



Vodárenská biologie 2010

3.2. – 4.2. 2010

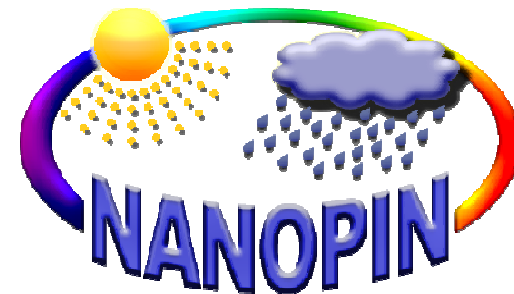


ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINKY FOTOKATALYTICKY AKTIVNÍCH NANOVrstev TiO_2

Eva Musilová, Eva Podholová, Jana Říhová Ambrožová, Josef Krýsa, Jiří Zita, Jiří Rathouský, Vít Kalousek

Obsah

- Nanovrstvy TiO_2 a jejich fotokatalytická aktivita
 - Metodika testování a inhibice mikroorganismů
 - Výsledky
-
- Výzkumné centrum pro nanopovrchové inženýrství
MŠMT ČR (Nanopin)



TiO₂: Krystalické formy a jejich využití

Rutil

- pigment, tzv. titanová běloba
- nátěrové hmoty
- potravinové doplňky
- kosmetické přípravky



Anatas

- fotokatalyticky aktivní
- fotokatalyticky indukovaná superhydrofilita
- samočistící schopnosti
- desinfekční účinky

■ Useful properties of the photocatalyst

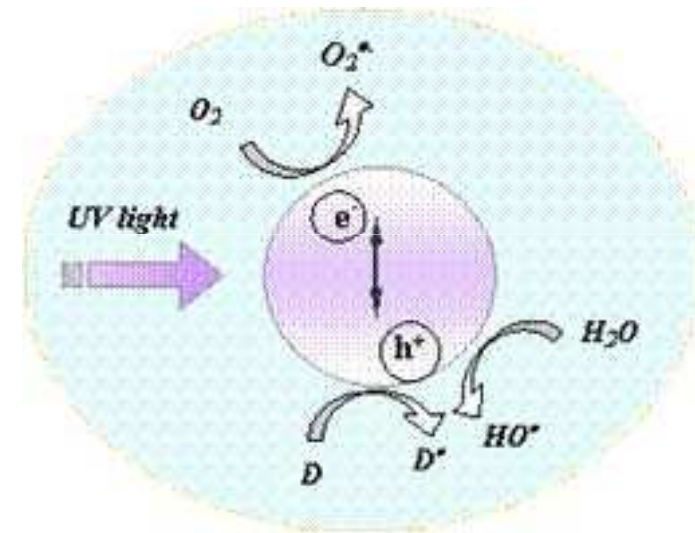


TiO₂ : Fotokatalyticky aktivní povrchy

- fotokatalýza je proces, kdy dojde k absorpci fotonu o dostatečné energii v částicích polovodiče a tvorbě nositelů kladného náboje (tzv. díry) a elektronů
- díry pak reagují s molekulami vody za vzniku •OH, majících silný oxidační účinek. •OH jsou pak schopny porušit buněčnou stěnu mikroorganismů a tak iniciovat jejich zánik

