

v y d á v á
O S V Ě D Ě N Í

(UKZUZ 002466/2018)

o uznání certifikované metodiky
v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výsledků výzkumných organizací a hodnocení
programů účelové podpory, schválené usnesením vlády ČR ze dne 8. února 2017 č. 107.

Název metodiky: **METODIKA MODIFIKACE A SYNTÉZY
NANOKOMPLEXŮ ZINKU PRO DIETNÍ VYUŽITÍ U
HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT**

Autoři: **Pavel Horký, Kristýna Šmerková, Pavel Kopel, David
Hynek, Eliška Kabourková, Zuzana Bytešnicková, Libor
Kalhotka, Ladislav Zeman, Pavel Nevrkla, Iva Čáslavová,
Eva Václavková, Jiří Skládanka, Vojtěch Adam,**

Název organizace: **Mendelova univerzita v Brně,
Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.**

Místo vydání metodiky: **Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno**
Rok vydání metodiky: **2017**
ISBN: **978-80-7509-535-0**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné
organizace MZe NAZV QK1720349 „Nanokomplexy zinku jako alternativa náhrady
antibiotik u prasat.

Projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“ ANO/NE*.

Brno 9. ledna 2018

Razítko odborného orgánu státní správy:

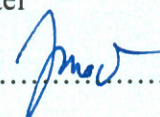
Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Daniel Jurečka

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

ředitel

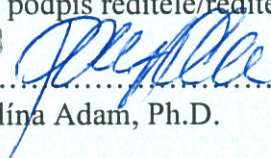
Podpis zástupce odborného útvaru státní správy:

.....

Souhlas Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

Datum a podpis ředitele/ředitelky odboru:

26 -01- 2018

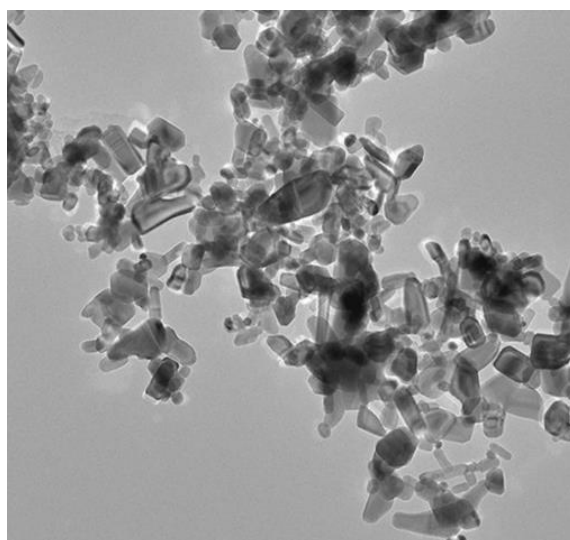
.....
Ing. Pavlína Adam, Ph.D.

**MINISTERSTVO
ZEMĚDĚLSTVÍ**
Razítko
Pěšnov 65/17
110 00 Praha 1- Nové Město
-3-

Mendelova univerzita v Brně

**METODIKA MODIFIKACE A SYNTÉZY NANOKOMPLEXŮ
ZINKU PRO DIETNÍ VYUŽITÍ U HOSPODÁŘSKÝCH
ZVÍŘAT**

Pavel Horký a kolektiv

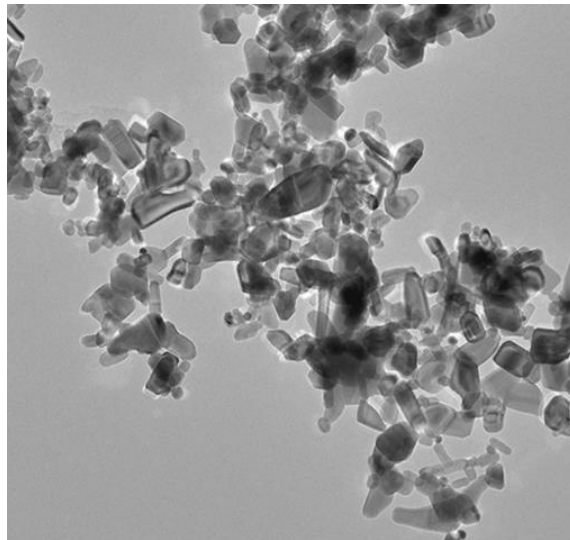


Certifikovaná metodika, Brno 2018

Mendelova univerzita v Brně

**METODIKA MODIFIKACE A SYNTÉZY NANOKOMPLEXŮ
ZINKU PRO DIETNÍ VYUŽITÍ U HOSPODÁŘSKÝCH
ZVÍŘAT**

Pavel Horký, Kristýna Šmerková, Pavel Kopel, David Hynek, Eliška Kabourková, Zuzana Bytešníková, Libor Kalhotka, Ladislav Zeman, Pavel Nevrkla, Iva Čáslavová, Eva Václavková, Jiří Skládanka, Vojtěch Adam



Certifikovaná metodika, Brno 2018

METODIKA MODIFIKACE A SYNTÉZY NANOKOMPLEXŮ ZINKU PRO DIETNÍ VYUŽITÍ U HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT (metodická pomůcka pro zemědělskou praxi-certifikovaná metodika)

Lektorovali:

Ing. Jiří Kolouch – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

prof. Ing. David Zapletal, Ph.D. – Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně



Tato publikace vznikla z výsledků řešení grantu QK1720349 „Nanokomplexy zinku jako alternativa náhrady antibiotik u prasat“ financovaného Národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV).

Doporučená citace:

Pavel Horký, Kristýna Šmerková, Pavel Kopel, David Hynek, Eliška Kabourková, Zuzana Bytešníková, Libor Kalhotka, Ladislav Zeman, Pavel Nevrkla, Iva Čáslavová, Eva Václavková, Jiří Skládanka, Vojtěch Adam: Metodika modifikace a syntézy nanokomplexů zinku pro dietní využití u hospodářských zvířat, *Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2017, 28 s., ISBN 978-80-7509-535-0*

© Mendelova univerzita v Brně a Vysoké učení technické v Brně.
ISBN 978-80-7509-535-0



Tato práce vznikla v rámci projektu „Nanokomplexy zinku jako alternativa náhrady antibiotik u prasat“ (QK1720349), financovaného Národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV)

Řešitelská pracoviště:

Mendelova univerzita v Brně

Vysoké učení technické v Brně

Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i.

Obsah

Anotace.....	6
Annotation.....	6
1 Úvod.....	7
2 Cíl metodiky.....	10
3 Vlastní popis metodiky.....	11
3.1 Příprava zinkových nanočástic.....	11
3.2 Příprava tekutého a tuhého kultivačního média.....	12
3.3 Příprava bakteriálních kultur.....	12
4 Charakterizace nanočástic.....	14
4.1 4.1 Charakterizace částic pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM).....	14
4.2 4.2 Charakterizace velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla (DLS)....	16
5 Stanovení antibakteriálních vlastností nanočástic.....	16
5.1 Disková difúzní metoda.....	16
5.2 Metoda růstových křivek mikroorganismů.....	17
5.3 Kultivační metoda.....	19
6 Srovnání novosti postupů.....	21
7 Popis uplatnění metodiky.....	22
8 Ekonomické aspekty.....	23
Použitá literatura.....	24
Seznam publikací předcházejících metodice.....	26
Poděkování.....	27

Anotace

Zinek řadíme mezi esenciální prvky v organismu. V posledních letech se používá jako nástroj pro snížení používání antibiotik a jako prevence průjmových onemocnění u odstavených selat. Aby bylo docíleno antimikrobiální aktivity, je nutné podávat zinek ve vysokých dávkách (2000 – 2500 mg/kg diety) nejčastěji ve formě oxidu zinečnatého. Díky těmto nadlimitním dávkám zinku dochází k nadměrné akumulaci zinku v prasečí kejďě, která je následně aplikována jako hnojivo zejména pro výživu kukuřice. Vzniká tak velice palčivý problém, kdy jsou půdy přesyceny nadlimitními hodnotami zinku. Řešením může být použití nejmodernějších postupů za pomoci nanotechnologií, kdy bude možné dávky zinku razantně snížit při zachování jeho účinku. Cílem této metodiky bylo vytvořit ucelený postup, syntézy nanokomplexů zinku za pomoci fosforečnanů. Součástí metodiky jsou rovněž mikrobiologické vlastnosti jednotlivých nanokomplexů zinku.

