

**ČESKÉ VYSOKÉ
UČENÍ TECHNICKÉ
V PRAZE**

FAKULTA ELEKTROTECHNICKÁ



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

**DANIEL
VÍTEK**

České vysoké učení technické v Praze

Fakulta elektrotechnická

Katedra teorie obvodů



Bakalářská práce

Nanokompozity stříbrných nanočástic a nanodiamantů pro
inhibici bakterií

Nanocomposites of silver nanoparticles and nanodiamonds for
bacterial inhibition

Autor: Daniel Vítek

Vedoucí práce: prof. RNDr. Bohuslav Rezek, Ph.D.

Vedoucí práce – specialista: Ing. Kateřina Kolářová, Ph.D.

Studijní program: Lékařská elektronika a bioinformatika

Praha 2022

Oficiální zadání práce



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Vítek** Jméno: **Daniel** Osobní číslo: **483405**
Fakulta/ústav: **Fakulta elektrotechnická**
Zadávající katedra/ústav: **Katedra teorie obvodů**
Studijní program: **Lékařská elektronika a bioinformatika**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Nanokompozity stříbrných nanočástic a nanodiamantů pro inhibici bakterií

Název bakalářské práce anglicky:

Nanocomposites of silver nanoparticles and nanodiamonds for bacterial inhibition

Pokyny pro vypracování:

V biomedicíně mohou mít nanomateriály a zejména nanočástice nejružnější funkce od nosičů léčiv po luminiscenční značky. Diamantové nanočástice se svojí výbornou biokompatibilitou, fotoluminiscenčními vlastnostmi a aktivním, modifikovatelným povrchem nabízejí v tomto směru řadu výhodných vlastností. Stříbrné nanočástice jsou zase široce využívané pro své optické a antibakteriální vlastnosti. Pokyny k této práci jsou:

1. Seznamte se s doporučenou literaturou a vypracujte přehled současného stavu problematiky. Zaměřte se především na téma přípravy kompozitních nanomateriálů na bázi uhlík-kov a jejich antibakteriálních vlastností.
2. Připravte dispergované suspenze nanodiamantů s dobrou stabilitou částic.
3. Připravte kompozit nanodiamant-stříbro s použitím dusičnanu stříbrného jako prekurzoru stříbrných nanočástic.
4. Výsledný nanokompozit charakterizujte z hlediska stability a velikosti částic pomocí DLS, UV-vis a mikroskopie.
5. Zhodnotte naměřené výsledky a diskutujte je s publikovanými údaji.

Seznam doporučené literatury:

J. Herych, Š. Stehlík, K. Mazanec, et al.: Appl. Catal. B 259 (2019) 118097, doi: 10.1016/j.apcatb.2019.118097
A. Panáček, L. Kvítek, M. Směkalová, et al.: Nature Nanotech. 13 (2018) 65, doi: 10.1038/s41565-017-0013-y
B.M. Chang, L. Pan, H.H. Lin, et al.: Sci. Rep. 9 (2019) 13164 (2019), doi: 10.1038/s41598-019-49675-z
I. Machová, M. Hubálek, T. Bělinová, et al.: Carbon 162 (2020) 650, doi: 10.1016/j.carbon.2020.02.061

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

prof. RNDr. Bohuslav Rezek, Ph.D. katedra fyziky FEL

Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) bakalářské práce:

Ing. Kateřina Kolářová, Ph.D. Fyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Praha

Datum zadání bakalářské práce: **24.01.2022** Termín odevzdání bakalářské práce: **20.05.2022**

Platnost zadání bakalářské práce: **30.09.2023**

prof. RNDr. Bohuslav Rezek, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) práce

doc. Ing. Radoslav Bortel, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

prof. Mgr. Petr Páta, Ph.D.
podpis otkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Student bere na vědomí, že je povinen vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v bakalářské práci.

Datum převzetí zadání

Podpis studenta

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl veškeré použité informační zdroje v souladu s Metodickým pokynem o dodržování etických principů při přípravě vysokoškolských závěrečných prací.

V Praze dne

.....

Podpis autora práce

Poděkování

Chtěl bych poděkovat zejména vedoucím své práce Ing. Kateřině Kolářové, Ph.D. a prof. RNDr. Bohuslavu Rezkovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce a vstřícný přístup.

Dále děkuji své rodině nejenom za každodenní morální podporu.

Děkuji také za možnost vypracovat tuto práci na Fyzikálním ústavu AV ČR.

Abstrakt

Antibiotika, z důvodu nadužívání, ztrácí svou efektivitu, a proto se hledají nová léčiva, která by je postupně dokázala nahradit. Jedním z řešení by mohly být kompozity na bázi nanodiamant-stříbro. Stříbrné nanočástice totiž disponují vynikajícími antibakteriálními vlastnostmi a nanodiamanty se vyznačují výbornou biokompatibilitou a dalšími výhodnými vlastnostmi. Hlavním cílem bylo vytvoření těchto nanokompozitů a zkoumání jejich stability v kultivačních médiích. Kultivace probíhala po dobu 1 a 4 h v Muellerově-Hintonově bujónu a 0,9 % NaCl. Pro vytvoření kompozitů byly použity oxidované a hydrogenované high-pressure high-temperature nanodiamanty MSY50, které byly potaženy vrstvou chitosanu. Tato vrstva sloužila k lepšímu navázání stříbrných nanočástic. Pro vyhodnocení stability byla použita metoda dynamického rozptylu světla, analýza zeta potenciálu, optická spektroskopie v UV-Vis oblasti a skenovací elektronová mikroskopie. Tyto analytické metody potvrdily úspěšné vytvoření obou typů kompozitů i následnou stabilitu v kultivačních médiích.

Klíčová slova: nanodiamanty, stříbrné nanočástice, inhibice bakterií, nanokompozity

Abstract

Antibiotics, due to their overuse, are losing their effectiveness and new drugs are being sought to replace them over time. One solution could be nanodiamond-silver composites. Silver nanoparticles have excellent antibacterial properties and nanodiamonds are characterised by excellent biocompatibility and other advantageous features. The main objective was to create these nanocomposites and investigate their stability in culture media. Cultivation was carried out for 1 and 4 h in Mueller-Hinton Broth and 0.9% NaCl. Oxidized and hydrogenated high-pressure high-temperature MSY50 nanodiamonds were used to form the composites, which were coated with a layer of chitosan. This layer served to better bind the silver nanoparticles. Dynamic light scattering, zeta potential analysis, UV-Vis spectroscopy and scanning electron microscopy were used to evaluate the stability. These analytical methods confirmed the successful formation of both types of composites and the subsequent stability in culture media.

Keywords: nanodiamonds, silver nanoparticles, bacterial inhibition, nanocomposites

Seznam použitých zkratek

NP	nanočástice
ND	nanodiamant
HPHT	high-pressure high-temperature
DNDs	detonační nanodiamanty
TiO ₂	oxid titaničitý
TNT	trinitrotoluen
RDX	hexogen
DLS	dynamický rozptyl světla
UV-Vis	ultrafialovo-viditelná oblast světelného spektra
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
SE	sekundární elektrony
BSE	zpětně odražené elektrony
MSY	monokrystalický syntetický diamant
O-NDs	vodní suspenze oxidovaných nanodiamantů
H-NDs	vodní suspenze hydrogenovaných nanodiamantů
chit-O-NDs	chitosanem pokryté oxidované nanodiamanty
chit-H-NDs	chitosanem pokryté hydrogenované nanodiamanty
Ag-O-NDs	postříbřené chitosanové oxidované nanodiamanty
Ag-H-NDs	postříbřené chitosanové hydrogenované nanodiamanty
dH ₂ O	demineralizovaná voda
M-H Broth	Muellerův Hintonův bujón (kultivační roztok)
NaCl	chlorid sodný
HCl	kyselina chlorovodíková
chit-NDs	chitosanové nanodiamanty
PVP	polyvinylpyrrolidon
Ag	stříbro
AgNO ₃	dusičnan stříbrný
Ag-NDs	stříbrem pokryté chitosanové nanodiamanty
FWHM	full width at half maximum

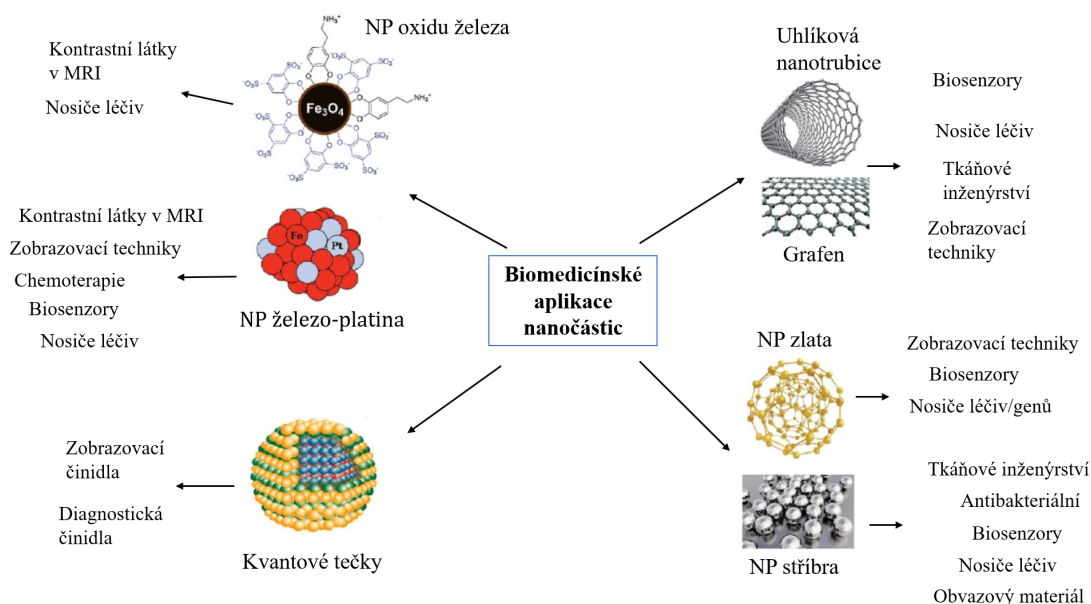
Obsah

1. Úvod.....	10
1.1. Nanočástice v biomedicině	10
1.1.1. Diamantové nanočástice.....	11
1.1.2. Stříbrné nanočástice	12
1.1.3. Chitosan	13
1.2. Cíle práce	13
1.3. Analytické metody	14
1.3.1. Dynamický rozptyl světla.....	14
1.3.2. Analýza zeta potenciálu	15
1.3.3. Optická spektroskopie v UV-Vis oblasti.....	16
1.3.4. Skenovací elektronová mikroskopie	17
2. Metodika práce	19
2.1. Příprava, kultivace a měření holých nanodiamantů	19
2.2. Příprava, kultivace a měření chitosanových NDs	20
2.3. Příprava, kultivace a měření kompozitu diamant-stříbro	21
3. Výsledky práce a jejich diskuze	23
3.1. Výsledky nanočástic před kultivací a diskuze.....	23
3.2. Výsledky nanočástic po kultivaci v médiích a diskuze	26
3.3. Analýza SEM	29
4. Závěr.....	32
5. Seznam použitých laboratorních přístrojů a jejich obsluha	33
6. Dodatečné grafy	34
7. Použitá literatura.....	38

1. Úvod

1.1. Nanočástice v biomedicině

V posledním desetiletí se nanočásticím (NPs) v biomedicině dostává čím dál větší pozornosti. Ta se odráží v širokém použití těchto částic v biosenzorech, nosičích léčiv (pro tzv. drug delivery), zobrazovacích a diagnostických technikách, tkáňovém inženýrství a mnohých dalších oblastech (Obr. 1). Nanočástice se začali hojně používat díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem a vyššímu poměru plochy k objemu. Pro biomedicínu je zcela stěžejní, aby tyto částice byly biokompatibilní a netoxické. To se dá ovlivnit mnoha faktory jako je např.: jejich chemické složení, velikost, tvar, povrchové úpravy a náboj. [1-3]



Obr. 1: Biomedicínské aplikace nanočástic, převzato z [1] a upraveno.

Nanočástice v lidském těle interagují s celou řadou molekul. Mezi nejdůležitější molekuly, se kterými NPs přijdou do styku, patří aminokyseliny (proteiny). Po kontaktu a následném navázání nanočástice s proteinem vzniká tzv. proteinová korona, která ovlivňuje fyzikální a chemické vlastnosti NP. Navázání může způsobovat agregaci částic, ale i naopak může vést ke zlepšení stability NPs. Tyto procesy jsou dány převahou přitažlivých, či odpuzivých sil, a jsou charakterizovány zeta potenciálem. Vzhledem k tomu, že se tyto děje odehrávají v lidském těle, je nezbytné vědět, jak probíhají a jaký celkový dopad mají pro zdraví člověka. Touto problematikou interakce nanodiamantů s proteiny se podrobně zabýval tým doktorky Machové. [4]

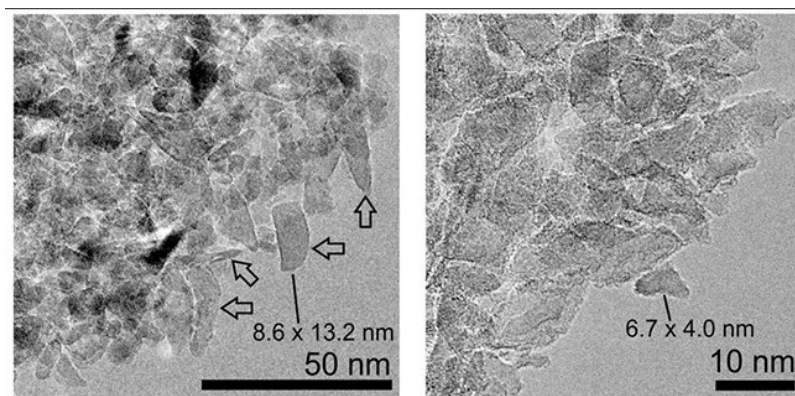
Hlavní motivací této práce bylo zlepšení stability stříbrných nanočástic v prostředí lidského těla. Tyto NPs by mohly do budoucna, díky svým vynikajícím antibakteriálním vlastnostem, nahradit antibiotika. Očekávalo se, že navázáním stříbra na nanodiamanty, by mohlo dojít k cílené stabilizaci stříbrných nanočástic. Nanodiamanty totiž disponují výbornou biokompatibilitou a dalšími výhodnými vlastnostmi. Podrobněji jsou tyto materiály a jejich vlastnosti popsány níže v podkapitolách 1.1.1 a 1.1.2.

1.1.1. Diamantové nanočástice

Diamantové nanočástice, známy též jako nanodiamanty (NDs), nabývají, nejenom na poli biomedicíny, velkého zájmu. [5] Je to zejména kvůli rozšíření výroby do průmyslového měřítka [4, 6, 7] a také díky přenesení vlastností běžných diamantů do škály miniaturních rozměrů (jednotky až stovky nanometrů). [4, 8] Mezi tyto vlastnosti patří tvrdost [8], mechanická robustnost [4, 9], výborná biokompatibilita [4, 5, 8-10], fotoluminiscenční (fluorescenční) vlastnosti [7, 8, 10, 11], tepelná vodivost [8] a chemická stabilita [4, 6].