Výhody fotokatalytické reakce TiO₂

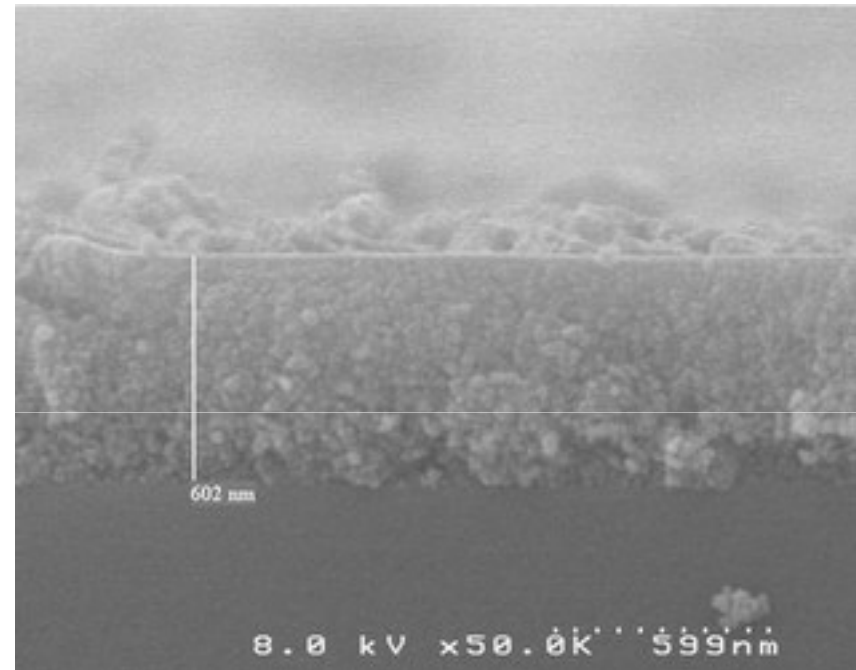
- není nutno přidávat žádné chemikálie
- rychlost inaktivace se s dobou příliš nemění
- je možno využít sluneční energii
- efekt je nepřetržitý



Inhibice mikroorganismů

Testované vzorky nanovrstev TiO₂:

- neporézní vrstvy TiO₂ (J.Zita, FCHT, VŠCHT v Praze)
- porézní vrstvy TiO₂ (V.Kalousek, ÚFCH Jaroslava Heyrovského, AVČR)
- základ ze sodnovápenatého skla
- ochranná SiO₂ mezivrstva (chrání fotokatalytickou TiO₂ vrstvu před difusí Na⁺ iontů)
- příprava metodou sol-gel
- jednotlivé vrstvy jsou pak na nosné sodnovápenaté sklo nanášeny metodou dip coating (ponoření a vytažení definovanou rychlostí)
- vrstvy se vypalují při teplotě 530 °C, po dobu 3 hodin

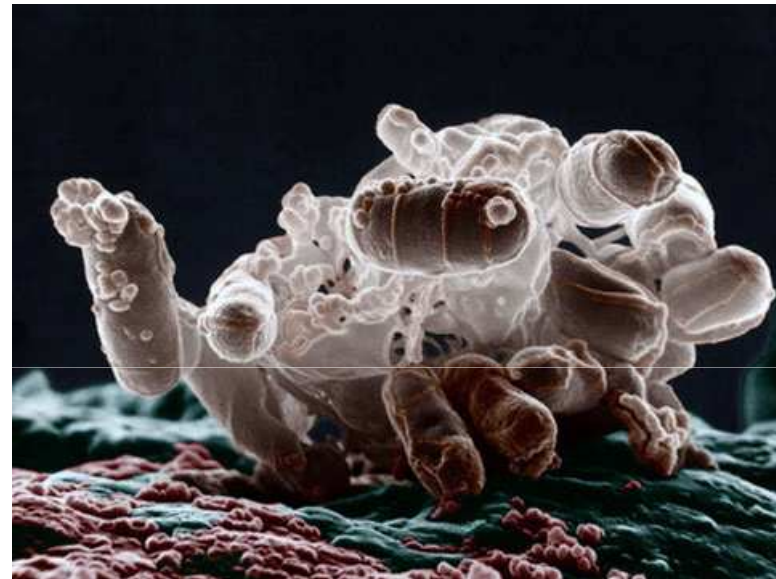


Obr. 2 SEM fotografie vrstvy TiO₂ připravené metodou sol-gel, http://www.nanopin.cz/cz/cz_page02.html, 29.9. 2009

Inhibice mikroorganismů

Testovaný mikroorganismus

- *Escherichia coli*
- modelovým organismus, který je uváděn v normě ISO 27 447 (Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) – Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials)
- gramnegativní (G-) termotolerantní koliformní bakterie
- bakterie sídlící ve střevním traktu člověka a vyšších živočichů
- indikátor fekálního znečištění (vody)
- čistá kultura z referenční České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně (CCM 3954)
- suspenze bakterií ve fyziologickém roztoku



