



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

Antiseptické nanostruktury mědi pro biomedicínské aplikace

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor bakalářské práce: Lucie Študlarová

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Anton Fojtík, CSc.

Kladno 2015/2016

Katedra biomedicínské techniky

Akademický rok: 2015/2016

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Lucie Študlarová**
Obor: Biomedicínský technik
Téma: **Antiseptické nanostruktury mědi pro biomedicínské aplikace**
Téma anglicky: Copper antiseptic nanostructures for biomedical applications


Zásady pro vypracování:

V práci se zaměřte na možnosti přípravy nanočástic, studium jejich vlastností a možnosti využití v biomedicínských oborech. Vyzkoušejte různé technologie přípravy antiseptických nanostruktur mědi ve vodném prostředí. Zároveň se zaměřte na různé metody studia parametrů získaných nanočástic mědi. Změřte optická spektra a popište výsledky. Změřte velikosti připravených nanočástic pomocí elektronového mikroskopu a zpracujte statistiku velikosti připravených částic. Popište postup měření bakteriologické účinnosti .

Seznam odborné literatury:

[1] Fojtík, A. a kol., NANO fascinující fenomén současnosti, ed. 1, COMTES FHT, 2014, ISBN 978-80-260-7135-8

zadání platné do: 30.09.2017
Vedoucí: doc. Ing. Anton Fojtík, CSc.
Konzultant: Ing. Zuzana Fílová, Dr. Marie Weiserová, AV ČR, v.v.i., MBÚ, Praha


vedoucí katedry / pracoviště


děkan

V Kladně dne 22.02.2016

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Antiseptické nanostruktury mědi pro biomedicínské aplikace“ vypracovala samostatně. Veškerou použitou literaturu a podkladové materiály uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Kladně

.....

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. Ing. Antonu Fojtíkovi, Csc za vedení bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Zuzaně Fílové za konzultace a možnost využít laboratorní prostory při praktické části. Děkuji Dr. Marii Weiserové (laboratoř molekulární genetiky bakterií, MBU AV ČR) za uvedení do problematiky měření antibakteriální účinnosti a za pomoc při práci v této oblasti. Moje poděkování patří také pracovníkům Ing. Janu Grymovi a Dr. Romanu Yatskivovi, z Ústavu fotoniky a elektroniky AV ČR a Dr. Krejzlarovi z Technické univerzity v Liberci, za umožnění měření velikosti nanočástic mědi na elektronovém mikroskopu.

Název bakalářské práce:

Antiseptické nanostruktury mědi pro biomedicínské aplikace

Abstrakt:

Cílem této práce byla příprava vhodných vzorků nanočástic mědi, třemi metodami, vzhledem k třem druhům použitých organických stabilizátorů nanočástic. Optická spektra použitých vzorků byla změřena pomocí spektrofotometru. Byla studovaná antibakteriální účinnost připravených vzorků nanočástic mědi, na gramnegativních bakteriích *Escherichia coli*. Tato účinnost byla podrobněji diskutována. Změřené velikosti nanočástic byly statisticky zpracovány. Byl diskutován vliv způsobu přípravy na velikost částic.

Klíčová slova:

Nanotechnologie, nanostruktury, měď, nanočástice, antiseptické vlastnosti, antibakteriální účinnost, skenovací elektronový mikroskop SEM, tunelový elektronový mikroskop TEM.

Master's Thesis title:

Copper antiseptic nanostructures for biomedical applications

Abstract:

This thesis is focused on preparation of a pilot sample of copper nanoparticles. These samples were prepared three different ways. The basic parameters were determined using the spectrophotometer. Antibacterial efficacy against gram-negative bacterium *Escherichia coli* was confirmed. The size of particular nanoparticles was measured by scanning electron microscope.

Key words:

Nanotechnology, nanostructure, copper, nanoparticles, antiseptical, antibacterial efficacy, scanning electron microscope SEM, transmission electron microscopy TEM.

Obsah

Úvod.....	1
1. Historie.....	3
2. Příprava.....	5
2.1 Top-down	5
2.2 Bottom-up	5
2.2.1 Chemická metoda	5
3. Aplikace nanotechnologií	7
3.1 Materiálové inženýrství.....	7
3.2 Nanoelektronika	7
4. Nanobiotechnologie, nanomedicína.....	9
4.1 Nanomedicína v onkologii	9
4.2 Nanofarmacie	10
4.3 Tkáňové inženýrství	10
5. Nanomateriály.....	11
5.1 Kovové nanomateriály	11
5.2 Bezpečnost nanomateriálů	12
6. Nanočástice mědi	13
6.1 Toxicita nanočástic mědi.....	13
6.1.1 Antibakteriální účinky	14
7. Metody zkoumání nanočástic	15
7.1 STM (Scanning Tunneling Microscope).....	15
7.2 AFM (Atomic force microscopy).....	16
7.3 SEM (Scanning electron microscope).....	17
7.4 TEM (Transmission electron microscopy).....	18
8. Spektrofotometrie	19
8.1 Jednopaprskový spektrofotometr	20
8.2 Dvoupaprskový spektrofotometr.....	20
9. Praktická část	21
9.1 Použité přístroje	21
9.2 Použité chemikálie	21
9.3 Příprava nanočástice mědi.....	21
9.4 Měření antibakteriologické účinnosti.....	22
9.5 Proměření nanočástic na SEM	24

9.5.1	SEM- Lyra 3 FEG-SEM x FIB	24
9.5.2	SEM- ZEISS ULTRA PLUS	25
9.6	Statistické zpracování velikosti částic.....	25
9.6.1	Určení počtu nanočástic v roztoku.....	26
9.6.2	Určení počtu atomů v jedné částice	27
10.	Výsledky	28
10.1	Metoda se stabilizátorem chitosan.....	28
10.1.1	Metoda se stabilizátorem chitosan a redukčním činidlem	28
10.2	Metoda se stabilizátorem želatinou	30
10.3	Metoda se stabilizátorem citrátem.....	31
10.4	Antibakteriální účinnost- Chitosan.....	31
10.4.1	Výpočet účinnosti- Chitosan.....	32
10.5	Antibakteriální účinnost- Citrát.....	32
10.5.1	Výpočet účinnosti- Citrát.....	33
10.6	Antibakteriální účinnost- Želatina.....	33
10.6.1	Výpočet účinnosti- Želatina.....	34
10.7	Statistické zpracování velikosti nanočástic- Citrát.....	34
10.7.1	Statistické zpracování velikosti nanočástic - Citrát s NaBH ₄	36
10.8	Statistické zpracování velikosti nanočástic - Želatina.....	37
	Diskuze	39
	Závěr	41
	Seznam použité literatury	43
	Seznam obrázků.....	46
	Seznam tabulek	47
	Seznam grafů	48
	Seznam příloh	49

Seznam symbolů a zkratek

AFM	Mikroskopie atomárních sil
STM	Rastrovací tunelová mikroskopie
SEM	Řádkovací elektronová mikroskopie
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
LED	Light emitting diode
UV-VIS	Ultraviolet- Visible spectroscopy

Fyzikální:

D (nm)	Naměřený průměr
e (C)	Náboj elektronu
h (J/s)	Planckova konstanta
I (A)	Tunelový proud
m (kg)	Hmotnost elektronu
M (kg/mol)	Molární hmotnost
n (mol)	Látkové množství
s (m)	Vzdálenost elektrod
U (V)	Napětí
V (cm ³)	Objem

Statistické značení:

S	Směrodatná odchylka
\bar{x}	Aritmetický průměr

Úvod

Cílem této práce byla příprava antiseptických nanočástic. Práce je zaměřená na studium kovových nanomateriálů, konkrétně na nanočástice mědi. Nanočástice byly připravovány ve vodném prostředí

Práce je členěná do dvou částí a to části teoretické a praktické.

V první, teoretické části jsem se věnovala úvodu do nanotechnologií a hlavním metodám výroby nanomateriálů.

V druhé části práce jsem se věnovala

- i. přípravě nanočástic,
- ii. spektrofotometrickému měření,
- iii. měření antibakteriální účinnosti a
- iv. statistickému zpracování velikosti nanočástic.

Při přípravě nanočástic mědi se využilo několik metod podle přidaného stabilizátoru. Použité redukční činidlo umožní redukovat ionty kovů na kovové atomy. Následně z kovových atomů se vytvářejí kovové částice. Stabilizátor vytváří na povrchu nanočástic vrstvu, která zabraňuje koagulaci částic. Po přípravě nanočástic mědi jsme provedli spektrofotometrické měření, abychom získali optická spektra, které charakterizují základní vlastnosti nanočástic mědi v roztoku.

Výchozím předpokladem této práce je vědecky podložená hypotéza, která tvrdí, že nanočástice mědi by měly účinně působit v boji proti bakteriím, respektive vykazovat antibakteriální účinnost na specifické kmeny bakterií. V našem případě jsme pracovali s grampozitivními bakteriemi kmene *Bacillus subtilis* a gramnegativními bakteriemi kmene *Escherichia coli*.

Pro přibližné určení velikosti nanočástic mědi a jejich početní zastoupení v roztoku bylo nutné provést statistické zpracování. Vyhodnocení velikosti bylo provedeno ze snímků z elektronového mikroskopu, kde jsme změřili velikosti částic pomocí programu ImageJ. Získané hodnoty jsme statisticky zpracovali pomocí průměru a směrodatné odchylky. Pro lepší znázornění výsledků byly sestaveny histogramy rozložení hodnot.

Tato práce popisuje základní vlastnosti nanočástic mědi a jejich možné využití v medicíně. Díky zjištěným antibakteriálním účinkům lze do budoucna uvažovat o

možnosti využití nanočástic mědi v boji proti bakteriím vyskytujícím se běžně v nemocničním prostředí. Další aplikací nanočástic mědi, by bylo možné využití jejich vysoké vodivosti. Toho by se dalo využít při snímání elektrické aktivity mozku (EEG), vylepšením dosavadních elektrod pomocí nanočástic mědi.

1. Historie

První použití nanotechnologií se objevovalo již ve 4. století před naším letopočtem. Z této doby jsou známé ozdobné skleněné předměty, které mění barvu, pokud sklem prochází zdroj světla. Tyto vlastnosti jsou i dnes známy i ve sklech oken chrámů, které se stavěly ve středověku. V současnosti bylo zjištěno, že zbarvení pochází z nanostruktur kovu, např. zlata. [1]

V roce 1611 irský chemik Robert Boyle publikoval práci, v které kritizoval Aristotelův názor na hmotu. Ta se podle Aristotela skládá ze čtyř elementů- země, ohně, vody a vzduchu. Podle Boyla se hmota skládá z malých částic. [1]

Další výzkumy zabývající se převážně koloidní chemií malých částic, posunuly znalosti o jejich vlastnostech dopředu. Později, na základě všech těchto znalostí, se zrodil nový vědní obor, nanotechnologie. Ve své publikaci z roku 1915 *Svět zapomenutých rozměrů* profesor Dr. Wolfgang Ostwald popisuje vlastnosti částic, které mají podobné vlastnosti těm, které se studují v současné době. Popsal změny vlastností látky, kterým dnes říkáme vlastnosti „nano“ [1],[4]

Další fyzik, který mluvil o mikrotechnologii, byl profesor Richard Feynman, který ve své přednášce "Plenty of Room at the Bottom" nastínil teoretické možnosti zápisu informací ve velmi malém objemu hmoty a tím předpověděl teoretickou budoucnost nanotechnologiím. Nikdy se sice nezmínil o nanočásticích jako takových, ale tvrdil, že vše, co doposud víme, se dá zapsat do objemu krychličky rozměru zrnka písku. Předpověděl mnohé využití nanočástic, které bude možné realizovat až po vynalezení potřebné techniky. Položil otázku: „Když to umí příroda proč ne my?“ Dnes můžeme říct, že tyto dříve utopické myšlenky se staly skutečností a v nejbližších letech dosáhneme nových znalostí. [1],[4]

Dalším průkopníkem nanotechnologií je profesor Eric Drexler, který předpověděl technologickou revoluci v oblasti nano. Ta by měla spočívat v nástupu malých systémů, takzvaných nanorobotů. V porovnání s jinými vědci byl Drexler pouze vizionář a předpověděl revoluci v této oblasti. Výroba nanorobotů je zatím budoucnost. Termín nanotechnologie byl poprvé použit v roce 1974 profesorem Taniguchim. Jeho cílem bylo dosáhnout přesnosti ve výrobě v nano rozměrech. [1]

Koncem 20. století se objevil termín molekulární inženýrství, který zavedl von Hippel. [4]

V 80. letech byla snaha vytvořit menší čipové technologie a k tomu bylo nutné použít potřebné přístroje pro sledování mikrosvěta. Jedním z těchto přístrojů je rastrovaný tunelový mikroskop SPM a mikroskop atomových sil AFM. Tyto přístroje umožnily sledování a měření dějů na atomární úrovni. V současné době je nanotechnologie jeden z nejvíce se rozvíjejících vědních oborů. Důkazem je nárůst aplikací spojených s nanotechnologií či rovnou s nanočásticemi. [1], [4]

Pokud budeme dále hovořit o nanotechnologiích nebo nanočásticích, měly by splňovat tyto podmínky:

1. Alespoň jeden rozměr 1-100 nm.
2. Fyzikální a chemické vlastnosti jsou na úrovni atomů a molekul, to znamená odlišné charakteristiky v porovnání s původním materiálem.
3. Možnost vytvářet větší struktury kombinací materiálů. [1], [4]

2. Příprava

V současné době se setkáváme s dvěma způsoby výroby nanočástic. Jedná se o metody Top-down a Bottom-up. Tyto metody se liší podle výchozího stavu materiálu. Jedná se o přípravu malých částic z větších celků, například rozpouštěním velkých a tím tvorba malých, nebo skládáním a kombinací, jednotlivých malých částí, například molekul, do větších celků. Při přípravě nanočástic je cílem získat částice kontrolovatelného tvaru, velikosti a složení. [1]

2.1 Top-down

Metoda top-down spočívá v rozkládání velkých struktur na menší. Je to metoda fyzikální a mechanická. Tato metoda je ve velkém využívána při výrobě počítačových čipů a dalších produktů pro denní využití. K výrobě se využívá krátké vlnové délky optického zdroje. Zdroj krátké vlnové délky představuje například ultrafialové a rentgenové záření, díky kterému je možné vyrobit nanostruktury o rozměrech 10 až 100 nanometrů pomocí litografické tiskové techniky. [1], [4]

2.2 Bottom-up

Metoda bottom-up funguje na principu skládání atomů z menších struktur do větší struktury. Tuto metodu je možné označit jako chemickou nebo elektrochemickou. V dnešní době se stále pracuje na rozvoji této techniky. Inspirace pro metodu zdola nahoru vychází z biologických systémů, kde příroda využívá své vlastnosti z malých částí vytvářet složité kombinace, aby byly vytvořeny v podstatě všechny struktury potřebné pro život. [1], [4]

2.2.1 Chemická metoda

Chemická metoda je jedna z nejpoužívanějších metod založená na metodě bottom-up. Tato metoda je založena na skládání jednotlivých atomů nebo molekul v nanočástice. Jsou to kontrolovatelné postupy, které vytvoří výslednou nanočástici. Cílem skládání atomů nebo molekul je získat nanočástici o určité velikosti a vlastnostech, předem přesně definovaných. Při vytváření nanočástice je nutné růst částice včas zastavit. Tím získáme zvolené vlastnosti. Ke kontrole růstu nanočástic se využívá velké množství stabilizátorů. Díky použití stabilizátoru zabráníme kontaktu dvou nanočástic, které by tak zvětšily svoji velikost a mohly by se stát makročásticí. Stabilizátor funguje jako klec, která brání spojování jednotlivých nanočástic do shluků. [1],[4]

Jako nejčastější chemická metoda je využívána redukce solí přechodných kovů. Touto metodou lze vyrobit například nanočástice mědi, zlata, stříbra a platiny. Mezi hlavní použité stabilizátory patří želatina, natrium lauryl sulfat nebo kyselina askorbová. Jako redukční činidlo se využívá tetrahydroboritanu sodného. [3]

3. Aplikace nanotechnologií

Nanotechnologie se postupně dostávají do všech odvětví a to díky unikátním vlastnostem nanočástic, které si popíšeme později. Aplikace se dají rozdělit do několika nejvýznamnějších odvětví, jako je materiálové inženýrství, nanobiotechnologie, nanomedicína či specializace na léčiva-nanofarmacie a informační technologie. [27]

3.1 Materiálové inženýrství

Materiálové inženýrství se zabývá výrobou nových materiálů s využitím nanostruktur. V současné době se jedná o oblast nejvíce prostudovanou. Materiálové inženýrství se uplatňuje v chemickém průmyslu, automobilovém průmyslu, kosmetickém průmyslu, technickém průmyslu a ochraně životního prostředí.