Díky těmto charakteristikám mají NDs široké spektrum využití. Nachází se v biosenzorech [5, 9] nebo se používají jako nosiče léčiv [4, 5, 10, 12] či jako „bioimaging agents“ v moderních zobrazovacích technikách. [4, 5, 7] Navíc je možné aktivně upravovat chemické vlastnosti jejich povrchů [4, 6, 9], což dále rozšiřuje využití NDs (např. v heterogenní katalýze [6]). Mimo biomedicínu se dále používají pro galvanické pokovování, lubrikaci a leštění povrchů. [12] Dále také ke zvětšení objemu pórovité struktury a transferu elektrického náboje, což po přidání NDs k TiO_2 má za důsledek zlepšení schopnosti odbourávat toxické látky. [6]

Nanodiamanty mohou být v dnešní době relativně snadno vytvořeny synteticky mnoha způsoby. [8] Dvě komerčně nejpoužívanější metody jsou HPHT („high-pressure, high-temperature“) a detonace. V první metodě diamanty vznikají za vysoké teploty a tlaku (1500 °C | jednotky GPa) růstem okolo zárodečného uhlíkového centra. [7, 13] Poté probíhá drcení tohoto materiálu. Pod elektronovým mikroskopem jsou patrné odštěpy a ostré hrany NDs vzniklých touto metodou (Obr. 2). [9] Detonační nanodiamanty (DNDs) vznikají v detonační komoře při explozi typicky trinitrotoluenu (TNT) a hexogenu (RDX) za nedostatku kyslíku [4, 6, 8] a za přítomnosti chladících médií. [7] Tyto NDs mají sférický tvar [7] a jejich velikost se pohybuje v řádu jednotek nanometrů [6]. Na rozdíl od DNDs, nanodiamanty HPHT mají širší distribuci velikostí [7, 9] a méně defektů v mřížkové struktuře [9, 14].



Obr. 2: TEM (Transmisivní elektronová mikroskopie) fotografie zachycující ostré hrany HPHT nanodiamantů. Převzato z [15] a upraveno.

1.1.2. Stříbrné nanočástice

Stříbrné nanočástice na rozdíl od NDs nevykazují stabilitu. Stříbro se však po několik staletí ve svých různých formách hojně využívá pro své antibakteriální vlastnosti, kterými disponují i jeho NP. [16] Nejsou to ovšem jediné významné vlastnosti, kterými disponuje. Dále to jsou např. výborné optické schopnosti (vysoká odrazivost), termální a elektrická vodivost, chemická a katalytická aktivita. [1, 2]

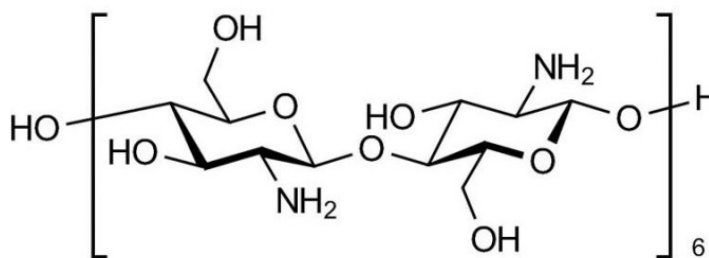
V dnešní době mají mnohé využití, například na poli medicíny se používají v lékařských textiliích (obvazovém materiálu). [2, 10] Zkoumá se, zda v budoucnu dokáží vylepšit, či dokonce nahradit antibiotika. [16, 17] Proto už nyní probíhají výzkumy schopností bakterií vybudovat si odolnost vůči stříbrným nanočásticím. Tým Doc. Panáčka [16] zjistil, že podobně jako u antibiotik tato rezistence skutečně vzniká. Zároveň ji ale dokázal potlačit přidáním extraktu z kůry granátového jablka do kultivačního média s bakteriemi. Dalším řešením, jak tuto rezistenci utlumit, by mohlo být použití většího množství stříbra (to by ovšem bylo v nadměrném množství pro lidské buňky toxické). [10] Vývoj odolnosti bakterií vůči stříbrným nanočásticím vede ke ztrátě antibakteriálních vlastností NP a je spojen s jejich shlukováním. [16] Proto jedním z cílů (Kapitola 1.2. Cíle práce) této studie bylo analytickými metodami sledovat stabilitu připravených nanočástic.

Kovové nanočástice mohou být obecně připraveny fyzikálními či chemickými metodami. [18] Fyzikální metody přípravy probíhají za vysokých teplot ve vakuu a jsou finančně náročnější, nicméně u nich nedochází k možné kontaminaci chemikáliemi. Zatímco chemické metody využívají redukční činidla pro výrobu nanočástic, jsou snáz proveditelné a lépe se upravují. [18, 19] V této práci vznikaly stříbrné nanočástice právě pomocí chemické redukce. Jako redukční činidlo byl použit polyvinylpyrrolidon, který se běžně používá pro stabilizaci NPs

[20]. Tento postup přípravy stříbrných nanočástic a následného nanesení na NDs vedl v práci paní doktorky Kolářové [9] k vytvoření stabilních nanokompozitů. Proto jsme předpokládali, že by tato příprava mohla fungovat i pro NDs jiné velikosti a jiný povrchových modifikací. Konkrétně pro nanodiamanty potažené chitosanem.

1.1.3. Chitosan

Chitosan je přírodní polysacharid vzniklý deacetylací chitinu, má výbornou biokompatibilitu, díky čemuž má řadu využití. Slouží pro zlepšování stability jiných NPs [21], používá se v tkáňovém inženýrství, kosmetice [22] či jako nosič léčiv [23]. Chitosan se díky velkému množství aminových a hydroxylových skupin (Obr. 3) dobře váže na ostatní NPs, ať už pomocí vodíkových můstků či elektrostatických interakcí. [22] Z těchto důvodů byl v této práci použit pro lepší navázání stříbrných NPs na nanodiamanty.



Obr. 3: Strukturální vzorec molekuly chitosanu.

Převzato z: <https://www.elicityl-oligotech.com/chitosan/239-chitosan-oligosaccharide---average-dp6.html>

1.2. Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo vytvoření kompozitu na bázi nanodiamant-stříbro a následná charakterizace z hlediska stability a velikosti částic. Dále byla zkoumána stabilita vytvořených kompozitů po 1 a 4 h kultivaci v kultivačních médiích – v bujónu M-H Broth a 0,9 % NaCl. Charakterizace částic se prováděla pomocí analytických metod: dynamického rozptylu světla, analýzy zeta potenciálu, optické spektroskopie v ultrafialovo-viditelné oblasti světelného spektra a skenovací elektronové mikroskopie. Jednotlivé principy těchto metod jsou popsány níže v kapitole 1.3. Tomuto hlavnímu cíli předcházelo vytvoření dispergovaných suspenzí nanodiamantů s dobrou stabilitou částic, díky kterým se později vytvářely nanokompozity. Vlastnosti těchto částic se opět zkoumaly analytickými metodami.

1.3. Analytické metody

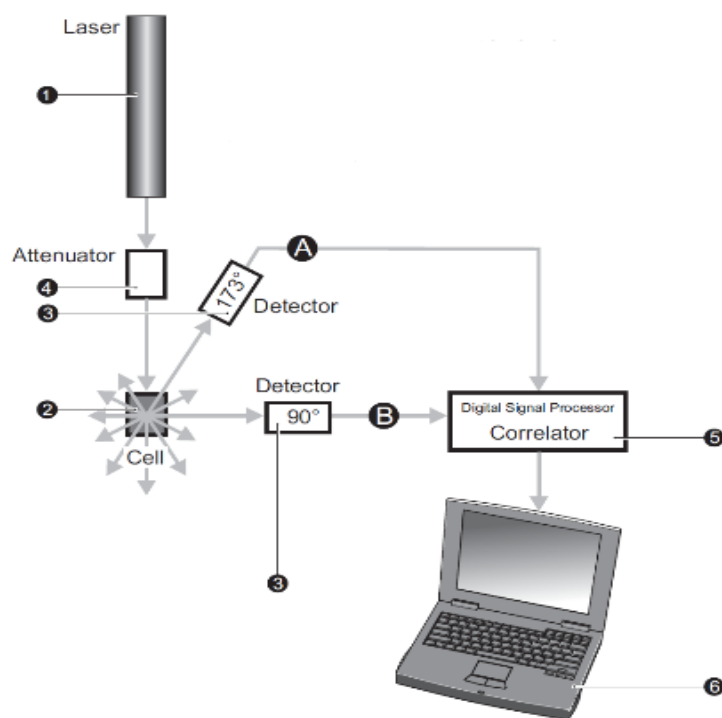
Pomocí analytických metod byla u vytvořených nanokompozitů zkoumána jejich stabilita, velikost, absorpce záření a topografické a morfologické vlastnosti. Konkrétně byly použity tyto metody: 1) Dynamický rozptyl světla (DLS), 2) Analýza zeta potenciálu, 3) Optická spektroskopie v ultrafialovo-viditelné oblasti světelného spektra (UV-Vis) a 4) Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).

1.3.1. Dynamický rozptyl světla

„Dynamic light scattering“ je analytická metoda určující velikosti nano a mikročástic měřením jejich Brownova pohybu. Tato metoda využívá rozptylu světla. Rozlišují se dva typy rozptylu: elastický (Rayleighův) rozptyl – rozptýlené záření má jiný směr ale stejnou energii jako záření dopadající a neelastický (Ramanův) rozptyl – rozptýlené záření má jiný směr i jinou energii než záření dopadající. Metoda dále využívá Stokesovy-Einsteinovy rovnice (1), jež udává vztah mezi velikostí částic a rychlostí vyvolané Brownovým pohybem. V této rovnici je rychlost zastoupena difuzním koeficientem D , $d(H)$ reprezentuje hydrodynamický průměr, k je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota a η je viskozita.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad 1)$$

Z této rovnice plyne, že částice menších rozměrů mají v kapalině rychlejší pohyb/rychlost difuze, zatímco větší částice pomalejší, což je základní princip této metody. Ta probíhá následovně. Nejprve je vzorek umístěn do cely, kde je ozářen laserem. Poté se detektorem sleduje kolísání intenzity rozptýleného světla a autokorelací se vyhodnocuje, jak rychle se tato fluktuace mění. Z té je odvozen difuzní koeficient a následně samotná velikost NP. Rychlejší změna fluktuace, odpovídá rychlejšímu pohybu, a tedy menší částici. Samotný přístroj měří distribuci intenzity záření, která se dá převést na distribuci objemu, či na distribuci počtu. V této práci byla použita distribuce počtu, která určuje počet částic o dané velikosti. Schéma přístroje, provádějícího DLS, je uvedeno na Obr. 4. [24]



Obr. 4: Schéma přístroje využívající metodu DLS, převzato z [24].

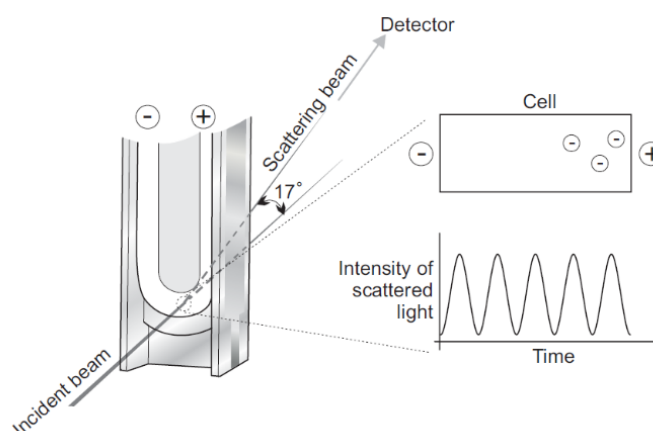
1.3.2. Analýza zeta potenciálu

Zeta potenciál (ZP) je elektrický potenciál vytvářející se na rozhraní částice a kapaliny (nazývaném slipping plane). Slouží k analýze stability NP a jejich interakce s molekulami a povrchy. Koloidní roztok je obvykle považován za stabilní, pokud je magnituda ZP částice vyšší než $|30|$ mV. Při takovýchto hodnotách mají částice tendenci se vzájemně odpuzovat a nedochází k jejich aglomeraci. Hodnoty ZP se získávají měřením elektroforetických mobilit a jsou výrazně ovlivněny velikostí pH. Zeta potenciál se následně vypočítá pomocí Henryho rovnice (2), kde U_e je elektroforetická mobilita (rychlost částice v elektrickém poli), ϵ je dielektrická konstanta, z reprezentuje zeta potenciál, η je viskozita a $f(Ka)$ je Henryho funkce. Henryho funkce je aproximována většinou dvěma hodnotami – 1,5 pro suspenze ve vodních roztocích a 1,0 pro ostatní roztoky.

$$U_e = \frac{2\epsilon z f(Ka)}{3\eta} \quad 2)$$

Elektroforetická mobilita je měřena v cele se dvěma opačně nabitými elektrodami, mezi kterými se pohybují částice (Obr. 5). Navíc, napětí na elektrodách se rychle přepíná mezi kladnými a zápornými hodnotami, což vede k neutralizaci elektroosmotického toku a pro

zpřesnění výsledků elektroforetických mobilit. Pomocí principu „Laser Doppler Velocimetry“ se vyhodnocuje kolísání intenzit rozptýleného světla, které odpovídá dané rychlosti částic. [24, 25]



Obr. 5: Zjednodušený princip měření elektroforetické mobility, převzato z [24].

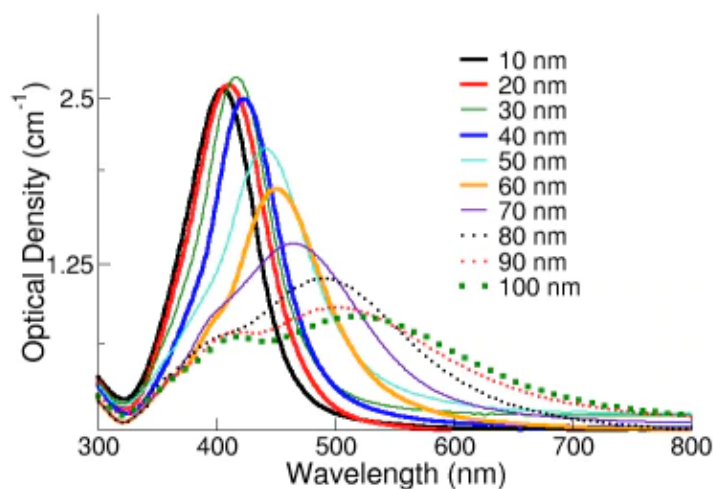
1.3.3. Optická spektroskopie v UV-Vis oblasti

Optická spektroskopie v ultrafialovo-viditelné oblasti světelného spektra je analytická metoda sloužící ke kvantitativní analýze koncentrace určité látky ve zkoumaném vzorku. Funguje na principu měření absorpce elektromagnetického záření v rozsahu od 200 do 800 nm (od ultrafialového záření až po viditelné světlo). Pohlcení záření na dané vlnové délce je dáno Lambertovým-Beerovým zákonem (3), který říká, že absorpce A je přímo úměrná molární koncentraci C , šířce absorpční vrstvy l a molárnímu absorpčnímu koeficientu ϵ_λ .