Obr. 3 *Escherichia coli*, <http://www.microbiologybytes.com/blog/2009/01/>, <http://ideje.cz/cz/clanky/bakterie-jsou-schopny-videt-budoucnost>, 5.6.2009

Metodika testování

Testovací komora

- fluorescenční zářivky s výkonem 32 W a emitující fotonový tok s maximem při vlnové délce 370 nm
- cirkulace vzduchu pro udržení konstantní teploty během testu



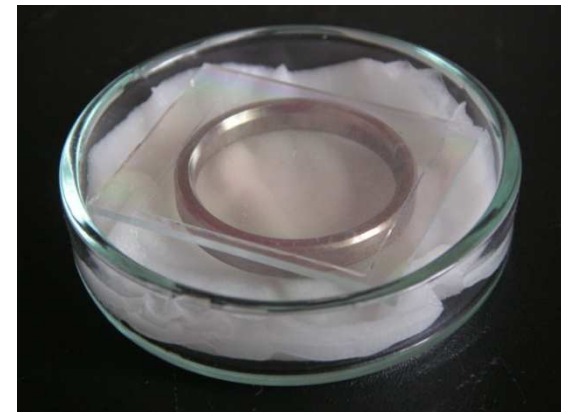
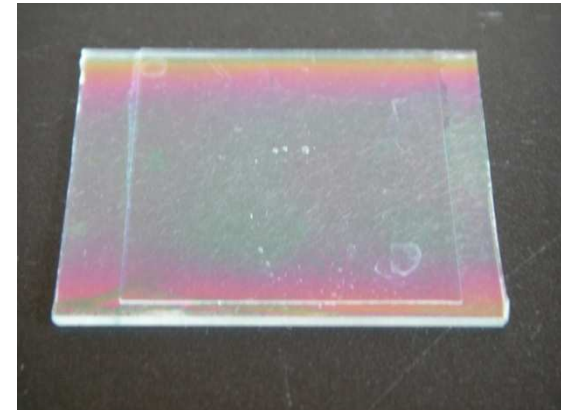
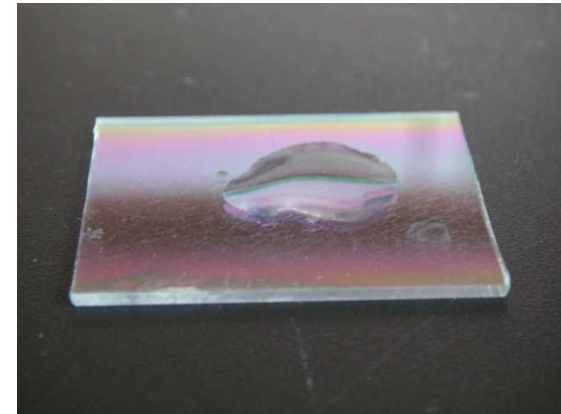
Obr. 4 Aparatura, foto: Eva Musilová

Metodika testování

- inhibici mikroorganismů v prostorech, které přijdou do styku se vzdušnou vlhkostí
- nová metodika testování, pracující s malým objemem zahuštěného vzorku
- stanovení: m-FC agar, Colilert/Quanti-Tray

Tenká vrstva kapaliny:

- dle normy ISO 27 447
- objem vzorku 50 μ l na sklo s nanovrstvou,
- velikost skla 25x30 mm, plocha 24x24 mm (krycí sklo),
- Petriho miska , navlhčená buničina,
- v časech 0 a 60 min oplach fyziologickým roztokem
- vysychání brání víčko misky a navlhčená buničina.