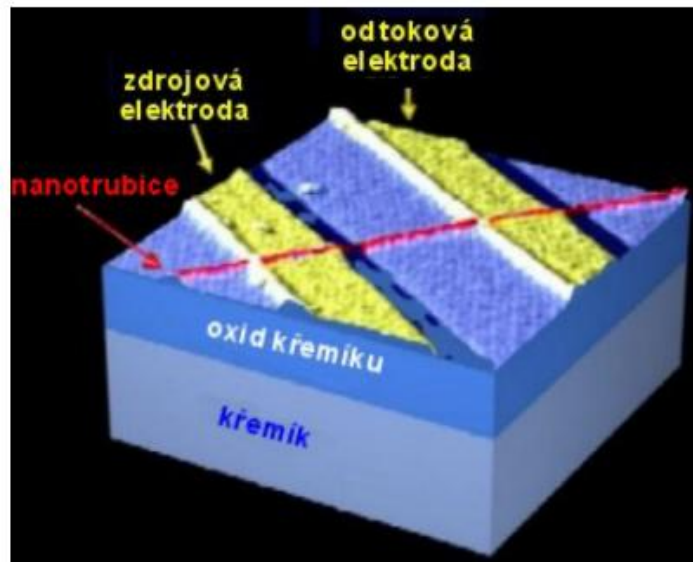
Konkrétním příkladem mohou být nanoprášky určitých sloučenin, které se využívají v kosmetickém průmyslu. Dále se můžeme setkat s tkaninami obsahující nanočástice stříbra, díky kterým jsou tyto tkaniny antibakteriální. Nanočástice křemíku byly též aplikovány na sklo, které tak získalo lepší povrchové vlastnosti. V současné době je studována možnost využití nanotechnologií pro čištění vodních ploch, půdy a při výrobě zcela biologicky rozložitelných materiálů. [27]

3.2 Nanoelektronika

Nanoelektronika se soustředí na výrobu tranzistorů, čipů a jiných elektronických přístrojů o menší velikosti, ale větší kapacitě. Pojem nanoelektronika nesmíme zaměňovat s pojmem mikroelektronika. Rozdíl je v rozměrové oblasti. Podstatou mikroelektroniky je rozměrová oblast 1 μ m-100nm. Na druhé straně se nanoelektronika zabývá vkládáním částic nanorozměrů (velikost molekuly) do elektronických obvodů v rozměrové oblasti 100nm-2nm. Byly objeveny nové nanomateriály, které mají nové vlastnosti, jako větší tvrdost, supravodivost a výrazně lepší magnetické chování. Jedná se například o chemické látky jako fullereny nebo uhlíkaté trubičky. Další velký posun byl uskutečněn ve výrobě LED obrazovek díky polovodičům v nanorozměrech. Výzkumy se také věnují miniaturizaci procesorů a pamětí, u kterých chtějí získat větší kapacitu při menší velikosti. [1][4]

Velkým objevem byl nanomateriál na bázi uhlíku- grafen. Tento materiál byl objeven v roce 2004 Andrem Greimem a Konstantinem Novoselovem. Bylo dokázáno, že grafen má velmi dobré vlastnosti. Bylo zjištěno, že grafen vykazuje relativně vysokou pohyblivost

elektronů, která u jiných materiálů nebyla pozorována. Dále má vysokou vodivost, pevnost, tuhost a také dobré optické vlastnosti. Díky těmto vlastnostem se otevírá nové využití v elektronice, například při výrobě nových typů tranzistorů nebo při výrobě displejů. [11]



Obrázek 1: Tranzistor CNFET, zhotoven pomocí nanotechnologií [21]

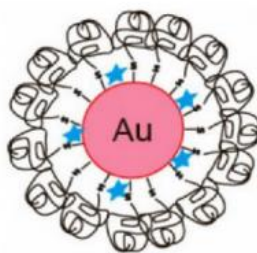
4. Nanobiotechnologie, nanomedicína

Nanobiotechnologie a nanomedicína jsou vědní oblasti se zaměřením na aplikaci nanostruktur v medicíně a biologii. Tyto vědní oblasti jsou zatím v počátcích, a proto je obtížné najít jednotnou definici termínu nanomedicína. V této práci je zmíněna definice podle Foresight Nanotech Institute: „*Nanomedicína může být definována jako monitorování, oprava konstrukce a kontrola lidského biologického systému na molekulární úrovni pomocí nanozařízení a nanostruktur.*“ [13]

V těchto oborech se objevují nové diagnostické a terapeutické metody. Mezi diagnostické metody patří využití nanočástic v onkologii, pro včasné odhalení nádorů. Další oblastí výzkumu je transport léků do organismu, tedy nanofarmacie. Nitrožilní přístup podávání léků může být nahrazen přípravou koloidních roztoků aplikovatelných do ústní dutiny. Nový výzkum se také provádí v oblasti ionizující záření, které by mohlo být nahrazeno nanočásticemi a infračerveným světlem, což by znamenalo odstranění škodlivého záření pro pacienty. Jednotlivé obory budou postupně detailněji rozepsány v následujících kapitolách. [14]

4.1 Nanomedicína v onkologii

Nanočástice lze v onkologii využívat pro diagnostické i terapeutické účely. V první řadě mohou nanočástice pomoci lokalizovat nádorové buňky, což je důležité, jelikož včasné objevení nádoru zvyšuje pravděpodobnost úplného vyléčení. Při diagnostice nádoru nejde pouze o objevení nádoru, ale i specifikaci velikosti, tvaru a umístění v organismu. K tomu lze opět využít nanočástice, které se použijí jako kontrastní látky při snímání z magnetické rezonance. Tyto kontrastní látky jsou schopné se navázat na receptory určitých buněk, které hledáme, a ve výsledném vzorku září v místě nádoru. V případě, kdy je nádor lokalizován, je možné nanočástice využít též k léčbě. [1], [4]



Obrázek 2: Nanočástice zlata, které je možné využít při hledání nádorů [21]

V onkologické terapii se využití nanočástic staví na přední pozici výzkumu. Díky cílenému směřování léku do nádoru by bylo možné omezit nežádoucí účinky na okolní tkáň, které se vyskytují například u chemoterapie. Také je možné do nádoru vpravit nanočástice, která nesou jinou molekulu, díky které bude ozařování účinnější. Podobný princip může být použit při ultrazvukovém snímání. Nádor bude cíleně ozařován a dojde k jeho destrukci. [14], [21]

4.2 Nanofarmacie

Nanočástice buď mohou napomáhat při distribuci léku v organismu, nebo mohou nahradit léky a stát se samotným léčebným prostředkem. Mezi základní látky použitelné při přenesu léku do organismu řadíme lipozómy, dendrity, fullereny, nanotrubičky a další. [14]

Nanočástice přenášející léky nahradí mnohdy bolestivé žilní podání léku. V podstatě se dá vyrobit koloidní sprej obsahující nanočástice s potřebným lékem, které se vpraví do organismu ústní dutinou. Jejich účinnost nebude nijak znehodnocena. Další výhodou podání léku pomocí nanočástic je menší degradace léčivých látek v organismu, zvýšená stabilita a kontrolovatelná distribuce. V neposlední řadě je velkou výhodou zkrácení léčby a tím i snížení nákladů. [2], [14], [21]

Dalším předmětem zkoumání je podávání inzulínu pomocí nanočástic. Byl by vyráběn pomocí nanočástic a kdykoliv by mohl být uvolněn do organismu. [19]

4.3 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je obor zabývající se vytvářením nových tkání. Tyto tkáňe jsou vyrobeny *in vitro* (mimo tělo) a poté implantovány do těla. V současné době není k dispozici velké množství výsledků pro zhodnocení přínosů a nedostatků. Výroba nových tkání je velmi časově i finančně náročná. V další části kapitoly se zaměřím především na regenerativní medicínu, která kombinuje tkáňové inženýrství s nanotechnologiemi. [14]

Ve studiích se věnují konstrukci biokompatibilních materiálů. Mezi ně patří nanotrubičky pro kostní implantáty nebo kovové nanomateriály při náhradě svalů. Kosti díky implantovaným nanotrubičkám získají větší pevnost a tím se zmenšuje pravděpodobnost zlomenin. Kovové nanosvaly mohou být vyrobeny například z platiny, která je lehká, ale zároveň velice pevná. [4], [14]

5. Nanomateriály

Nanomateriály jsou struktury s přesně definovanými vlastnostmi. V první řadě se jako nanomateriály využívají kovové nanočástice jako například zlato, stříbro, měď a jiné. Kovové nanomateriály mají velké uplatnění v medicíně a biologii, převážně díky antibakteriálnímu účinku. Setkat se můžeme také s uhlíkatými nanomateriály, konkrétně s fullereny, uhlíkovými trubičkami či nanodiamanty. Tyto materiály mají využití v elektronice a informační technologii. Dalším typem nanomateriálů jsou například polovodiče nebo keramické nanomateriály. V současné době se využívá nanočástic stříbra při léčbě popálenin. [4]

5.1 Kovové nanomateriály

Kovové nanočástice a nanomateriály jsou dnes velmi využívány v biomedicíně a inženýrství. Kovové nanomateriály mají výhodu v tom, že je můžeme využít jako samostatný prvek, nebo je můžeme kombinovat mezi sebou nebo i s jinými látkami. Zmenšení kovových materiálů do nanorozměrů vede ke zlepšení jejich vlastností. Zejména jsou zmiňované mechanické vlastnosti konkrétně pevnost a elasticita. [4]

Mezi ušlechtilé kovové nanočástice patří například zlato, stříbro, platina a měď. Neušlechtilé kovové nanočástice jsou železo, hliník a jejich slitiny a sloučeniny. Ušlechtilé kovové nanomateriály jsou zajímavé díky jejich optickým, magnetickým a chemickým vlastnostem. Také se studuje jejich katalytická aktivita. [8], [12]

Kovové materiály se využívají hlavně kvůli antibakteriálním účinkům. Ty jsou zkoumané v mnoha studiích, jako například studie Chena zabývající se toxicitou nanočástic mědi *in vivo*. [22] Antibakteriální efekt nanočástic je způsoben jejich malými rozměry a tím změnou fyzikálních a chemických vlastností částic. Mezi tyto vlastnosti patří například optické, magnetické, změna bodu tání nebo povrchová reaktivita. Pokud připravíme kovové nanočástice s rozměrem menším než je rozměr vykazující rezonanci plasmonu (oligomerní částice), dokážou se navázat tyto nanočástice na bakterii a zničit ji, ale už se nedokážou od bakterie oddělit. Mají jednorázovou funkci. Naopak pokud máme nanočástice, s velikostí které vykazují plasmonovou rezonanci, tj. mají již kovový charakter, umí se tyto částice navázat a zničit danou strukturu a poté se od bakterie oddělit a postup opakovat. [9]

Pro přípravu kovových nanomateriálů se využívá laserová ablace, kondenzace z plynné fáze, naprašování tenkých vrstev a jiné chemické metody. [1], [4]

5.2 Bezpečnost nanomateriálů

Nanomateriály nebo obecně nanotechnologie jsou považovány za nový vědní obor, který přináší řadu nových objevů, ale zároveň i možná nebezpečí. Hunt a Riediker ve své práci tvrdí, že nemáme ani tušení, jaký dopad můžou mít nanočástice na lidský organismus či okolní přírodu.[23]. Prozatím jsou nanomateriály v legislativě brány stejně jako jakýkoliv jiný chemický materiál. Přesto, že nanomateriály existují už od starověku, není doposud prozkoumán vliv nanomateriálů na lidský organismus.[23]

V předchozí kapitole bylo popisováno možné využití v medicíně. Nanočástice lze využít v diagnostické a terapeutické části léčby nádorů. Jak víme z literatury, nanočástice je schopná proniknout do buňky (pokud je menší než 4 nm) a díky svojí toxicitě dokáže buňku zničit, hlavně porušením DNA. Podle studií by to mohlo stát za mutagenními vlivy a tím by mohlo dojít například až k rozvoji rakoviny. [20]

Zatím jsme pouze na úrovni dohadů o rizicích nanočástic, proto je nutné provést mnoho výzkumů. Mezi bezpečnostní opatření by měla patřit změna legislativy či komunikace vědců s veřejností o nanomateriálech. [20]

6. Nanočástice mědi

Měď patří mezi ušlechtilý kovový prvek, který známe už od starověku. Její vlastnosti se v podobě nanočástice mohou změnit. Nanočástice mědi tak jako jiné kovové nanočástice mají velmi dobré uplatnění v praktických aplikacích, protože mají unikátní optické, elektrické, magnetické a mechanické vlastnosti. Díky velmi nízké pořizovací ceně oproti jiným kovům (např. zlato) jsou vyhledávanější. [3]

Tato práce se věnuje přípravě nanočástic mědi ve vodném prostředí a její možné využití díky antibakteriálním vlastnostem v praxi. Měď má velmi dobré vlastnosti, které se dají využít v mnoha oblastech. Měď není tak stabilní jako stříbro, proto je nutné při přípravě dodržet správné podmínky. [3]