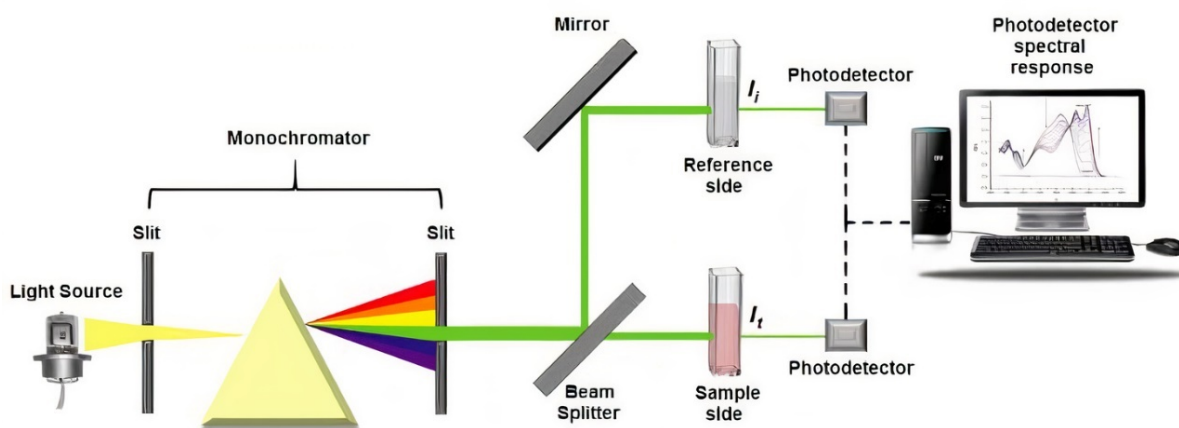
$$A = Cle_\lambda \quad 3)$$

Každý látka má vrchol absorpčního spektra na různých vlnových délkách, díky čemuž je možné tyto prvky detekovat. U stříbrných nanočástic se vrchol pohybuje okolo 405 nm [10], nicméně s rostoucí velikostí stříbrných nanočástic se vrchol absorpce zplošťuje a posouvá doprava (Obr. 6). [26]

Pro zmenšení možné chyby vlivem roztoku média, se používá takzvaná „dual-beam UV-Vis“ metoda. Ta obsahuje v jedné kyvetě vzorek zkoumaný a ve druhé vzorek referenční (Obr. 7). [27, 28]



Obr. 6: Vliv velikosti stříbrných nanočástic na absorpční maximum, převzato z [26].



Obr. 7: Schéma dual-beam UV-Vis metody, převzato z [27].

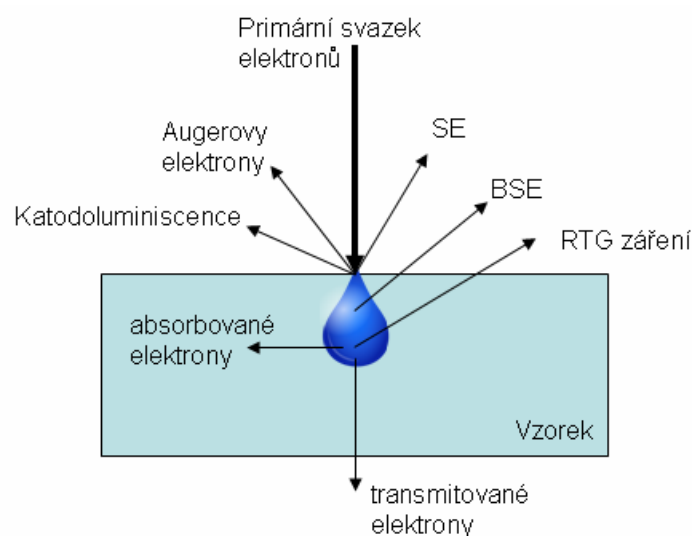
1.3.4. Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie je zobrazovací metoda sloužící pro analýzu topografických, morfologických a obecně i elektronických a chemických vlastností materiálů. Funguje na principu postupného skenování povrchu materiálu elektronovým svazkem. Elektrony jsou elektronovým dělem postupně vyslány ke každé části povrchu zkoumaného materiálu. Na nich probíhá detekce interakcí vyvolaných těmito elektrony a z těchto detekcí se poté formuje výsledný obraz. Celý proces probíhá ve vakuu, což zabraňuje rozptýlení elektronů do okolního prostředí. Na rozdíl od běžných mikroskopů se místo klasických skleněných čoček

používají čočky elektromagnetické, které slouží pro zaostření elektronového svazku. V závislosti na druhu detekovaných elektronů (Obr. 8) rozlišujeme několik metod SEM. Dvě nejběžnější metody, které byly použity i v této práci jsou založeny na: 1) detektorech sekundárních elektronů (SE), 2) detektorech zpětně odražených elektronů (BSE).

Sekundární elektrony jsou elektrony vzniklé neelastickým rozptylem po dopadu elektronového svazku na vzorek. Mají nižší energii, a proto pozorovateli poskytují informace pouze z vnější vrstvy materiálu o jeho tvaru – to jsou tzv. topografické informace.

Na rozdíl od sekundárních elektronů, BSE jsou původní, zpětně odražené, elektrony vzniklé elastickým rozptylem. Ty mají vyšší energii, a proto mohou procházet i hlubšími vrstvami vzorku, díky čemuž zobrazují kontrast jednotlivých použitých materiálů a částečně i jejich tvar. Prvky s vyšším atomovým číslem odráží elektrony silněji, a proto mají pod mikroskopem světlejší barvu – v případě této práce nám stříbrné nanočástice po zobrazení v SEM výrazně světle kontrastují v porovnání s diamanty. [28-30]



Obr. 8: Typy detekovatelných elektronů, převzato z [31].

2. Metodika práce

2.1. Příprava, kultivace a měření holých nanodiamantů

V této práci byl použit diamantový prášek MSY50 (Monokrystalický syntetický diamant) o průměru částic pohybujícím se v rozmezí 0-100 nm (Microdiamant AG, vyrobený metodou HPHT). Tvar NDs by měl mít pravidelnou blokovou strukturu. [32]

Z pohledu funkcionalizace povrchů NDs se pracovalo se dvěma základními typy: oxidovanými a hydrogenovanými nanodiamanty. Oxidované vznikly žiháním při teplotě 420 °C po dobu 5 hodin v peci od firmy LAC, a hydrogenované vznikly žiháním při teplotě 800 °C po dobu 6 hodin při průtoku dusíku (100 ml / min) v univerzálním vysokoteplotním žihacím modulu od firmy CLASIC CZ. Tyto úpravy mají za důsledek odlišné vlastnosti NDs – včetně jejich zeta potenciálu. Suspenze oxidovaných NDs ve vodě se vyznačují silně negativním ZP, suspenze hydrogenovaných NDs naopak silně pozitivním ZP. [4]

V první fázi výzkumu byly připraveny tzv. „pristine nanodiamonds“ neboli holé nanodiamanty. Ty posloužili nejen k samotnému měření, ale také jako základní stavební kameny nanokompozitů v pozdějších fázích práce. Oxidované a hydrogenované NDs byly každé zvlášť převedeny do suspenze s demineralizovanou vodou (dH₂O) v poměru 1 mg/1 ml a po dobu 1 h nechány důkladně se rozptýlit pomocí ultrazvuku (cyklus 0,3; amplituda 52 %). Od tohoto kroku se pracovalo již pouze s hotovými vodními suspenzemi oxidovaných (O-NDs) a hydrogenovaných (H-NDs) NDs, nikoli se samotným suchým práškem.

Následovalo kultivování takto připravených částic v Muellerově Hintonově bujónu (M-H Broth) a v 0,9 % roztoku NaCl po dobu 1, 4 a 24 h. M-H Broth (Oxoid) je kultivační médium obsahující hovězí bujón, kasein a škrob, které zajišťují dostatek vitamínů, aminokyselin a dalších sloučenin. Kultivování začalo probíhat přidáním 1 ml média (M-H Broth nebo NaCl) k 0,25 ml NDs. Po uplynutí stanovených časů (1, 4 a 24 h) bylo potřeba vzorky přefiltrovat. Proto byly mikropipetou přepipetovány do eppendorfek o objemu 2 ml a po dobu 10 min centrifugovány (Eppendorf MiniSpin Plus, 14500 rpm – otáček za minutu). Nanodiamanty se tak sedimentací oddělily od kultivačního média. Médium bylo následně mikropipetou nahrazeno 2,25 ml dH₂O, čímž se dosáhl výsledný poměr 1:9 nanodiamantů ku demineralizované vodě. Vzorky byly tímto postupem připraveny k měření.

Byly prováděny analýzy O-NDs a H-NDs před a po vystavení nanodiamantů kultivačním médiím. Vodní suspenze NDs, které nebyly kultivovány, byly ještě před měřením doředy demineralizovanou vodou v poměru 1 NDs : 3 dH₂O. Vzorky byly následně dány do 600 µl

kyvet (Malvern Instrument Ltd.) a pomocí principu DLS byla určena velikost NDs (Malvern Zetasizer Nano ZS (ZEN3600)). V tom samém přístroji probíhala i analýza jejich zeta potenciálu. Na závěr byly na křemíkový substrát nakapány 3 μ l suspence s nanočásticemi jednotlivými vzorků a ponechány při laboratorní teplotě na vzduchu až do uschnutí substrátu. Poté byly pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) na přístroji MAIA 3 (TESCAN) pořízeny při urychlovacím napětí 10 kV obrázky vzorků v SE a BSE režimech.

2.2. Příprava, kultivace a měření chitosanových NDs

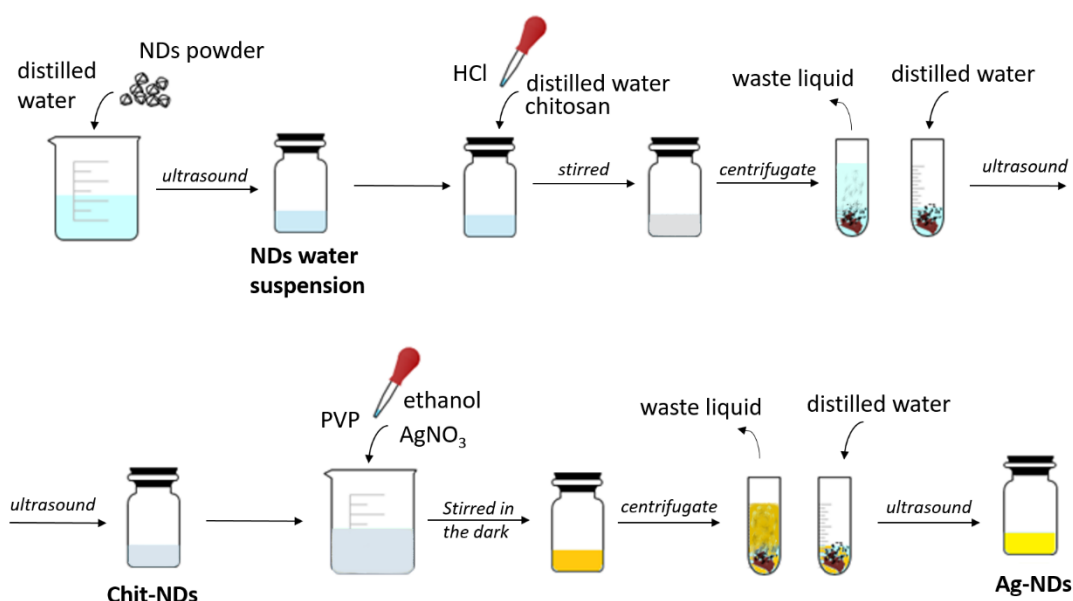
V další fázi probíhalo potažení nanodiamantů chitosanovou vrstvou. Od tohoto přírodního polysacharidu jsme si slibovali zvýšení stability NDs a schopnosti tvořit kompozit s nanočásticemi stříbra. [21] Bylo naváženo 25 mg chitosanu (Aldrich), k tomu přidáno 25 ml demineralizované H_2O . Poté, za stálého míchání magnetickým míchadlem, bylo mikropipetou odměřeno a vstříknuto 22 μ l HCl. Na závěr, po úplném rozpuštění chitosanu, bylo přidáno 6,1 ml O-NDs vzniklých v první fázi přípravy. Tento vzorek byl přesunut na plotnu a po dobu 2 h míchán a zahříván na 60 °C. Celý proces se opakoval pro hydrogenované nanodiamanty (namísto oxidovaných).

Vzorky se nechaly týden odležet a poté je bylo potřeba pomocí centrifugy přečistit. Od obou vzorků se odebralo 10 ml, které byly pomocí pipety přendány do 10 eppendorfek o objemu 2 ml (5 eppendorfek s oxidovanými vzorky a 5 eppendorfek s hydrogenovanými vzorky) Centrifugace probíhala 10 minut při 14500 rpm. Následně se odebralo z každé zkumavky 1,75 ml supernatantu a místo něj bylo přidáno stejné množství dH_2O . Proces se 3x opakoval. Vzorky se postupně přelávali do menšího množství zkumavek – oxidované NDs k oxidovaným, hydrogenované k hydrogenovaným. Po posledním, třetím opakování, zbyly už pouze dvě zkumavky. Jedna s přečištěnými chitosanovými O-NDs a druhá s přečištěnými chitosanovými H-NDs. Nakonec byly eppendorfky umístěny pod ultrazvukový hrot, aby došlo k dispergaci částic a tímto procesem byly získány chitosanové nanodiamanty (chit-NDs). Konkrétně světle šedivé chitosanové oxidované nanodiamanty (chit-O-NDs) a tmavě šedivé chitosanové hydrogenované nanodiamanty (chit-H-NDs) (Obr. 10).

Nanodiamanty pokryté chitosanovou vrstvou byly po stejnou dobu jako holé NDs vystaveny kultivačním médiím a přečištěny pomocí centrifugy. Měření jejich charakteristik (zeta potenciálu a distribuci velikostí) před a po kultivaci a následné focení probíhalo stejným způsobem.

