspenze 10^8 - 10^9**
- Bujonová kultura se nalije do Petriho misky do výšky hladiny 5 mm.
- K přenesení bakteriální suspenze do všech 96 jamek s bujonem na mikrotitrační destičce se používá inokulátor se 48 jehlami.

PROKARYOTA A EUKARYOTA

PROKARYOTA

- bakterie a sinice
- jádro je morfologicky zřetelné, neodděluje ho však od cytoplazmy membrána
- buňka je haploidní
- množení je pouze nepohlavní
- nepřítomnost buněčných organel
- nejsou mitochondrie, chloroplasty, endoplazmatické retikulum

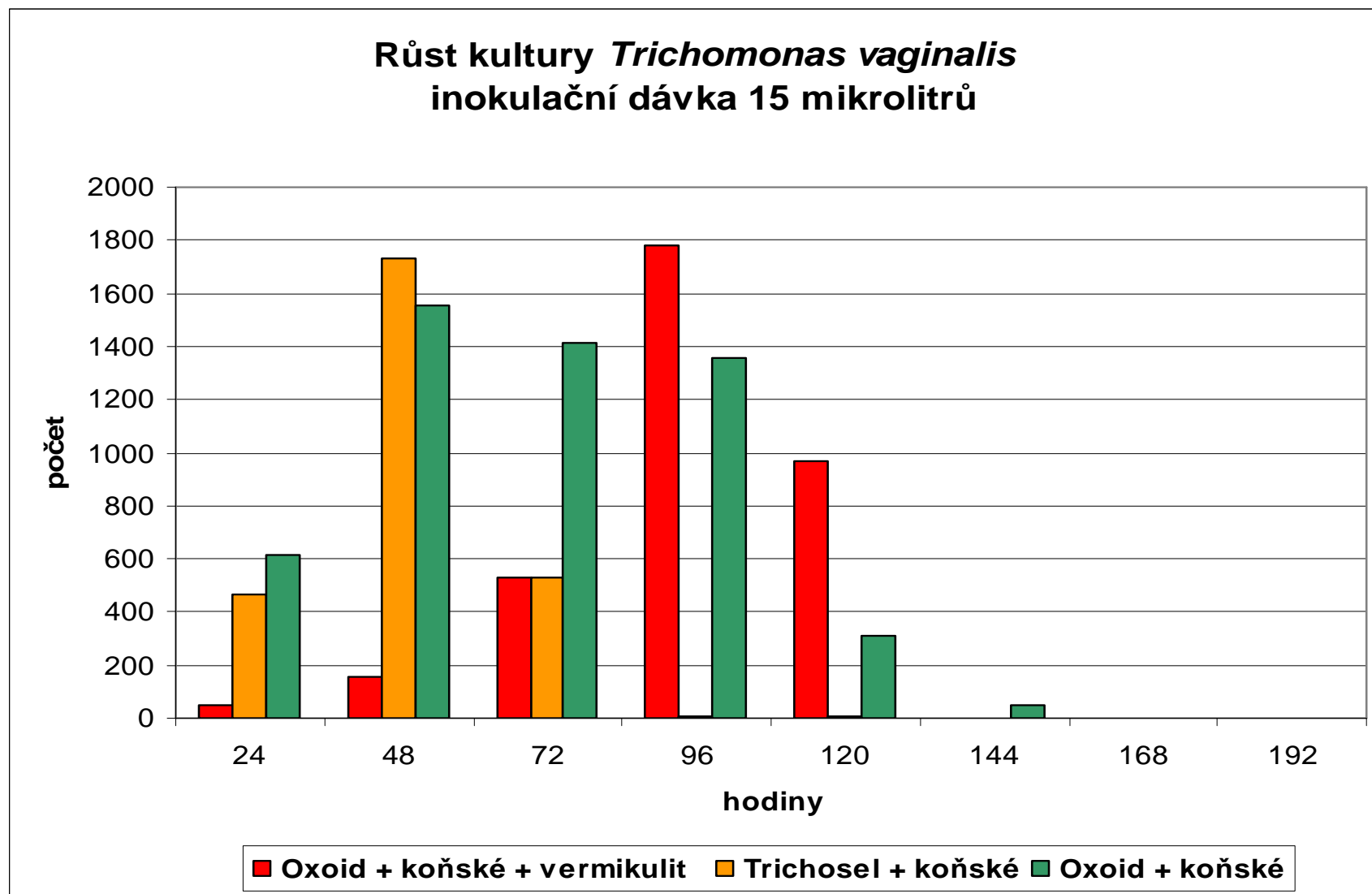
EUKARYOTA

- mikrosporidia, bičíkovci, rostliny, houby, nálevníci, živočichové, lidé
- jádro oddělené od cytoplazmy membránou
- splynutím dvou haploidních buněk v diploidní zygotu
- rozmnožování pohlavní
- přítomnost buněčných organel
- přítomny mitochondrie, chloroplasty, endoplazmatické retikulum

Metodika

- Testy v mikrotitračních destičkách probíhají na typových bakteriálních kulturách (prokaryota)
Staphylococcus aureus CCM 3953, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3988, *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960 v suspenzi denzity 10^8 až 10^9 /ml
- Testy ve zkumavkách provádíme na eukaryotních buňkách ***Trichomonas vaginalis*** z axenických kultur v suspenzi 10^6 /ml. Inokulační dávka je 15 μ l.
- V půdě Oxoid jsou 10 % jíly s nanočásticemi ředěny v poměru 1 : 3 až na koncentraci 0,0015 %.

Srovnání růstu kultury *Trichomonas vaginalis* v půdě s vermikulitem a v kontrolních půdách



Antimikrobiální a antiprotozoární účinek

- Nanočástice Zn^{2+} v montmorillonitu a vermikulitu působí antimikrobiálně v ředění suspenze 10 % až 3,3 % (7, 13)
- Prvok *Trichomonas vaginalis* je usmrcován působením nanočástic Zn^{2+} v ředění jílové suspenze 0,37 % až 0,12 % (7, 13)
- **Je 100 x citlivější nežli bakterie**

Závěry a pokračování

- Použité metodiky pro stanovení antimikrobiálního a antiprotozoárního účinku nanočástic se osvědčily
- Spolu s dalšími pracovními postupy s nimi počítáme pro zkoušky toxicity nanočástic

Děkuji za pozornost



Jílový hydrogel z japonské laboratoře drží tvar

FOTO: Tokijská univerzita