Nanočástice mědi vykazují při pokojové teplotě trvalé magnetické vlastnosti s vysokými magnetickými momenty. Rozdíl magnetických momentů nanočástic zlata a stříbra od nanočástic mědi je vysvětlován možnou oxidací nanočástic mědi. K tomuto jevu dochází, protože oxid je stabilnější než částice mědi. [3]

Při přípravě nanočástic v laboratorním prostředí působí na strukturu, tvar a velikost částice okolní vlivy, jako například teplota, pH, tlak, vlhkost, dokonce i použité chemikálie. Nanočástice mědi jsou velmi nestabilní i při přípravě ve vodném prostředí a proto je nutné využít stabilizátorů. Naopak výhodou při výrobě nanočástice je schopnost řídit proces a to díky redukčním činidlům. Pomocí vhodného redukčního činidla dokážeme připravit nanočástici o dané velikosti. [3]

Měď jako makrolátka je velmi dobrý vodič a tato vlastnost se zlepšuje u nanorozměrů. Díky tomu se uplatní při výrobě polovodičových součástek. Dále se studuje aplikace jako katalyzátorů a maziv. Oxid měďnatý se využívá jako katalyzátor při výrobě hedvábí. Také se využívají jako přidané barvivo do skla a keramiky. [17]

6.1 Toxicita nanočástic mědi

Měď patří mezi toxické látky, kdy díky toxicitě dochází ke zničení buněčné membrány bakterie. Měď uvolňuje kovový iont, který se naváže na buněčnou membránu a vyvolá buněčnou smrt. Z toho můžeme usoudit, že toxicita způsobuje antibakteriální účinnost nanočástic mědi. [22]

6.1.1 Antibakteriální účinky

Nanočástice mědi mají podobné antibakteriální účinky jako stříbro, ale měď je levnější, snáze se kombinuje s polymery a je stabilnější. [3]

Podle výzkumů, kterými se zabýval Raffi a spol. došli k závěru, že je možné využít nanoměď proti různým kmenům bakterií. [16] Nanočástice mají velkou výhodu proti antibiotikům, protože si bakterie nedokážou vytvořit rezistenci vůči nanočásticím mědi. Využití antibakteriálního účinku lze aplikovat v medicíně, speciálně v chirurgii pro potažení nástrojů. Nástroje jsou pak odolné proti usazení bakterií na povrchu a případnému přesunu na lidskou tkáň. Důvodem antibakteriálních účinků je velikost nanočástic, čímž mohou procházet póry v membráně (kolem 3-4 nm) a navázat se na životně důležité enzymy bakterie. To omezí funkci těchto enzymů a dochází k buněčné smrti. Vědecké studie připisují toxické účinky nanočástice mědi jejich velikosti a specifickému povrchu. [10],[22]

Antibakteriální chování částic nanomědi bylo ověřeno na bakterii *Escherichia coli*. Díky aplikaci mědi se počet bakterií v koloniích redukoval, a počty kolonií se rovněž redukovaly, až došlo k zastavení růstu kolonií. Touto studií se zabýval Raffi a jeho kolektiv. Kolonie bakterie *Escherichia coli* byly zkoumány pomocí SEM mikroskopie a zjistilo se, že nanočástice mědi vytvořily v membráně dutiny a kanálky narušující její strukturu. Měď proniká do cytoplazmy, až dojde k zániku buňky. [3],[16]

Schopnost proniknutí nanočástice mědi do buňky a její zničení bylo potvrzeno i studií, která se zabývala možným poškozením DNA působením nanočástic oxidu měďnatého. Ze studie vyplývá, že vystavení rostliny působení nanočástic mědi mělo větší dopad na změnu DNA než působení jiné chemické látky. Tento experiment měl dokázat možnou škodlivost nanomateriálů pro životní prostředí, ale vše bylo prováděno v laboratořích a byly použity větší koncentrace, než které se vyskytují v přírodě. [17]

7. Metody zkoumání nanočástic

Mikroskopie patří mezi nejpoužívanější metody pro zkoumání částic. Mikroskopii, kterou využíváme ke zkoumání nanočástic, můžeme rozdělit na mikroskopii světelnou a mikroskopii založenou na detekci částic pomocí elektronového svazku. Nejdůležitější mikroskopy jsou AFM a STM. STM je rastrovací tunelová mikroskopie, díky ní dokážeme charakterizovat povrch vodivých a polovodivých vzorků až na atomové úrovni. AFM je mikroskopie atomárních sil pro zkoumání vodivých a nevodivých vzorků. Mikroskopie založená na elektronovém svazku je SEM a TEM. Obě tyto metody mají velké využití v nanometrologii. SEM je rastrovací elektronová mikroskopie a TEM je transmisní elektronové mikroskopie. Klasické světelné mikroskopy jsou nejvíce využívány pro oblast 1 μm a větší, z důvodu jednoduchosti a větší dostupnosti. [1],[2]

Jako další techniky využívané pro zkoumání nanotechnologií můžeme uvést mikroskopii magnetických sil, mikroskopii laterálních sil nebo skenovací optickou mikroskopii v blízkém poli. [1],[2]

7.1 STM (Scanning Tunneling Microscope)

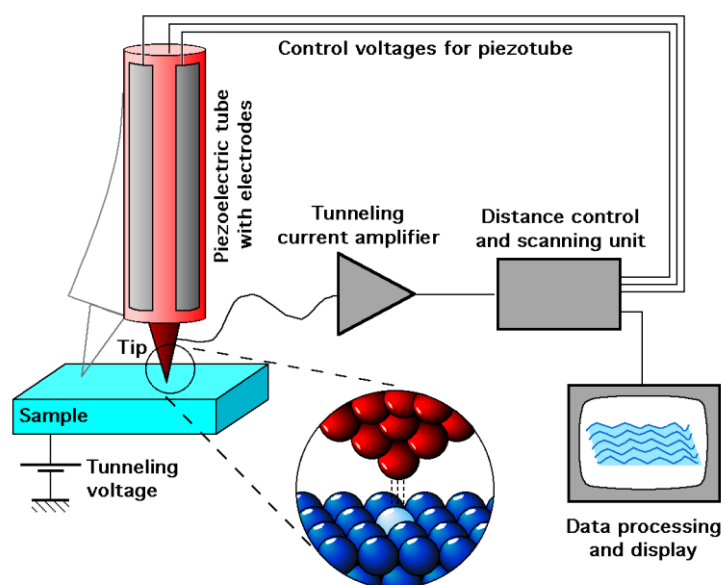
V roce 1981 byla vyvinuta rastrovací tunelová mikroskopie vědci G. Binnigem a H. Rohrerem. Za tento objev získali v roce 1986 Nobelovu cenu. STM se využívá při zkoumání tenkých vrstev a povrchů. Na povrchu sledujeme jednotlivé atomy, defekty a vlastnosti povrchů. Dále lze využít pro manipulaci s atomy a molekulami. [2]

Metoda je založena na principu změny průběhu napětí mezi hrotem a povrchem vodivého vzorku. Princip je založen na kvantové fyzice, konkrétně na tunelovém jevu. Tunelový jev porušuje principy klasické fyziky. Elektrony procházejí potenciálovou bariérou, i když mají nižší energii než bariéra. Hrot má stejné vlastnosti jako zkoumaný vzorek, to znamená, že vlnová funkce je na hrotu i na povrchu stejná. Vlnové funkce se překryjí, vykompenzují se a dojde ke vzniku tunelu. Elektrony procházejí tunelem v energetické bariéře, která vzniká překrytím vlnových funkcí elektronů atomů na hrotu a na povrchu vzorku. Velikost tunelového proudu je úměrná vzdálenosti hrotu od povrchu, tedy vzdálenosti elektrod. [2]

Tunelový proud lze dopočítat rovnicí:

$$I = U \cdot A(U) \exp \left[-2 \sqrt{\frac{2me}{h^2}} s \right], \quad (7.1.1)$$

kde m je hmotnost elektronu, U je napětí mezi elektrodami, $A(U)$ je závislost tunelového proudu na napětí s je vzdálenost mezi elektrodami, h je Planckova konstanta a e je náboj elektronu. [2]



Obrázek 3: Schéma tunelové mikroskopie [5]

Rastrovací tunelový mikroskop se skládá z piezoelektrické trubice s elektrodami, hrotu, ovládání posunu, vyrovnávače vibrací a počítače. [2]

7.2 AFM (Atomic force microscopy)

Mikroskopie atomárních sil byla vyvinuta až v roce 1986. Její využití je podobné jako u STM a to pro analýzu povrchu vzorku i k tvorbě struktur. Obraz je skládán bod po bodu. Na rozdíl od STM lze zkoumat vzorky i ve vodivém elektrolytu. To má velké uplatnění v elektrochemii. Zkoumá rozložení atomárních sil a poskytuje rozlišení na atomární úrovni. Povrch je oproti elektronové mikroskopii, (která má pouze 2D projekci), zobrazen ve 3D. [2]

Přibližováním hrotu k vzorku dochází k vyvolání přitažlivé či odpudivé síly. Hrot se pohybuje díky piezoelektrickým skenerům, které se pohybují v řádu nanometrů. Pokud si představíme vrstvu, kterou zkoumáme, představíme si, že vlnová funkce má přesah na

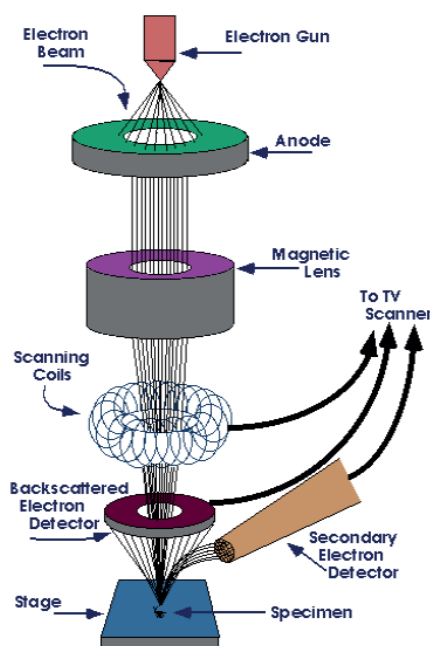
povrchu. Tohoto přesahu se dotýká špička hrotu mikroskopu. To znamená, že špička hrotu se přiblíží k hmotě, ale nedotkne se jí. AFM zobrazuje pouze povrch vzorku nikoliv objemovou strukturu. [1],[2]

Základem mikroskopu je hrot a ohebný nosník. Piezoelektrické skenery zajišťují pohyb hrotu. Detekce se provádí pomocí laseru a odraz dopadá na fotodetektor. AFM se většinou umísťuje na antivibrační stoly, pro zajištění přesné polohy hrotu. [2]

7.3 SEM (Scanning electron microscope)

Řádkovací elektronový mikroskop je založen na principu pohyblivého svazku elektronů místo světelného paprsku, který se využívá u klasického optického mikroskopu. Vlnová délka elektronů je řádově menší než vlnová délka světla. Elektronový mikroskop se využívá pro pozorování povrchu pomocí sekundárních elektronů. Byl zkonstruován v roce 1942 vědcem V. K. Zworykinem. Je to jeden z nejvyužívanějších mikroskopů pro zkoumání makro a nano světa. [2]

Při zkoumání povrchu vzorku dokážeme určit jednotlivé atomy, chemické složení a další vlastnosti preparátu. Zkoumaný vzorek musí být pozorován ve vakuu, aby nedošlo k interakci elektronů. Elektrony se odrazí od atomů a molekul vzorku a vytvoří výsledný obraz, který pozorujeme. To má velké využití v materiálovém výzkumu nebo v biologických aplikacích. [2]



Obrázek 4: Schéma elektronového mikroskopu [2]

7.4 TEM (Transmission electron microscopy)

TEM je transmisní elektronový mikroskop. Světelný zdroj je nahrazen svazkem elektronů, které musí procházet vakuem. Principiálně transmisní elektronový mikroskop funguje na odrazu elektronů od pozorovaného vzorku. Elektrony se odrazí do magnetické čočky, která nahrazuje skleněnou čočku z klasického mikroskopu. Pomocí TEM je možné pozorovat vzorky o tloušťce řádově 100 nm. Má vysokou rozlišovací schopnost. Obraz je detekován senzory nebo je zachycen na fotografický film. [2], [4]

Transmisní elektronový mikroskop je konstruován z tubusu s elektronovou optikou, vakuovým systémem, elektromagnetickými čočkami a zdrojem elektronů. Pro pozorování vzorků je nutné odstranit veškerou vodu, protože by mohla ovlivnit průchod elektronů.[2]

8. Spektrofotometrie

Spektrofotometrie patří mezi optické metody. Využívá se pro stanovení koncentrace látek. Dané látky musí absorbovat záření o vlnové délce v UV nebo viditelné oblasti. Pokud látky záření neabsorbují, je možné látky chemickou reakcí pozměnit. Spektrofotometrické stanovení patří mezi nepřímé metody. Při určení koncentrace analytu je zapotřebí využít standardy. To se provádí nejen pomocí kalibrační přímky. Kalibrační přímka udává závislost absorbance na koncentraci látky. [24], [25]

Spektrofotometr se skládá ze čtyř částí- zdroje záření, monochromátoru nebo polychromátoru, vzorku a detektoru. Jako zdroj záření se nejčastěji používá wolframová, halogenová a deuteriová žárovka. V případě UV-VIS spektrofotometru, kdy se využívá ultrafialového záření, se jako zdroj používá vodíková nebo xenonová výbojka. Monochromátor je část přístroje, který zajišťuje propustnost pouze části spektra. V jednoduchých fotometrech se využívá klasických filtrů, které propustí jenom určité záření. U spektrofotometrů monochromátor tvoří hranol, reflexní mřížka nebo u polychromátoru Rowlandův kruh. Vzorek se měří dle použitého přístroje. U vertikálního fotometru se využívá mikrotitrační destičky a záření je k destičce vedeno optickými vlákny. Proto je stanovení absorbance velice rychlé. U klasických spektrofotometrů se využívá plastová kyveta a u spektrometrů měřících v UV-VIS oblasti se vzorek proměřuje v křemenné kyvetě. Detektor se skládá z fotonky nebo fotonásobiče. Fotonka je skleněná trubička s dvěma elektrodami a je propustná pro dané záření. Ve fotonásobiči dochází k fotoelektrickému jevu, kde dojde k vyražení elektronu. Signál, který dopadá na fotokatodu, se změní na elektrony a ty jsou dalším vyražením na dynodách zesilovány. [24], [25]

Absorpční spektrofotometrie je založena na spektrální závislosti absorpce světla. Absorbující záření je přímo úměrné tloušťce absorbujícího prostředí, kterým záření prochází. Koncentrace neznámého vzorku lze dopočítat pomocí Lambertova-Beerova zákona. [24], [25]

Absorpční koeficient udává kolik je daná látka schopná pojmout záření. Směrnice této přímky odpovídá součinu absorpčního koeficientu a délce optické dráhy. Hlavní podmínkou platnosti tohoto zákona je konstantní hodnota absorpčního koeficientu. [6],[24]

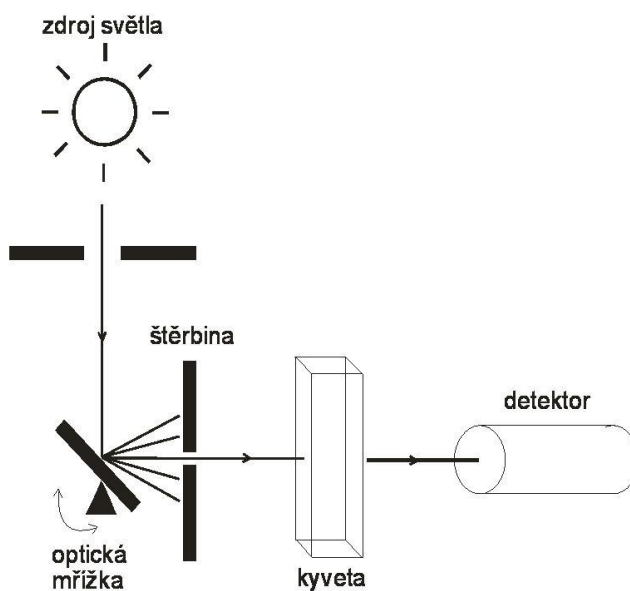
Spektrofotometry můžeme dále dělit podle principu na jedno a dvoupráskové.