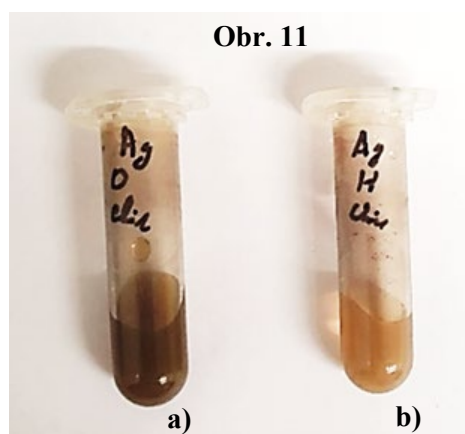
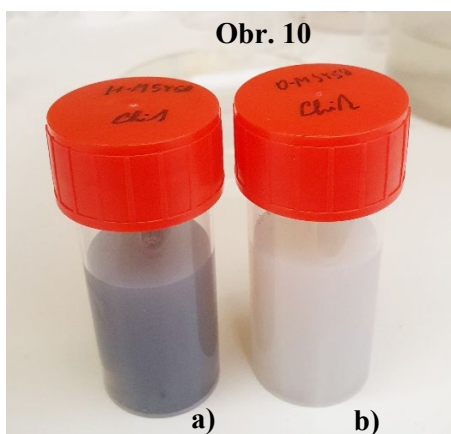
2.3. Příprava, kultivace a měření kompozitu diamant-stříbro

V poslední fázi přípravy se vytvářely nanokompozity na bázi nanodiamantů a stříbrných nanočástic. V procesu byly použity oba typy chit-NDs (chit-O-NDs i chit-H-NDs) získané v minulém kroku. Růst těchto stříbrných nanočástic probíhal v etanolovém roztoku. K přípravě bylo potřeba odměřit 4 ml etanolu, 1 ml chit-NDs a navážit na mikrováhách 0,1 g PVP (polyvinylpyrrolidon K25 Carl ROTH, zde slouží jako redukční činidlo). Vše bylo postupně smícháno do jedné kádinky a na závěr byl pomalu přikapáván roztok 0,04 g AgNO_3 (od firmy RNDr. Karel Martyčák) rozpuštěný v 1 ml v dH_2O . Kádinka byla zakryta alobalem, aby zůstal roztok ve tmě a nedošlo k degregaci stříbrných nanočástic. Následně byla přesunuta na plotnu, kde probíhalo míchání ($60\text{ }^\circ\text{C} / 1\text{ h}$). Roztok pozvolna měnil svůj odstín až dosáhl finální tmavě žluto-zelené pro postříbřené chitosanové oxidované nanodiamanty (Ag-O-NDs) a tmavě žluté barvy pro postříbřené chitosanové hydrogenované nanodiamanty (Ag-H-NDs) (Obr. 11). Na závěr už stačilo pouze 1x vzorky přefiltrovat v centrifuzě ($14500\text{ rpm} / 10\text{ min}$), odebrat odpadní tekutinu (zbytky etanolu, vody a PVP) a následně pomocí ultrazvukového hrotu dispergovat v novém čistém vodném roztoku. Důležitou roli, pro řízení a kontrolu pokrytí stříbrných nanočástic a jejich velikostí, hrálo množství AgNO_3 , koncentrace PVP, teplota a čas. [33] Snahou tohoto celého postupu znázorněného na (Obr. 9) bylo získat stříbrem pokryté chitosanové nanodiamanty (Ag-NDs). Zda-li došlo k vytvoření nanokompozitů, se poté ověřovalo pomocí DLS, UV-Vis spektroskopie a SEM.



Obr. 9: Schéma přípravy kompozitu na bázi diamant-stříbro, převzato z [9] a upraveno.

Vytvořené nanokompozity byly vystavené kultivačním médiím po dobu 1 a 4 h. Kromě DLS a SEM se navíc pro zkoumání charakteristik prováděla i UV-Vis spektroskopie, která měřila absorpci záření v rozsahu od 200 do 800 nm (Jasco V-730 double beam spectrophotometer). Pro měření touto metodou musely být vzorky přepipetovány do kyvet (Katrrell S.p.A.).



Obr. 10: Přípravené suspenze: a) chit-H-NDs b) chit-O-NDs.

Obr. 11: Přípravené suspenze: a) Ag-O-NDs b) Ag-H-NDs.

3. Výsledky práce a jejich diskuze

3.1. Výsledky nanočástic před kultivací a diskuze

U holých NDs byla zjištěna vysoká stabilita částic. Všechny připravené nanodiamanty byly před kultivací v médiích podrobeny analýze zeta potenciálu (Tabulka 1 a Graf 1). Dále u nich byla prováděna analýza DLS (Tabulka 2 a Graf 2). U všech měření se pro kontrolu sledovala hodnota pH – ta se pohybovala převážně neutrálně ($\text{pH} = 7 \pm 1$). Chyba naměřených hodnot se určovala pomocí metody FWHM (Full width at half maximum), ze které byla vypočítána pro normální (Gaussovské) rozdělení směrodatná odchylka sigma ($\text{FWHM} \approx 2,355 \sigma$).

Nejprve se zkoumaly hydrogenované holé nanodiamanty (**H-NDs**). Ty prokazovaly díky vysoké absolutní hodnotě ZP (47 mV) výbornou stabilitu koloidního roztoku svých částic a nízké hodnoty rozdělení jejich velikostí (58 nm). V dalším kroku přípravy došlo ke zdařilému obalení H-NDs chitosanovou vrstvou. Což bylo potvrzeno ustálením hodnot ZP těchto nanočástic **chit-H-NDs** na 25 mV a zvětšení distribuce velikostí (95 nm). Na závěr bylo zkoumáno pokrytí těchto nanodiamantů stříbrnými nanočásticemi. **Ag-H-NDs** měly nižší ZP (9 mV), a proto docházelo k vytváření shluků (213 nm). Tyto dosavadní výsledky naznačovaly, že k vytvoření nanokompozitů opravdu došlo. To však bylo ještě zapotřebí ověřit pomocí UV-Vis spektroskopie a SEM.

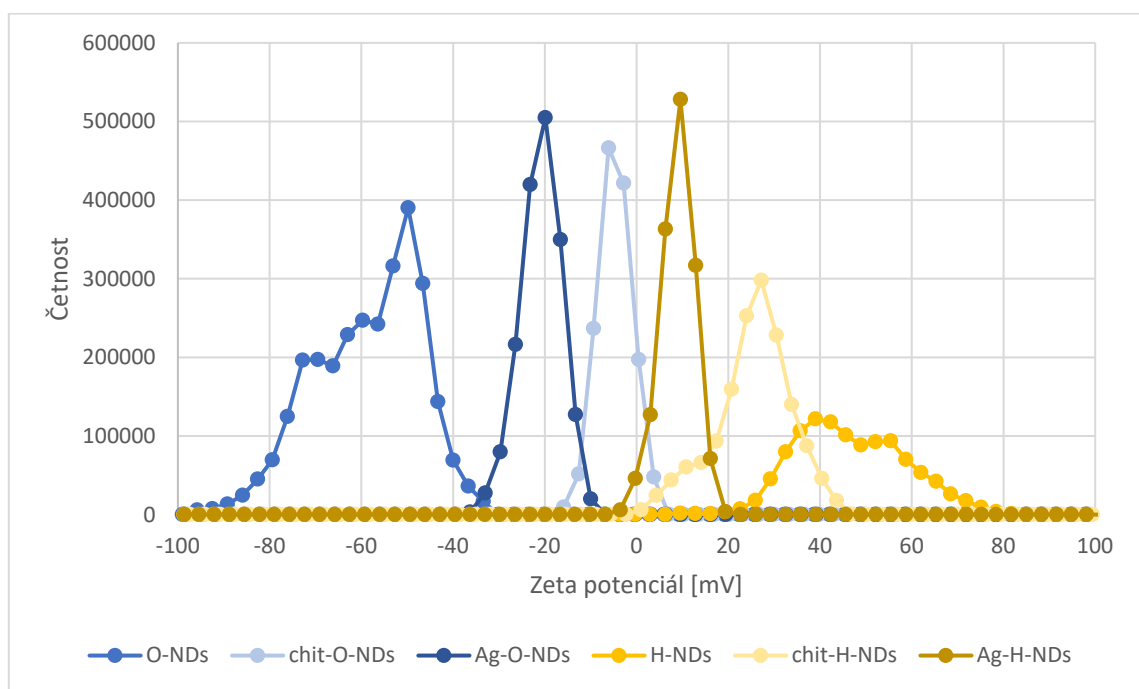
Oxidované holé nanodiamanty (**O-NDs**) byly taktéž stabilní. Měly vysokou absolutní hodnotu ZP (-59 mV) a jejich rozdělení velikostí mělo střední hodnotu v 53 nm. Tato velikost, podobná jako u H-NDs, odpovídá hodnotám daným výrobcem. Po přidání chitosanu k O-NDs se ZP přiblížil k izoelektrickému bodu 0 mV, ale nepřekročil ho (-5 mV). Z toho lze usuzovat, že navázání chitosanu k O-ND a vytvoření **chit-O-NDs** neproběhlo úplně v pořádku. Navíc se velikost těchto částic z důvodu agregace výrazně zvětšila (206 nm). Z důvodu špatného spojení chitosanu s O-NDs se část stříbrných nanočástic neměla na co navázat. Proto se v suspenzi nevyskytovaly pouze stříbrem pokryté chitosanové oxidované nanodiamanty (**Ag-O-NDs**), ale také samostatné stříbrné nanočástice, které negativně ovlivňovaly výsledky analýz. ZP se vyšplhal na slibných -21 mV. Nicméně tuto vyšší hodnotu způsobily, jak již bylo uvedeno, samostatné NP stříbra vyredukované v PVP, nikoli nanokompozit. Toto zjištění bylo potvrzeno střední hodnotou velikosti (93 nm), která oproti hodnotě chit-O-NDs poklesla. Z těchto analýz Ag-O-NDs se tedy zatím nedá spolehlivě určit, zda kompozit vzniká, či nikoli.

Tabulka 1: Analýza zeta potenciálu oxidovaných a hydrogenovaných NDs, chit-NDs a Ag-NDs.

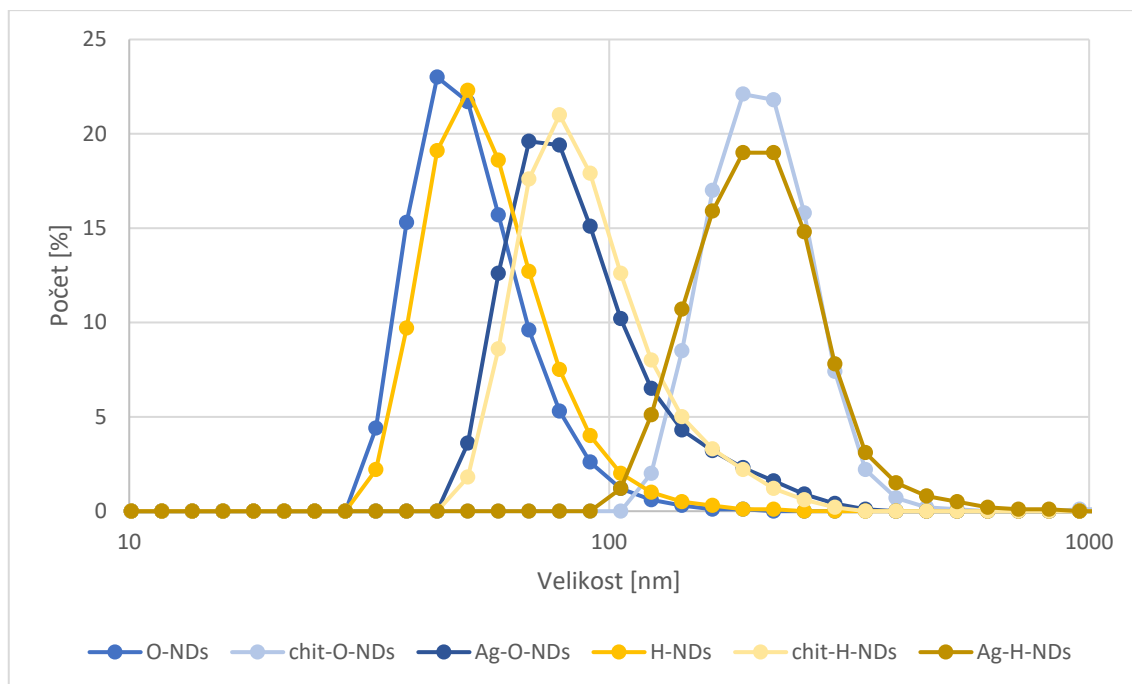
	O-NDs	chit-O-NDs	Ag-O-NDs		H-NDs	chit-H-NDs	Ag-H-NDs
zeta potenciál [mV] střední hodnota	-59	-5	-21		47	25	9
FWHM [mV]	28	9	11		30	13	9
σ [mV]	12	4	5		13	6	4

Tabulka 2: DLS charakterizace velikostí oxidovaných a hydrogenovaných NDs, chit-NDs a Ag-NDs.

	O-NDs	chit-O-NDs	Ag-O-NDs		H-NDs	chit-H-NDs	Ag-H-NDs
velikost [nm] střední hodnota	53	206	93		58	95	213
FWHM [nm]	29	129	51		33	53	148
σ [nm]	12	55	22		14	23	63

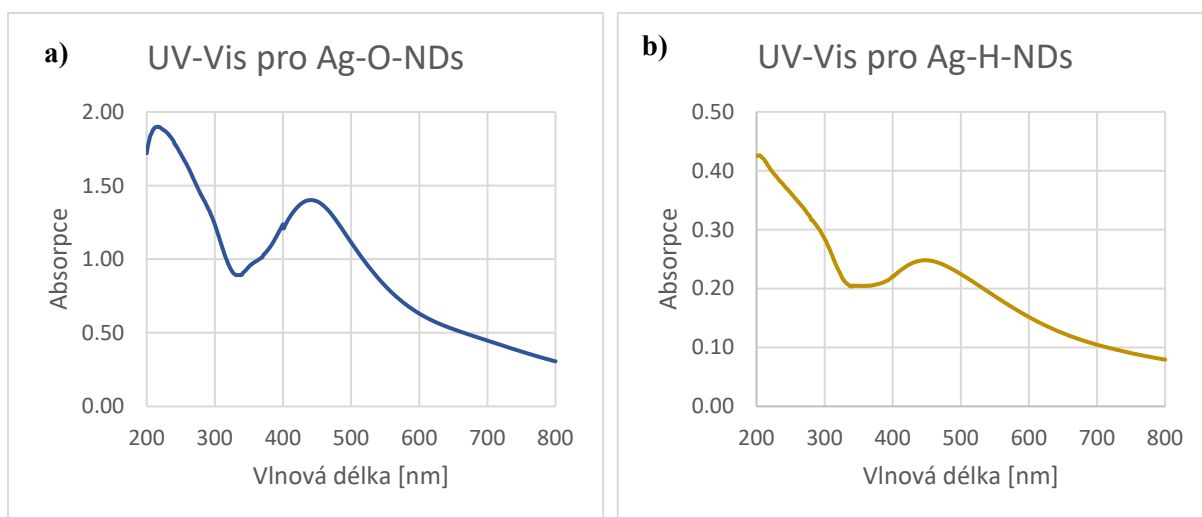


Graf 1: Analýza zeta potenciálu oxidovaných a hydrogenovaných NDs, chit-NDs a Ag-NDs.



Graf 2: DLS charakterizace velikostí oxidovaných a hydrogenovaných NDs, chit-NDs a Ag-NDs.

Dále byla u kompozitů na bázi diamant-stříbro provedena optická spektroskopie v UV-Vis oblasti. Získané křivky závislosti absorpce záření na vlnových délkách byly následně derivovány. Tímto postupem byly obdrženy informace o jednotlivých absorpčních maximech. **Ag-O-NDs** měly maximum v 441 nm a **Ag-H-NDs** v 447 nm. Tyto absorpční vrcholy potvrzují výskyt stříbrných nanočástic a dle (Obr. 6) uvedeného v Kapitole 1.3.3 by měly mít velikost cca 60 nm.



