



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**  
**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**  
**Katedra biomedicínské techniky**

---

# **Příprava antiseptických nanostruktur pro biomedicínské aplikace**

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor bakalářské práce: Eliška Heinzová

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

---

**Kladno 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: **Eliška Heinzová**  
Obor: Biomedicínský technik  
Téma: **Příprava antiseptických nanostruktur pro biomedicínské aplikace**  
Téma anglicky: Preparation of 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 nanočástic v hydrofilním prostředí. Zároveň se zaměřte na metody studia parametrů získaných antiseptických nanočástic a jejich bakteriologických účinků. 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 pro biomedicínské aplikace“ vypracoval/a samostatně. Veškerou použitou literaturu a podkladové materiály uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Kladně

.....

Eliška Heinzová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing Antonu Fojtíkovi, CSc. za odborné doprovázení. Dále za velkou ochotu mým konzultantkám Dr. Marii Weiserové a Ing. Zuzaně Fílové. Také za cenné rady Bc. Janu Kabelkovi a Ing. Stanislavu Kušmírekovi. V neposlední řadě také rodině a všem, kteří mě po dobu vytváření této práce podporovali.

**Název bakalářské práce:**

Antiseptické nanostruktury pro biomedicínské aplikace

**Abstrakt:**

Nanotechnologie je rychle se rozvíjející interdisciplinární vědní obor. Důsledky vyplývající ze studií nanočástic se začínají využívat v mnoha oblastech včetně biomedicínských aplikací. Tato bakalářská práce se zaměřuje na antiseptické nanostruktury vhodné pro biomedicínské aplikace a biomedicínskou techniku. Zabývá se stříbrnými nanočásticemi, které mají vynikající baktericidní vlastnosti. Popisuje se jejich výroba s využitím tří různých stabilizátorů. Připravené nanočástice jsou zkoumány pomocí spektrofotometru, SEM mikroskopu a je testována jejich bakteriální účinnost na čtyřech druzích bakterií. Dále jsou porovnávány parametry jednotlivých roztoků a je zkoumán jejich vliv.

**Klíčová slova:**

nanotechnologie, nanočástice stříbra, bakterie

**Bachelor's Thesis title:**

Preparation of antiseptic nanostructures for biomedical applications

**Abstract:**

Nanotechnology is a fast growing interdisciplinary field. Consequences resulting from the studies of nanoparticles can be used in many fields, biomedical application included. This bachelor thesis focuses on antiseptic nanostructures suitable for biomedical applications and biomedical engineering. The thesis concentrates on silver nanoparticles which have the most significant bactericidal properties. The thesis describes production of silver nanoparticles using three different stabilizers. Prepared nanoparticles are studied by using spectrophotometer, SEM microscope and their antibacterial efficiency is tested on four species of bacteria. Parameters of each solution are compared to each other and their impact is examined.

**Key words:**

nanotechnology, silver nanoparticles, bacteria

# Obsah

Úvod.....	1
1 Nanotechnologie .....	2
1.1 Historie nanotechnologií .....	2
2 Příprava nanočástic .....	3
2.1 Dispergační metody .....	4
2.2 Kondenzační metody.....	4
2.2.1 Chemická redukce.....	5
2.2.2 Stabilizace nanočástic .....	5
3 Studium vlastností nanočástic.....	6
3.1 Metrologie nanočástic .....	6
3.1.1 STM mikroskop .....	6
3.1.2 AFM mikroskop.....	7
3.1.3 TEM mikroskop.....	7
3.1.4 SEM mikroskop .....	7
3.2 Spektrofotometrie.....	8
3.2.1 Dvoupaprskový spektrofotometr .....	9
4 Využití nanočástic v biomedicínských oborech .....	9
4.1 Kovové nanočástice .....	10
5 Nanočástice stříbra.....	11
5.1 Využití antimikrobiálních vlastností stříbra.....	11
5.2 Působení stříbrných nanočástic na mikroorganismy.....	12
5.3 Toxicita stříbrných nanočástic .....	14
6 Experimentální část.....	15
6.1 Použité přístroje .....	15
6.2 Použité chemikálie .....	15
7 Příprava roztoků.....	16
7.1 Syntéza nanočástic stříbra s citrátem .....	16
7.2 Syntéza nanočástic stříbra s želatinou.....	16
7.3 Syntéza nanočástic stříbra s chitosanem .....	17
8 Spektrofotometrie .....	17
9 Mikroskopie .....	18
10 Statistika velikosti částic.....	19

11	Měření bakteriologické účinnosti .....	20
12	Výsledky .....	25
12.1	Nanočástice stříbra s citrátem.....	25
12.2	Nanočástice stříbra s želatinou .....	28
12.3	Nanočástice stříbra s chitosanem.....	31
12.4	Porovnání roztoků AgNO <sub>3</sub> s citrátem s a bez redukčního činidla .....	34
12.5	Porovnání roztoků AgNO <sub>3</sub> s citrátem o různých koncentracích .....	37
12.6	Porovnání roztoků z AgNO <sub>3</sub> a CH <sub>3</sub> COOAg.....	39
13	Diskuse.....	43
14	Závěr .....	45
	Citovaná literatura.....	46
	Seznam obrázků.....	50
	Seznam grafů .....	51
	Seznam tabulek.....	52



## **Seznam symbolů a zkratk**

AFM Mikroskopie atomárních sil

LB Lisogeny broth

ot/min Jednotka počet otáček za minutu

SEM Řádkovací elektronová mikroskopie

SPM Mikroskopie skenovací sondou

STM Rastrovací tunelová mikroskopie

TEM Transmisní elektronová mikroskopie

UV-VIS Ultraviolet-Visible spectroscopy

# Úvod

Nanotechnologie jsou v současné době ve fázi významného rozvoje a výzkumu. Jsou využívány zejména pro jejich specifické vlastnosti lišící se od makrolátky. Aplikace nanočástic je v některých oborech již běžnou praxí, jejich budoucí využití však přesahuje současný stav. Především v biomedicínské praxi, kde jsou bakterie často nežádoucí, by mohly být vhodným řešením antiseptické nanostruktury.

Práce se zaměřuje na nanostruktury využitelné v biomedicínských oborech, zvláště v biomedicínské technice. Byly studovány nanočástice stříbra, které mají velmi dobré antiseptické účinky. Ty mají velký potenciál využití hlavně proto, že mnoho druhů bakterií začíná být rezistentní vůči antibiotikům. Je tedy třeba hledat nové účinné postupy, jak přítomnost bakterií eliminovat. Studie dokazují, že nanočástice stříbra účinkují jak na grampozitivní, tak na gramnegativní bakterie, navíc se jedná o roztoky, jejichž účinnost je dlouhodobá, proto může být jejich využití široké např. při sterilizaci zdravotnické techniky nebo při rozprašování v prostorech, kde je potřeba nadstandartní čistoty. Částice mohou být také součástí textilií, ze kterých se šijí zdravotnické potřeby, pláště, prostěradla nebo sloužit při péči o diabetickou nohu apod. V teoretické části práce jsou popsány vlastnosti a účinky nanočástic, jakým způsobem je možné je zkoumat a jejich vliv na organismus. V experimentální části práce byly připraveny roztoky nanočástic stříbra metodou bottom-up s několika druhy stabilizátorů. V práci je uveden postup výroby a parametry připravených roztoků. U jednotlivých roztoků jsou změřena spektra pomocí spektrofotometru, získán obraz pomocí SEM mikroskopu a vypočítána statistika velikosti a počtu částic. V neposlední řadě jsou uvedeny výsledky antiseptické účinnosti připravených roztoků. Jednotlivé roztoky jsou dále porovnávány podle konkrétního parametru a tedy je určen jeho vliv na prostředí kde bude roztok použit.