8.1 Jednopaprskový spektrofotometr

Jednopaprskový přístroj funguje na principu jednoho paprsku. Nejdříve paprsek projde srovnávacím vzorkem a hodnota prošlého světla se zaznamená. Poté se srovnávací vzorek vymění za měřený a opět se zaznamená hodnota. Z údajů se dopočte absorbance. [25]

8.2 Dvoupaprskový spektrofotometr

Dvoupaprskové přístroje umožňují podstatně rychlejší měření, avšak jsou dražší oproti klasickým jednopaprskovým. V případě použití dvoupaprskového spektrofotometru využijeme dva svazky paprsku. Jeden svazek světla prochází měřeným vzorkem a druhý srovnávacím vzorkem (blankem). Tento typ přístroje byl využit při měření. [24]



Obrázek 5: Schéma jednopaprskového spektrofotometru [7]

9. Praktická část

9.1 Použité přístroje

- UV-VIS spektrofotometr Specord 210 plus
- Magnetické míchadlo ARE Heating Magnetic Stirrer
- Mini Spin plus- Eppendorf
- Environmental Shaker- incubator BIOSAN
- Super-mixer
- Lyra 3 FEG-SEM x FIB
- ZEISS ULTRA PLUS

9.2 Použité chemikálie

- Síran měďnatý- Modrá skalice CuSO_4
- Lauryl sulfát sodium $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OSO}_3\text{Na}$
- Destilovaná voda
- Tetrahydroboritan sodný NaBH_4
- Želatina- Dorapis
- Citrát- citronan sodný $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$
- Chitosan
- *Bacillus subtilis*- grampozitivní
- *Escherichia coli*- gramnegativní
- Fyziologický roztok

9.3 Příprava nanočástice mědi

Nanočástici mědi byly připraveny ve vodném prostředí. Metody přípravy se lišily v použitých chemikáliích a vlastnostech prostředí. Pro přípravu nanočástic jsme použili síran měďnatý. Dále jsme roztok stabilizovali pomocí chitosanu, želatiny, lauryl sulfátu nebo citrátu. Stabilizátor vytvoří kolem nanočástice obal a nedojde ke shlukování nanočástic. Připravené nanočástice bez stabilizátoru mají velký chemický potenciál a proto mají tendenci se spojovat mezi sebou a tím dosáhnout nízkého chemického potenciálu. Jako redukční činidlo jsme využili tetrahydroboritan sodný. Redukční činidlo dodává elektron atomu a vytvoří se kovové nanočástice.

9.4 Měření antibakteriologické účinnosti

Měření antibakteriologické účinnosti bylo prováděno v Mikrobiologickém ústavu akademie věd. Při testování antibakteriálních účinků nanočástic mědi byly použity dva kmeny bakterií: gramnegativní *Escherichia coli* (C 600) a grampozitivní *Bacillus subtilis*. Dělení bakterií je založeno na odlišných vlastnostech bakteriální stěny. Grampozitivní bakterie obsahují proteoglykan a polysacharid, tvořící buněčnou stěnu. Barvení dle Grama je založeno na principu barvení buňky pomocí krystalové violeti a Lugolovo roztoku. Následně se využije například alkoholu k obarvení buňky. U grampozitivních bakterií alkohol není schopný prostoupit buněčnou stěnou, tudíž nerozpustí komplex. Při použití safraninu dobarvíme bakterii na tmavě fialovou. Gramnegativní bakterie jsou tvořeny proteoglykanem a lipopolysacharidem. V případě gramnegativních bakterií dochází k vyplavení komplexu alkoholem. Po přidání safraninu se bakterie zbarví červeně. [28]

Do označených zkumavek jsme napipetovali 1 ml bakteriální kultury vyrostlé přes noc. Buňky byly centrifugovány 3 min při 10 rpm a byl odstraněn bujon.

Po centrifugaci jsme vyndali zkumavky a nechali vykapat přebytečný bujon. Poté do vzorků s bakteriemi byly přidány vzorky nanočástice mědi. Vše bylo promícháno a přemístěno do sterilních kultivačních zkumavek. Roztoky, které obsahovaly bakterie i nanočástice se ředily na 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , (10^{-3}) původní koncentrace. Roztoky obsahující pouze bakterie bylo nutné naředit na 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} původní koncentrace. Před rozředěním bylo nutné roztoky s nanočásticemi mědi a bakteriemi nechat hodinu kultivovat. Z nezředěného roztoku jsme odpipetovali 100 μ l do další zkumavky, kam jsme dali 900 μ l fyziologického roztoku a postupně dál ředili. Poté jsme vzorky nanесли na vysušené médium a nechali inkubovat do druhého dne.

Pro experimentální vzorek bylo vyséváno ředění 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , (10^{-3}). Pro kontrolní vzorek jsme vysévali ředění 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Misky jsme nechali kultivovat přes noc v 37°C. Druhý den byl spočítán počet kolonií v experimentálním i kontrolním vzorku.

Bakteriocidní účinek příslušného roztoku nanočástic vypočítáme podle vzorce:

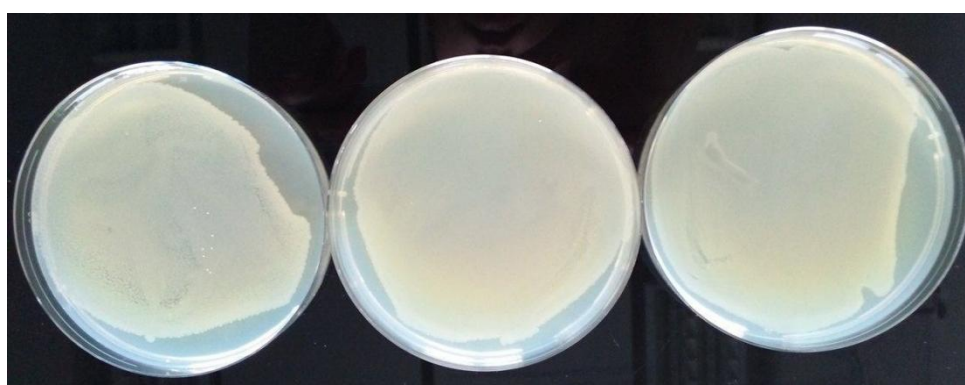
$$\text{Účinnost (\%)} = \frac{\text{CFU/ml v kontrolním vzorku} - \text{CFU/ml v experimentálním vzorku}}{\text{CFU/ml v kontrolním vzorku}} \quad (9.4.1)$$

Baktericidní účinek s hodnotou 99,9999 % je považován za výborný. [29]

Na následujících snímcích jsou vidět výsledky antibakteriální účinnosti.



Obrázek 6: Pozitivní výsledek



Obrázek 7: Negativní výsledek



Obrázek 8: Kontrolní vzorky

Na obrázku 6 vidíme pozitivní výsledek. Zleva doprava je ředění 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} roztoku nanočástic mědi s bakterií *Escherichia coli*. Ze snímku je patrné, že roztok nanočástic mědi působí na kmen bakterií *Escherichia coli* a ty se dále nedělí. Na obrázku 7 lze pozorovat negativní vzorek nanočástic mědi s bakterií *Bacillus subtilis*, kde nedochází k antibakteriální účinnosti nanočástic mědi. Na obrázku 8 jsou vyneseny kontrolní vzorky v ředění 10^{-6} , 10^{-7} .

9.5 Proměření nanočástic na SEM

Připravené roztoky nanočástic jsme proměřili na elektronovém mikroskopu. Využili jsme dvě pracoviště a to Ústav fotoniky a elektroniky, Akademie věd ČR v Praze a pracoviště na Technické univerzitě v Liberci.

9.5.1 SEM- Lyra 3 FEG-SEM x FIB

Na Ústavu fotoniky a elektroniky, Akademie věd ČR, jsme proměřili roztoky nanočástic mědi. Pro měření bylo nutné roztoky nejdříve připravit, aby bylo možné je pozorovat na elektronovém mikroskopu.

Jako podklad jsme využili křemíkový substrát. Ten jsme nejprve nechali povařit v metylalkoholu, abychom odstranili všechny nečistoty. Poté jsme nanесли kapku roztoku mědi a nechali ustát v digestoři. Nanočástice ve vzorcích, připravené touto metodou, byly hůře pozorovatelné.

Po tomto zjištění jsme zkusili jako substrát uhlíkové mřížky. Roztok nanočástic mědi jsme na mřížku nakapali a nechali zaschnout nebo je možné mřížku v roztoku jenom namočit. Mřížku jsme nechali opět ustát v digestoři. Všechny připravené vzorky jsme proměřili na elektronovém mikroskopu ve vakuu.



Obrázek 9: Elektronový mikroskop Lyra 3 FEG-SEM x FIB

9.5.2 SEM- ZEISS ULTRA PLUS

Na Technické univerzitě v Liberci jsme proměřili roztoky nanočástic na elektronovém mikroskopu. Příprava nanočástic před měřením byla odlišná od přípravy na Ústavu fotoniky a elektroniky.

Jako substrát byla využita uhlíková vrstva pokrytá teflonem. Pomocí pinzety jsme odtrhli teflon a nakapali roztok nanočástic. Takto připravené vzorky jsme nechali působit několik sekund, aby nanočástice klesly na uhlíkovou podložku, kde se uchytily. Poté jsme vzali filtrační papír a odebrali nadbytečnou vodu z kapky. Vzorek byl připravený pro proměření v SEM ve vakuu. Pro lepší rozlišení nanočástic na snímku lze původní roztok naředit. V našem případě jsme zředili roztok 1:20.

Snímky pořízené z mikroskopu ZEISS ULTRA PLUS jsme využili pro další zpracování. Pomocí programu ImageJ na měření velikosti nanočástic jsme změřili jednotlivé částice v roztocích a provedli jsme statistické zpracování. [26]



Obrázek 10: Elektronový mikroskop ZEISS ULTRA PLUS

9.6 Statistické zpracování velikosti částic

Za účelem spočítání přibližného počtu vzniklých nanočástic v definovaném objemu roztoku a přibližného počtu atomů v jedné vytvořené nanočástici bylo nezbytné jednotlivě pro každý testovaný vzorek roztoku zjistit průměr jedné nanočástice. Pro ideální definici

průměru reprezentativní částice celého vzorku je potřebné si uvědomit nutnost vytvoření balíku dat s počtem všech nanočástic vyskytujících se v roztoku. Reálně to není možné provést, jelikož v 1 ml roztoku se nachází hrubým odhadem 10^{11} částic. Kromě toho u vzorků, v kterých nám vznikají částice dvou velikostí je tato úloha velice obtížná. Z těchto důvodů námi definovaný průměr nanočástic vzorku bude aproximovaný, tedy statisticky vyjádřený, pouze z balíku dat poskytnutých námi zvoleným softwarem ImageJ. V případě vzorku obsahující dva druhy částic, bude datový balík při vyjadřování aproximovaného průměru vzorku složený jen z prvků početnějšího druhu částic. Softwarové měření částic ze SEM snímku funguje na principu změření jednotlivých nanočástic ve vzorku.

Každý datový balík reprezentující jeden vzorek obsahoval minimálně 100 prvků. Vzhledem k faktu, že zkoumaný datový balík má nezjistitelný charakter, je při volení metod jejich zpracování a vyhodnocení nevyhnutelné vědět, s jakým rozložením zkoumané veličiny pracujeme. V současné době existuje celá řada testů normality odlišující se silou a náročností. Datový balík jsme podrobili Kolmogorovov-Smirnovovmu testu. Základní hypotézou testu je, že náhodný prvek má předpokládané (normální) rozdělení. V případě, že p-hodnota je menší jak nastavená úroveň hladiny významnosti α , potom je základní hypotéza odmítnutá a existuje důkaz, že testované prvky nejsou předpokládaného rozdělení. Zvolená úroveň významnosti α byla 0,1. Testování datových balíků a následné statistické vyhodnocení dat bylo vykonané v numerickém softwaru MatLab. Ve všech případech se ukázalo normální- parametrické rozložení dat. Tato skutečnost nám umožnila určit aritmetický průměr datového balíku.

Dále hodnoty podrobíme výpočtu směrodatné odchylky, vycházeli jsme ze vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i^2 - \bar{x})^2}, \quad (9.6.1)$$

kde N je počet vzorků, x_i jsou dílčí hodnoty a \bar{x} je aritmetický průměr.

9.6.1 Určení počtu nanočástic v roztoku

Chceme zjistit, kolik nanočástic zredukovaných na určitou velikost je v daném roztoku mědi. Jako ilustrační příklad si uvedeme výpočet z roztoku mědi o koncentraci 10^{-3} M a velikost zredukovaných nanočástic je 10 nm. Tento výpočet použijeme pro jednotlivé metody.

Relativní atomová hmotnost mědi je 63,546 g. Hustota mědi je 8,94 g/cm³. Pro výpočet vycházíme z objemu.

$$V = \frac{m}{\rho}, \quad (9.6.1.1)$$

za m dosadíme relativní hmotnost a za ρ hustotu.

$$V = \frac{63,546}{8,94} = 7,108 \text{ cm}^3$$

Tento objem obsahuje 1 mol roztoku mědi. Koncentrace je 10⁻³ M a objem je 1 ml.

$$V = 7,108 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3 \text{ Cu v 1 ml}$$

Pro další výpočet si musíme dopočítat objem zredukovaných nanočástic.

$$V = \frac{1}{6} \pi D^3 = \frac{1}{6} \pi \cdot 10^3 = 523,6 \text{ nm}^3$$

Objem roztoku máme v cm³ a proto ho musíme převést na nm³:

$$1 \text{ cm}^3 = 10^{21} \text{ nm}^3$$

Nakonec spočítáme počet částic v roztoku o 10 nm.

$$N = \frac{7,108 \cdot 10^{-6} \cdot 10^{21}}{523,6} = 1,357 \cdot 10^{16}$$

V roztoku o koncentraci 10⁻³ M je 1,357 · 10¹⁶ částic o velikosti 10 nm.