Graf 3: UV-Vis spektroskopie provedená pro a) oxidované (vrchol v 441 nm) a b) hydrogenované (vrchol v 447 nm) Ag-NDs.

3.2. Výsledky nanočástic po kultivaci v médiích a diskuze

Kultivace v médiích M-H Broth a 0,9 % NaCl probíhala pro všechny připravené NP, tedy konkrétně pro NDs, chit-NDs a Ag-NDs. Vždy, po určitém čase kultivace, byla realizována analýza ZP a DLS. Holé a chitosanové NDs byly kultivovány po dobu 1, 4 a 24 h. Jejich výsledky jsou k dispozici v kapitole „6. Dodatečné grafy“. Vzhledem k trendu, kdy se charakteristiky v těchto časech nijak výrazně v čase neměnily, došlo u Ag-NDs ke kultivaci a následné analýze pouze po 1 a 4 h. Z důvodu vysoké podobnosti hodnot naměřených po těchto dvou kultivačních časech pro Ag-NDs, jsou zde uvedeny výsledky jejich ZP (Tabulka 3 a Graf 4) a DLS (Tabulka 4 a Graf 5) pouze po 4 h. Výsledky po 1 h a jsou taktéž uvedeny v kapitole „6. Dodatečné grafy“. U všech měření se opět kontrolovala hodnota pH – ta se pohybovala ve stejném rozptylu jako před kultivací ($\text{pH} = 7 \pm 1$). Chyba měření byla určena metodou FWHM, ze které byla přibližně vypočtena směrodatná odchylka.

Kultivace nanokompozitů Ag-NDs v M-H Broth byla stejná pro oba typy funkcionalizace povrchů NDs (Ag-H-NDs i Ag-O-NDs).

Tabulka 3: Analýza zeta potenciálu oxidovaných a hydrogenovaných Ag-NDs. Porovnání ZP před kultivací v M-H Broth a NaCl a 4 h po ní.

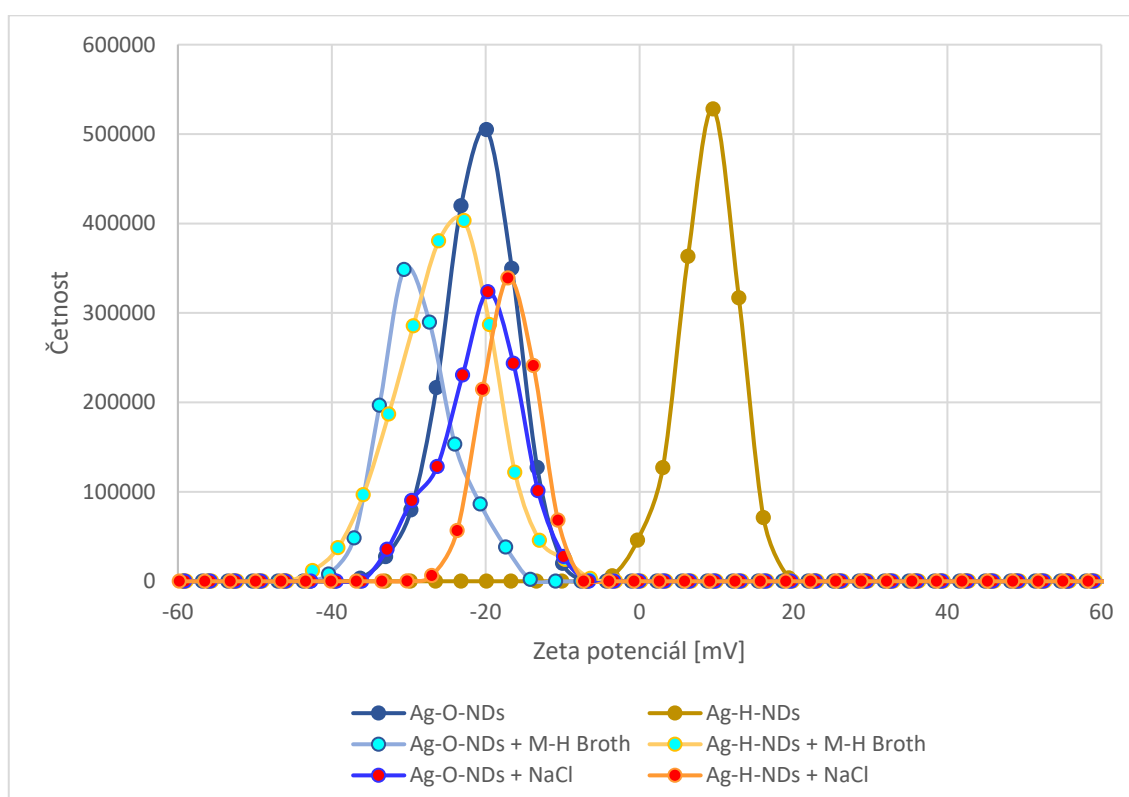
	Ag-O-NDs	Ag-O-NDs + M-H Broth	Ag-O-NDs + NaCl		Ag-H-NDs	Ag-H-NDs + M-H Broth	Ag-H-NDs + NaCl
zeta potenciál [mV] střední hodnota	-21	-29	-21		9	-25	-17
FWHM [mV]	11	10	11		9	14	9
σ [mV]	5	4	5		4	6	4

Tabulka 4: DLS charakterizace velikostí oxidovaných a hydrogenovaných Ag-NDs. Porovnání DLS před kultivací v M-H Broth a NaCl a 4 h po ní.

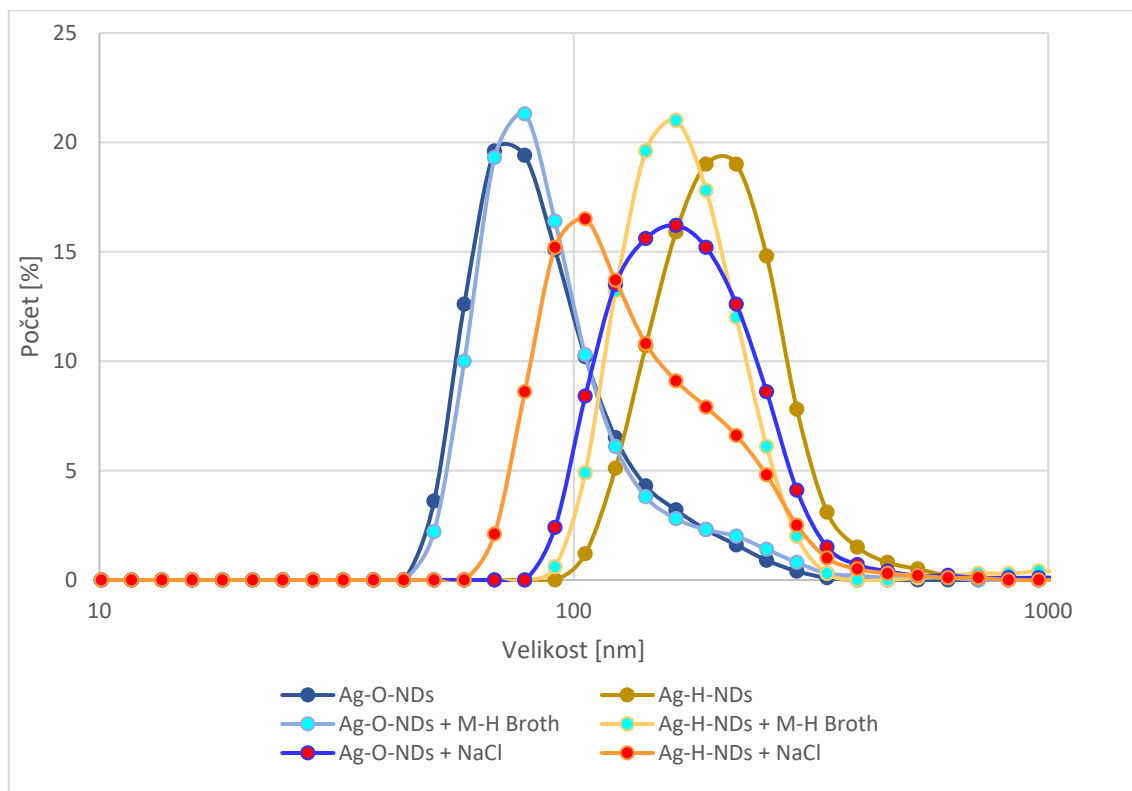
	Ag-O-NDs	Ag-O-NDs + M-H Broth	Ag-O-NDs + NaCl		Ag-H-NDs	Ag-H-NDs + M-H Broth	Ag-H-NDs + NaCl
velikost [nm] střední hodnota	93	98	183		213	195	145
FWHM [nm]	51	45	154		148	112	104
σ [nm]	22	19	65		63	48	44

U **Ag-H-NDs** se po 4h kultivaci v M-H Broth ZP přehoupl přes izoelektrický bod do záporných hodnot na -25 mV. Po kultivaci v NaCl se ZP oproti M-H Broth snížil na -17 mV, což vedlo k okem pozorovatelnému shlukování. Velikost těchto nanokompozitů před a po kultivaci v obou médiích se v rámci směrodatné odchylky výrazně neměnila.

U **Ag-O-NDs** se po 4h kultivaci v M-H Broth ZP vyšplhal až na -29 mV. Díky tomu byl vzorek stále průzračný a nedaly se lidským okem pozorovat žádné shluky. Že nedochází k aglomeraci následně potvrdilo i DLS (98 nm). Po kultivaci stejných částic v NaCl nicméně docházelo ke shlukování. Střední hodnota zeta potenciálu a střední hodnota velikosti Ag-O-NDs v NaCl byla -21 mV a 183 nm.

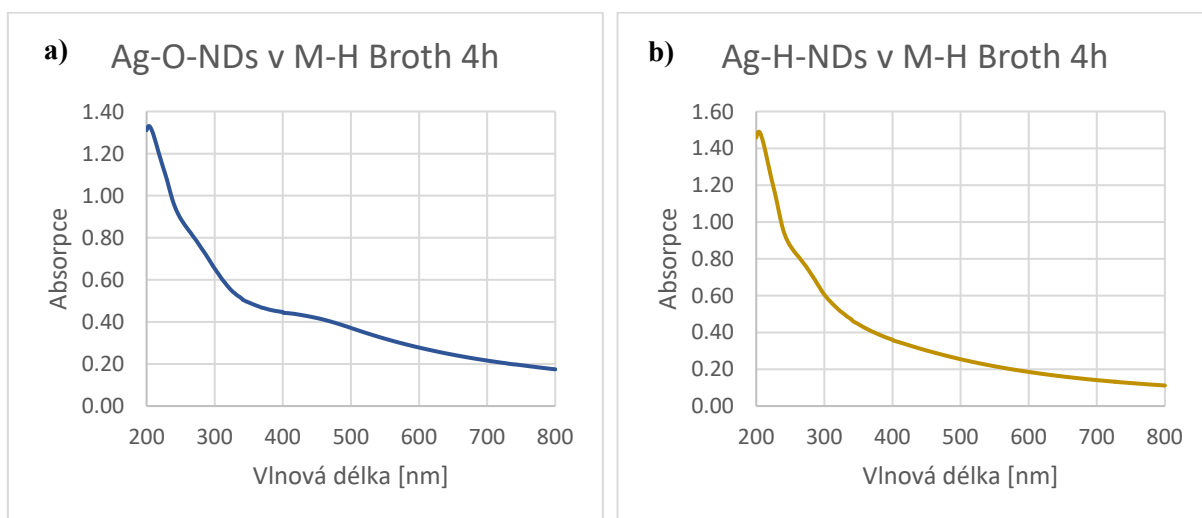


Graf 4: Analýza zeta potenciálu oxidovaných a hydrogenovaných Ag-NDs po 4h kultivaci v M-H Broth (azurové značky) a NaCl (červené značky).



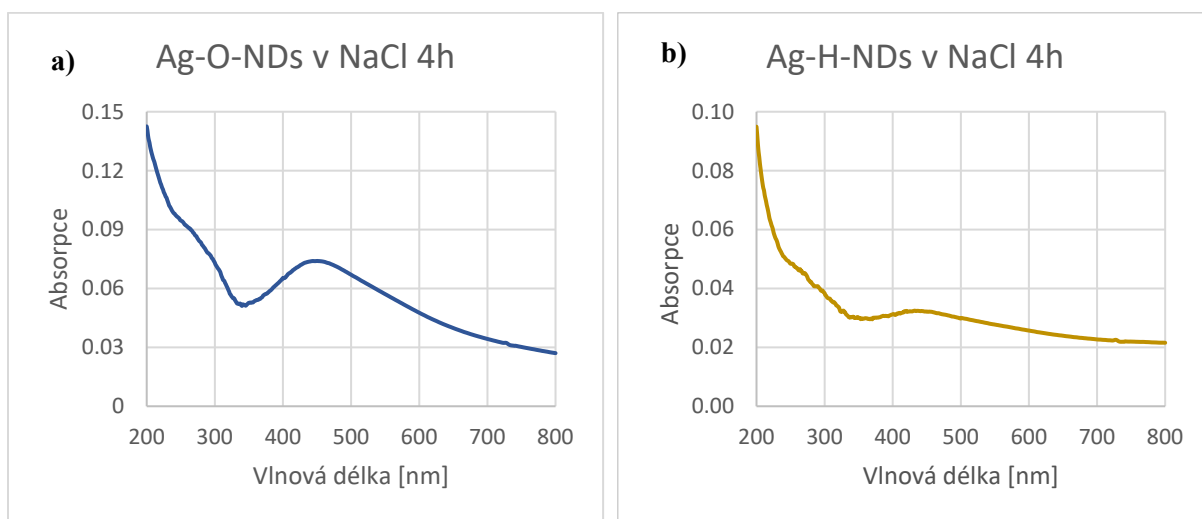
Graf 5: DLS charakterizace velikostí oxidovaných a hydrogenovaných Ag-NDs po 4h kultivaci v M-H Broth (azurové značky) a NaCl (červené značky).

Optickou spektroskopií v UV-Vis oblasti se zkoumaly Ag-NDs i po 4h kultivaci v médiích. Ag-NDs po vystavení bujónu M-H Broth nevykazovaly žádné zřetelné vrcholy (Graf 6). Tyto výsledky jsou nicméně v rozporu s fotografiemi ze SEM, které jasně dokazují, že Ag-NDs v kultivačním roztoku M-H Broth vydržely.



Graf 6: UV-Vis spektroskopie provedená po 4h kultivaci v kultivačním roztoku M-H Broth pro a) Ag-O-NDs a b) Ag-H-NDs.

Analýza UV-Vis spektroskopie provedená pro Ag-NDs po 4h kultivaci v NaCl vykazovala maxima, spočtena pomocí derivací, na podobných vlnových délkách jako před kultivací. Vrchol Ag-O-NDs (Graf 7, a) se posunul na spektru vlnové délky lehce doprava do hodnoty 447 nm, což by mělo dle (Obr. 4 v kapitole 1.1.2) signifikovat malinké zvětšení stříbrných NPs. Vrchol Ag-H-NDs (Graf 7, b) se posunul doleva na hodnotu 436 nm, což znamená zmenšení stříbrných NPs. Celková nižší absorpce těchto nanokompozitů je zapříčiněna menší koncentrací částic v roztoku.