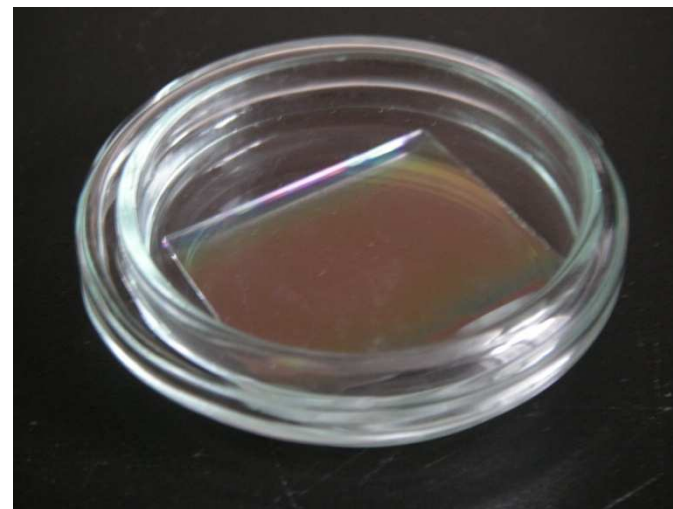


Obr. 5 Tenká vrstva kapaliny, foto: Eva Musilová

Metodika testování

Metoda malého objemu:

- objem vzorku 3 ml, Petriho miska (45 mm),
- sklo s nanovrstvou o velikosti 25x30 mm,
- doba testu 120 min, po 20 min odebíráno 100 μ l.



Obr. 6 Metoda malého objemu, foto: Eva Musilová

Stanovení

- m-FC agar

- Colilert/Quanti-Tray:

- stanovení koliformů a *Escherichia coli* na základě průkazu specifických enzymů pomocí fluorogenního či chromogenního substrátu,
- alternativní metoda, zařazená do Vyhl. č. 252/2004 Sb.,
- oplach 100 ml
- inkubační doba – 18 hodin.

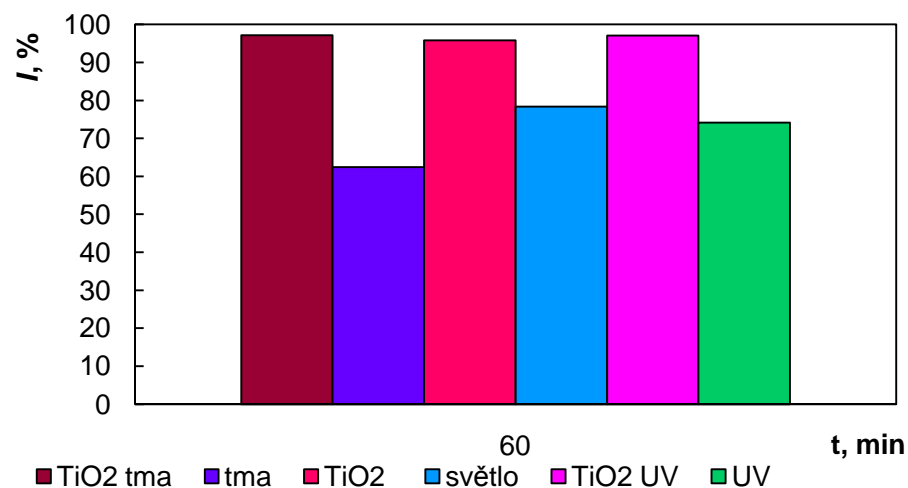
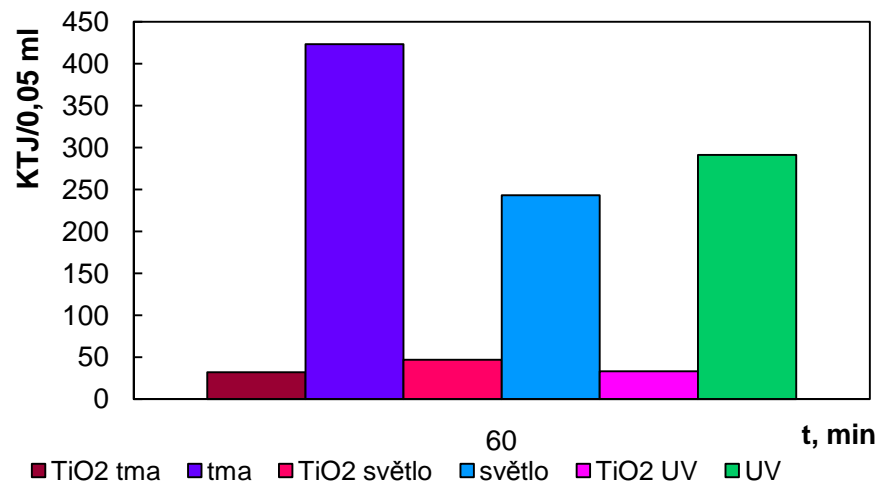
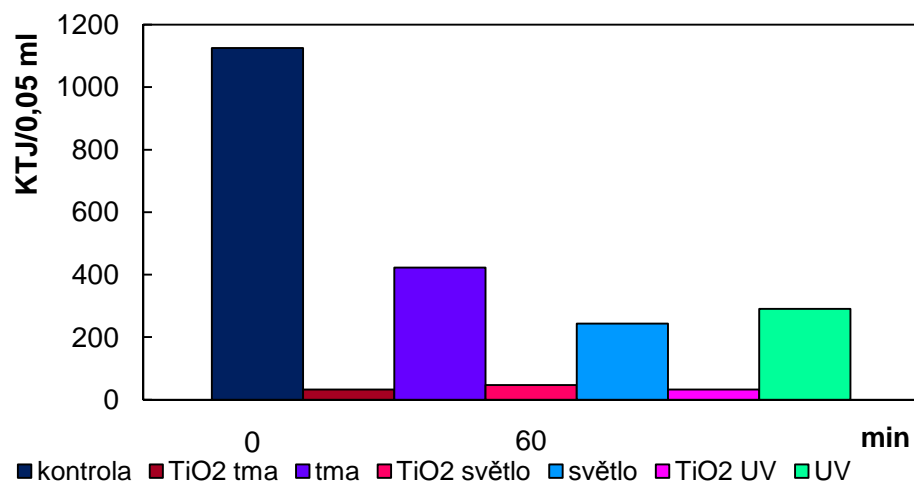