# 1 Nanotechnologie

Nanotechnologie je interdisciplinární vědní obor, který zasahuje do oblastí fyziky, chemie, biologie, medicíny, techniky, textilního průmyslu a mnoha dalších oborů. Předpona nano znamená miliardtina ( $10^{-9}$ ) základní jednotky [1]. Jedná se o velikost částic na úrovni atomů nebo molekul, kde hmota nabývá kvantových vlastností. Nanomateriály se liší svými vlastnostmi od makrolátky. Nanočástice mohou být využity přímo jako aktivní medium nebo jako nosiče různých léčiv. [2], [3]

Podstata toho, proč nanostruktury vykazují unikátní vlastnosti, je jejich prostorové omezení (space confinement) a z toho plynoucí kvantové důsledky. Zmenšováním rozměrů struktury se zmenšuje prostor pro volný pohyb elektronů nebo fotonů v látce. Když je velikost struktury nebo částice alespoň v jednom rozměru menší než vlnová délka elektronu, musí elektron zkrátit svoji vlnovou délku na rozměr částice. Tím, že elektron zkrátí vlnovou délku, zvětší svoji energii a vytvoří vyšší energetickou hladinu. V důsledku toho se začnou měnit fyzikální, fyzikálně chemické a optické vlastnosti látky, což tvoří podstatu unikátních vlastností nanostruktur. [2] V makrosvětě se to projeví zcela zjevným způsobem, např. uhlí je červené a rozpustné v organických rozpouštědlech, křemík je bledě žlutý a má silnou oranžovou luminiscenci, železo je žluté a rozpustné v polárních rozpouštědlech aj. [3]

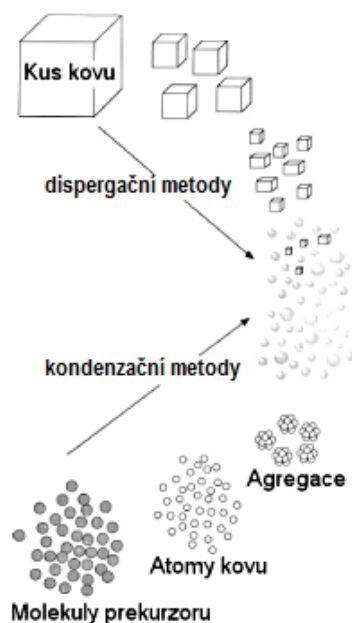
## 1.1 Historie nanotechnologií

Pojem nanotechnologie se začal používat v až posledních desetiletích. Některé jevy, které bychom dnes označili za nanotechnologie, jsou však známy z dávné historie. Již ve 4. století našeho letopočtu vyráběli římskí sklenáři sklo, obsahující kovy aniž by věděli, že z kovu při tavení skla vznikají nanočástice které jsou zodpovědné za barvu skla. Také široká škála barev mozaik v oknech středověkých katedrál vznikla přítomností nanočástic ve skle. Lidé znali výrobní postupy, kterými barvu skla získají, aniž by potřebovali znát teorii “nano“. [2] Až průběhu 19. a 20. století dochází k velkému rozmachu postupů v chemii, fyzice, optice a především technice, ze kterých se pak zrodily nanotechnologie, jak je známe dnes. První všeobecně rozšířenou technikou založenou na principu nanotechnologií je fotografie založená na halogenidech stříbra, které se po expozici rozkládají na stříbrné nanočástice. [1]

Roku 1915 napsal Dr. Wolfgang Ostwald knihu Koloidní chemie „Svět zapomenutých rozměrů“. V této knize se zabýval materiálními objekty, které leží mezi makrolátkou a molekulární strukturou malých částic až po úroveň jednotlivých molekul. Pojednává o rozměrové oblasti, fyzikálních a chemických vlastnostech malých koloidních částic, změně barvy a chemického chování. S pojmem nanotechnologie je často spojován také teoretický fyzik Richard Feynman, nositel Nobelovy ceny za fyziku. Ten poprvé nastínil možnosti miniaturizace v roce 1959 ve své přednášce s názvem „There is plenty of Room at the Bottom“. Předpověděl tehdy možnost vytváření materiálů a mechanismů na úrovni atomů a molekul. Uváděl, že příroda umí tyto struktury vytvářet a využívat, tak proč by nemohl i člověk? Tím nastínil teoretické základy nanovědy a předpověděl možnosti syntetické konstrukce na molekulární úrovni. [1], [2] V té době však ještě nebyla k dispozici technika, která by umožnila pozorovat, a tedy i manipulovat s tak malými objekty. Proto byla řada předpovězených úvah považována za utopie. Zásadní zlom v rozvoji nanotechnologií přinesl objev Skenovacího tunelovacího mikroskopu (STM - Scanning Tunneling Microscope) a mikroskopu atomových sil (AFM - Atomic Force Microscopy) v 80. letech 20. století. Od té doby dochází k exponenciálnímu nárůstu objevů, publikací, patentů a praktického použití nanotechnologií ve všech oborech lidské činnosti. [1]

## 2 Příprava nanočástic

Metody přípravy nanočástic lze rozdělit do dvou základních skupin. V první z nich fyzikálními postupy vytváříme stále menší částice z většího celku, je to tedy cesta vedoucí od makrolátky k nanostruktuře. Tyto metody se označují jako dispergační nebo také top-down (shora-dolů) metoda. V druhém případě se slučují jednotlivé atomy do větších částic, a tedy nanostruktury vytváříme přímo z jednotlivých atomů a molekul. Tato skupina se nazývá kondenzační nebo také bottom-up (zdola-nahoru) metody. [2], [4]



Obrázek 1: Metody přípravy kovových nanočástic [5]

## 2.1 Dispergační metody

Dispergace znamená rozbíjení větších shluků atomů a molekul na menší částice [6]. Vznik disperzní soustavy touto cestou vyžaduje vynaložení práce, kterou je nutno dodat k překonání působících mezimolekulárních sil [7]. Touto metodou dochází k postupnému zmenšování materiálu částic. To se může dít různým způsobem, např. laserovou ablací, kdy dochází působením vysoce energetického laserového paprsku k přehřátí určitého místa na povrchu pevné fáze a k následnému odtrhávání částic koloidních rozměrů. Nebo ultrazvukem, kdy ultrazvukové vlny o frekvenci nad 20 000 Hz vyvolávají v látkách periodické stlačování a roztahování, čímž vznikají drobné trhliny a dochází k rozpadu látky. Dále je možné použít mletí, jehož princip je založen na rozmělnění materiálu mlecími tělesy při nárazu na stěny nádoby. K tomuto účelu existuje řada mlýnů různých konstrukcí, např. kulové mlýny, koloidní, vibrační či proudové. [2], [7], [8] Dispergační metody nejsou při přípravě nanočástic kovů často používány. [4]

## 2.2 Kondenzační metody

Způsob výroby nanočástic kondenzačními nebo také bottom-up (zdola-nahoru) metodami je v současnosti nejvyužívanější. [2], [4] Kondenzačními metodami lze připravit vysoce dispergované a poměrně monodisperzní koloidní soustavy. Kondenzace lze dosáhnout buď fyzikálními metodami nebo chemickými reakcemi. V případě fyzikálních

metod jsou používány převážně metody založené na kondenzaci par kovů či uhlíku na vhodné podložce. Chemické postupy jsou podstatně využívanější, protože umožňují přípravu většího počtu koloidních soustav různého chemického složení. Z původně rozpustné látky se vhodnou chemickou reakcí vytvoří látka v daném prostředí nerozpustná. [8] U chemických metod je k dispozici řada reakcí, které vedou k vytvoření nerozpustného produktu. Jedná se o kontrolované chemické reakce jednotlivých složek iontů, ze kterých se skládá materiál nanočástic. Ionty vzájemně interagují a vytvářejí molekuly, které po uspořádání vytváří částice. Cílem je jejich růst při určité velikosti zastavit nebo přerušit. Toho může být docíleno teplotním skokem, změnou koncentrace, změnou difúzního koeficientu na membránách, filtrací apod. [2], [4]