9.6.2 Určení počtu atomů v jedné částici

V další části chceme určit počet atomů v jedné částici. Částice měla velikost 10 nm. Pomocí Avogadrovy konstanty, které udává počet částic v jednotkovém látkovém množství, zjistíme velikost atomů mědi v koncentraci 10⁻³ M.

$$1l = 6,023 \cdot 10^{23}$$

$$10^{-3} M = 6,023 \cdot 10^{17} \text{ atomů Cu}$$

V předchozí kapitole jsme si spočítali počet částic o průměru 10 nm, to použijte pro počet atomů mědi v jedné částici o stejné velikosti.

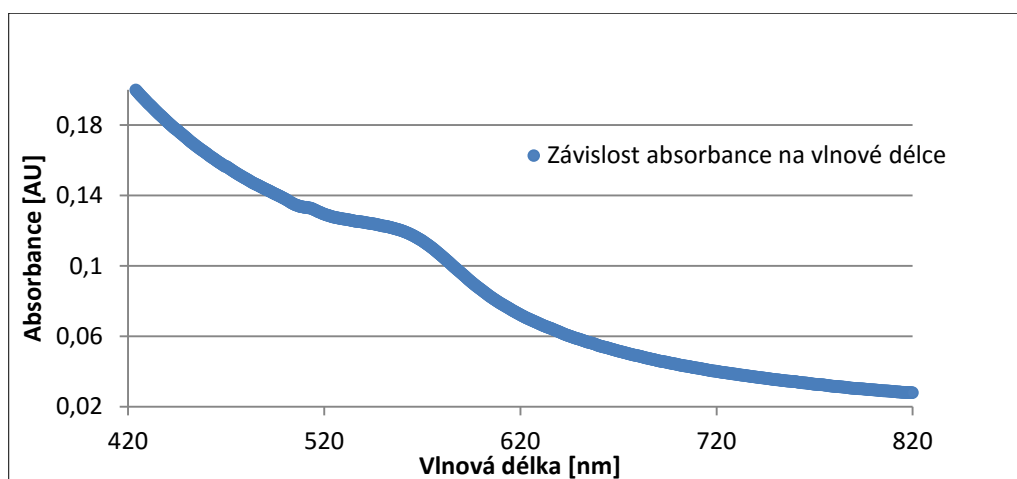
$$N = \frac{6,023 \cdot 10^{17}}{1,357 \cdot 10^{12}} = 443\,846 \text{ atomů v jedné částici}$$

V jedné částici o velikosti 10 nm je 443 846 atomů.

10. Výsledky

10.1 Metoda se stabilizátorem chitosan

Při přípravě prvních vzorků jsme přidali jako stabilizátor chitosan. Chitosan patří mezi polysacharidy, který se vyrábí z chitinu. Do připraveného roztoku mědi ($50 \text{ ml } 10^{-3} \text{ M } \text{Cu}^{2+}$) bylo přidáno $5 \text{ ml } 0,1 \%$ chitosanu.



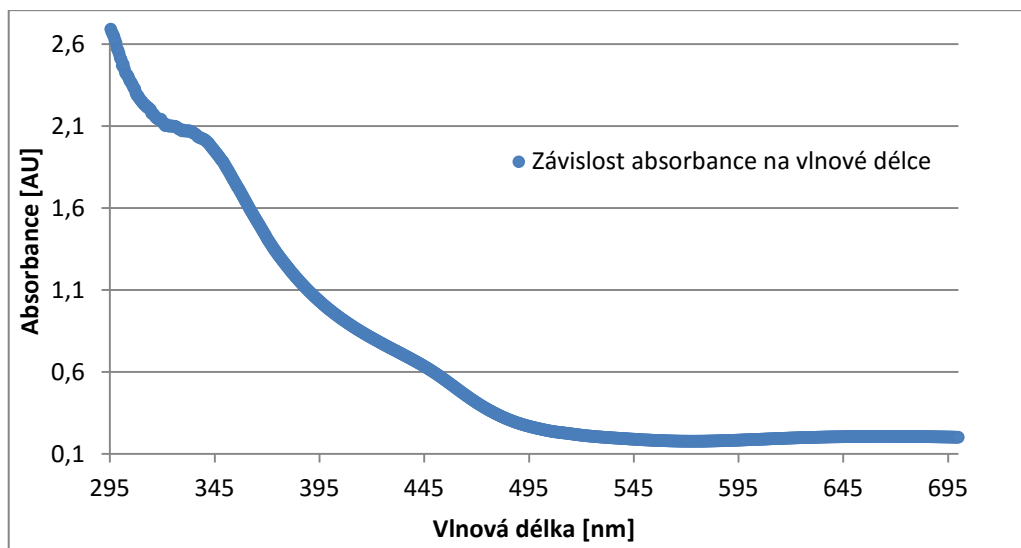
Graf 1: Závislost absorpance na vlnové délce u nanomědi s chitosanem

Z optického spektra je vidět, že nejvyšší pík se nachází v 560 nm vlnové délky. Tato vlnová délka spadá do zelenožlutého spektra. Výsledná barva nanočástice je ovlivněna tvarem nanočástic.

Z grafu 1 je patrné, že dochází k excitaci volných elektronů s dopadajícím světlem, mluvíme o povrchové plasmové excitaci u 560 nm vlnové délky. Světlem vybuzené elektrony v kovových nanočásticích jsou volné, nevázané, proto dochází k jejich vibraci při dopadu světla. Resonancí volných elektronů na povrchu částice se absorbuje světlo a vytváří se plasmonová excitace- plasmon. V našem případě vidíme malou absorpci světla, tudíž mluvíme o slabé resonanci. Chitosan tvoří povrchovou vazbu s nanočásticemi a tím snižuje výšku resonančního píku plasmonu.

10.1.1 Metoda se stabilizátorem chitosan a redukčním činidlem

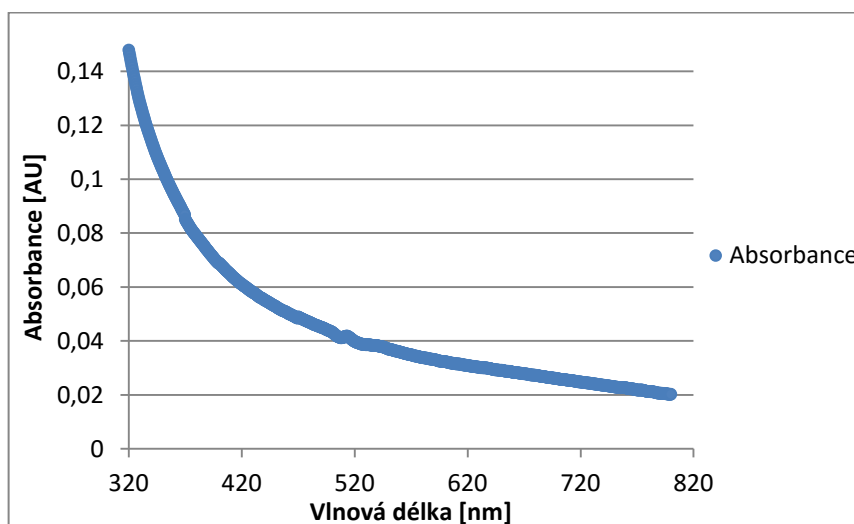
Tento vzorek jsme připravili podobným způsobem jako v předchozí kapitole, ($50 \text{ ml } 10^{-3} \text{ M } \text{Cu}^{2+}$) a přidali jsme $5 \text{ ml } 10^{-2} \%$ stabilizátoru natrium laurylsulfátu a $1 \text{ ml } 10^{-1} \text{ M}$ redukčního činidla NaBH_4 . Roztok krátce přejde varem, změní barvu na zelenou.



Graf 2: Závislost absorbance na vlnové délce nanomědi s natrium lauryl sulfatem

V grafu 2 se pík nachází v 345 nm vlnové délky a další se nachází v 445 nm. První odpovídá fialové a druhý fialovomodré barvě podle optického spektra. To znamená, že se v roztoku nachází dvě velikosti částic.

Tento samý roztok jsme proměřili po týdnu a sledovali jsme změnu z hlediska možné oxidace nanočástic v roztoku. V grafu 3 nelze pozorovat žádnou absorbanci, tudíž došlo k oxidaci roztoku.

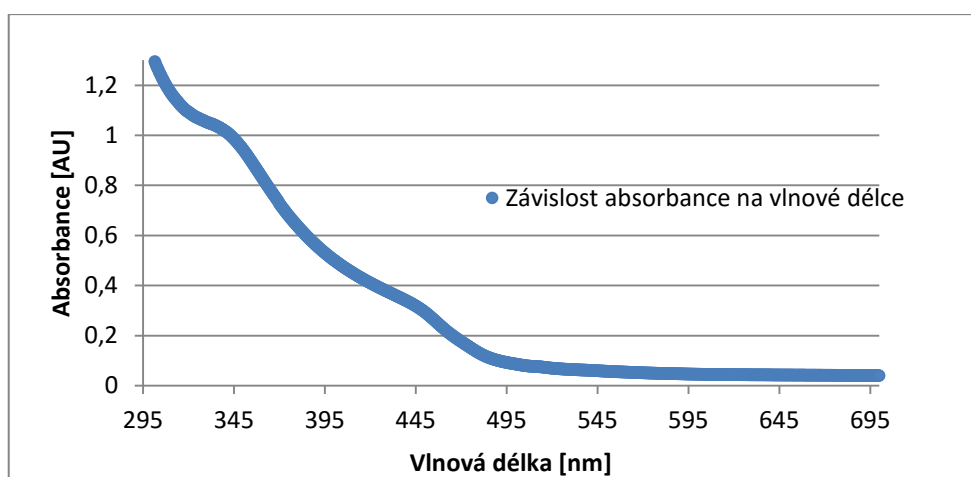


Graf 3: Závislost absorbance na vlnové délce nanomědi s lauryl sulfatem sodným a NaBH_4 proměřené po týdnu

10.2 Metoda se stabilizátorem želatinou

Pro další přípravu roztoku byla přidána želatina a NaBH_4 . Želatina byla v pevném stavu, proto bylo nutné želatinu rozpustit ve vodě a připravit zásobní roztok.

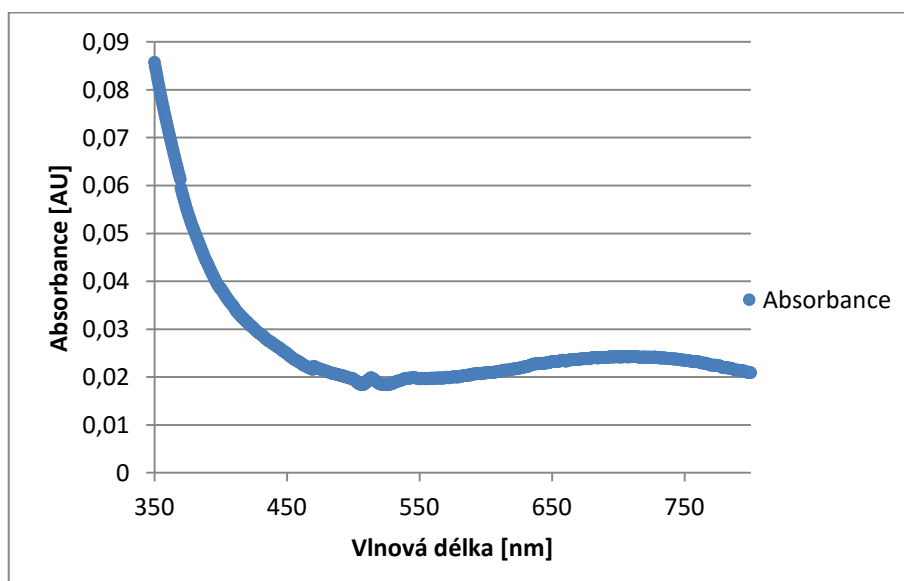
Do 50 ml roztoku 10^{-3}M síranu měďnatého přidáme 5 ml $10^{-2}\%$ želatiny a poté přidáme 1 ml 10^{-1}M NaBH_4 . Barva roztoku nanočástic mědi se změnila na žlutou.



Graf 4: Závislost absorpance na vlnové délce nanomědi s želatinou a NaBH_4

Na grafu 4 je optické spektrum, kde vidíme dva píky a to jeden ve 335 nm a druhý ve 445 nm vlnové délky. Opět to odpovídá fialové a fialovomodré barvě. V roztoku jsou dva komplexy, tedy dvě velikosti nanočástic. Vrchol ve vyšší vlnové délce ubírá elektrony plasmonu a zbylé volné elektrony kmitají s vyšší frekvencí, než elektrony u vrcholu v 345 nm.

Roztok jsme proměřili na spektrofotometru znovu po týdnu uskladnění.

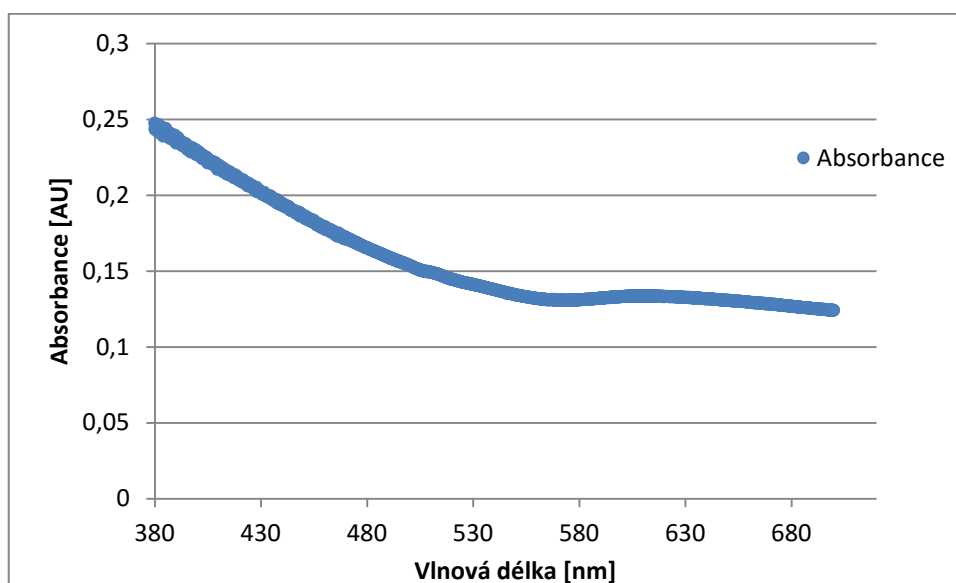


Graf 5: Závislost absorpance na vlnové délce nanomědi s želatinou a NaBH_4 změřené po týdnu

Z grafu je patrné že nanočástice se z části oxidovali a zbylé vytvořili komplex v oblasti mezi 650-750 nm. To znamená, že proti grafu 4 došlo posunutí vrcholu více vpravo. Elektrony budou kmitat s větší frekvencí. Komplex se nachází v modrozelené oblasti.