Klíčová slova: zinek, nanotechnologie, antibakteriální vlastnosti, výživa monogastrů

Annotation

Generally, zinc is one of the essential elements in the body. In recent years, it has been used as a tool for reducing the use of antibiotics and to prevent diarrheal diseases in weaned piglets. To achieve the antimicrobial activity, zinc should be administered in high doses (2000 - 2500 mg/kg diet) and usually in the form of zinc oxide. These over-limit doses of zinc lead to excessive accumulation in pig manure, which is subsequently applied as a fertilizer for maize. This creates a problem when soils are supersaturated with over limit of zinc. The solution can be the use of latest nanotechnology-based techniques, where zinc doses can be dramatically reduced while its effect is maintained. The aim of this methodology was to create a coherent process of zinc nanocomplexes synthesis using phosphates. The microbiological characteristics of the individual nanocomplexes of zinc are part of the methodology.

Keywords: zinc, nanotechnology, antibacterial properties, nutrition

1 Úvod

Zinek (latinsky Zincum) je středně tvrdý křehký modrobílý kov, na lomu krystalický a lesklý. V periodické tabulce prvků se nachází ve čtvrté periodě a dvanácté skupině společně s kadmíem a rtuťí. Zinek se vyskytuje ve formě dvoumocného iontu, kdy jsou jeho d-orbitály kompletně zaplněny elektrony a nemůže tak podléhat redoxním změnám. Atomové číslo zinku je 30, atomová hmotnost 65,409 a bod tání 419,4 °C. Řadí se mezi biogenní prvky, což znamená, že je pro život nezbytný. Fyzikálně-chemické vlastnosti mu předurčují mimořádné využití a důležitost v biologických systémech. Zinek je důležitou součástí enzymového systému, který působí antioxidačně. Zabraňuje tak, společně s vitaminy a selenem, tvorbě mediátorů zánětu v těle [1].

Zinek je stopový prvek (mikroelement), který je nezbytný pro člověka a zvířata. Mikroelementy se vyskytují v organismech v řádech mg/kg a pro mnoho zvířat jsou nepostradatelné. Jako prvek má významnou roli ve více než 160 enzymech, je nezbytný pro DNA replikaci, transkripci a proteinovou syntézu. Bývá součástí různých metaloproteinů, kde plní strukturální i katalytickou funkci. Jeho množství v organismu ovlivňuje růst živočišných organismů. Účastní se také metabolismu sacharidů [2].

Zdrojem zinku ve výživě zvířat jsou především oxidy, sírany, uhličitany, octany a jiné. Jeho potřeba roste s vyšším příjmem mědi a vápníku [3]. Bylo prokázáno, že doplňování zinku do krmných dávek ovcí má pozitivní vliv na produkci mléka a vyšší hmotnost jehňat. Nedostatek zinku v půdě a tím i v krmivu se projevuje sníženou chutí k přijímání krmiva, záněty kůže, u drůbeže špatným opeřením. U kuřat a krůťat se vyskytují při nedostatku zinku zkrácené a ztlustělé dlouhé kosti pánevních končetin, zvětšené klouby [4]. Zároveň dochází ke snížení líhivosti vajec [5]. Nadbytek zinku a některých stopových prvků nemusí vždy vyvolávat u zvířat zdravotní obtíže, ale jeho vysoký obsah ve výkalech může mít negativní vliv na ekologickou zátěž a půdní mikrobiom. U lidí je nedostatek zinku spojován s vypadáváním vlasů, sníženým metabolismem vitamínu A, špatným hojením ran, nižší imunitou nebo například poškozením varlat. Výzkumy prokázaly, že dlouhodobé doplňování zinku u pacientů s jaterní encefalopatií zlepšuje neurologické symptomy a metabolické parametry [6]. Biologická dostupnost zinku z různých zdrojů je rozdílná. Pokud síran zinečnatý heptahydrát má hodnotu 100, potom uhličitán zinečnatý 93, oxid zinečnatý 67, chlorid zinečnatý 107 a chelát zinku s methioninem dokonce 131 [7]. Mikroprvky obecně bývají někdy vázány s organickými látkami, jako jsou aminokyseliny, v tzv. cheláty, které mají vyšší účinnost. Vazbami s kyselinou fytoovou vznikají fytáty, které jsou pro zvířata nedostupné. Takto vázaný

mikroprvek lze pro využití zvířaty uvolnit enzymatickou hydrolyzou. Fytáza k tomu potřebná je v rostlinných krmivech zastoupena v malém množství, zvířata si ji neumí vytvořit, proto musí být do krmiv přidávána [3].

Chemická forma zinku ovlivňuje jeho vstřebatelnost, využívány jsou formy organické a anorganické. Organické formy jsou obecně lépe stravitelné, a to zejména formy chelátové. Chelát v překladu znamená kleště, těmi jsou právě aminokyseliny svírající minerální látku, jež je takto pro organismus lépe absorbována. Navázáním kovu na chelát jsou ovlivněny všechny procesy metabolismu, je udržována optimální hladina mikroprvků v organismu v porovnání s formou anorganickou. Z anorganických forem se využívají síran, oxid či uhličitan zinečnatý. Použitím síranů ve větším množství je účinek lipofilních vitaminů snižován. Míra resorpce je z oxidové a síranové formy nízká, většinou do 15 %. Vhodnějšími formami jsou zinek organicky vázaný na aminokyseliny, kdy vstřebatelnost dosahuje až 60 % [8].

Potřeby zinku ve výživě monogastričních zvířat

Potřeba zinku pro rostoucí prasata v 1 kg směsi se snižuje v průběhu výkrmu ze 130 mg/kg u kojených selat až na 80 mg/kg u prasat ve druhé fázi výkrmu. Pro chovná prasata v odchovu je udávána potřeba 100 mg/kg, březím a kojícím prasnicím je doporučováno 80 a 85 mg/kg zinku. Maximální povolená dávka zinku v krmných směsích pro prasata je v EU 250 mg/kg. Důvodem je běžné využívání vyšších koncentrací zinku v dietách selat pro tlumení průjemových onemocnění a tím jeho zvýšené vylučování ve výkalech [9]. Zinek je například u prasat významnou složkou výživy. Jeho příjem v krmivu je preventivně hlídán již u selat. Ta mohou při jeho deficitu onemocnět parakeratózou, která může vést až ke smrti [10]. Další významnou funkcí zinku je jeho antibakteriální aktivita. Této vlastnosti se využívá zejména ve výživě selat jako prevence průjemových onemocnění a omezení výskytu *E. coli*, která má tyto nepříjemnosti na svědomí. Aby se u zinku mohly projevit jeho antibakteriální vlastnosti, musí být do diety selat přidáván ve vysokých dávkách (2000 – 2500 mg/kg diety) po dobu 7 – 14 dnů v průběhu odstavu. Tyto vysoké dávky se sebou ovšem nesou vysoké riziko v podobě velkého vylučování zinku do potravního řetězce. Je tedy na místě v současné době hledat alternativní formy zinku. V praxi se nejčastěji využívá oxid zinečnatý. Jako výhodná alternativa jak omezit vylučování zinku do prostředí může být ve formě nanokomplexů zinku [11].