Graf 7: UV-Vis spektroskopie provedená po 4h kultivaci v 0,9 % NaCl pro a) Ag-O-NDs a b) Ag-H-NDs.

3.3. Analýza SEM

Na závěr byly pomocí SEM vyhotoveny fotografie všech připravených nanokompozitů před i po kultivaci v médiích. Následně byla grafickým editorem ImageJ provedena analýza fotografií Ag-NDs. Jednak se měřila hustota pokrytí NDs stříbrnými nanočásticemi a jednak velikost stříbrných NPs. Velikost se zkoumala metodou měření nejdelší vzdálenosti stříbrné NP. Zkoumalo se 12 fotografií, některé z nich jsou vidět na Obr. 12 až Obr. 15.

Hustota pokrytí Ag-O-NDs stříbrnými NPs se před kultivací pohybovala okolo 20 % (Tabulka 5, a)). Po kultivaci klesla na 14 %. Hustota pokrytí Ag-H-NDs stříbrnými NPs se před kultivací pohybovala okolo 16 % (Tabulka 5, b)). Po kultivaci klesla na 13 %.

Průměrná velikost stříbrných NPs u Ag-O-NDs byla 49 nm. Po kultivaci v M-H Broth miniaturně vzrostla na 55 nm a po kultivaci v NaCl se dostala na 56 nm. Průměrná velikost stříbrných NPs u Ag-H-NDs byla 51 nm. Po kultivaci v M-H Broth vzrostla na 54 nm a po kultivaci v NaCl se snížila na 44 nm. Tento nízký trend změny velikosti Ag NP po kultivaci

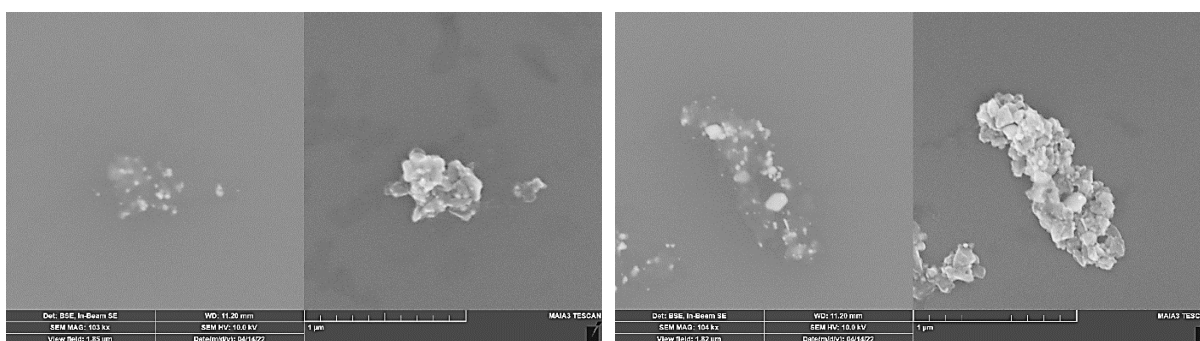
v NaCl u obou typu kompozitů potvrzuje spektroskopie v UV-Vis oblasti. Nicméně na jasné závěry by muselo být analyzováno mnohem více kompozitů.

Fotografie Ag-H-NDs před kultivací (Obr. 12) ukazují výsledný úspěšně vytvořený nanokompozit chitosanových NDs pokrytých stříbrnými NPs. Naopak fotografie Ag-O-NDs před kultivací (Obr 13), ukazují nejenom nanokompozit, ale také samostatně vyskytující se NDs a stříbrné NPs, což je dáno již diskutovaným špatným navázáním chitosanu a stříbra (3.1 Výsledky nanočástic před kultivací a jejich diskuze).

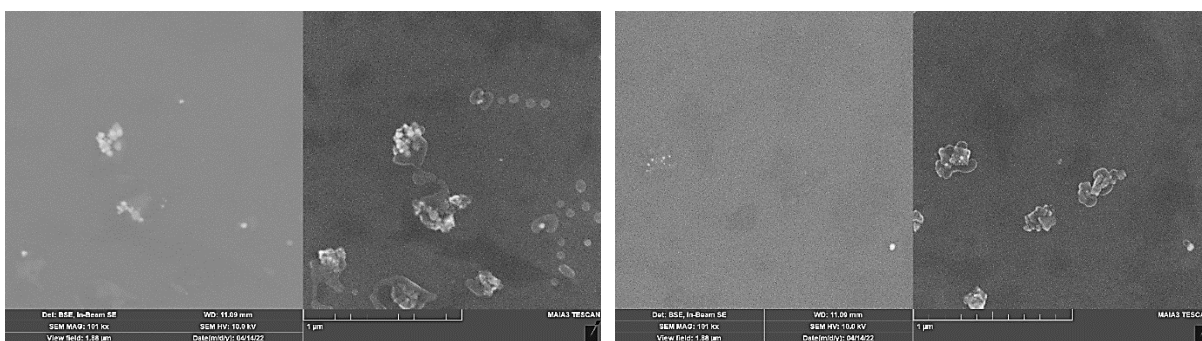
Fotografie Ag-NDs po kultivaci v M-H Broth a NaCl (Obr. 14 a Obr. 15) ukazují výsledné nanokompozity v kultivačních médiích.

Tabulka 5: Analýza velikosti Ag NPs a hustoty pokrytí NDs stříbrnými nanočásticemi na základě SEM. Byly změřeny a) oxidované a b) hydrogenované Ag-NDs před a po kultivaci v médiích.

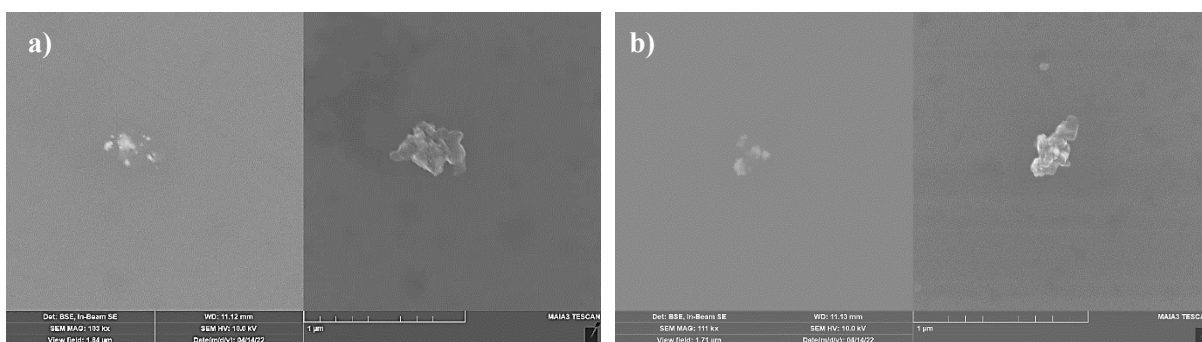
a)	hustota pokrytí [%]	průměrná velikost Ag NPs [nm]	b)	hustota pokrytí [%]	průměrná velikost Ag NPs [nm]
Ag-O-NDs	27	58	Ag-H-NDs	23	62
	30	43		9	40
	16	40			
	9	53			
Ag-O-NDs + M-H Broth	4	46	Ag-H-NDs + M-H Broth	11	52
	21	64		12	47
				19	62
Ag-O-NDs + NaCl	17	56	Ag-H-NDs + NaCl	14	51
				11	43
				12	38



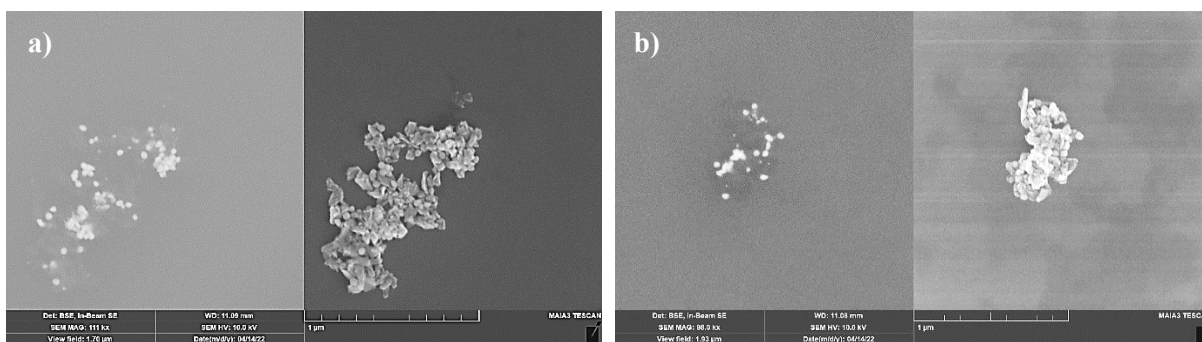
Obr. 12: SEM Ag-H-NDs před kultivací. Na fotografiích je vidět dobré uchycení stříbrných nanočástic na chitosanové nanodiamanty a jejich shluknutí. Levá polovina obou obrázků je zachycena pomocí detektorů BSE a zdůrazňuje materiálový kontrast. Pravá polovina je zachycena pomocí detektorů SE a zdůrazňuje tvar kompozitu.



Obr 13: SEM Ag-O-NDs před kultivací. Na fotografiích je vidět jednak pokrytí chit-O-NDs stříbrnými NPs, ale také výskyt neuchycených samostatných Ag-NPs. Levá polovina obou obrázků je zachycena pomocí detektorů BSE a zdůrazňuje materiálový kontrast. Pravá polovina je zachycena pomocí detektorů SE a zdůrazňuje tvar kompozitu.



Obr. 14: SEM Ag-H-NDs po 4h kultivaci v a) M-H Broth, b) NaCl. Na fotografiích jsou vidět stabilní vzniklé nanokompozity. Levá polovina obou obrázků je zachycena pomocí detektorů BSE a zdůrazňuje materiálový kontrast. Pravá polovina je zachycena pomocí detektorů SE a zdůrazňuje tvar kompozitu.



Obr. 15: SEM Ag-O-NDs po 4h kultivaci a) M-H Broth, b) NaCl. Na fotografiích jsou vidět shluky vzniklých nanokompozitů. Levá polovina obou obrázků je zachycena pomocí detektorů BSE a zdůrazňuje materiálový kontrast. Pravá polovina je zachycena pomocí detektorů SE a zdůrazňuje tvar kompozitu.

4. Závěr

V první fázi práce byli připraveny dva typy dispergovaných suspenzí nanodiamantů (H-NDs a O-NDs). Díky výborné stabilitě byly tyto NDs následně použity pro přípravu nanokompozitů. Stabilita (ve smyslu, že nedocházelo k agregaci) byla potvrzena nejen pomocí DLS, ale také vysokými absolutními hodnotami ZP.

Pomocí analytických metod bylo potvrzeno, že příprava kompozitů na bázi diamant-stříbro se skutečně podařila a byly dokonce úspěšně připraveny dva typy nanokompozitů. Jedny na bázi hydrogenovaných NDs (Ag-H-NDs), druhé na bázi oxidovaných NDs (Ag-O-NDs). Hustota pokrytí stříbrem těchto NDs se pohybovala okolo 20 %.

Vytvoření stabilního kompozitu Ag-H-NDs bylo potvrzeno odpovídajícími hodnotami DLS, ZP, UV-Vis spektroskopie a následně i fotografiemi ze SEM. Úspěšně byly také vytvořeny Ag-O-NDs. V roztoku se však vedle těchto kompozitů nacházely i samovolné částice NDs a stříbra, které byly viditelné i na fotografiích SEM. Proto se dá konstatovat, že syntéza kompozitu proběhla lépe u Ag-H-NDs, zejména díky lepší interakci s chitosanem.

Připravené kompozity Ag-NDs byly následně vystaveny po dobu 1 a 4 h buněčnému kultivačnímu médiu. Vlastnosti se nijak výrazně neměnily, což ukazuje dobrou stabilitu i v biologicky relevantním prostředí. V bujónu M-H Broth vydržely oba typy Ag-NDs, díky vytvoření proteinové korony, stabilní. Stabilitu potvrdila analýza DLS, ZP a fotografie ze SEM. UV-Vis spektroskopie měla příliš slabý signál stříbrných nanokompozitů, pravděpodobně díky proteinové koruně. Kompozity Ag-NDs kultivované ve fyziologickém roztoku 0,9 % NaCl také vydržely stabilní a nerozpustily se, což hrozilo kvůli přítomnosti Cl⁻ iontů. Nanodiamant tedy Ag NP pomohl stabilizovat. To potvrdily všechny analytické metody, včetně UV-Vis spektroskopie.

Vytvoření stabilních kompozitů na bázi nanodiamantů a stříbrných nanočástic ukazuje vzájemnou výhodnou interakci mezi nimi. Tato interakce pomáhá Ag NPs syntetizovat a stabilizovat, a úspěšně propojuje antibakteriální vlastnosti stříbra a vlastnosti nanodiamantů. To dává naději, že by doopravdy tyto nanokompozity mohly sloužit jako anorganická antibiotika. Naše práce je základem pro další studie, které by tyto předpoklady mohly potvrdit.