10.3 Metoda se stabilizátorem citrátem

Nakonec jsme použili pro stabilizaci nanočástic mědi citrát. Roztok nanočástice mědi ($50 \text{ ml } 10^{-3} \text{ M } \text{Cu}^{2+}$) jsme zahřáli a přidali $0,05 \text{ ml } 10^{-4} \text{ M}$ citrátu. Nakonec bylo přidáno redukční činidlo NaBH_4 , 120 kapek. Proměříme na spektrofotometru. Barva roztoku se změnila na hnědou.



Graf 6: Závislost absorpance na vlnové délce nanomědi s citrátem a NaBH_4

V grafu vidíme píky v rozmezí 350 nm a poté menší v 620 nm. První odpovídá fialové barvě a druhý žluté. Opět se v roztoku nachází dva komplexy s různou velikostí nanočástic. Pík v 630 nm kmitá s vyšší frekvencí než pík v nižší vlnové délce.

10.4 Antibakteriální účinnost- Chitosan

Pro následující zkoušení antibakteriální účinnosti jsme nejdříve pracovali s roztokem mědi stabilizovaným chitosanem. Vzorek jsme aplikovali na gramnegativních a grampozitivních kmenech bakterií. Také jsme si připravili kontrolní vzorek obsahující pouze bakterie, který jsme porovnávali s ostatními vzorky.

V prvním experimentu jsme testovali nanočástice mědi stabilizované chitosanem a lauryl sulfátem sodium. V následující tabulce jsou uvedeny počty kolonií bakterií CFU (colony forming units), spočítané po 16 hodinách kultivace. V tabulce je *Escherichia coli* označena 1 a *Bacillus subtilis* jako 2.

Tabulka 1: CFU po kultivaci při prvním měření

Ředění roztoku nanočástic	10^0	10^{-1}	10^{-2}
1/Chitosanem a Lauryl sulfátem	0	0	0
2/Chitosanem a Lauryl sulfátem	∞	∞	∞

Tabulka 2: CFU po kultivaci při druhém měření

Ředění roztoku nanočástic	10^0	10^{-1}	10^{-2}
1/Chitosanem	10	3	1
2/Chitosanem	∞	∞	∞

Z tabulek je patrné, že roztok nanočástic mědi s chitosanem působí na bakterii Escherichia Coli v obou měřeních. Na bakterii Bacillus subtilis roztok měděných nanočástic nepůsobí.

10.4.1 Výpočet účinnosti- Chitosan

Pro výpočet účinnosti roztoku nanočástic mědi budeme vycházet ze vztahu (2). V kontrolním vzorku bylo $1,5 \times 10^9$ CFU/ml, v ředění 10^{-7} kontrolního vzorku. V experimentálním vzorku nenarostla žádná kolonie bakterie Escherichia coli.

$$\text{Účinnost (\%)} = \frac{15 \cdot 10^8 - 0}{15 \cdot 10^8} \cdot 100\% = 100\%$$

Účinnost roztoku nanočástice mědi s chitosanem a lauryl sulfátem je 100 %.

Při druhém měření bylo v kontrolním vzorku o ředění 10^{-7} $1,82 \times 10^{10}$ CFU/ml. Experimentální vzorek obsahoval 1×10^3 CFU/ml.

$$\text{Účinnost (\%)} = \frac{182 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^3}{182 \cdot 10^8} \cdot 100\% = 99,9999\%$$

Účinnost roztoku nanočástice mědi s chitosanem je 99,9999 %.

10.5 Antibakteriální účinnost- Citrát

Opakovali jsme postup přípravy jako u předchozího měření. Pro experimentální vzorek bylo vyséváno ředění 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} . Pro kontrolní vzorek jsme vysévali ředění 10^{-6} , 10^{-7} . Pro první pokus jsme použili nanočástice mědi s citrátem a pro druhým pokus jsme přidali redukční činidlo NaBH_4 . Označení 1 představuje Escherichia coli a 2 Bacillus subtilis.

Tabulka 3: CFU po kultivaci při prvním pokusu s citrátem.

Ředění roztoku nanočástic	10^0	10^{-1}	10^{-2}
1/Citrát	38	8	2
2/Citrát	∞	∞	∞

Tabulka 4: CFU po kultivaci při pokusu s citrátem NaBH_4 .

Ředění roztoku nanočástic	10^0	10^{-1}	10^{-2}
1/Citrát s NaBH_4	7	0	0
2/Citrát s NaBH_4	∞	∞	∞

V tabulce vidíme výsledky účinnosti nanočástice mědi na bakterie. Roztok nanočástic mědi s citrátem v obou případech působí na *Escherichia coli*. Na *Bacillus subtilis* je výsledek negativní.

10.5.1 Výpočet účinnosti- Citrát

V kontrolním vzorku bylo $1,82 \times 10^{10}$ CFU/ml a v experimentálním 2×10^3 CFU/ml.

$$\text{Účinnost (\%)} = \frac{182 \cdot 10^8 - 2 \cdot 10^3}{182 \cdot 10^8} \cdot 100\% = 99,9999 \%$$

Účinnost roztoku nanočástice mědi s citrátem je 99,9999 %.

Při druhém pokusu bylo v kontrolním vzorku $9,60 \times 10^{10}$ CFU/ml. V experimentální vzorku došlo k zničení kolonií bakterie na nulu.

$$\text{Účinnost (\%)} = \frac{960 \cdot 10^8 - 0}{960 \cdot 10^8} \cdot 100\% = 100 \%$$

Účinnost roztoku nanočástice mědi s citrátem je 100 %.

Roztok nanočástic mědi se stabilizátor citrátem s i bez redukčního činidla má účinnost na bakterii *Escherichia Coli*. V případě *Bacillus subtilis* bychom museli udělat další pokusy pro ověření dosažených výsledků.

10.6 Antibakteriální účinnost- Želatina

Nakonec jsme zjišťovali účinnost roztoku nanočástic mědi se stabilizátorem želatina. Jako kmeny bakterií jsme využili *Escherichia Coli* 1 a *Bacillus subtilis* 2. Postupovali jsme stejně jako při předchozích pokusech.

Tabulka 5: CFU po kultivaci se stabilizátorem želatinou.

Ředění roztoku nanočástic	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
1/Želatina	tisíce	145	7	7
2/Želatina	∞	∞	∞	tisíce

Z tabulky můžeme usoudit, že roztok opět účinkuje pouze na Escherichia Coli. V případě Bacillus subtilis roztok nanočástic mědi účinkoval negativně.

10.6.1 Výpočet účinnosti- Želatina

V kontrolním vzorku se nacházelo 15×10^8 CFU/ml a v experimentálním vzorku bylo 7×10^4 CFU/ml.

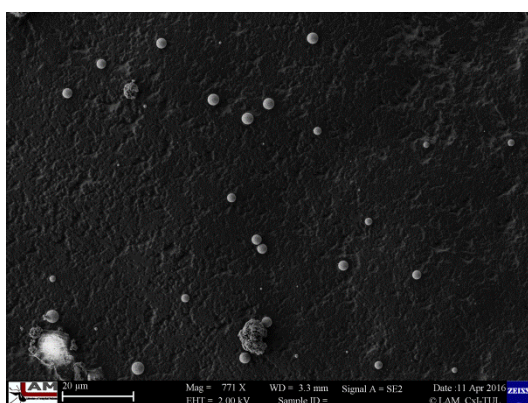
$$\text{Účinnost (\%)} = \frac{15 \cdot 10^8 - 7 \cdot 10^4}{15 \cdot 10^8} \cdot 100\% = 99,9953 \%$$

Účinnost roztoku nanočástice mědi s želatinou je 99,9953 %.

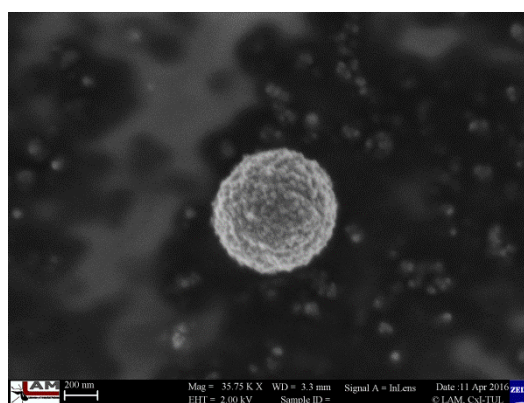
Tento výsledek nemůžeme považovat za výborný, ale přesto vidíme účinnost roztoku proti bakterii Escherichia Coli.

10.7 Statistické zpracování velikosti nanočástic- Citrát

Na následujících obrázcích vidíme nanočástice mědi se stabilizátorem citrát. Nanočástice se přitahují k sobě a tvoří kulové shluky. Nejdříve jsme proměřili velké shluky nanočástic při zvětšení 771 krát. Snímky jsou pořízené pomocí SEM ZEISS ULTRA PLUS.

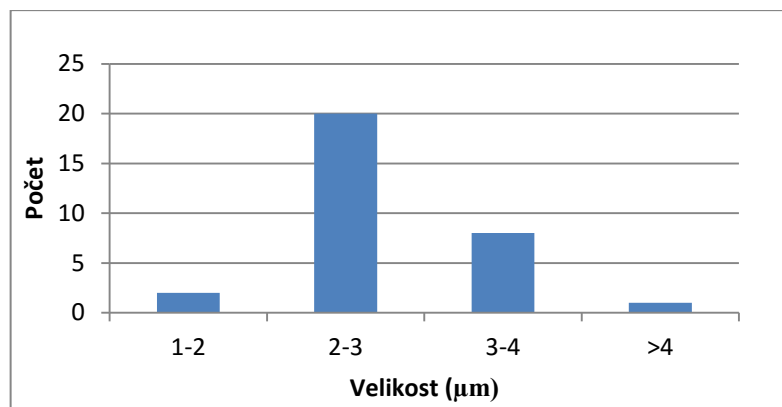


Obrázek 11: Shluky nanočástic mědi s citrátem



Obrázek 12: Přiblížený shluk nanočástic mědi 35,75k

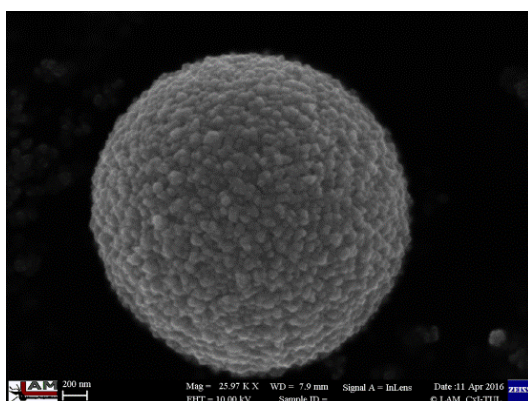
Pomocí programu ImageJ jsme změřili velikosti nanočástic ze snímků SEM. Výsledky jsou zobrazeny v následujícím grafu.



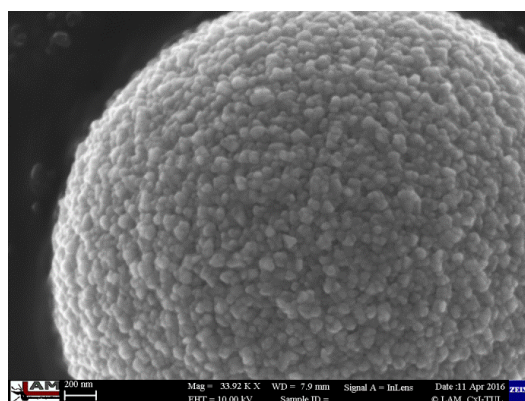
Graf 7: Rozložení velkých shluků nanočástic.

Aritmetický průměr velikosti nanočástic: $\bar{x} = 2,73 \text{ nm}$
 Směrodatná odchylka: $s = 0,43 \text{ nm}$
 Počet nanočástic v roztoku: $N = 6,68 \cdot 10^{14}$

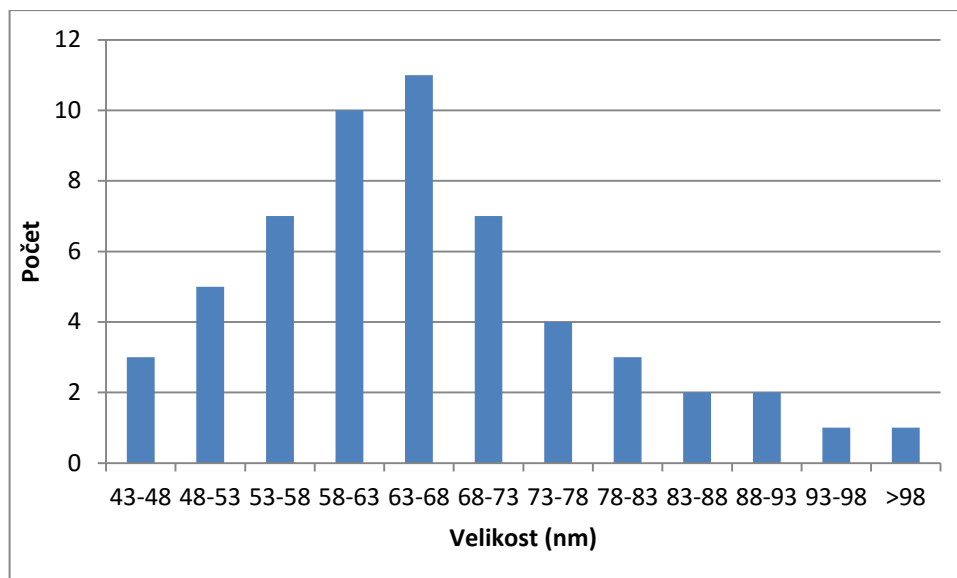
Následující snímky byly pořízeny při změně parametrů elektronového mikroskopu (z 2 kV na 10 kV). Změřili jsme velikosti nanočástic, které tvoří velké shluky.



Obrázek 13: Shluk nanočástic mědi s citrátem
25,97 k



Obrázek 14: Zaostrěný jeden shluk nanočástic
33,92 k



Graf 8: Rozložení malých nanočástic ze sluku.

Největší počet částic se nachází v rozmezí 63-68 nm. Spočítáme aritmetický průměr a směrodatnou odchylku nanočástic.