Nanokomplexy zinku jako výživový doplněk

Pojem nanotechnologie je odvozen od slov *nanos* neboli trpaslík a *techné* neboli dovednost či zkušenost. Tento obor se zabývá objekty o velikostech v řádu nanometrů, což je 1 – 100 nm (10^{-9} m). Nanotechnologie jsou interdisciplinární vědeckou oblastí, zabývající se stavbou a inženýrstvím molekulárních objektů hmoty (nanomateriálů). Dále je využíváno jejich unikátních vlastností v různých výzkumech, ale i v praxi [12]. Jedním ze zdrojů zinku mohou být zinkové nanokomplexy. Je velice dobře známo, že zinkové nanočástice jsou dobře vstřebatelné tkáněmi a snadno překračují biologické bariéry. V současné době je již poměrně dobře známá jejich syntéza. Otázkou ovšem zůstává, jak se tyto látky chovají z pohledu toxicity. Zda mohou být využity pro orální podávání a sloužit jako zdroj zinku pro živočišný organismus. Z tohoto důvodu se současný výzkum zaměřil na ověření toxicity některých modifikovaných nanočástic zinku [13]. Nanočástice zinku v dietě zvířat, mohou rovněž snížit výskyt amoniaku ve stáji [11].

Zinek se ve vysokých dávkách používá jako antibakteriální prostředek k prevenci průjmových onemocnění. Antimikrobiální peptidy jsou v přírodě všudypřítomné s více než 1000 známými zástupci a jsou složkou první obranné linie organismů proti infekčním mikroorganismům [14]. Tyto mikroorganismy jsou schopny ovlivnit imunitní odpověď včetně posílení vrozené imunity a potlačení zánětlivých procesů. Organismy vylučují kationické a anionické peptidy s antimikrobiálním účinkem. Anionické antimikrobiální peptidy mají malou velikost, anionický charakter, za který jsou odpovědné homopolymerní aspartátové oblasti a jako kofaktor pro baktericidní aktivitu potřebují zinek. Poprvé byly nalezeny u ovcí. Mechanismus účinku u těchto peptidů zatím nebyl spolehlivě prokázán, avšak předpokládá se, že bakteriální buňka je přijímá společně se zinkem. Baktericidní účinek anionických peptidů je inhibován v přítomnosti fosfátu nebo EDTA, naproti tomu s rostoucí koncentrací NaCl se zvyšuje. Anionické antimikrobiální peptidy byly nalezeny v plicích, játrech, tenkém střevu savců a rovněž v krevním séru [15]. V současné době převládají tlaky ze zemí EU o regulaci zkrmování vysokých dávek zinku zejména u prasat. Vysoká dávka zinku ve formě oxidu zinečnatého lze snížit právě využitím nanomateriálů, které mají několikanásobně vyšší senzitivitu vůči biologickým membránám v porovnání s konvenčními formami zinku.

2 Cíl metodiky

Cílem této metodiky je vytvořit ucelený postup syntézy nanokomplexů zinku, určeného pro dietární účely u monogastrických zvířat. Tento postup bude využitelný jednak pro biochemické laboratoře, ale zejména krmivářské firmy zabývající se výrobou minerálních premixů. Zároveň je v metodice popsán postup charakterizace jednotlivých nanokomplexů.

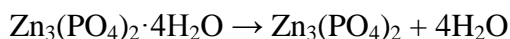
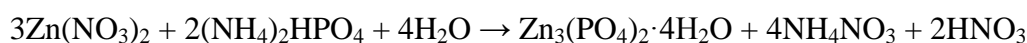
3 Vlastní popis metodiky

3.1 Příprava zinkových nanočástic

Fosforečnan zinečnatý je znám především jako pigment, který na rozdíl od chromanu zinečnatého a oxidu olova, nemá žádnou toxicitu. Lze jej použít pro ochranu povrchu kovů, protože má skvělé antikorozi vlastnosti. Průmyslově se fosforečnan zinečnatý vyrábí z oxidu zinečnatého a kyseliny fosforečné nebo ze zinečnatých solí a fosforečnanů. Antikorozi vlastnosti ve velké míře závisí na distribuci velikosti částic. Velikost částic lze ovlivnit přímo technologickým postupem ve výrobě nebo je produkt upravován následně mletím vedoucím k získání mikronových částic. Nejvýhodnější je připravit přímo částice, jejichž velikost nepřesahuje 100 nm [16].

Je známo mnoho metod syntézy fosforečnanu zinečnatého z různých surovin, ale produkty lze stěží označovat za nanomateriály [17].

Fosforečnan zinečnatý byl připraven reakcí dusičnanu zinečnatého s fosforečnanem diamonným ve vodném roztoku bez nebo s komplexním činidlem (kyselina citrónová). Syntéza probíhala ve třech krocích. Prvým bylo vysrážení $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (hopeit) při teplotě 293 do 363K. Následovala kalcinace (1 – 2 h) při nízké teplotě (473 – 523 K) a hydratace vedoucí opět k hopeitu.



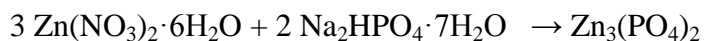
Ve druhém případě byla reakční směs obsahující dusičnan zinečnatý, fosforečnan diamonný a kyselina citronová zahuštěna za tvorby husté pěny, která byla termicky upravena. Zkoncentrování bylo provedeno na ultratermostatu při teplotách 348 - 353 K po dobu asi 3 hodin. Kalcinace se prováděla při teplotě 453 K po dobu 5 – 120 min.

Zn-A



Dusičnan zinečnatý (4,46 g) byl rozpuštěn ve vodě (50 ml) a zahřát na 60°C. Za míchání byl přidán roztok hydrogenfosforečnanu amonného (1,32 g ve 20 ml vody). Vznikala ihned bílá sraženina. Suspenze byla míchána 2 h a objem byl doplněn na 100 ml.

Zn-B



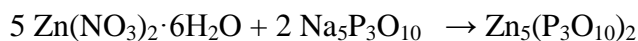
Dusičnan zinečnatý (4,46 g) byl rozpuštěn ve vodě (50 ml) a zahřát na 60 °C. Za míchání byl přidán roztok hydrogenfosforečnanu sodného (2,68 g ve 20 ml vody). Vznikala ihned bílá sraženina. Suspenze byla míchána 2 h a objem byl doplněn na 100 ml.

Zn-C



Dusičnan zinečnatý (3 g) byl rozpuštěn ve vodě (50 ml). Za míchání byl přidán roztok difosforečnanu sodného (1,33 g ve 20 ml vody). Vznikala ihned bílá sraženina. Suspenze byla míchána 2 h a objem byl doplněn na 100 ml.