### **2.2.1 Chemická redukce**

Oxidačně-redukčními reakcemi je možné připravit nanočástice kovů (redukční děje) i nekovů (oxidační děje) [8]. V současné době převládají v praxi tzv. “wet” metody přípravy kovových nanočástic, kdy je rozpustná sloučenina kovu redukována vhodným redukčním činidlem. Při chemické redukci rozpustné sloučeniny kovu vznikají atomy, spojující se při jejich dostatečném přesycení, tedy při dostatečné síle redukčního činidla, v roztoku do zárodků pevné fáze. Tyto zárodky mohou po dosažení kritické velikosti dále růst za vzniku stabilních nanočástic. Z hlediska konečné velikosti těchto částic je obvykle rozhodujícím okamžikem počáteční fáze reakce, kdy vzniká hlavní frakce zárodků. Přídavkem dalších látek do reakčního systému (stabilizátory) lze navíc ovlivňovat velikost, morfologii nebo stabilitu vznikajících nanočástic. [4], [9] Nejčastěji využívaným anorganickým redukčním činidlem je tetrahydridoboritan sodný  $\text{NaBH}_4$ . Z látek organické povahy je pro přípravu koloidních částic nejčastěji používán citrát sodný (trisodná sůl kyseliny citronové). [10]

### **2.2.2 Stabilizace nanočástic**

Nanočástice jsou nestálé z důvodu jejich agregace, což vede ke vzniku shluků. Ve většině případů má agregace za následek ztrátu vlastností spojovaných s koloidním stavem těchto nanočástic [5]. Podmínkou pro vytvoření stabilních nanostruktur je zabránit vzájemnému kontaktu nanočástic. Nanočástice mají snahu se spojovat, zvětšením svého objemu se snaží dosáhnout energetického minima. Při styku dvou nanočástic přirozeně dochází k jejich spojení a nanočástice zvětšují svoji velikost, rostou. Tomuto růstu se říká

Ostwaldův růst, kdy menší částice přirozeně předává elektron větší částici. Pro zabránění tomuto procesu se používají stabilizátory. Stabilizátory jsou látky, které na povrchu nanočástic vytvoří potenciální bariéru [2]. Stabilizátor je intaktní látka a neměl by zasahovat do chemické struktury částice, pouze se na ni fyzikální vazbou navázat. Existuje velké množství používaných stabilizátorů, které se obecně dělí do hydrofilní a hydrofobní skupiny. [11]

## **3 Studium vlastností nanočástic**

### **3.1 Metrologie nanočástic**

Nanometrologie se zabývá měřením rozměrů struktur na úrovni nanometrů. Základní typy metod mikroskopování nanočástic se dělí do dvou skupin. Do první patří mikroskopie skenovací sondou (Scanning Probe Microscopy, SPM) což jsou metody založené na pohybu sondy v těsné blízkosti povrchu pozorovaného objektu. Tato skupina se dělí na dva základní typy: skenovací tunelová mikroskopie (Scanning Tunneling Microscopy, STM) a mikroskopie atomárních sil (Atomic Force Microscopy, AFM). Druhou skupinou metod, používaným v nanometrologii jsou mikroskopické techniky založené na svazku částic, tedy skenovací elektronová mikroskopie (Scanning Electron Microscopy, SEM) a transmisní elektronová mikroskopie (Transmission Electron Microscopy, TEM). [12]

#### **3.1.1 STM mikroskop**

Skenovací tunelová mikroskopie byla vyvinuta v laboratořích IBM v roce 1981 [12]. Funkce skenovacího tunelového mikroskopu je založena na monitorování elektrického proudu, který protéká mezi vodivým vzorkem a hrotem ve vakuu bez jejich fyzického kontaktu. [1] STM mikroskop obsahuje vodivý hrot, který má vlastní vlnovou funkci materiálu. Ten se přiblíží na vzdálenost vlnové funkce materiálu vzorku. Vlnové funkce se vzájemně překryjí a vykompenzují (vyruší) tím vznikne v potenciálech “tunel“. Hrot i povrch vzorku tedy fungují jako elektrody a vzniká mezi nimi tunelový proud elektronů procházejících “tunelem” v potenciálové bariéře. Velikost tohoto proudu je úměrná tvaru a vzdálenosti elektrod (šířce potenciálové bariéry) a topografii povrchu. Hrot při skenování kopíruje povrch a změny řídicího napětí jsou použity pro zobrazování. [12]

### **3.1.2 AFM mikroskop**

Mikroskop atomárních sil byl vynalezen v roce 1986, o pět let později než STM [12]. Princip funkce AFM mikroskopu je založena na existenci přitažlivých a odpuzivých sil mezi hrotem a vzorkem v jejich těsné blízkosti, která je dána energetickým potenciálem [1]. Ostrý hrot je umístěn na konci pružného raménka s menší tuhostí, než je tuhost meziatomových vazeb. Hrot je veden po povrchu zkoumaného vzorku nebo nad ním v těsné blízkosti kmitá. [12] Je-li měření prováděno s hrotem ve větší vzdálenosti od povrchu vzorku, působí na něj přitažlivá síla a jedná se o bezkontaktní režim měření. Pokud je naopak hrot mikroskopu přiblížen na vzdálenost menší, než je hodnota vazebné vzdálenosti, bude na něj působit odpuzivá síla a hovoří se o měření v kontaktním režimu. [1]

### **3.1.3 TEM mikroskop**

První transmisní elektronový mikroskop byl postaven roku 1933. Konstrukce transmisního elektronového mikroskopu vychází z uspořádání běžného optického mikroskopu, pouze došlo k nahrazení jednotlivých částí. Světelný zdroj optického mikroskopu je nahrazen elektronovým dělem, které slouží jako zdroj elektronů. Skleněné čočky jsou nahrazeny čočkami elektromagnetickými a místo okuláru je fluorescenční stínítko. Díky tomu, že de Broglieho vlnová délka elektronů je řádově kratší než vlnová délka viditelného záření, dosahuje elektronový mikroskop lepšího rozlišení a zvětšení, a to až dvoumilionkrát. [1] Dráha elektronů od elektronového děla až po stínítko musí být ve vakuu, aby nedocházelo k absorpci elektronů molekulami vzduchu a k jejich kontaminaci částí mikroskopu. Výsledný obraz vzniká, když proud elektronů prochází vzorkem. Urychlovací napětí elektronů je 100 – 400 kV. Dále je obraz zvětšen a zaostřen čočkami na objektivu a objeví se na obrazovce. [12]