Aritmetický průměr velikosti nanočástic: $\bar{x} = 67,75 \text{ nm}$

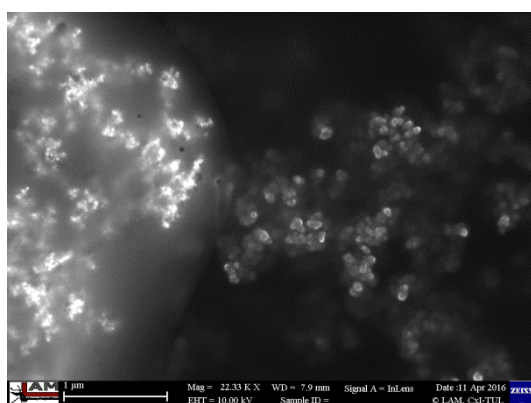
Směrodatná odchylka: $s = 21,57 \text{ nm}$

Počet nanočástic v roztoku: $N = 4,37 \cdot 10^{10}$

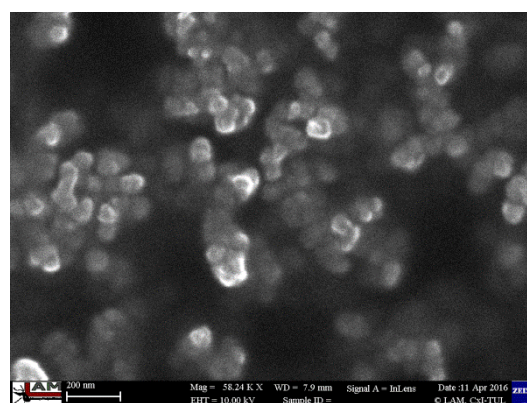
Počet atomů v jedné kuličce: $N = 13\,814\,220$

10.7.1 Statistické zpracování velikosti nanočástic - Citrát s NaBH_4

Roztok nanočástic mědi s citrátem a NaBH_4 jsme proměřili na SEM a získali následující snímky.

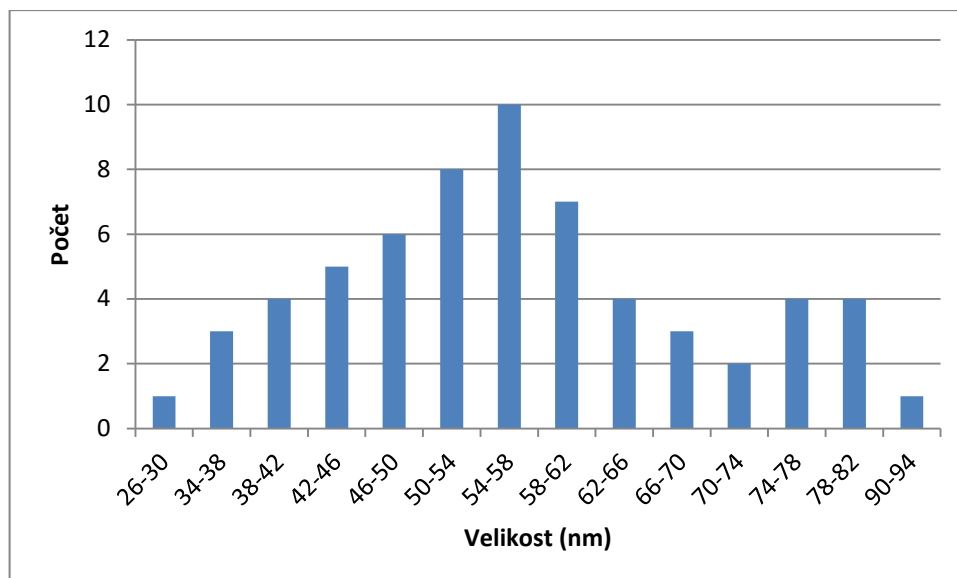


Obrázek 15: Nanočástice mědi s citrátem a NaBH_4 22,33 k



Obrázek 16: Přibližný roztok s citrátem a NaBH_4 58,24 k

Na předchozích snímcích 15 a 16 byla změřená velikost částic mědi.



Graf 9: Rozložení nanočástic s citrátem a NaBH₄.

V grafu jsou dva vrcholy, které odpovídají spektrofotometrickému proměření. V předchozí části jsme změřili optické spektrum, na kterém se objevily dva píky, které odpovídají dvěma komplexům o dvou velikostech. První komplex má největší počet částic o velikosti 54-58 nm. Druhý komplex má nanočástice o velikosti 74-82 nm.

Aritmetický průměr velikosti nanočástic: $\bar{x} = 56,54 \text{ nm}$

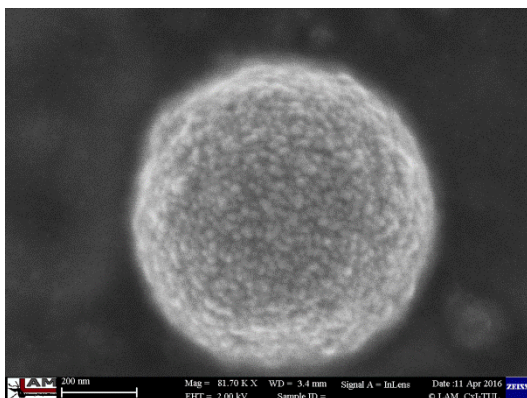
Směrodatná odchylka: $s = 13,33 \text{ nm}$

Počet nanočástic v roztoku: $N = 7,51 \cdot 10^{10}$

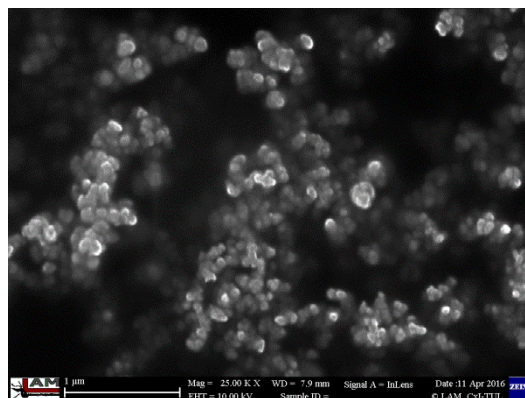
Počet atomů v jedné kuličce: $N = 8\,019\,973$

10.8 Statistické zpracování velikosti nanočástic - Želatina

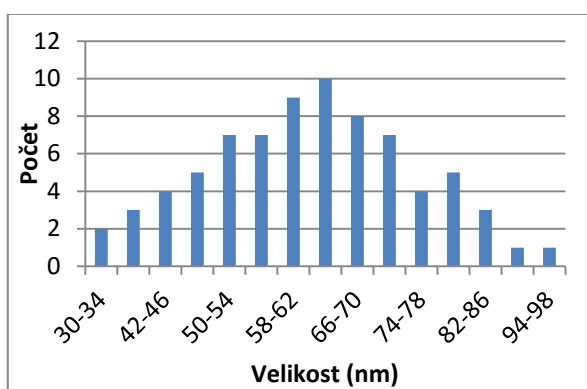
Následující snímky ukazují roztok nanočástic mědi se stabilizátorem želatinou. Nanočástice tvoří kulové shluky, ale i volné nanočástice.



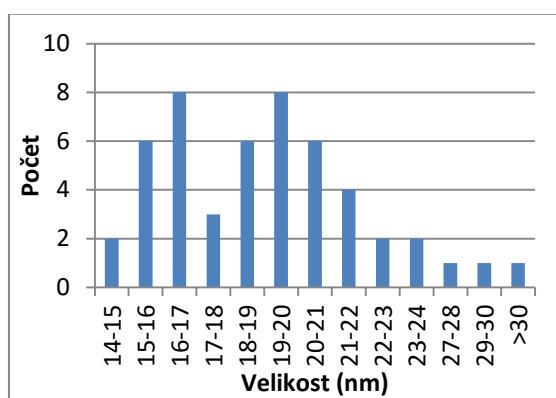
Obrázek 17: Nanočástice mědi s želatinou ve shluku 81,70 k



Obrázek 18: Nanočástice mědi s želatinou 25 k



Graf 10: Rozložení nanočástic s želatinou ve shluku.



Graf 11: Rozložení nanočástic s želatinou volně.

Na obou grafech vidíme dva vrcholy. To odpovídá spektrofotometrickému proměření, kde jsme pozorovali dva vrcholy, tedy dva komplexy s různou velikostí nanočástic mědi. Nanočástice ve shluku mají jeden komplex v rozmezí 62-66 nm a druhý komplex se nachází v 78-82 nm. Stejný průběh se nachází v grafu 11.

Aritmetický průměr velikosti nanočástic: $\bar{x} = 62,19 \text{ nm}$

Směrodatná odchylka: $s = 13,27 \text{ nm}$

Počet nanočástic v roztoku: $N = 5,64 \cdot 10^{10}$

Počet nanočástic v jedné kuličce: $N = 10\,679\,078$

Diskuze

V této práci jsme se věnovali přípravě nanočástic ve vodném prostředí pomocí tří metod. Metody se lišily podle použitého stabilizátoru. Použité stabilizátory byly citrát, želatina, natrium laurylsulfat a chitosan. Stabilizátor by měl zajistit, aby se nanočástice neagregovaly a zůstaly jednotlivě.

Tyto stabilizátory jsou organického původu, aby bylo možné vytvořené nanočástice aplikovat do biologických systémů. Stabilizátor je intaktní, nemá vliv na tvoření komplexu, ale pouze stabilizuje velikost částic. Použité stabilizátory jsou hydrofilní. Nejčastěji se využívá citrát, který jsme na naše nanočástice mědi aplikovali také.

U vzorků byla proměřena optická spektra. Z grafů 1-6 je patrné jakou vlnovou délku světla absorbuje daná nanočástic. Při použití stabilizátoru chitosanu a následné redukci jsme vzorek znovu proměřili a získali nové optické spektrum. Přitom se objevil jeden soubor velikostí nanočástic v rozmezí 520-550 nm. Když je charakter stabilizátoru elektrofilní, ubírá elektrony plasmonu a dochází k posuvu maxima k nižším frekvencím tudíž k delším vlnovým délkám. Velikost píku na grafech 1-6 odpovídá koncentraci nanočástic.

Při použití stabilizátoru želatiny nebyl na optickém spektru patrný žádný pík. Po přidání redukční látky, tetrahydroboritanu sodného, NaBH_4 se redukcí kovových iontů vytvořily nanočástice. V roztoku se objevily dvě adsorbční maxima nanočástic. První maximum u kratších vlnových délek bude patrně odpovídat menším částicím a podstatně větší částice by měli absorbovat u delších vlnových délek.

Poslední vzorek pro změření optického spektra byl roztok se stabilizátorem citrátem. Široké, nevýrazné maximum v oblasti kolem 620 nm signalizuje širokou velikostní distribuci částic. Statistika popisu velikosti částic je ve shodě s charakterem optickému spektra.

V další části práce jsme zjistili antibakteriální účinnost mědi na bakterie *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*. Připravené pilotní vzorky jsme aplikovali proti kmenům bakterií. Roztoky (s chitosanem, citrátem a želatinou) připravené třemi metodami, měly pozitivní výsledek na bakterii *Escherichia coli*. V případě bakterie *Bacillus subtilis* jsme dostali negativní výsledek. Získané výsledky antibakteriální účinnosti nanočástic mědi byly ve shodě se studii uvedenými v teoretické části. Účinnost na grampozitivní kmény byla negativní.

Pro statistické zpracování velikosti nanočástic bylo nutné získat snímky připravených roztoků nanočástic mědi. Snímky byly pořízeny na elektronových mikroskopech. Přístup na elektronové mikroskopy byl umožněn na Ústavu fotoniky a elektroniky, Akademi věd ČR a na Technické univerzitě v Liberci. Postup přípravy vzorků před proměřením na elektronovém mikroskopu se lišil. Postup přípravy vzorků na Ústavu fotoniky a elektroniky nebyl vhodný pro naše vzorky, ale přesto byly výsledky akceptovatelné.

Postup při měření na Ústavu fotoniky a elektroniky byl následující. Daný roztok se aplikoval na křemíkový substrát, který byl předtím očištěn v metylalkoholu. Tím došlo k nahromadění velkého počtu částí na sebe. Při pozorování tedy nebylo možné oddělit jednotlivé vrstvy od sebe a snímky jsme nemohli zařadit do statistického zpracování.

Oproti tomu postup přípravy na Technické univerzitě v Liberci využívá jako podkladového substrátu uhlíkové mřížky, která je pokrytá teflonem. Kapka roztoku s nanočásticemi se aplikovala na uhlíkovou mřížku a nechala se ustát několik desítek sekund. Během této doby došlo k částečné sedimentaci nanočástic na uhlíkovou podložku. Poté se pomocí filtračního papíru odebrala přebytečná tekutina z kapky. Díky této metodě bylo možné pozorovat jednotlivé nanočástice mědi v roztoku.

Snímky získané na elektronovém mikroskopu typu ZEISS ULTRA PLUS na Technické univerzitě v Liberci jsme použili pro statistické zpracování. Pomocí programu ImageJ, který nám byl doporučen, jsme změřili velikosti jednotlivých částic. Provedli jsme statistické vyhodnocení pomocí aritmetického průměru a směrodatné odchylky. Veškeré výsledky jsme zpracovali do grafů 7-11 a je patrné že rozložení velikosti nanočástic se shoduje s optickými spektry. Rozložení velikosti nanočástic odpovídá normálnímu rozložení.

Závěr

Cílem této práce byla příprava pilotních vzorků nanočástice mědi. Pro přípravu jsme zvolili tři metody postupu. Metody přípravy se liší použitým stabilizátorem. Do roztoku lze také přidat redukční činidla, která předávají elektrony, a dojde k vzniku kovových iontů. Přidáním redukčního činidla, které přidá kovový charakter, dojde ke změně zbarvení roztoku, což indikuje vznik nanočástic.

Změřili jsme optická spektra daných nanočástic připravených třemi metodami. Na optických spektrech jsme pozorovali, v jaké vlnové délce se nanočástice absorbují.

U některých metod dochází patrně ke vzniku dvou druhů částic, dvou velikostí, nebo jediné se strukturovanou absorbancí.

V další části práce jsme provedli měření antibakteriální účinnosti nanočástic mědi. Vyzkoušeli jsme účinnost roztoků nanočástic mědi na gramnegativní *Escherichii coli* a grampozitivní *Bacillus subtilis*. Podle našich výsledků byly nanočástice mědi účinné na kmeny bakterie *Escherichia coli*. V případě kmenů *Bacillus subtilis* byly výsledky negativní. Pro další pozorování antibakteriálních účinků na grampozitivní kmeny je nutné experimenty opakovat.

Pro statistické zpracování jsme vycházeli ze snímků z elektronového mikroskopu typu ZEISS ULTRA PLUS. Nanočástice mědi jsme nechali proměřit na elektronovém mikroskopu na dvou pracovištích – Ústav fotoniky a elektroniky, Akademie věd ČR a Technická univerzita v Liberci. Využili jsme snímky pořízené na elektronovém mikroskopu ZEISS ULTRA PLUS, protože měly lepší kvalitu než snímky z elektronového mikroskopu Lyra 3 FEG-SEM x FIB. Kvalita snímků byla závislá na předchozí přípravě nanočástic pro proměření.