5. Seznam použitých laboratorních přístrojů a jejich obsluha

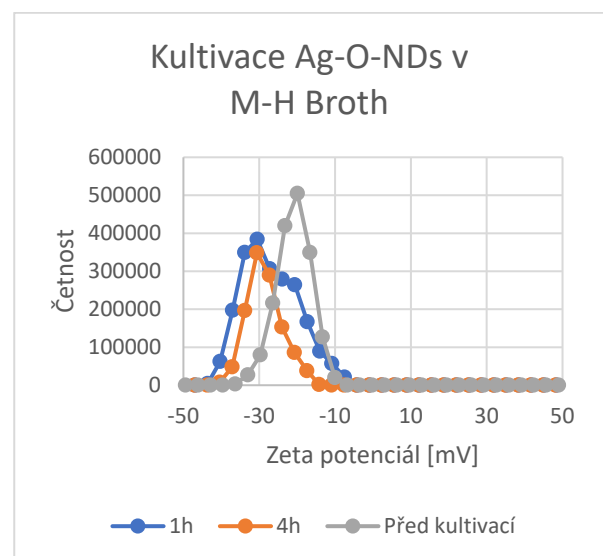
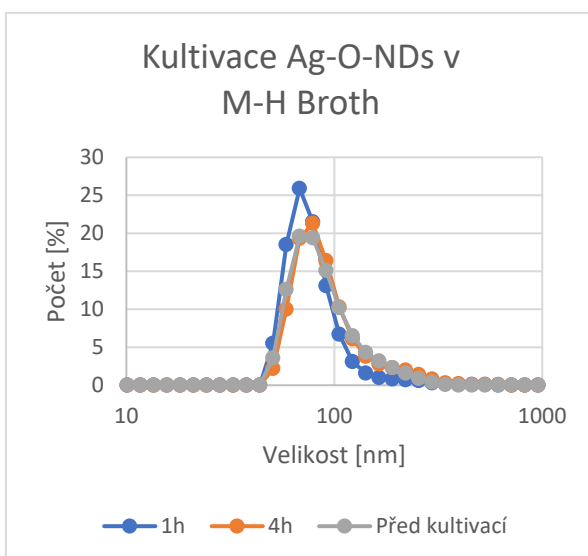
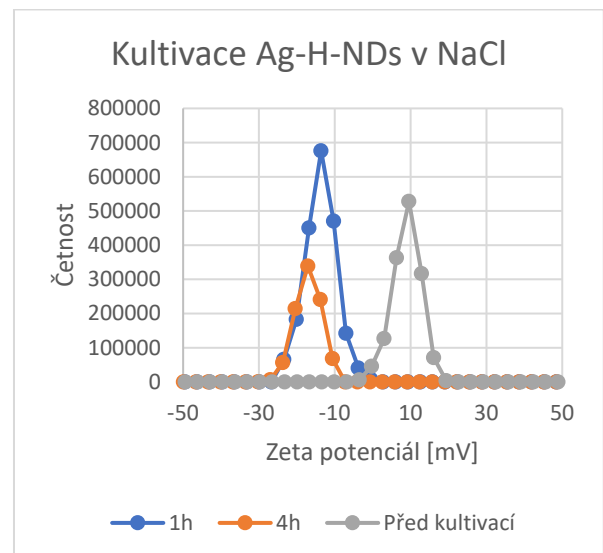
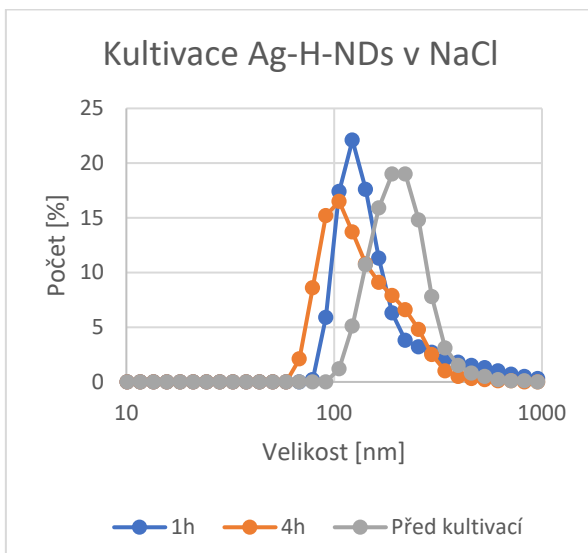
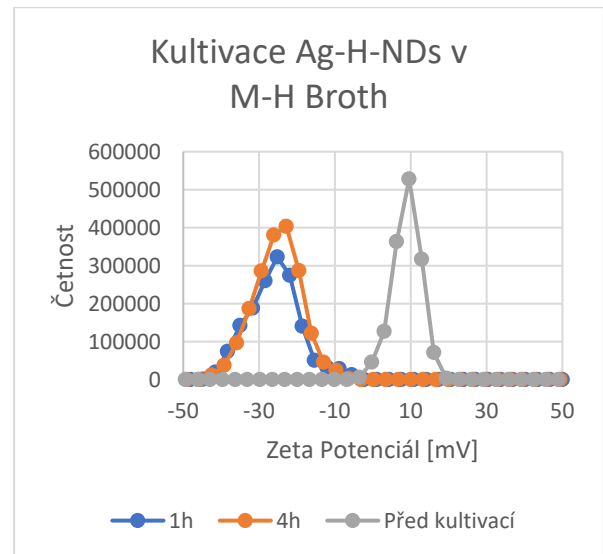
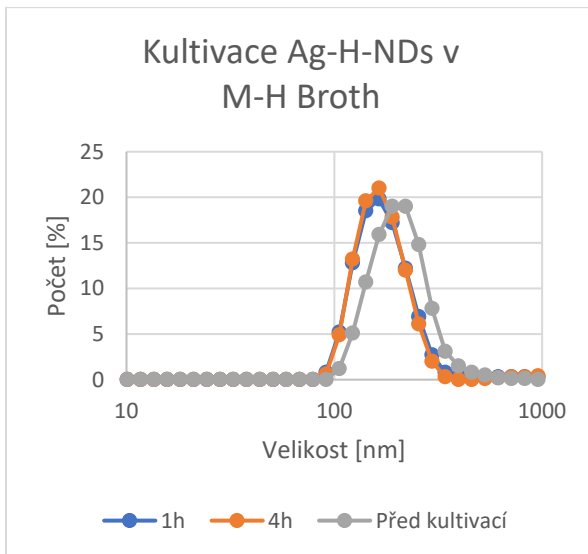
Centrifuga – Eppendorf MiniSpin Plus	Daniel Vítek
Ultrazvukový hrot	Daniel Vítek
Laboratorní váhy – Analytical Balances M-Pact (AX224)	Daniel Vítek
Laboratorní plotna – Hot plate stirrer digital (CD162)	Daniel Vítek
Laboratorní pipety – Eppendorf Research Plus	Daniel Vítek
DLS & Zeta – Malvern Zetasizer Nano ZS (ZEN3600)	Daniel Vítek
UV-Vis – Jasco V-730 double beam spectrophotometer	Daniel Vítek
SEM – MAIA 3 (TESCAN),	Ing. Kateřina Kolářová, Ph.D.

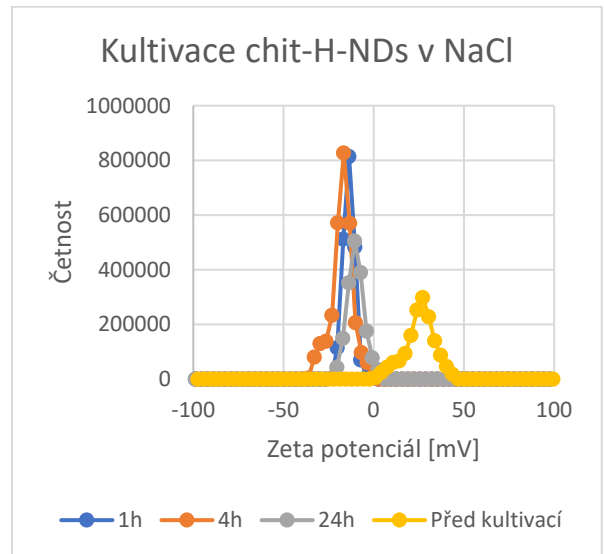
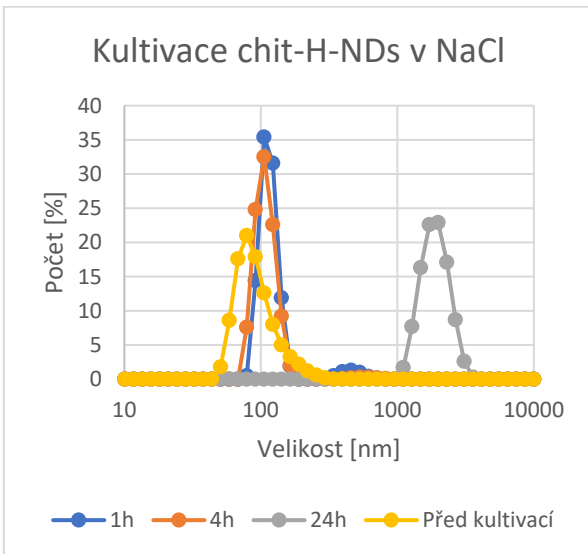
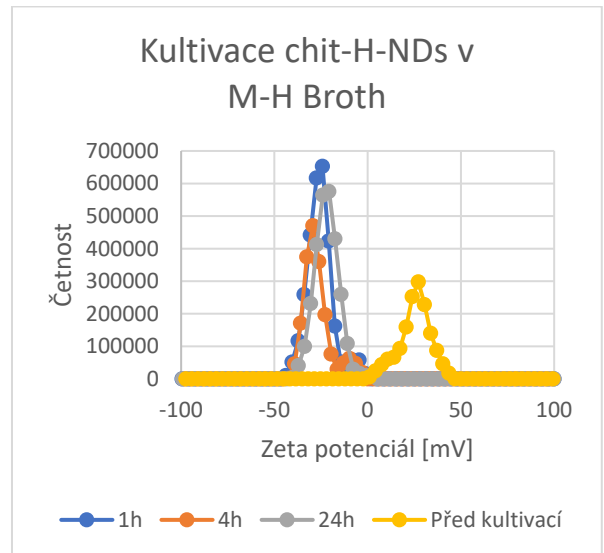
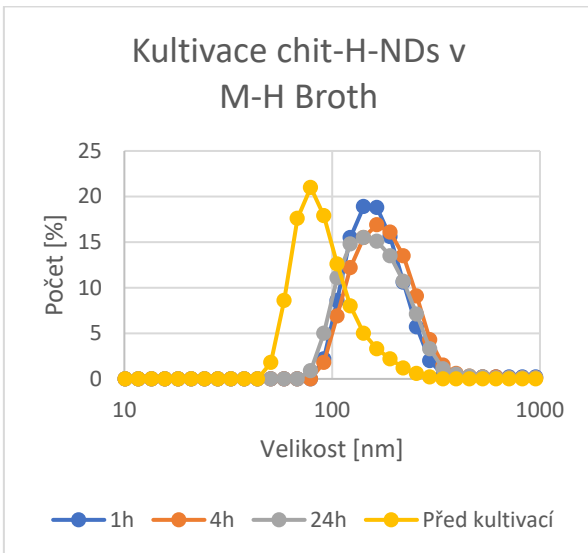
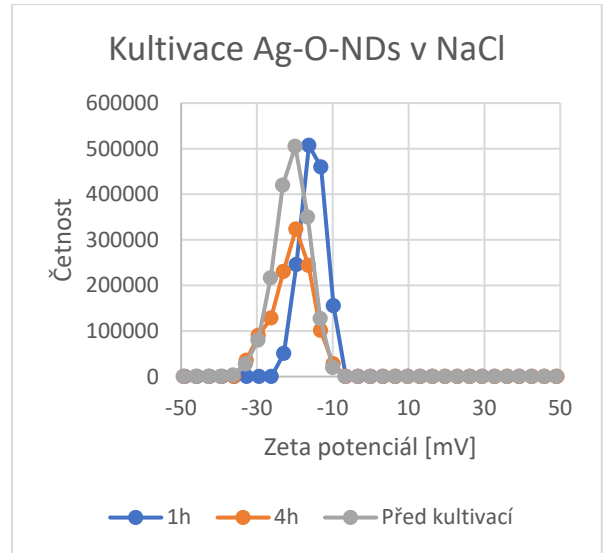
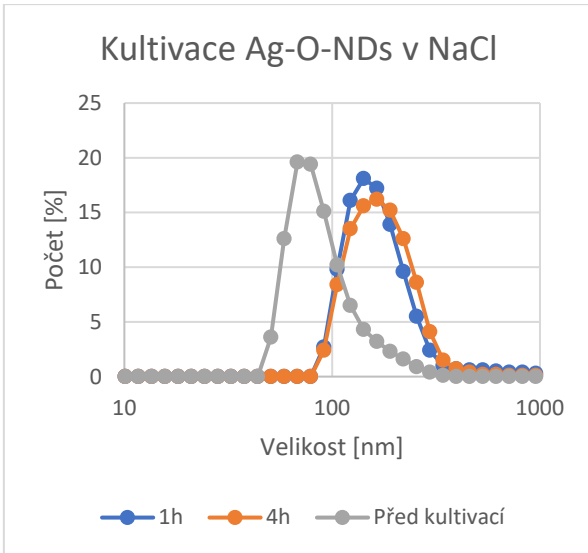
Vlastní příspěvek k práci:

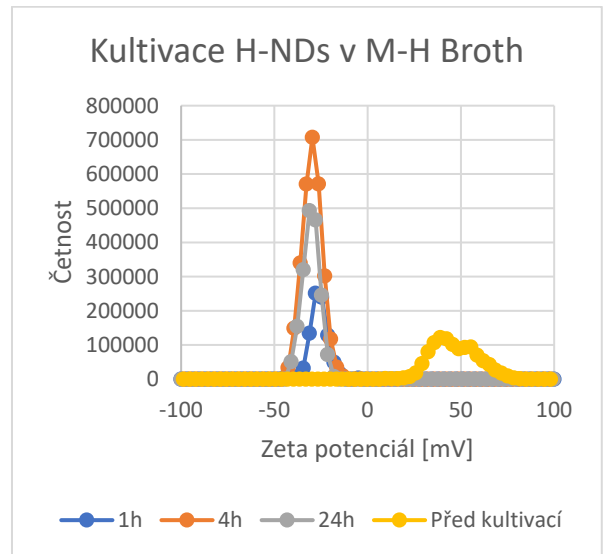
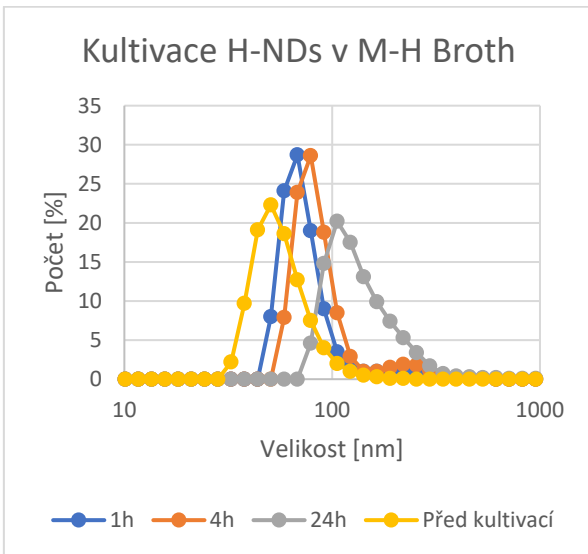
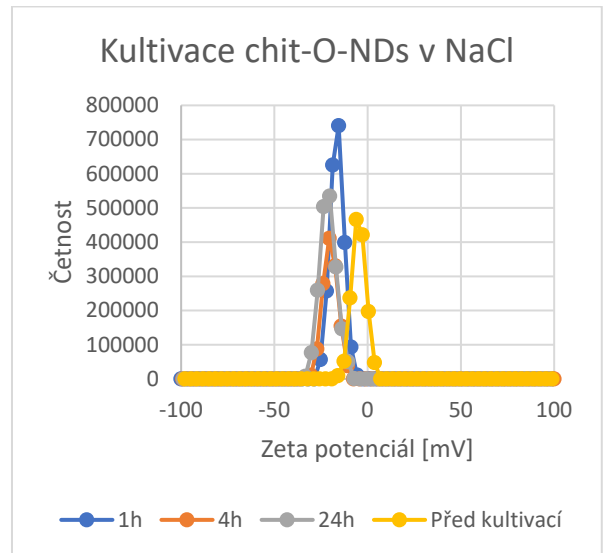
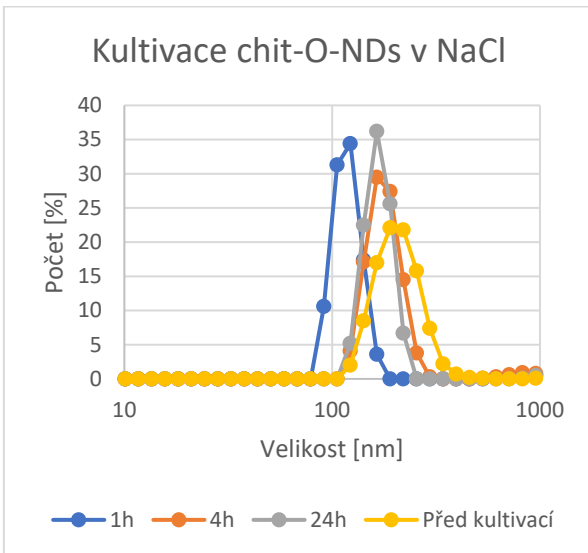
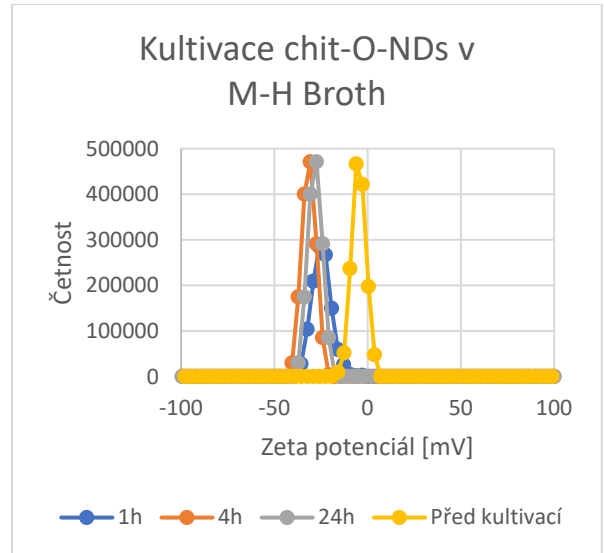
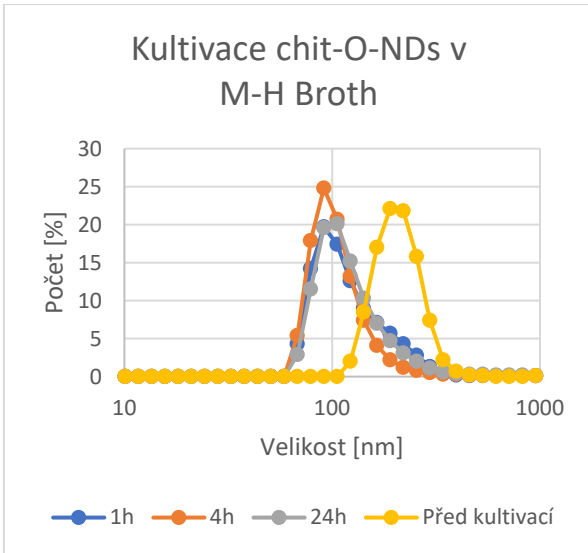
Přístroje byly obsluhovány dle tabulky výše. Prvotní funkcionalizaci povrchů NDs (oxidací a hydrogenací) provedla Mgr. Jitka Libertínová. Syntézu NDs, chit-NDs a Ag-NDs uskutečnil Daniel Vítek. Měření DLS, ZP a UV-Vis spektroskopie vykonal Daniel Vítek. Analýzu, vizualizaci dat a sepsání práce provedl Daniel Vítek.