Zn-D



Dusičnan zinečnatý (1,49 g) byl rozpuštěn ve vodě (50 ml). Za míchání byl přidán roztok trifosforečnanu sodného (0,74 g ve 20 ml vody). Vznikala ihned bílá sraženina. Suspenze byla míchána 2 h a objem byl doplněn na 100 ml.

3.2 Příprava tekutého a tuhého kultivačního média

Všechny použité bakteriální kultury byly kultivovány v živném médiu Muller-Hinton Broth (MHB) nebo Luria-Bertani Broth (LBB). MHB se skládalo z 21 g/L MHB směsi (Oxoid, Hampshire, UK) a LBB z tryptonu 10g/L, NaCl 10 g/L a kvasničného extraktu 5 g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Po přidavku MilliQ vody (Thermo Electron LED GmbH, Německo) proběhla sterilizace média v parním sterilizátoru (Tuttnauer, Holandsko) při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Pro testování antimikrobiální aktivity byl dále využit Muller-Hinton Agar (MHA) a Luria-ertani Agar (LBA). MHA obsahoval 38 g/L MHA směsi (Oxoid, Hampshire, UK) a LBA byl složen z tryptonu 10g/L, NaCl 10 g/L, kvasničného extraktu 5 g/L a 15 g/L bakteriologického agaru (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Po přidavku MilliQ vody proběhla sterilizace média v parním sterilizátoru při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

3.3 Příprava bakteriálních kultur

Všechny použité bakteriální kultury byly pořízeny z České sbírky mikroorganismů v Brně (Česká republika). Příprava biologického materiálu probíhala z hluboce zmrazených

bakteriálních kultur uchovávaných při teplotě -80 °C. Sterilní kličkou bylo asepticky odebráno 10 µL mikrobiální kultury *Staphylococcus aureus* (NCTC 8511), *Escherichia coli* (NCTC 13216) nebo methicilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA) a smícháno s 25 ml sterilního MHB nebo LBB. Inkubace bakteriálních kultur proběhla přes noc ve třepacím inkubátoru Hood TH 15 (Edmund Buhler GmbH, Německo) při teplotě 37 °C a 120 RMP.

Příprava diskové difúzní metody. Bakteriální kultura byla naředěna pomocí PBS na 0,5 stupně McFarlandovi stupnice. Pomocí vatového tamponu došlo k nanesení mikroorganismů na celý povrch Petriho misky s agarem MHA. Prázdné sterilní disky (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA), určené ke zjišťování antimikrobiální citlivosti, byly asepticky impregnovány 10 µL zinkových NPs. Takto připravené disky byly následně umístěny na agar s bakteriální kulturou a inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C v inkubátoru (Sanyo, USA).

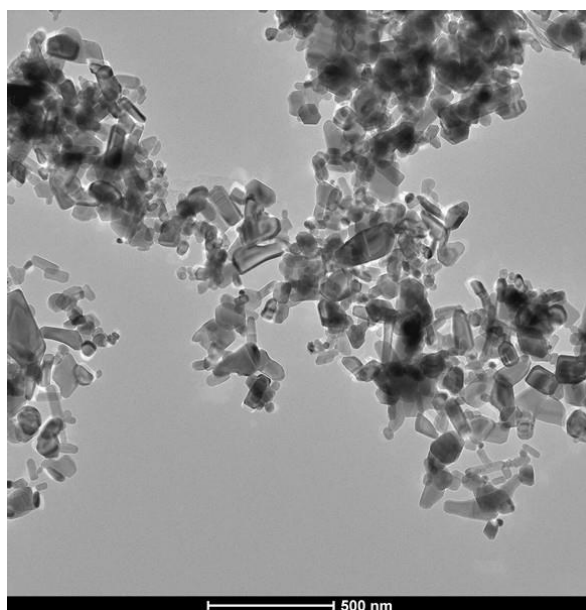
Příprava růstových křivek. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky byla nanesena mikrobiální kultura (1 stupeň McFarlanda) a naředěna 1:1 roztokem zinkových nanočástic o různých koncentracích nebo v případě kontroly pouze vodou. Absorbance bakteriálního zákalu byla detekována při vlnové délce 620 nm po dobu 24 hodin při 37 °C v intervalu 0,5 hodiny.

Příprava kultivační metody. Bakteriální kultura o zákalu 0,5 McFarlanda byla dále naředěna devítinásobným objemem média (1 ml kultury + 9 ml LBB) desítkovým ředěním podle typu použitých bakterií. Všechny zkumavky s příslušným ředěním byly umístěny do inkubátoru (Sanyo, USA) na dobu 120 minut při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo z každé zkumavky odebráno 300 µL a smícháno se 300 µL testované látky o různých koncentracích (v případě kontroly s vodou). Následovala inkubace při 37 °C po dobu 120 minut při rotaci 20 RPM pomocí programovatelného rotátor Multi RS-60 (Biosan, Lotyšsko). Po inkubaci bylo na povrch plotny s LB agarem naneseno 100 µL směsi bakteriální kultury s nanočásticemi. Inokulum bylo rozetřeno a následovala inkubace při 37 °C po dobu 24 hod.

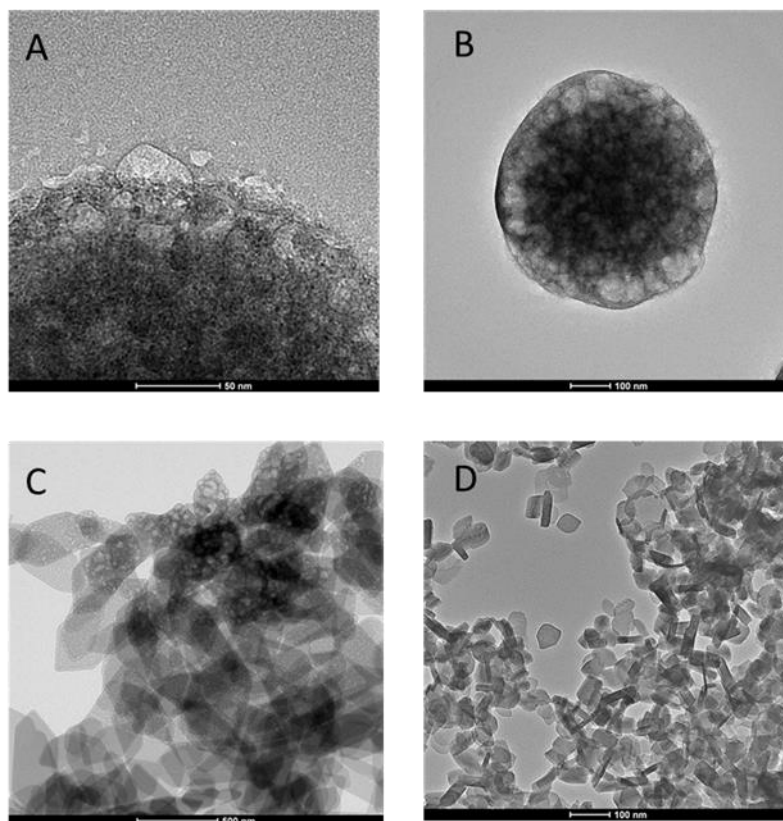
4 Charakterizace nanočástic

4.1 4.1 Charakterizace částic pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM)

Studované vzorky byly zobrazeny pomocí transmisní elektronové mikroskopie. TEM analýza byla provedena s použitím $\sim 4 \mu\text{L}$ vzorku, naneseném a zasušeném na měděné mřížce (400-mesh) s uhlíkovou vrstvou. Vysušený vzorek byl zobrazen pomocí Tecnai F20 TEM (FEI, Eindhoven, Netherlands) při 120 kV.