Snímky z elektronového mikroskopu jsme zpracovali v programu ImageJ, ve kterém jsme změřili velikosti nanočástic mědi. Velikosti nanočástic se liší použitou metodou přípravy. Spočítali jsme aritmetický průměr a směrodatnou odchylku velikosti nanočástic. Z těchto hodnot jsme poté spočítali počet nanočástic v daném roztoku.

Dokázali jsme připravit nanočástice mědi třemi metodami. Zjistili jsme, že nanočástice mědi mají velkou nevýhodu kvůli rychlé oxidaci na vzdušném kyslíku. Měď je obecně nestabilní prvek a v případě nanočástic dochází k oxidaci povrchu jejich jednotlivých částic. Proto je nutné v přípravě zajistit stabilní podmínky nebo využít jiné sloučeniny

zabraňující oxidaci. Pro využití nanočástic mědi v medicíně jsme zjistili účinnost proti bakteriím. V případě bližšího zkoumání nanočástic bych doporučila transmisní elektronový mikroskop. Díky němu by bylo možné získat kvalitnější výsledky.

Díky antibakteriální účinnosti nanočástic lze aplikovat nanočástice proti bakteriím například v nemocničním prostředí.

Seznam použité literatury

- [1] FOJTÍK, Anton. *Nano - fascinující fenomén současnosti: nanočástice, nanostruktury a nanotechnologie - důmyslné formy hmoty : od objevu fenoménu po biomedicínské aplikace*. 1. vyd. Praha [i.e. Dobřany]: COMTES FHT, 2014, 288 s. ISBN 978-80-260-7135-8.
- [2] ZÍTKA, Ondřej (ed.). *Moderní nanotechnologie na počátku 21. století: kolekce učebních textů projektu OPVK NANOTEAM*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2013, 221 s. ISBN 978-80-214-4802-5.
- [3] PRUCEK, Robert a Martina KILIANOVÁ. *Cvičení ze základů nanomateriálové chemie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013, 71 s. ISBN 978-80-244-3752-1.
- [4] HOŠEK, Jan. *Úvod do nanotechnologie*. Vyd. 1. V Praze: České vysoké učení technické, 2010, 170 s. ISBN 978-80-01-04555-8.
- [5] *Word of the Week: Nanotechnology* [online]. [cit. 2015-11-17]. Dostupné z: <http://www.nanoword.net/library/nwn/1.htm>
- [6] KŘÍŽENECKÁ, Sylvie a Václav SYNEK. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014, 143 s. ISBN 978-80-7414-804-0.
- [7] VEJRAŽKA, Martin. *Wikipedia.cz* [online]. [cit. 19.11.2015]. Dostupný na WWW: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spektrofotometr.jpg>
- [8] MODY, V. V., SIWALE, R., SINGH, A., & Mody, H. R. (2010). *Introduction to metallic nanoparticles. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(4), 282–289. <http://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>
- [9] RANA, Sachindri; KALAICHELVAN, P. T. *Antibacterial activities of metal nanoparticles*. 2011
- [10] MAHAPATRA, Ojas, et al. *Ultrafine dispersed CuO nanoparticles and their antibacterial activity. Journal of Experimental Nanoscience*, 2008, 3.3: 185-193.
- [11] KLUKOVÁ, Ludmila; BERTÓK, Tomáš. *Vlastnosti a elektrochemické využití Grafénu. Chem. Listy*, 2014, 108: 653-659.
- [12] SIEGEL, Jakub; A Václav, Marek STASZEK. *Nanočástice ušlechtilých kovů připravené v kapalinách. Chem. Listy*, 2014, 108: 1102-1112.
- [13] FREITAS JR, Robert A. *Nanomedicine, vol. IIA: Biocompatibility, Landes Bioscience*, 2003. Online <http://www.foresight.org/Nanomedicine/>

- [14] ŠRÁMEK, Jaromír, et al. *Nanotechnologie v medicíně. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta–Biofyzikální ústav*, 2009.
- [15] PRNKA, Tasilo a Karel ŠPERLINK. *Sedmý rámcový program evropského výzkumu a technického rozvoje*. Vyd. 1. Ostrava: Repronis, 2006. ISBN 80-7329-134-7.
- [16] RAFFI, Muhammad, et al. *Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against Escherichia coli*. *Annals of Microbiology*, 2010, 60.1: 75-80.
- [17] ŠUTA, Miroslav. *Nanotechnologie: Nanočástice oxidu měďnatého mohou poškozovat DNA zemědělských plodin*. *Blog.respekt.cz* [online]. 2012 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <http://suta.blog.respekt.cz/nanotechnologie-nanocastice-oxidu-mednateho-mohou-poskozovat-dna-zemedelskych-plodin/>
- [18] MAYERGOYZ, I. D. *Plasmon resonances in nanoparticles*. Hackensack, NJ: World Scientific, c2013. World Scientific series in nanoscience and nanotechnology, v. 6.
- [19] *Nanotechnologie, nanočástice a nanomateriály: Aplikace* [online]. [cit. 2016-03-17]. Dostupné z: <http://www.nanocastice.cz/>
- [20] FILIPOVÁ, Zuzana, Jana KUKUTSCHOVÁ a Miroslav MAŠLÁŇ. *Rizika nanomateriálů*. 1. vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012. ISBN 978-80-244-3201-4.
- [21] KUBÍNEK, Roman a Milan VŮJTEK. *Nanotechnologie a jejich aplikace v elektronice*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4008-8.
- [22] CHEN, Zhen, et al. *Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo*. *Toxicology letters*, 2006, 163.2: 109-120.
- [23] HUNT, Geoffrey; RIEDIKER, Michael. *Building expert consensus on problems of uncertainty and complexity in nanomaterials safety*. *Nanotechnology Perceptions*, 2011, 7.2: 82-98.
- [24] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [25] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-586-2.
- [26] ImageJ [online], aktualizace 10.4.2016 [cit. 15.4.2016]. Dostupné z <http://imagej.net/Welcome>, Požadavky na systém: procesor Intel, AMD s podporou SSE2 (64-bit), operační systém Windows 7 SP1 a vyš, volné místo na disku 5 GB, operační paměť 8 GB.

- [27] KUBÍNEK, R.; STRÁNSKÁ, V. *Úvod do problematiky nanotechnologií*. Kvalitní rozvoj učitelství fyziky, 2007.
- [28] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, c2010. ISBN 978-80-86850-04-7.
- [29] L Huang, D-Q Li, Y-J Lin, M Wei, DG Evans, X Duan: *Controllable preparation of Nano-MgO and investigation of its bactericidal properties*. Journal of Inorganic Biochemistry 2005, 99:986-993. [Online]

Seznam obrázků

Obrázek 1: Tranzistor CNFET, zhotoven pomocí nanotechnologií [21].....	8
Obrázek 2: Nanočástice zlata, které je možné využít při hledání nádorů [21]	9
Obrázek 3: Schéma tunelové mikroskopie [5].....	16
Obrázek 4: Schéma elektronového mikroskopu [2]	17
Obrázek 5: Schéma jednopaprskového spektrofotometru [7].....	20
Obrázek 6: Pozitivní výsledek	23
Obrázek 7: Negativní výsledek.....	23
Obrázek 8: Kontrolní vzorky	23
Obrázek 9: Elektronový mikroskop Lyra 3 FEG-SEM x FIB	24
Obrázek 10: Elektronový mikroskop ZEISS ULTRA PLUS	25
Obrázek 11: Shluky nanočástic mědi s citrátem	34
Obrázek 12: Přiblížený shluk nanočástic mědi 35,75k.....	34
Obrázek 13: Shluk nanočástic mědi s citrátem 25,97 k.....	35
Obrázek 14: Zaostřený jeden shluk nanočástic 33,92 k.....	35
Obrázek 15: Nanočástice mědi s citrátem a NaBH ₄ 22,33 k	36
Obrázek 16: Přiblížený roztok s citrátem a NaBH ₄ 58,24 k	36
Obrázek 17: Nanočástice mědi s želatinou ve shluku 81,70 k.....	38
Obrázek 18: Nanočástice mědi s želatinou 25 k	38

Seznam tabulek

Tabulka 1: CFU po kultivaci při prvním měření	32
Tabulka 2: CFU po kultivaci při druhém měření.....	32
Tabulka 3: CFU po kultivaci při prvním pokusu s citrátem.	33
Tabulka 4: CFU po kultivaci při pokusu s citrátem NaBH ₄	33
Tabulka 5: CFU po kultivaci se stabilizátorem želatinou.	34

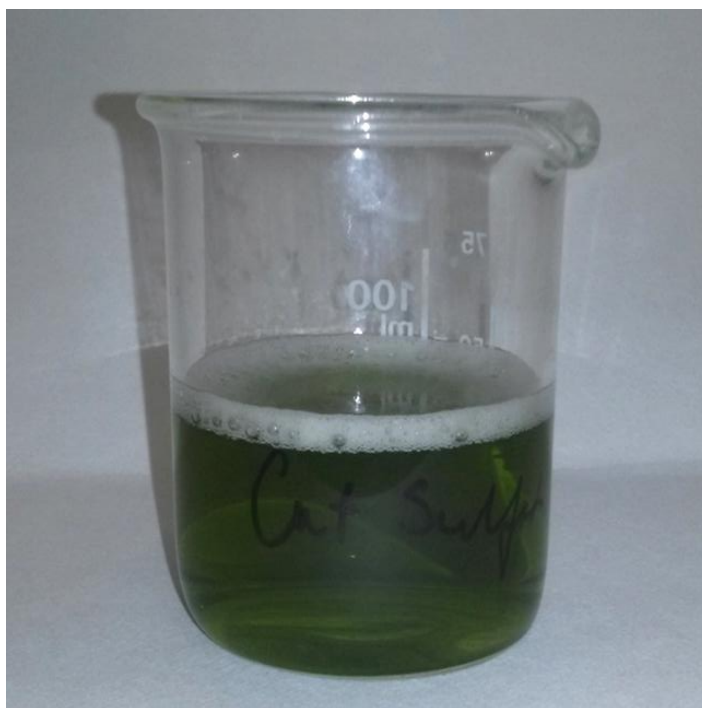
Seznam grafů

Graf 1: Závislost absorbance na vlnové délce u nanomědi s chitosanem.....	28
Graf 2: Závislost absorbance na vlnové délce nanomědi s lauryl sulfate sodium a NaBH_4	29
Graf 3: Závislost absorbance na vlnové délce nanomědi s lauryl sulfate sodium a NaBH_4 proměřené po týdnu	29
Graf 4: Závislost absorbance na vlnové délce nanomědi s želatinou a NaBH_4	30
Graf 5: Závislost absorbance na vlnové délce nanomědi s želatinou a NaBH_4 změřené po týdnu	30
Graf 6: Závislost absorbance na vlnové délce nanomědi s citrátem a NaBH_4	31
Graf 7: Rozložení velkých shluků nanočástic.....	35
Graf 8: Rozložení malých nanočástic ze shluku.....	36
Graf 9: Rozložení nanočástic s citrátem a NaBH_4	37
Graf 10: Rozložení nanočástic s želatinou ve shluku.	38
Graf 11: Rozložení nanočástic s želatinou volně.....	38

Seznam příloh

Příloha 1: Roztok nanočástic mědi s chitosanem a Lauryl sulfátem sodium.....	50
Příloha 2: Roztok nanočástic mědi s želatinou	50
Příloha 3: Roztok nanočástic s citrátem a NaBH ₄	51
Příloha 4: Elektronový mikroskop ZEISS ULTRA PLUS	51
Příloha 5: Elektronový mikroskop Lyra 3 FEG-SEM x FIB	52
Příloha 6: Nanočástice mědi s citrátem.....	52

Příloha 1: Roztok nanočástic mědi s chitosanem a Lauryl sulfátem sodium



Příloha 2: Roztok nanočástic mědi s želatinou



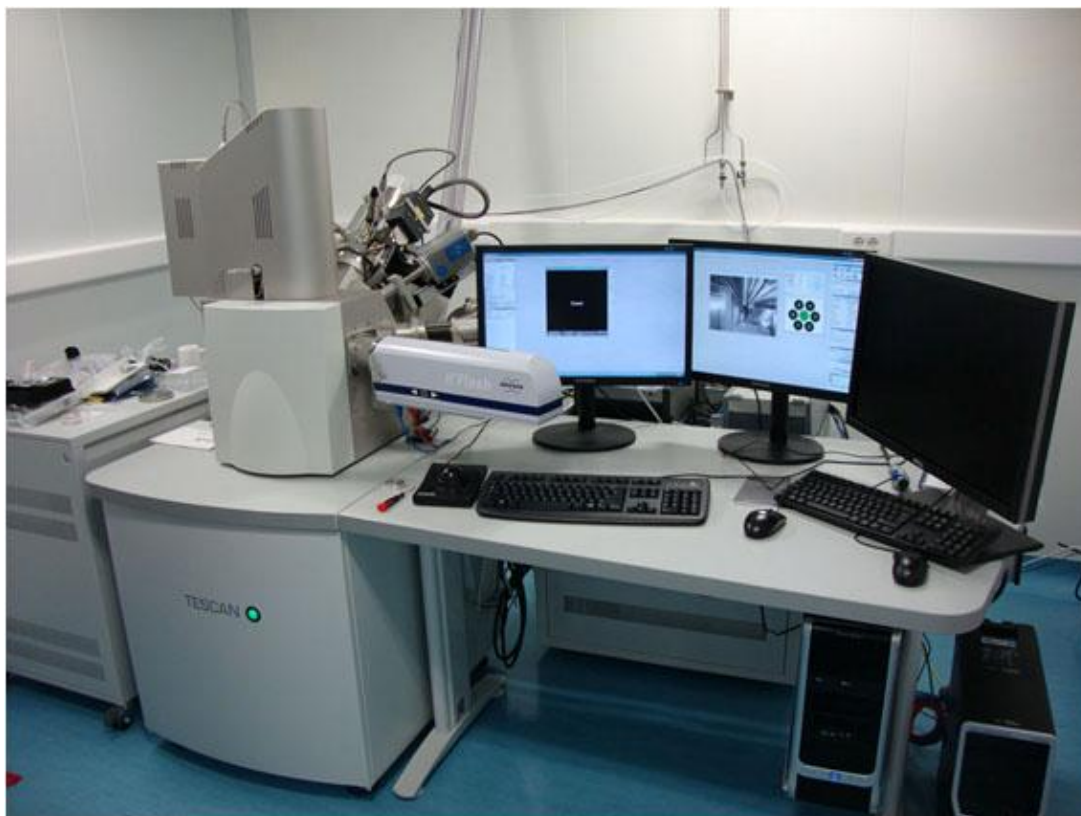
Příloha 3: Roztok nanočástic s citrátem a NaBH_4



Příloha 4: Elektronový mikroskop ZEISS ULTRA PLUS



Příloha 5: Elektronový mikroskop Lyra 3 FEG-SEM x FIB



Příloha 6: Nanočástice mědi s citrátem