Obr. 7 Ukázka výsledků stanovení pomocí Colilert/Quanti-Tray

Výsledky

Metodika testování v tenké vrstvě kapaliny

Množství bakterií v 0,05 ml vzorku, ($2,3 \cdot 10^4$ KTJ/ml)



t, min	Počet KTJ na 0,05 ml vzorku		Inhibice růstu (%)
	0	60	
TiO ₂ , tma	1125	32	97
tma	1125	423	62
TiO ₂ , světlo	1125	47	96
světlo	1125	247	78
TiO ₂ , UV	1125	33	97
UV	1125	291	74

Výsledky

Porovnání účinnosti porézních a neporézních vrstev

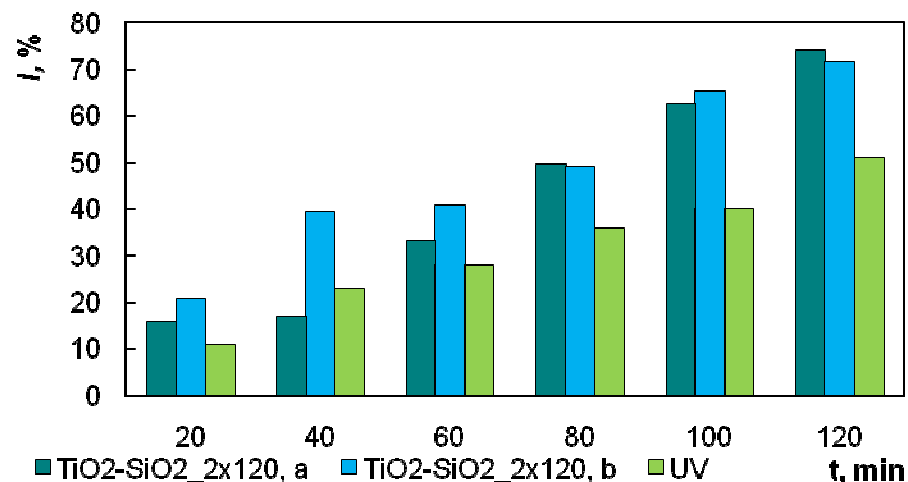
Metodika testování:

- objem vzorku 3 ml
- 120 min
- 100 μ l
- 10^3 KTJ/ml

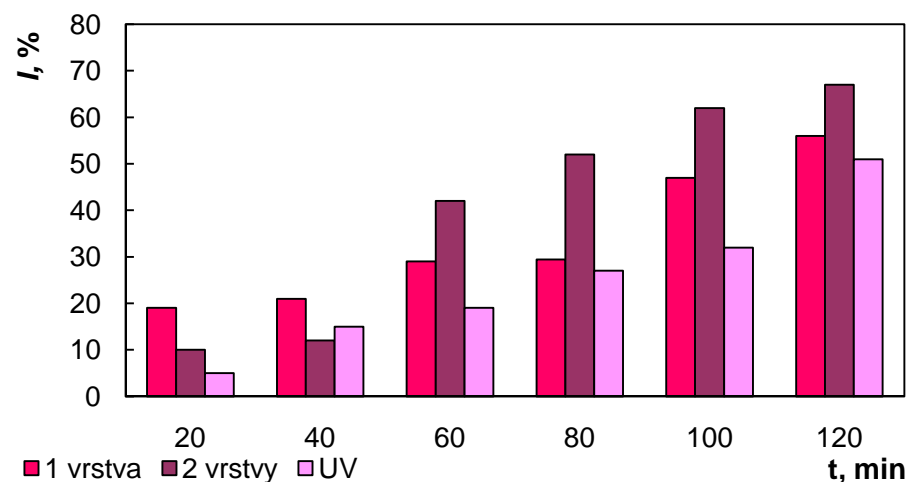
Inhibice růstu bakterií

$$I = \left(\frac{K - n_i}{K} \right) \cdot 100$$

K – kontrola v čase 0,
 n_i – počet v jednotlivých časech,
 I – inhibice růstu.



Srovnání inhibice růstu bakterií, neporézní vrstva



Srovnání inhibice růstu bakterií, porézní vrstva

Výsledky

Neporézní a porézní vrstvy

Neporézní vrstva

t, min	Počet KTJ/ml				Inhibice růstu (%)		
	UV, a	UV, b	Sklo a	Sklo b	UV	Sklo a	Sklo b
0	3090	2080	3090	2080	-	-	-
20	2740	1860	2600	1650	11	16	21
40	2680	1380	2570	1260	23	17	39
60	2460	1340	2070	1230	28	33	41
80	2100	1250	1560	1060	36	50	49
100	1880	1240	1160	720	40	62	65
120	1380	1110	800	590	51	74	72

Porézní vrstva

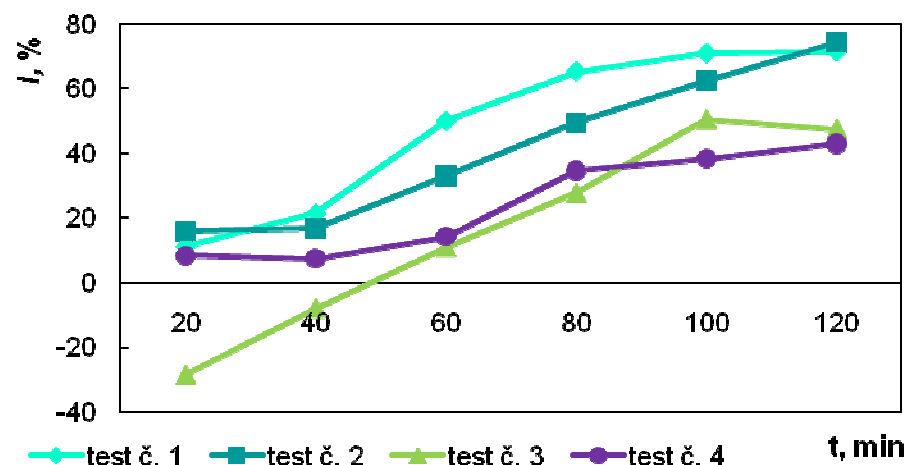
t, min	Počet KTJ/ml				Inhibice růstu (%)		
	UV, 1 vrstva	UV, 2 vrstvy	1 vrstva	2 vrstvy	UV	1 vrstva	2 vrstvy
0	2890	5570	2890	5570	-	-	-
20	2780	5280	2330	5000	5	19	10
40	2390	4900	2290	4890	15	21	12
60	2320	4650	2060	3210	19	29	42
80	1950	4380	2050	2700	27	29	52
100	2170	3410	1520	2130	32	47	62
120	1410	2790	1260	1830	51	56	67