Obr. 1: TEM zobrazení nanočástic ZnO značeného jako ZnO-N. Nanočástice o velikosti do 100 nm byly dodány firmou Sigma Aldrich.

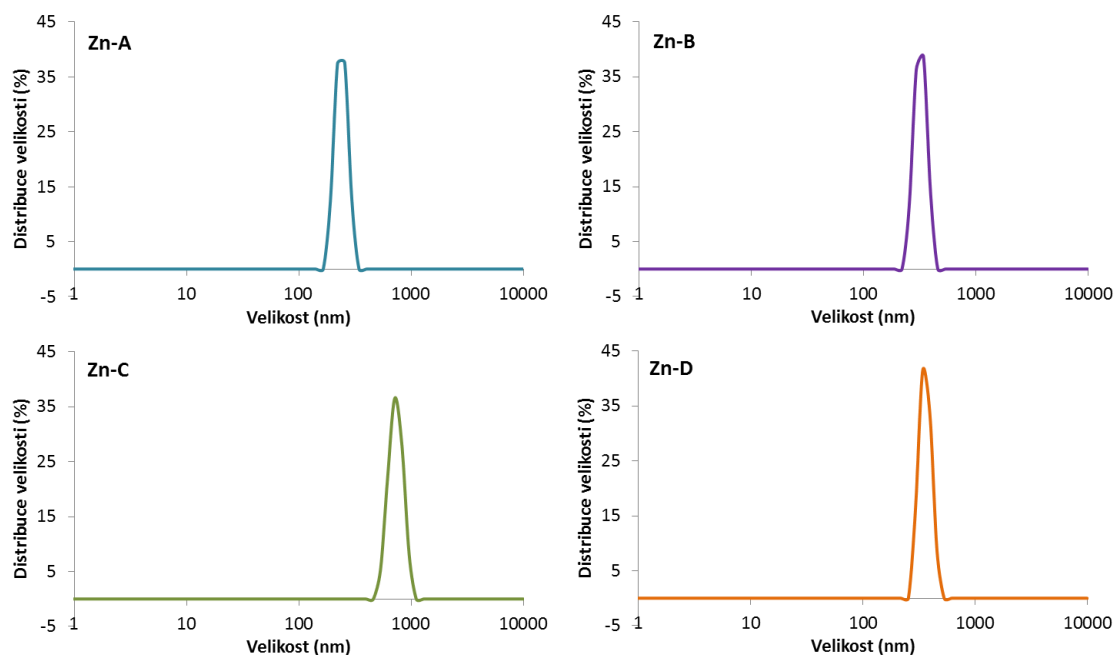


Obr. 2: TEM zobrazení nanočástic Zn-A (A), Zn-B (B), Zn-C (C) a Zn-D (D).

Výsledky charakterizace nanočástic pomocí transmisní elektronové spektroskopie jsou uvedeny na [Obr. 1 a 2](#). Na [Obr. 1](#) jsou částice ZnO dodaného firmou Sigma Aldrich a popsané dodavatelem jako nanočástice s velikostí <math><100\text{ nm}</math>. Většina krystalků tuto podmínku dodavatele splňuje, přičemž částice mají tvar tyčinek a hranolků. Na [Obr. 2](#) jsou charakterizovány připravené částice fosforečnanu zinečnatého A, AC a B ve srovnání s difosforečnanem zinečnatým (C a CC) a trifosforečnanem zinečnatým (D). Porovnáním vzorků A a B je vidět shodu ve velikosti částic kulovitěho tvaru, které jsou tvořeny menšími částicemi s velikostí do 100 nm. Vzorek AC je zcela odlišný. Přídavek kyseliny citronové do reakční směsi vede k vytvoření vločkovitých útvarů a jakéhosi listového tvaru částic. Difosforečnan zinečnatý (C) vytváří větší krystalky o rozměrech do 500 nm, které jsou však tvořeny splením menších částic s velikostí desítek nanometrů. Přídavek kyseliny citronové do reakční směsi vede nejspíše k rozrušení původní struktury a tvorbě izolovaných ostrůvků o rozměrech 100 až 200 nm, které jsou vytvořeny srostlicemi krystalků. Tvarem i velikostí krystalků se trifosforečnan zinečnatý velmi blíží struktuře nanočástic oxidu zinečnatého. Velikost částic byla dále stanovována v roztoku (viz níže) a potvrzuje závěry z TEM.

4.2 Charakterizace velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla (DLS)

Průměrná velikost částic a distribuce velikostí byla získána měřením quasielastického dynamického rozptylu světla na přístroji Malvern Zetasizer (NANO-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Velká Británie). Suspenze nanočástic v destilované vodě (1,5 ml, 1 mg/ml) byl nalit do polystyrenové cely a měřen při detekčním úhlu 173°, vlnové délce 633 nm, refrakčním indexu 0,30, reálném refrakčním indexu 1,59 a teplotě 25 °C.



Obr. 3: Analýza distribuce velikosti u částic Zn-A, Zn-B, Zn-C a Zn-D.

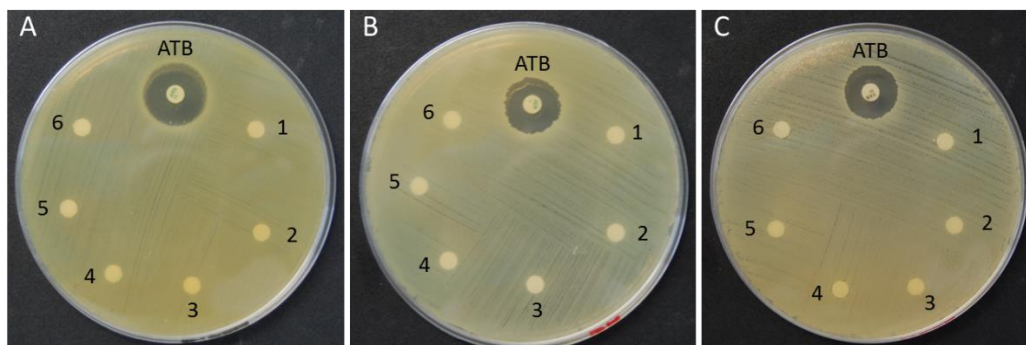
5 Stanovení antibakteriálních vlastností nanočástic

5.1 Disková difúzní metoda

Jedná se rutinně využívanou kvalitativní metodu sloužící ke stanovení citlivosti/rezistence mikroorganismů k antibakteriálním látkám [18, 19]. Principem je radiální difúze antimikrobiální látky z papírového disku do agaru a následné (ne)vytvoření inhibičních zón [20].

Po inokulaci agarů bakteriemi *E. coli*, *S. aureus* a MRSA následovala aplikace předem připravených disků impregnovaných nanočásticemi zinku a komerčně dostupných disků s antibiotiky (Bio-Rad, Francie) o koncentraci 6 µg na disk. Při inkubaci dochází ke kultivaci bakteriální kultury na povrchu agaru a poté jsou měřeny velikosti vytvořených inhibičních zón a porovnány s kontrolou, kterou tvoří disky s antibiotiky.