### **3.1.4 SEM mikroskop**

Princip rastrovacího elektronového mikroskopu je velmi podobný TEM mikroskopu, přesto byly první prakticky používané přístroje tohoto typu až v polovině 60. let 20. století [1]. Skenovací elektronový mikroskop SEM je přístroj určený k pozorování povrchů. Stejně jako u transmisního elektronového mikroskopu TEM se jedná o obdobu světelného mikroskopu, kde světelné paprsky nahrazuje elektronový svazek a obraz je



tvořen sekundárními nebo-li odraženými elektrony. Zdrojem elektronů ve špičce tubusu je přímo žhavené wolframové vlákno. Paprsek primárních elektronů je zkoncentrován elektromagnetickými čočkami. Před dopadem na povrch preparátů je rozpořívován vychylovacími cívkami tak, že pokryje řádky a tím skenuje malou plošku. Při dopadu elektronů na vzorek může nastat několik případů. Některé elektrony jsou absorbovány v závislosti na tloušťce a složení vzorku. To způsobí tzv. Amplitudový kontrast obrazu. Další elektrony jsou rozptýleny pod malými úhly, jejichž velikost závisí na složení vzorku, což způsobí tzv. fázový kontrast v obraze. V krystalických preparátech jsou elektrony rozptýleny do velmi odlišných směrů, které jsou závislé na krystalické struktuře, což způsobí tzv. difrakční kontrast obrazu. Některé z dopadajících elektronů mohou být odraženy a nazývají se zpětně odražené elektrony. [12]

## 3.2 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je optická metoda pro stanovení vlastností vzorku. Spektroskopické metody vychází z toho, že se při interakci s elektromagnetickým zářením excitují a následně deaktivují atomy, ionty, molekuly nebo radikály, případně jejich soubory. Na základě této interakce si hmota se zářením vyměňují energii, a proto jsou spektroskopické metody spojeny s absorpcí nebo emisí elektromagnetického záření. Princip spektrofotometrie spočívá v různém pohlcování světla v různých vlnových délkách. Pokud se měří jen při jedné vlnové délce, metoda se označuje fotometrie. Spektrofotometry umožňují měřit část libovolného absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek. Spektrofotometrické stanovení patří mezi nepřímé metody, kdy měření vychází ze vztahu měřené veličiny k různým jiným veličinám, s kterými podle své definice přímo nesouvisí. [13], [14]

Spektrofotometr se skládá ze čtyř částí: zdroje záření, monochromátoru nebo polychromátoru, vzorku a detektoru. Jako zdroj záření se nejčastěji používá wolframová, halogenová nebo deuteriová žárovka. V případě UV-VIS spektrofotometru, kdy se využívá ultrafialového záření, se jako zdroj používá vodíková nebo xenonová výbojka. Monochromátor zajišťuje propustnost pouze části spektra. V jednoduchých fotometrech se využívá interferenční filtr, který propustí jenom určité záření. Rozlišuje se několik druhů filtrů, jejichž vhodnou kombinací se sestaví filtr požadovaných vlastností. Low-pass filtry propouštějí světlo vlnových délek kratších, než je určitá mez (cut-off). High-pass filtry naopak propouštějí jen světlo, které má větší vlnovou délku, než je hraniční vlnová délka





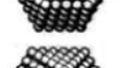

filtru. Pásmové filtry propouštějí určitý rozsah vlnových délek. U spektrofotometrů tvoří monochromátor hranol, reflexní mřížka nebo u polychromátoru Rowlandův kruh. Při měření vzorku se využívá plastová kyveta a u spektrometrů měřících v UV-VIS oblasti se vzorek proměřuje v křemenné kyvetě, z důvodu propustnosti UV záření. Detektor se skládá z fotonky nebo fotonásobiče. Ve fotonásobiči dochází k fotoelektrickému jevu, kdy dojde k vyražení elektronu. Signál, který dopadá na fotokatodu, se změní na elektrony a ty jsou dalším vyražením na dynodách zesilovány. [13] – [15]

### **3.2.1 Dvoupaprskový spektrofotometr**

Dvoupaprskové přístroje umožňují podstatně rychlejší měření, ale oproti klasickým jednopaprskovým jsou nákladnější. Při použití jednopaprskového spektrofotometru musí paprsek projít nejdříve měřeným a pak srovnávacím vzorkem. V případě použití dvoupaprskového spektrofotometru jsou využity dva svazky paprsku. Jeden svazek světla prochází měřeným vzorkem a druhý srovnávacím vzorkem. [14]

## **4 Využití nanočástic v biomedicínských oborech**

Nanostruktury nabízí díky svým jedinečným vlastnostem mnoho aplikací v biomedicíně. Zásadní předností jsou jejich malé rozměry. Ty jsou srovnatelné s rozměry buněk živých organismů, které dosahují velikosti 10 – 100  $\mu\text{m}$ , viry o velikostech 20 – 500 nm, proteiny 5 – 50 nm nebo geny, které mají šířku 2 nm a délku 10 – 100 nm. Velkou výhodou nanočástic je velká plocha jejich povrchu, jak je znázorněno na obr. 3. Povrch jednotlivých nanočástic může být modifikován a specificky funkcionalizován. Některé nanočástice mohou interagovat přímo s molekulami buněk i buněčných povrchů, aniž by změnilly chování reagujících molekul nebo své vlastní biochemické vlastnosti. [16]

Klastry atomů		Celkový počet atomů	Povrchové atomy (%)
1 klastr		13	92
2 klastry		55	76
3 klastry		147	63
4 klastry		309	52
5 klastrů		561	45
7 klastrů		1415	35

Obrázek 2: Rozložení a počty atomů na povrchu nanočástice [16]

Nanomedicína je označení pro uplatnění nanotechnologií při léčbě, diagnostice a monitorování nemocí. Přítomnost nanotechnologií v medicíně se zdá být relativně nedávný trend, základní nanotechnologické přístupy se však v lékařství používají již několik desetiletí. První příklad lipidových váčků, které se později staly známý jako lipozomy, byl popsán v roce 1965, první řízený uvolňovací systém polymerů makromolekul byl popsán v roce 1976 a první nanosenzor se objevuje v roce 2001. Nedávné studie o cílených nanočásticových kontrastních látkách pro včasnou charakterizaci aterosklerózy a kardiovaskulárních patologií na buněčné a molekulární úrovni mohou představovat nové hranice pro kombinování zobrazení a cíleného podávání léků. Nanotechnologie založené na manipulaci s vysoce účinnými “markery“ (značkovače cesty) a přesné kvantitativní detekční zařízení pro včasnou diagnostiku a pro sledování terapie bude mít široký vliv na léčbu pacienta, zlepšování kvality jeho života a snižování úmrtnosti u nemocí, jako je rakovina a Alzheimerova choroba. [17]

## 4.1 Kovové nanočástice

Kovové materiály se využívají hlavně kvůli jejich antibakteriálním účinkům. Antibakteriální efekt nanočástic je způsoben jejich malou velikostí a tím změnou vlastností částic. [18] Mezi ušlechtilé kovové nanočástice patří zlato, stříbro a platina. Neušlechtilé kovové nanočástice jsou měď, železo, hliník a jejich slitiny a sloučeniny. Ušlechtilé kovové nanomateriály jsou zajímavé díky jejich optickým, magnetickým a chemickým

vlastnostem. Antiseptické kovové nanočástice mají velký potenciál využití při nežádoucím růstu bakterií, který představuje již řadu let problém, a to nejen v současné medicíně, ale například i v potravinářském průmyslu. Použití kovových nanočástic s baktericidními vlastnostmi významnou alternativou existujících metod, jako jsou například antibiotika, které přestávají být účinné na stále více druhů bakterií, které získávají rezistenci vůči nim. Jeden z nejúčinnějších typů nanostruktur představují částice stříbra, které mají schopnost interagovat s proteiny obsaženými v bakteriálních membránách. Bylo zjištěno, že kovové nanočástice stříbra mají velmi silný antiseptický účinek pro velký počet bakteriálních kmenů. Tyto vlastnosti byly měřeny v různých laboratořích různými metodami. Ve všech případech byla jednoznačně potvrzena antiseptická aktivita. [3]