Výsledky

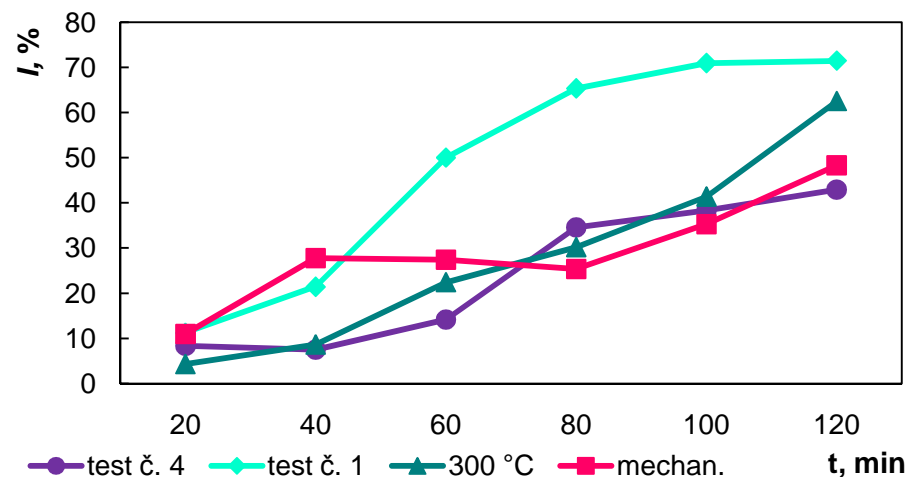
Ztráta účinnosti aktivní vrstvy a její reaktivace

Metodika testování:

- objem vzorku 3 ml
- 120 min
- 100 μ l
- 10^3 KTJ/ml
- na 1 skle 4 testy a pak reaktivace (vypálení, mechanická)
- po každém testu sterilizace pod UV-C lampami (60 minut)
- Inhibice růstu



Ztráta účinnosti nanopovrchu, inhibice růstu



Porovnání testů a reaktivace, inhibice růstu

Výsledky

Ztráta účinnosti aktivní vrstvy a její reaktivace

t, min	Počet KTJ/ml						Inhibice růstu (%)					
	Test č. 1	Test č. 2	Test č. 3	Test č. 4	300 °C	Mech .	Test č. 1	Test č. 2	Test č. 3	Test č. 4	300 °C	Mech .
0	1960	3090	1370	2400	2320	2920	-	-	-	-	-	-
20	1740	2600	1760	2200	2220	2600	11	16	-28	8	4	11
40	1540	2570	1480	2220	2120	2110	21	17	-8	8	9	28
60	980	2070	1220	2060	1800	2120	50	33	11	14	22	27
80	680	1560	990	1570	1620	2180	65	50	28	35	30	25
100	570	1160	680	1480	1360	1890	71	62	50	38	41	35
120	560	800	720	1370	870	1510	71	74	47	43	63	48

Závěr

Výsledky:

- Tenká vrstva kapaliny: inhibice i bez vlivu TiO_2 , zatím nahrazeno testováním v malém objemu.
- Srovnání účinnosti porézních a neporézních vrstev: neporézní vykazují větší inhibici *Escherichia coli*.
- Účinnost nanovrstvy při opakovaném testu: dochází ke snižování. Reaktivace teplotou - ano, mechanicky - ne.

Plány:

- Otestovat další mikroorganismy, řasy.
- Tenká vrstva kapaliny.
- Další způsoby reaktivace fotokatalytických vrstev, vliv mikroorganismů (účinnost).
- Zjistit inhibici bakterií v přítomnosti organické látky (soutěž).
- Problematika vyhodnocování výsledků. Samotný vliv TiO_2 , zavedení hodnoty R (rychlost inaktivace mikroorganismů ve vzorku, $\text{KTJ}/\text{cm}^2\text{min}$)

Použití:

- Prevence.



Děkuji za pozornost