Na obr. 4 jsou ukázány výsledky diskové difúzní metody pro *E. coli* (4A), *S. aureus* (4B) a MRSA (4C). Inhibiční zóny se vytvořily pouze u pozitivních kontrol (disků s antibiotiky). V případě testovaných látek nebyly pozorovány inhibiční zóny ani u zinkových nanočástic ani u samotného ZnO. Zóny se vytvoří pouze v případě dostatečné difuze antimikrobiálního materiálu do okolí disku. Nerozpustnost zinečnatých komplexů pravděpodobně způsobuje nedostatečné uvolňování Zn^{2+} . Pokud tedy nejsou nanočástice v přímém kontaktu s bakteriální kulturou, antibiotický efekt je výrazně nižší [21, 22].



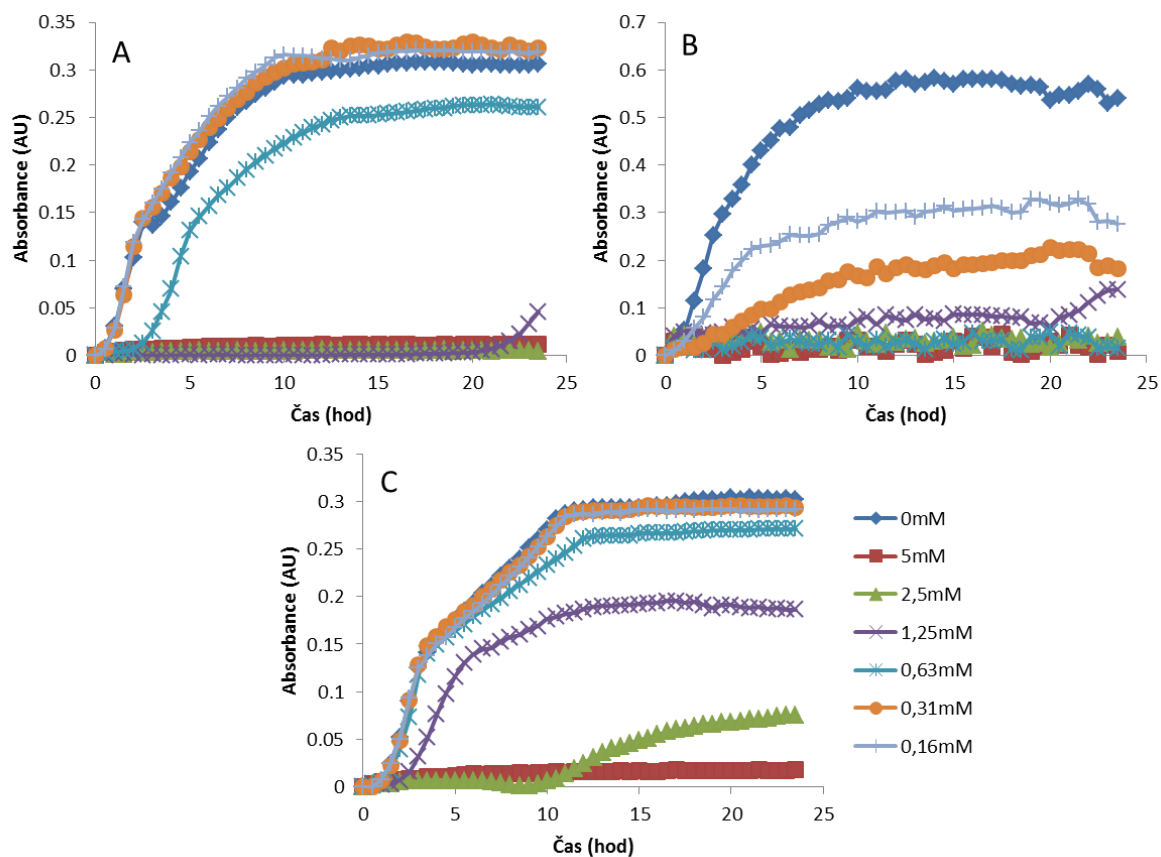
Obr. 4: Disková difúzní metoda pro (A) *E. coli* (antibiotikum amoxicilin), (B) *S. aureus* (antibiotikum penicilin) a (C) MRSA (antibiotikum vankomycin). Pořadí testovaných látek na discích: 1 – Zn-A, 2 – Zn-B, 3 – Zn-C, 4 – Zn-D, 5 – ZnO-N, 6 – ZnO.

5.2 Metoda růstových křivek mikroorganismů

Metoda stanovení růstových křivek mikroorganismů je grafickým znázorněním počtu živých mikroorganismů jako funkce času. Je to tedy záznam množství buněk stanovený v určitých časových intervalech během růstu bakteriální populace [23]. Křivky mění svůj tvar v závislosti nejen na kultivovaném mikroorganismu, ale také na teplotě, na složení živného média atd. [24].

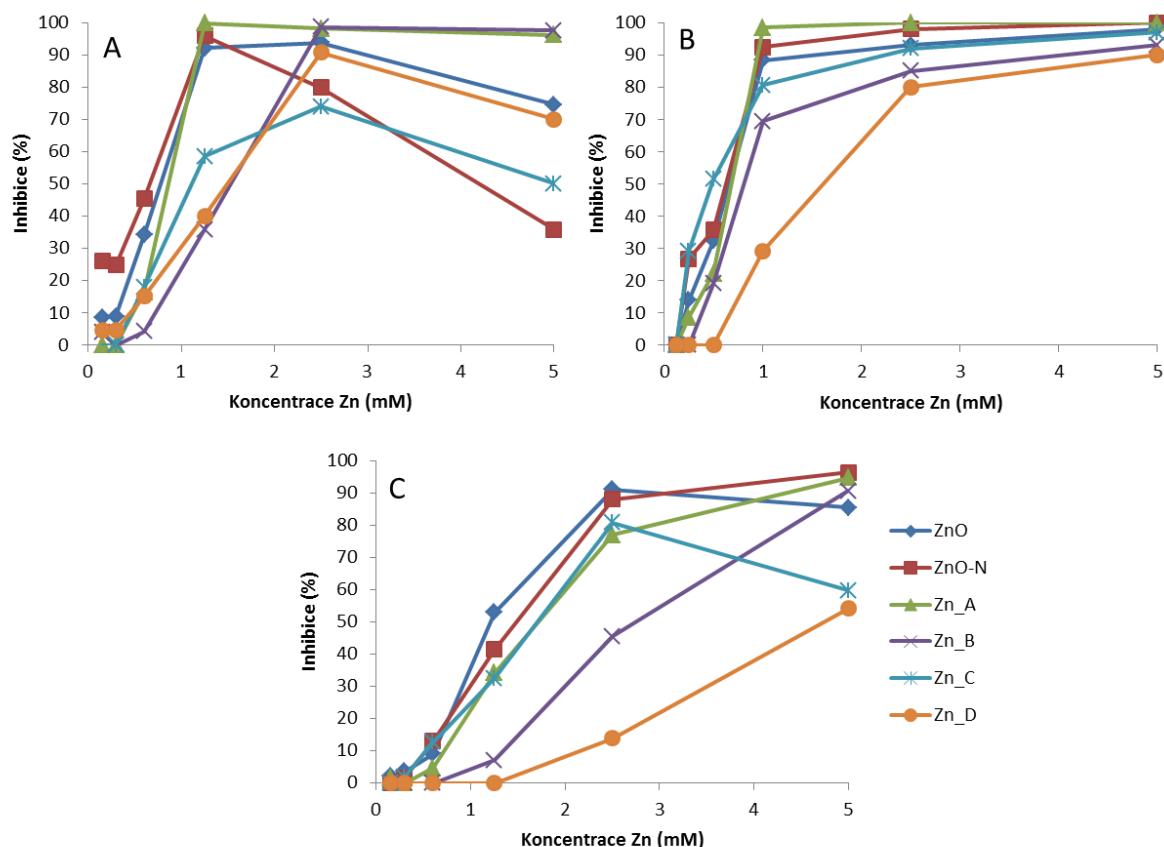
Jako zástupce gramnegativních mikroorganismů byla použita *E. coli* a z grampozitivních bakterií byl využit *S. aureus* a MRSA. K těmto mikroorganismům byly přidány různé typy nanočástic zinku (A-D) o koncentraci 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31 a 0,16 mM, stejně jako ZnO nanočástice (ZnO-N) a samotný ZnO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pro srovnání antimikrobiální aktivity se syntetizovanými částicemi. Koncentrace vybraných mikroorganismů byla zjišťována turbidimetrickým stanovením za pomoci Multiskenu EX (Thermo Fisher Scientific, Německo). Hodnota absorbance v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky přímo úměrně korespondovala s množstvím bakterií. Analýza mikrobiálního růstu pomocí stanovení absorbance je velice výhodnou metodou z hlediska jednoduchosti, rychlosti, finanční nenáročnosti a možnosti automatizace [25].