## 5 Nanočástice stříbra

Nanočástice stříbra jsou v současné době komerčně a aplikačně nejrozšířenějším typem nanočástic. Důvodem širokého spektra jejich využití je především jejich významná antibakteriální aktivita. [1] Svými specifickými vlastnostmi pomáhají stříbrné nanočástice bojovat proti bakteriálním infekcím [19]. Díky tomu, že roste odolnost mikrobiálních organismů vůči širokospektrým antibiotikům a zvyšují se nároky na cenu farmaceutických výrobků, začalo mnoho výzkumníků bádát po novém efektivním léku, který bude schopen účinně zabít mikroorganismy a nebude drahý. Antibakteriální účinek stříbrných iontů nebo solí je velmi dobře znám, ale účinek stříbrných nanočástic na mikroorganismy a antimikrobiální mechanismus je zatím stále předmětem výzkumu. [20] Mnohé studie již dokázaly, že ionty stříbra a sloučeniny obsahující stříbro jsou vysoce toxické pro mikroorganismy a vykazují silný biocidní efekt na více než 16 druhů bakterií ze skupin grampozitivních i gramnegativních. Stříbrné nanočástice navíc vykazují silné baktericidní vlastnosti i při velmi malých koncentracích. [18]

### 5.1 Využití antimikrobiálních vlastností stříbra

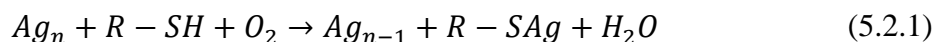
Již ve starověku si lidé všimli, že stříbro ničí nebezpečné choroboplodné zárodky. Je historicky známo, že už v době, kdy žil Alexandr Veliký, tedy několik set let před naším letopočtem, se vědělo, že voda k pití je bezpečná, pokud je uchovávána ve stříbrných nádobách. Tím se tento velký vojevůdce při svých válečných taženích vyvaroval řady infekcí přenosných vodou. V Římě se v bohatých patricijských domech potraviny

uchovávaly ve stříbrných nádobách a stříbrné mince se vhažovaly také do mléka. Ve středověku se zavedlo užívání stříbrného nádobí a příborů na všech panovnických dvorech a arabský vědec a lékař Avicenna aplikoval stříbrné soli k čištění krve. [21] Dále se od minulosti do dnešní doby v medicíně využívají stříbrné soli, stříbrné komplexy i sám kov. Biocidní aktivita stříbra souvisí s biologicky aktivními ionty stříbra, které se uvolňují z anorganických stříbrných solí a komplexů, jako je dusičnan stříbrný, uhličitan stříbrný a halogenidy stříbra. Jejich hlavní použití je lokální antimikrobiální ošetření drobných kožních poranění. Použití dusičnanu stříbrného (1% roztok) proti bakteriální infekci způsobenému zánětu spojivky u novorozeňat (oftalmia neonatorum) je stále běžná lékařská praxe, zejména v rozvojovém světě. Stříbrné soli jako je sulfadiazin stříbrný slouží k ochraně před infekcemi u pacientů s popáleninami a bércovými vředy. [22] Díky objevu antibiotik přestaly být tyto sloučeniny tak hojně využívány. Nanotechnologie však významně změnila vlastnosti kovů, a proto se stalo kovové stříbro ve formě nanočástic znovu využívaným. [19] Postupně bylo používání stříbrných solí ve vnitřním lékařství natrvalo nahrazeno jeho koloidní formou a v době první světové války už bylo stříbro v této formě podáváno nemocným nejen ústně, ale také nitrožilně. K užívání stříbra ve formě koloidního roztoku se přešlo proto, že v polovině 19. století byla podrobně popsána intoxikace solemi stříbra zvaná argyrie, projevující se viditelným zešednutím kůže. Medikamenty totiž v této době byly míchány ze stříbrného prášku, takže částice stříbra byly pro organismus příliš velké a navíc jich bylo mnoho. Onemocnění postihovalo také horníky ve stříbrných dolech. Platí pro každou látku, že co v nízké dávce pomůže, může být ve větším množství nebezpečné. [21] V současnosti se již nanostříbro využívá při omezení růstu bakterií, v dentální praxi, u katestrů, při léčbě popálenin a další. [20] V posledních letech roste odolnost bakterií vůči antibiotikům na základě vyvinutí nových bakteriálních kmenů. [18] Stříbrné nanočástice jsou proto důležité v případech, kdy se bakterie stávají rezistentní vůči antibiotikům [19]. Ionty stříbra také začínají být využívány pro pokrytí zdravotnických přístrojů antimikrobiální vrstvou [18]. Tento povlak může být účinnou strategií, aby se zabránilo infekci získané kvůli použití zařízení. [22]

## **5.2 Působení stříbrných nanočástic na mikroorganismy**

Toxicita stříbrných nanočástic pro mikroorganismy je dána chemickou reaktivitou jejich povrchu. Díky zmenšení rozměrů se výrazně zvětšuje povrch částice v poměru k objemu částice, což umožňuje lepší kontakt s mikroorganismem. Vzniká tím velký prostor pro

reakci, což zajišťuje speciální antimikrobiální vlastnosti nanočástic. Tyto částice menších rozměrů navíc snadněji pronikají buněčnou stěnou mikrobů a jsou tak ještě účinnější. Bakteriální membrána obsahuje proteiny obsahující síru, se kterými interagují stříbrné nanočástice: [23]



Antibakteriální aktivita stříbrných nanočástic je tedy spojena s interakcí s thiolovou skupinou obsaženou v proteinech. Stříbrné nanočástice také reagují s fosforem obsaženým ve sloučeninách jako je DNA. [24] Volné ionty stříbra  $Ag^+$  svojí katalytickou reakcí zabraňují funkci  $HS^-$  skupin oxidačních metabolických enzymů anaerobních organismů, které zajišťují jejich buněčné dýchání. Tím dochází k jejich odumření a následnému rozkladu. [1] Sulfhydrylová skupina  $-SH$ , která ve struktuře bakteriálních proteinů představuje jednu ze základních částí, se adsorbuje na povrch kovové nanočástice stříbra v disociované formě  $RS^-$ . Na povrchu částice se vytvoří vazba mezi sulfhydrylovou skupinou bakterie, iontem stříbra  $Ag^+$  a přebytečným elektronem, který vznikne v částici disociací jednoho atomu stříbra:



Přebytečný elektron, zůstává v částici. Pokud se částice zbaví přebytečného záporného náboje, oddělí se od klastru nebo dojde k oddělení organické molekuly s navázaným stříbrem  $RS-Ag$ . Tímto krokem se bakterie zbaví možnosti pokračování reprodukčního cyklu. Těžký kovový iont změní strukturu bakterie a ta v důsledku změny odumírá. Místo volné sulfhydrylové skupiny se vytváří vazba stříbrného iontu na místo vodíku a vzniká  $R-SAg$ . Po adsorpci  $R-SH$ , nebo jim podobných biologických sloučenin, na povrchu nanočástice dojde ke snížení absorpce plazmonového píku. To lze vysvětlit tím, že adsorbované molekuly změní strukturu elektronů na povrchu částice nebo jinými slovy zablokuje jeden povrchový atom, který se v přítomnosti kyslíku od nanočástice oddělí. Tento proces se může mnohonásobně opakovat, částice se zmenšuje až do vyčerpání všech atomů, které tvořily kovovou strukturu částice. Pak se tento efekt „likvidace“ zastaví. V běžných biologických prostředích vydrží částice několik týdnů i měsíců. [3]