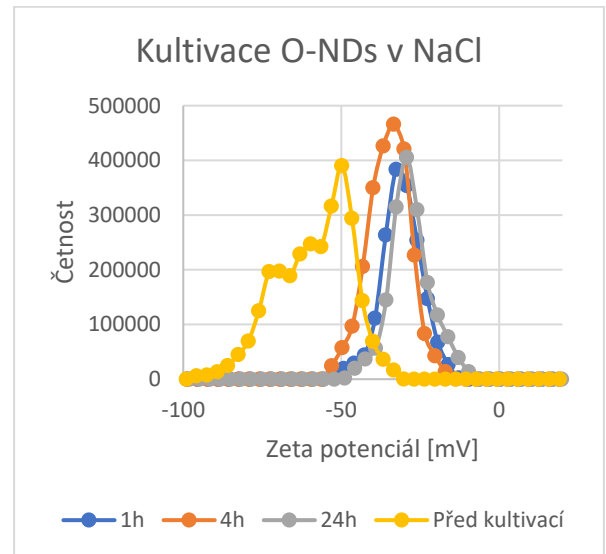
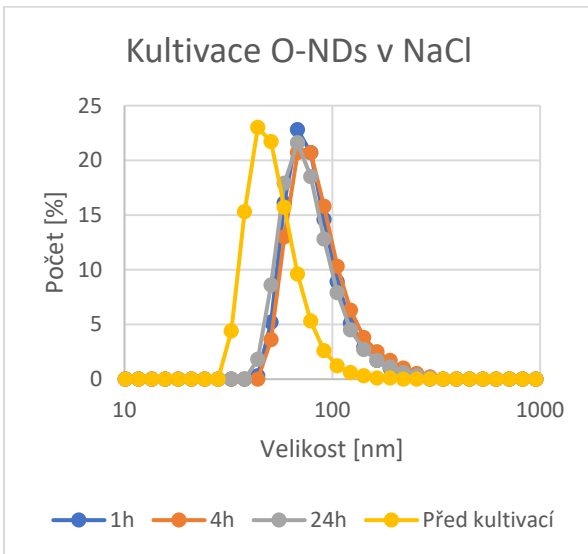
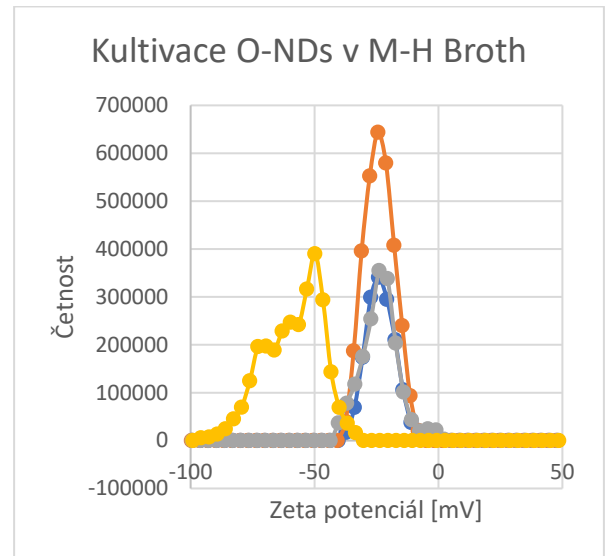
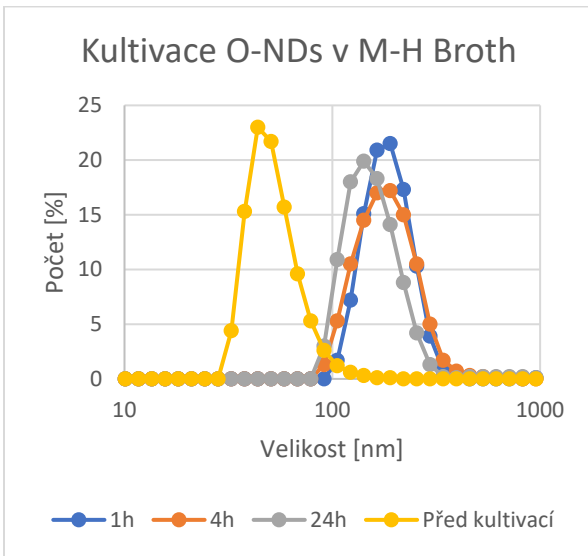
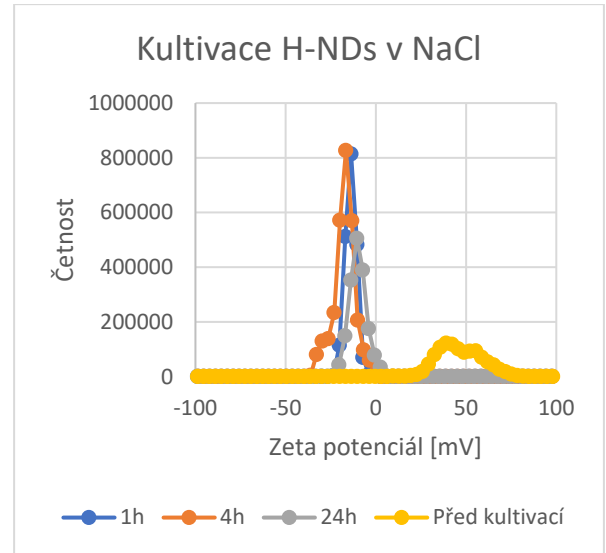
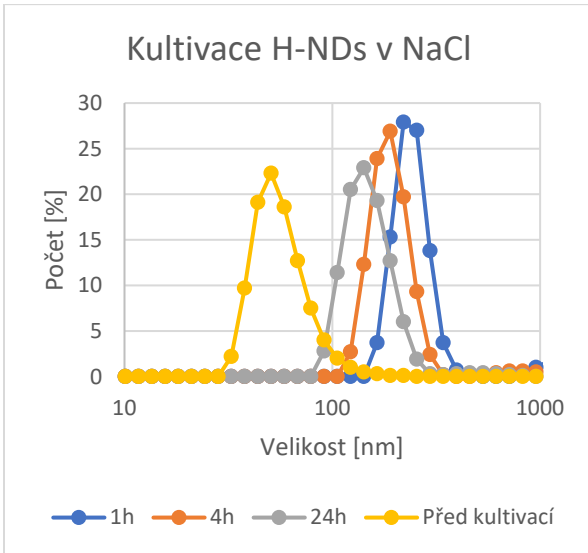
Ing. Kateřina Kolářová, Ph.D. a prof. RNDr. Bohuslav Rezek, Ph.D. provedli technickou a obsahovou recenzi práce s doporučeními na revizi a doporučeními ke způsobu zpracování, vizualizace a interpretace dat.

6. Dodatečné grafy









7. Použitá literatura

1. Nikzamir, M., A. Akbarzadeh, and Y. Panahi, *An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2021. **61**: p. 102316.
2. McNamara, K. and S.A.M. Tofail, *Nanoparticles in biomedical applications*. Advances in Physics: X, 2017. **2**(1): p. 54-88.
3. Ramos, A.P., et al., *Biomedical applications of nanotechnology*. Biophysical reviews, 2017. **9**(2): p. 79-89.
4. Machova, I., et al., *The bio-chemically selective interaction of hydrogenated and oxidized ultra-small nanodiamonds with proteins and cells*. Carbon, 2020. **162**: p. 650-661.
5. Bondon, N., et al., *Nanodiamonds for bioapplications, recent developments*. Journal of Materials Chemistry B, 2020. **8**(48): p. 10878-10896.
6. Henych, J., et al., *Reactive adsorption and photodegradation of soman and dimethyl methylphosphonate on TiO₂/nanodiamond composites*. J Applied Catalysis B: Environmental, 2019. **259**: p. 118097.
7. Šlegerová, J. and P. Cígler, *NANODIAMANTY – FLUORESCENČNÍ A ZOBRAZOVACÍ NANOSONDY*. Chem. Listy, 2014. **108**: p. 387-393.
8. Mochalin, V.N., et al., *The properties and applications of nanodiamonds*. Nature Nanotechnology, 2012. **7**(1): p. 11-23.
9. Kolarova, K., D. Miliaieva, and S. Stehlik, *Polyvinylpyrrolidone coating for nanodiamond stabilization in saline solution and silver nanoparticle decoration*. 2020. 80-85.
10. Chang, B.-M., et al., *Nanodiamond-supported silver nanoparticles as potent and safe antibacterial agents*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 13164.
11. Woodhams, B., et al., *Graphitic and oxidised high pressure high temperature (HPHT) nanodiamonds induce differential biological responses in breast cancer cell lines*. Nanoscale, 2018. **10**(25): p. 12169-12179.
12. Stehlik, S., et al., *Water interaction with hydrogenated and oxidized detonation nanodiamonds — Microscopic and spectroscopic analyses*. Diamond and Related Materials, 2016. **63**: p. 97-102.
13. Nesladek, M. and V. Petrakova, *Nanodiamant - Nový marker pro biomedicínu*. Vesmir, 2011. **90**(4): p. 214.
14. Stehlik, S., et al., *Size and Purity Control of HPHT Nanodiamonds down to 1 nm*. The Journal of Physical Chemistry C, 2015. **119**(49): p. 27708-27720.
15. Stehlik, S., et al., *Size Effects on Surface Chemistry and Raman Spectra of Sub-5 nm Oxidized High-Pressure High-Temperature and Detonation Nanodiamonds*. The Journal of Physical Chemistry C, 2021. **125**(10): p. 5647-5669.
16. Panáček, A., et al., *Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it*. Nature Nanotechnology, 2018. **13**(1): p. 65-71.
17. Shrivastava, S., et al., *Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles*. Nanotechnology, 2007. **18**: p. 225103.
18. Wang, H., et al., *Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles*. Materials Chemistry and Physics, 2005. **94**(2): p. 449-453.
19. Calderón-Jiménez, B., et al., *Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges*. 2017. **5**.
20. Zhang, X.F., et al., *Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(9).
21. Sinolits, A., et al., *Chitosan adsorption on nanodiamonds: stability and mechanism*. Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures, 2019. **28**: p. 1-5.

22. Sukhova, A.A., I.V. Gofman, and Y.A. Skorik, *Preparation and properties of chitosan–nanodiamond dispersions and composite films*. *Diamond and Related Materials*, 2019. **98**: p. 107483.
23. Mulder, R., et al., *Towards Bioactive Dental Restorative Materials with Chitosan and Nanodiamonds: Evaluation and Application*. *International Journal of Dentistry and Oral Science*, 2015. **2**: p. 147-154.
24. *Malvern Zetasizer ZS DLS user manual*.
25. Doane, T.L., et al., *Nanoparticle ζ -Potentials*. *Accounts of Chemical Research*, 2012. **45**(3): p. 317-326.
26. nanoComposix, *Silver Nanoparticles - Optical Properties*.
27. Sergio Braga, M., et al., *Multispectral colorimetric portable system for detecting metal ions in liquid media*. 2019. 1-6.
28. Omid, M., et al., *7 - Characterization of biomaterials*, in *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*, L. Tayebi and K. Moharamzadeh, Editors. 2017, Woodhead Publishing. p. 97-115.
29. Raval, N., et al., *Chapter 10 - Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development*, in *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, R.K. Tekade, Editor. 2019, Academic Press. p. 369-400.
30. Ltd., J., *Scanning Electron Microscope A to Z*.
31. Němeček, J., *Metody skenovací elektronové mikroskopie SEM a analytické techniky*. 2017.
32. AG, M., *Diamond powder MSY datasheet*. 2022.
33. Gong, J., N. Steinsultz, and M. Ouyang, *Nanodiamond-based nanostructures for coupling nitrogen-vacancy centres to metal nanoparticles and semiconductor quantum dots*. *Nature Communications*, 2016. **7**(1): p. 11820.
34. *Strukturní vzorec molekuly chitosanu*. [cit. 2.5.2022].
Dostupné z: <https://www.elicityl-oligotech.com/chitosan/239-chitosan-oligosaccharide--average-dp6.html>