Na obr. 5 je příklad růstových křivek pro *E. coli* (5A), *S. aureus* (5B) a MRSA (5C), které byly vystaveny působení nanočástic Zn-A.



Obr. 5: Vliv nanočástic Zn-A o různých koncentracích na růst bakteriální kultury (A) E. coli, (B) S. aureus a (C) MRSA.

Z růstových křivek byla pro všechny typy nanočástic zjištěna inhibice růstu (%) bakterií ve stacionární fázi křivky v porovnání s kontrolou bez přídavku nanočástic (obr. 6). Následně byla vypočítána inhibiční koncentrace IC_{50} . Tato hodnota udává koncentraci látky (nanočástic), při které dochází k inhibici růstu o 50 % [26]. V tabulce 1 jsou zaznamenány IC_{50} pro jednotlivé testované látky a mikroorganismy.



Obr. 6: Inhibice růstu (A) *E. coli*, (B) *S. aureus* a (C) MRSA vlivem zinkových nanočástic (ZnO-N, Zn-A, Zn-B, Zn-C, Zn-D) a samotného ZnO.

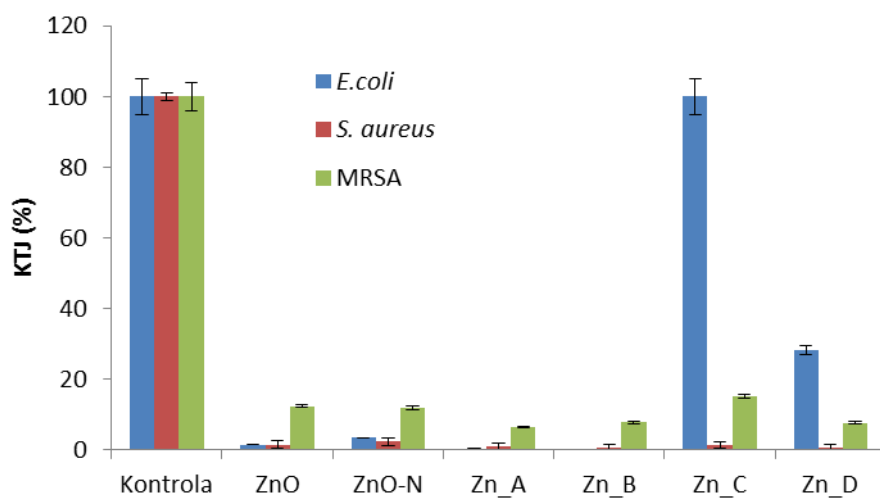
Tab. 1: Hodnoty IC_{50} (mM) pro jednotlivé testované látky a bakteriální kultury.

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA
ZnO	0,8	0,66	1,2
ZnO-N	0,7	0,62	1,45
Zn-A	0,9	0,68	1,6
Zn-B	1,5	0,8	2,7
Zn-C	1,1	0,48	1,6
Zn-D	1,5	1,6	4,7

5.3 Kultivační metoda

Roztěrem vzorku dochází k imobilizaci buněk na povrchu agaru. Po příslušné době inkubace jsou počítány vzniklé kolonie tvořící jednotky (KTJ) [27]. Počet kolonií vytvořených na agaru u misek, které byly inokulovány mikrobiální kulturou spolu s roztokem nanočástic, byl porovnán s počtem kolonií vytvořených na agaroch inokulovaných pouze danou mikrobiální kulturou. Antimikrobiální účinnost testované látky je vyjádřena v % KTJ oproti kontrole.

Kultivační technika byla testována na bakteriálních kulturách *E. coli*, *S. aureus* a MRSA. Příslušné ředění daného mikroorganismu bylo inkubováno s testovanou látkou o koncentraci 5 mM (obr. 7).



Obr. 7: Antimikrobiální aktivita zinkových nanočástic stanovena pomocí kultivační techniky

6 Srovnání novosti postupů

Jako dietní doplněk zinku pro monogastriční zvířata se v medikovaných krmných směsích nejčastěji používá oxid zinečnatý. Nanokomplexy zinku mohou být použity v menších koncentracích a jsou tedy šetrnější k životnímu prostředí. Podle Evropské komise má být navíc v roce 2022 silně zredukováno používání vysokých dávek zinku v krmných dávkách hospodářských zvířat. Dle dostupných výsledků je možné dávky zinku zredukovat o cca 15-20 % v porovnání s oxidem zinečnatým. Konkrétní postup syntézy nanokomplexů zinku je navržen tak, aby bylo možné výše uvedené zdroje zinku vyrábět průmyslově.

7 Popis uplatnění metodiky

Metodika je primárně určena pro krmivářské firmy, které mohou metodický postup využít při velkovýrobním procesu. Metodika tak bude rovněž nepřímo sloužit chovatelům hospodářských zvířat. Předložený postup lze rovněž využít v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Podle předložené metodiky může příslušný subjekt syntetizovat jednotlivé formy nanokomplexů zinku pro hospodářská zvířata. Navržený postup syntézy nanokomplexů zinku je koncipován tak, aby bylo možné metodiku zavést do výrobní praxe.

8 Ekonomické aspekty

Minerální látky tvoří majoritní podíl krmné směsi. Jedná se ovšem o jednu z nejdražších položek při tvorbě krmné dávky. Cena oxidu zinečnatého se pohybuje cca 500 Kč/kg. Při dávce 2500 gramů na tunu je tedy cena 1250 Kč/tuna. Při naší kalkulaci výroby zinkových nanočástic se výsledná cena pohybuje cca 600 Kč/kg. Při snížení dávky nanokomplexů zinku v krmné dávce o 30 % (1750 mg/kg diety) bude celkový náklad na tunu krmiva 1050 Kč. Další snížení nákladů na straně chovatele bude za veterinární léčbu.