### 5.3 Toxicita stříbrných nanočástic

V porovnání s jinými ionty těžkých kovů má stříbro pravděpodobně největší potenciál využití, protože v sobě spojuje vysokou antimikrobiální aktivitu s pozoruhodně nízkou toxicitou k lidskému tělu [22]. Naprostá většina těžkých kovů se chová jako buněčný jed, nicméně stříbrné nanočástice vykazují vynikající antibakteriální vlastnosti bez toho, aby byly toxické pro makroskopické organismy. Existuje několik studií uvádějící zdravotní nezávadnost nanočástic stříbra i ve velkém množství, které se jako jedinou toxickou reakcí projevuje šedomodrým zbarvením tkání kontaminovaného člověka, případně pocitem lehké chřipky, nazývané argyrie. Tato vleklá otrava stříbrem je historicky známá u lidí používajících k jídlu a jeho uchování stříbrné nádoby a byla často spojována s aristokratickou modrou krví. Nicméně při užívání nízkých dávek nanočástic stříbra dochází k pozitivnímu účinku na posílení imunitního systému. [1]

## 6 Experimentální část

Pro přípravu stříbrných nanočástic byla zvolena metoda bottom-up, kdy jsou chemickými postupy vytvářeny částice nanorozměrů. Připravené roztoky byly zkoumány spektrofotometricky, pomocí SEM mikroskopu a byla ověřena jejich bakteriologická účinnost.

### 6.1 Použité přístroje

- Analytické váhy
- Magnetické míchadlo s ohřevem ARE Heating Magnetic Stirrer
- UV-VIS spektrofotometr Specord 210 plus
- Odstředivka miniSpin plus
- Inkubátor environmental Shaker – Incubator ES 20
- Vortex Super-mixer
- SEM mikroskop Tescan Lyra 3
- SEM mikroskop Zeiss Ultra Plus

### 6.2 Použité chemikálie

- Dusičnan stříbrný  $\text{AgNO}_3$ , Lach-Ner p.a.
- Octan stříbrný  $\text{CH}_3\text{COOAg}$
- Citrát sodný  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$
- Želatina, Dorapis
- Chitosan



## 7 Příprava roztoků

Roztoky byly připravovány v laboratořích Fakulty biomedicínského inženýrství.

Jako zdroj stříbra byl použit dusičnan stříbrný  $\text{AgNO}_3$   $M[\text{AgNO}_3] = 170 \text{ g/mol}$  a octan stříbrný  $M[\text{CH}_3\text{COOAg}] = 167 \text{ g/mol}$ . Jako stabilizátory byly použity citrát sodný, chitosan acetát a želatina. Stabilizátory slouží ke stabilizaci velikosti nanočástic stříbra a zároveň mění jejich povrchové vlastnosti. Dále bylo použito redukční činidlo tetrahydridoboritan sodný  $\text{NaBH}_4$ . Všechny vodné roztoky byly připravovány s 3x destilovanou vodou.

### 7.1 Syntéza nanočástic stříbra s citrátem

Roztoky stříbrných nanočástic byly připravovány z dusičnanu stříbrného  $\text{AgNO}_3$  a z octanu stříbrného  $\text{CH}_3\text{COOAg}$ . Úlohu stabilizátoru v roztocích plnil citrát. Roztoky se lišily svou koncentrací, proto byly při přípravě objemy měněny dle výpočtu. Pro redukci roztoku bylo v některých případech, aby bylo možno porovnat jeho vliv, použito redukční činidlo tetrahydridoboritan sodný  $\text{NaBH}_4$ .

Ze zásobního roztoku  $\text{AgNO}_3$  bylo odebráno vypočítané množství dle výsledné koncentrace, které bylo naředěno 3x destilovanou vodou. Roztok byl za stálého míchání zahříván. Do vroucího roztoku byl pomalu po kapkách přidáván roztok citrátu. Vše za stálého míchání a varu. Po přidání celého objemu citrátu se začal roztok pomalu redukovat, což se projevilo barevnou změnou a z bezbarvého roztoku se stal světle žlutý. U určitých roztoků bylo přidáno malé množství tetrahydridoboritanu sodného  $\text{NaBH}_4$ , který způsobil prudkou redukci a roztok získal výrazně žlutou barvu.

### 7.2 Syntéza nanočástic stříbra s želatinou

Byly připravovány roztoky stříbrných nanočástic s želatinou, která slouží jako stabilizátor. Pro redukci roztoku bylo použito redukční činidlo tetrahydridoboritan sodný  $\text{NaBH}_4$ .

Ze zásobního roztoku  $\text{AgNO}_3$  byl odebrán vypočítaný objem dle žádoucí výsledné koncentrace. K odebranému množství byla přidána 3x destilovaná voda a vypočítané množství roztoku želatiny ze zásobního roztoku. V této fázi bylo přidáno malé množství

tetrahydridoboritanu sodného a roztok výrazně zežloutl. Roztok byl zamíchán a umístěn pod UV lampu při vlnové délce 254 nm.

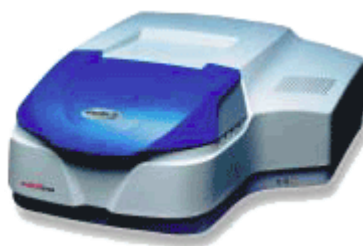
### 7.3 Syntéza nanočástic stříbra s chitosanem

Roztoky stříbrných nanočástic byly připravovány s chitosanem, který slouží jako stabilizátor. Pro redukci roztoku bylo použito redukční činidlo tetrahydridoboritan sodný  $\text{NaBH}_4$ .

Ze zásobního roztoku  $\text{AgNO}_3$  byl odebrán vypočítaný objem dle žádoucí koncentrace. K odebranému množství byla přidána 3x destilovaná voda a vypočítané množství roztoku chitosanu ze zásobní lahve. V této fázi bylo přidáno malé množství tetrahydridoboritanu sodného a roztok výrazně zežloutl. Roztok byl zamíchán a umístěn pod UV lampu při vlnové délce 254 nm.

## 8 Spektrofotometrie

Měření bylo provedeno pomocí dvoupaprskového UV-VIS spektrofotometru s chlazeným polovodičovým detektorem Specord 210 PLUS. Při měření byly vzorky v křemenných kyvetách, z důvodu propustnosti UV záření. Měřicí rozsah byl od 250 nm do 900 nm. [25]



Obrázek 3: Spektrofotometr Specord 210 PLUS [25]

Pík spektra určuje charakter kovových částic. Stříbrné nanočástice mají úzkou absorpci, způsobenou rezonancí lokalizovaného povrchového plazmonu. [23] Pro referenci bylo změřeno také spektrum roztoku bez stabilizátoru, kde se nevytvořily nanočástice a stříbro zůstalo ve formě atomů.

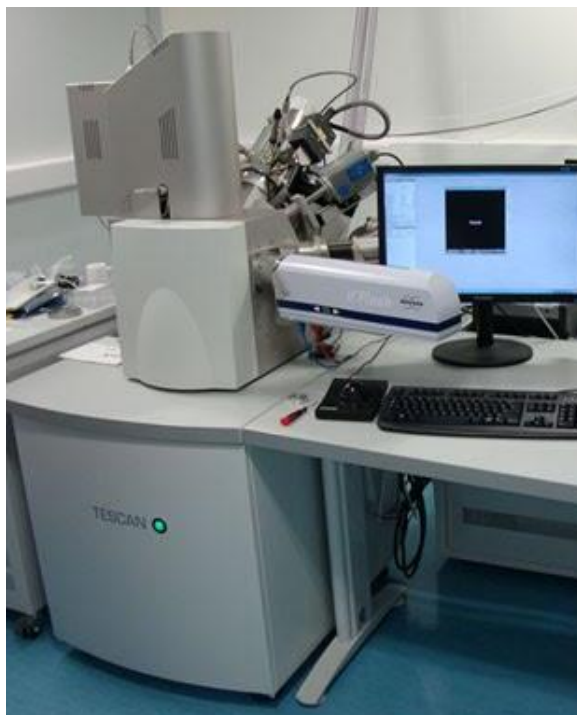
## 9 Mikroskopie

Pozorování pomocí SEM mikroskopu bylo prováděno na dvou pracovištích:

1. Ústav fotoniky a elektroniky Akademie věd České Republiky – UFE
2. Technická Univerzita Liberec - TUL

Na UFE byl k pozorování použit přístroj LYRA 3 TESCAN. Jedná se o multifunkční zařízení, které kromě SEM obsahuje další prvky jako iontový manipulátor, iontový litograf a další. Přístroj má urychlovací napětí elektronů 0,05 – 25 kV a hodnota vakua je cca  $10^{-5}$  Pa. Při přípravě roztoku před mikroskopováním byla na křemíkový substrát, přenesena kapka roztoku nanočástic. Poté se nechala odpařit vodní složka. Proces byl urychlen ohřevem. Po uschnutí byl křemíkový substrát nalepen pomocí teflonové pásky na stojan pro vzorky a přes přepouštěcí komoru umístěn do oblasti pro pozorování.

Na TUL byl k pozorování použit FEG SEM Zeiss Ultra Plus. Přístroj má rozsah urychlovacích napětí: 0,02 – 30kV. Postup přípravy roztoku před pozorováním se lišil. Na uhlíkovou vrstvu byla nalepena páska z teflonu, páska se odstranila a na uhlíkovou vrstvu se nanasla kapka roztoku. Po minutové prodlevě, určené k usazení částic, byla pomocí filtru odstraněna přebytečná vodní složka. Takto připravený vzorek byl umístěn do oblasti určené k pozorování.



Obrázek 4: Lyra 3 Tescan



Obrázek 5: FEG SEM Zeiss Ultra Plus

## 10 Statistika velikosti částic

Pomocí programu ImageJ byla vytvořena statistika velikostí vzniklých nanočástic. Software umožňuje nastavit měřítko dle známé vzdálenosti dvou bodů, v tomto případě měřítko na snímku ze SEM mikroskopu. Poté lze pomocí úsečky určit okraje částice a program vyhodnotí a uloží její velikost. Tento proces byl proveden u každého vzorku minimálně stokrát. Z takto získané množiny dat byly vytvořeny grafy rozdělení velikostí částic v roztoku. Pomocí Excelu byl vypočítán jejich průměr a směrodatná odchylka.

Vzorec pro výpočet aritmetického průměru velikosti částic:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (10.1)$$

Vzorec pro výpočet směrodatné odchylky velikostí částic:

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (10.2)$$

Ukázkový výpočet počtu nanočástic v roztoku stříbra: (10.3)

Znamé hodnoty:

Koncentrace sloučeniny stříbra v roztoku:  $c = 10^{-4} \text{ M}$

Naměřená průměrná velikost nanočástice:  $d = 18,5 \text{ nm}$

Relativní atomová hmotnost stříbra:  $M_{Ag} = 107,868$

Hustota stříbra:  $\rho_{Ag} = 10,49 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$

Výpočty:

Objem jednoho molu stříbra:

$$V_{\text{moluAg}} = \frac{M_{Ag}}{\rho_{Ag}} = \frac{107,868}{10,49} = 10,283 \text{ cm}^3$$

Objem stříbra v roztoku o koncentraci  $10^{-4} \text{ M}$  a objemu 1 ml:

$$V_{Ag} = 10,283 \cdot 10^{-4} \cdot 10^{-3} = 10,283 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^3 = 10,283 \cdot 10^{14} \text{ nm}^3$$

Objem nanočástice o průměru 18,5 nm:

$$V_{\text{částice}} = \frac{4}{3}\pi \cdot r^3 = \frac{4}{3}\pi \cdot 9,25^3 = 3\,315,23 \text{ nm}^3$$

Počet částic o průměru 18,5 nm v roztoku o objemu 1 ml:

$$n_{\text{částic}} = \frac{V_{Ag}}{V_{\text{částice}}} = \frac{10,283 \cdot 10^{14}}{3\,315,23} = 3,102 \cdot 10^{11} \text{ částic}$$

Ukázkový výpočet počtu atomů v jedné nanočástici: (10.4)

Znamé hodnoty:

Velikost nanočástice:  $d = 18,5 \text{ nm}$

Počet atomů v jednom molu (Avogadrova konstanta):  $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$

Počet částic o průměru 18,5 nm v roztoku o objemu 1 ml:  $n = 3,102 \cdot 10^{11}$

Výpočty:

Počet atomů v  $10^{-4}$  M roztoku o objemu 1 ml:

$$N = 6,023 \cdot 10^{23} \cdot 10^{-3} \cdot 10^{-4} = 6,023 \cdot 10^{16}$$

Počet atomů v jedné nanočástici o průměru 18,5 nm:

$$n_{\text{atomů}} = \frac{N}{n} = \frac{6,023 \cdot 10^{16}}{3,102 \cdot 10^{11}} = 194\,165 \text{ atomů}$$

## 11 Měření bakteriologické účinnosti

Měření bakteriologické účinnosti bylo provedeno na dvou pracovištích:

1. Mikrobiologický ústav Akademie věd České Republiky
2. Oddělení mikrobiologie kliniky dětského a dorostového lékařství Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Bakterie se rozdělují na dvě skupiny Gram pozitivní (G+) a Gram negativní (G-) na základě Gramova barvení. Toto dělení je založeno na různé stavbě bakteriální stěny. Grampozitivní bakterie mají stěnu tvořenou proteoglykanem a polysacharidy. Při barvení se krystalová violet dostává do buněk a tvoří s Luglovým roztokem modrou komplexní

barvu. Alkohol není schopný prostoupit buněčnou stěnou a rozpustit komplex. Dobarvení safraninem dodá bakteriím tmavě fialovou barvu. Gramnegativní bakterie mají stěnu tvořenou tenkou vrstvou proteoglykanu a vrstvou lipopolysacharidu. Při stejném postupu dochází k vyplavení komplexu alkoholem a k odbarvení. Safranin dobarví bakterie červeně. [26]

Pro testování baktericidní aktivity stříbrných nanočástic byly použity čtyři kmeny bakterií: Grampozitivní *Bacillus subtilis* a MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) a Gramnegativní *Escherichia coli* (C 600) a *Klebsiella pneumoniae* (KLPN).