Použitá literatura

1. Kim, N.R., et al., *Associations Between Serum Zinc Levels and Mental Health: Findings from the 2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey*. Biological Trace Element Research, 2017: p. 1-7.
2. Nowak, G. and B. Szewczyk, *Mechanisms contributing to antidepressant zinc actions*. Polish Journal of Pharmacology, 2002. **54**(6): p. 587-592.
3. Jn, Z., et al., *Antioxidant status and zinc levels in alcoholic liver disease*. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2014. **5**(3): p. B393-B399.
4. King, J.C., et al., *Biomarkers of nutrition for development (BOND)-Zinc Review*. Journal of Nutrition, 2016. **146**(4): p. 858S-885S.
5. Zali, A. and M. Ganjkhanlou, *Effect of zinc from zinc sulfate on trace mineral concentrations of milk in Varamini ewes*. African Journal of Biotechnology, 2009. **8**(22): p. 6464-6469.
6. Dastyh, M., Jr., et al., *Trace element status (Zinc, Copper, Selenium, Iron, Manganese) in patients with long-term home parenteral nutrition*. Annals of Nutrition and Metabolism, 2016. **69**(2): p. 120-124.
7. Luecke, R.W., *Domestic animals in the elucidation of zinc's role in nutrition*. Federation Proceedings, 1984. **43**(13): p. 2823-2828.
8. Blavi, L., et al., *Effects of zinc oxide and microbial phytase on digestibility of calcium and phosphorus in maize-based diets fed to growing pigs*. Journal of Animal Science, 2017. **95**(2): p. 847-854.
9. Pal, B., *Zinc in animal and human nutrition*. INDIAN J.NUTR.DIET., 1974. **11**(2): p. 91-109.
10. Milani, N.C., et al., *Dietary zinc oxide nanoparticles as growth promoter for weanling pigs*. Animal Feed Science and Technology, 2017. **227**: p. 13-23.
11. Predicala, B., A. Alvarado, and D. Asis. *Use of zinc oxide nanoparticles to control hydrogen sulphide, ammonia and odour emissions from pig barns*. in *ASABE - 9th International Livestock Environment Symposium 2012, ILES 2012*. 2012.
12. Wu, J., et al. *Impacts of ammonia on zinc oxide nanoparticle toxicity to Nitrosomonas europaea*. in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2017.
13. Skalickova, S., et al., *Selenium nanoparticles as a nutritional supplement*. Nutrition, 2017. **33**: p. 83-90.
14. Baldry, M., et al., *The agr Inhibitors Solonomide B and Analogues Alter Immune Responses to Staphylococcus aureus but Do Not Exhibit Adverse Effects on Immune Cell Functions*. Plos One, 2016. **11**(1).
15. Khan, I., et al., *Antimicrobial profile of some novel keto esters: Synthesis, crystal structures and structure-activity relationship studies*. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016. **29**(1): p. 39-49.
16. Grzmil, B., B. Kic, and K. Lubkowski, *Studies on obtaining of zinc phosphate nanomaterials*. Reviews on Advanced Materials Science, 2007. **14**(1): p. 46-48.
17. Vasovic, D.D., D.R. Stojakovic, and S.P. Zec, *Metal phosphate preparation using boron phosphate*. Materials Research Bulletin, 1997. **32**(6): p. 779-784.
18. Fiebelkorn, K.R., et al., *Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci*. Journal of Clinical Microbiology, 2003. **41**(10): p. 4740-4744.
19. Matuschek, E., D.F.J. Brown, and G. Kahlmeter, *Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories*. Clinical Microbiology and Infection, 2014. **20**(4): p. O255-O266.

20. Kronvall, G., C.G. Giske, and G. Kahlmeter, *Setting interpretive breakpoints for antimicrobial susceptibility testing using disk diffusion*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2011. **38**(4): p. 281-290.
21. Sevinc, B.A. and L. Hanley, *Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles*. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, 2010. **94B**(1): p. 22-31.
22. Wang, Y.W., et al., *Superior Antibacterial Activity of Zinc Oxide/Graphene Oxide Composites Localized around Bacteria*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014. **6**(4): p. 2791-2798.
23. Peleg, M. and M.G. Corradini, *Microbial Growth Curves: What the Models Tell Us and What They Cannot*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011. **51**(10): p. 917-945.
24. Zwietering, M.H., et al., *MODELING OF THE BACTERIAL-GROWTH CURVE*. Applied and Environmental Microbiology, 1990. **56**(6): p. 1875-1881.
25. Dalgaard, P. and K. Koutsoumanis, *Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models*. Journal of Microbiological Methods, 2001. **43**(3): p. 183-196.
26. Khan, M., et al., *Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized using *Pulicaria glutinosa* plant extract as a green bioreductant*. International Journal of Nanomedicine, 2014. **9**: p. 3551-3565.
27. Herigstad, B., M. Hamilton, and J. Heersink, *How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria*. Journal of Microbiological Methods, 2001. **44**(2): p. 121-129.

Seznam publikací předcházejících metodice

STENCLOVA, H., KARASEK, F., HORKY, P., VACULOVICOVA, M., KOPEL, P. The Influence of Zinc Nanocomplexes on Antioxidant Potential of The Organism. MendelNet 2016 - Proceedings of International PhD Students Conference. 1. vyd. Brno, Czech Republic: Mendel University in Brno, 2016. s. 824-828.

JELINKOVA, P., KOUDELKOVA, Z., MILOSAVLJEVIC, V., HORKY, P., KOPEL, P., ADAM, V. Utilization of Selenium Nanoparticles with Schiff Base Chitosan as Antibacterial Agents. MendelNet 2016 - Proceedings of International PhD Students Conference. 1. vyd. Brno, Czech Republic: Mendel University in Brno, 2016, s. 989-993.

HORKY, P., RUTTKAY-NEDECKÝ, B., NEJDL, L., RICHTERA, L., CERNEI, N., POHANKA, M., KOPEL, P., SKLADANKA, J., HLOUCALOVA, P., SLAMA, P., NEVRKLA, P., MLEJNKOVA, V., KLUSONOVA, I., KIZEK, R., ADAM, V. Electrochemical Methods for Study of Influence of Selenium Nanoparticles on Antioxidant Status of Rats. International Journal of Electrochemical Science. 2016. sv. 11, č. 4 s. 2799-2824. ISSN 1452-3981

Poděkování

Tato publikace vznikla z výsledků řešení grantu QK1720349 - Nanokomplexy zinku jako alternativa náhrady antibiotik u prasat, financovaného Národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV).

METODIKA MODIFIKACE A SYNTÉZY NANOKOMPLEXŮ ZINKU PRO DIETNÍ VYUŽITÍ U HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT

Vedoucí autorského kolektivu
doc. Ing. Pavel Horký, Ph.D.¹

Autorský kolektiv

Ing. Kristýna Šmerková, Ph.D.^{2,6}, doc. RNDr. Pavel Kopel, Ph.D.², Ing. David Hynek, Ph.D.², Bc. Ing. Eliška Kabourková, Ph.D.^{2,6}, Ing. Zuzana Bytešníková^{2,6}, doc. Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.⁴, prof. Ing. Ladislav Zeman, CSc. dr.h.c.¹, Ing. Pavel Nevrkla, Ph.D.³, Ing. Iva Čáslavová¹, Ing. Eva Václavková, Ph.D.⁵, doc. Ing. Jiří Skládanka, Ph.D.¹, prof. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.^{2,6}

Pracoviště autorů:

¹Ústav výživy zvířat a pícninářství, ²Ústav chemie a biochemie, ³ Ústav chovu a šlechtění zvířat, ⁴Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

⁵ Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Komenského 1239, Kostelec nad Orlicí, Česká republika, Evropská unie

⁶ Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 123, 612 00 Brno, Česká republika

Vydavatel: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Tisk: Vydavatelství Mendelovy univerzity v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Jazyková korektura: Ing. Marie Balabánová, Ph.D.

Vydání: první 2018

Počet stran: 28

Náklad: 100

ISBN: 978-80-7509-535-0