*Bacillus subtilis* je sporulující aerobní bakterie. Je nepatogenní a žije v půdě. [27] MRSA je označení pro kmeny bakterie *Staphylococcus aureus*, které získaly rezistenci vůči antibiotiku methicilinu. *Staphylococcus aureus* neboli zlatý stafylokok je kulovitá bakterie zodpovědná za řadu infekčních onemocnění především hnisavých. [28] *E. coli* je součást fyziologické mikroflóry tlustého střeva většiny teplokrevných živočichů. [29] KLPN je nepohyblivá, zapouzdřená, laktózu fermentující, fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie tvořící součást běžné flóry v ústech, trávicím traktu a na kůži. [30]

Bakteriální kmeny byly kultivovány přes noc v kompletním médiu (LB). Za tuto dobu dosáhne kultura stacionární fáze s obsahem  $10^8 - 10^9$  buněk/ml. Z výchozí bakteriální kultury byl odebrán 1 ml kultury do Eppendorfových zkumavek, dle počtu testovaných vzorků. Roztoky byly centrifugovány 3 minuty při 10 000 ot/min. Bakterie zůstaly na dně Eppendorfovy zkumavky a bujón byl odstraněn. Takto získané kultury byly resuspendovány:

1. v 1ml suspenze Ag partikulí = experimentální vzorek
2. v 1 ml pufru = kontrolní vzorek

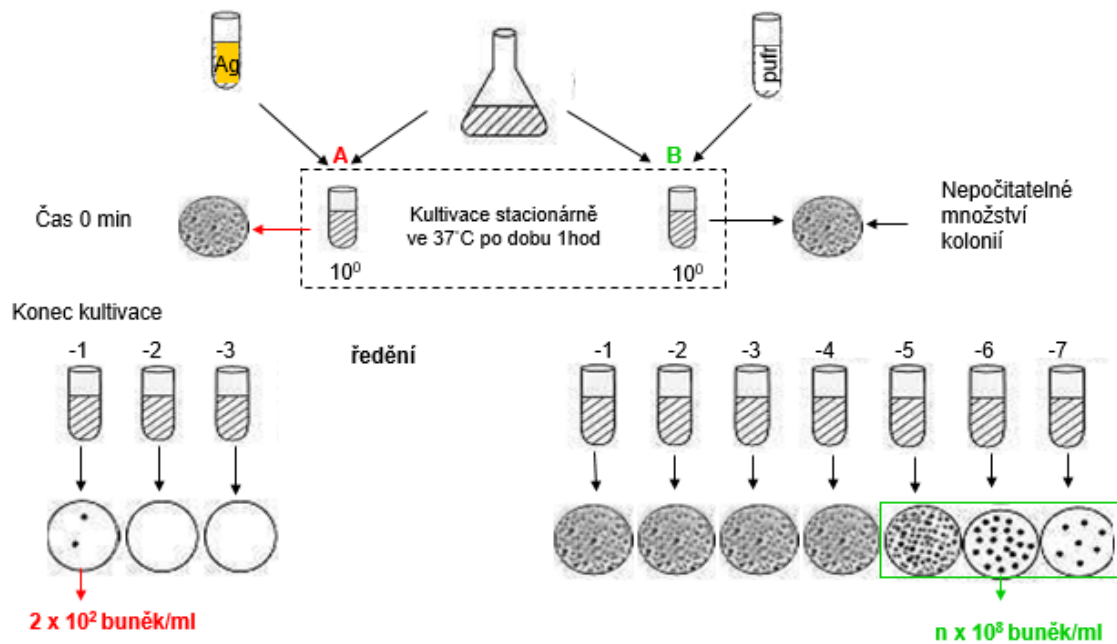
Po 1 hod kultivace (třepání při 37°C) byla připravena ředění fyziologickým roztokem 1:10, tak aby bylo možné spočítat izolované kolonie. Pro experimentální vzorek bylo provedeno ředění  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ . Pro referenční vzorek až do  $10^{-7}$ . 100 µl tekuté kultury bylo rozetřeno na Petriho misky s LA médiem (LA = LB s 1,5% agaru) se složením:

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
destilovaná voda	1000 ml

před autoklávováním pH upravené na 7,2 – 7,4

Pro experimentální vzorek byla vysévána ředění  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ . Pro referenční vzorek  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ .

Z výchozí bakteriální kultury narostlé přes noc (obsahuje řádově  $10^8$  buněk/ml) centrifugujeme 2 x 1 ml kultury a resuspendujeme: **A)** v 1 ml suspenze Ag partikulí = experimentální vzorek; **B)** v 1 ml fyziologického roztoku = referenční vzorek



Obrázek 6: Znázornění experimentu

Druhý den byl spočítán počet kolonií vyrostlých na experimentálním i kontrolním vzorku. Byl určen počet bakterií v použité suspenzi (titr CFU/ml). CFU – Colony forming unit znamená jednu bakterii tvořící jednu kolonii.

Ukázkový výpočet CFU/ml titru:

(11.1)

Počet CFU	Ředění	Objem
45	$10^{-1}$	100 $\mu$ l
450	$10^{-1}$	1 ml
$4,5 \cdot 10^2$	$10^{-1}$	1 ml
$4,5 \cdot 10^3$	$10^0$	1 ml

$$\text{CFU} = 4,5 \cdot 10^3 / \text{ml}$$

Byl vypočítán bakteriální účinek příslušného roztoku nanočástic podle vzorce:

$$\text{Účinnost} = \frac{\text{CFU/ml v kontrolním vzorku} - \text{CFU/ml v experimentálním vzorku}}{\text{CFU/ml v kontrolním vzorku}} \cdot 100\% \quad (11.2)$$

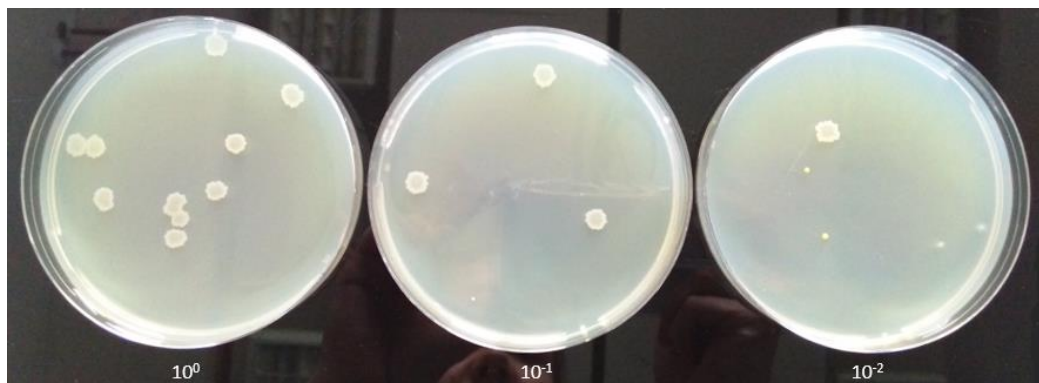
Ukázkový výpočet bakteriálního účinku:

CFU kontrolního vzorku:  $1,36 \cdot 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$

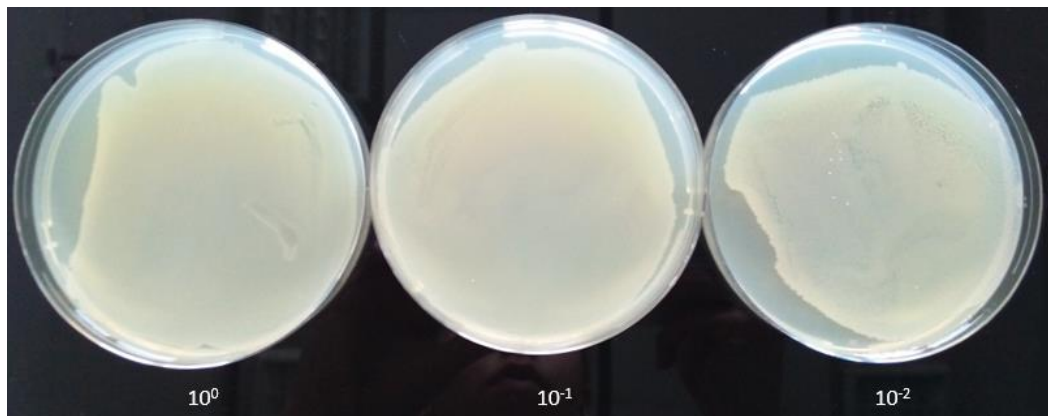
CFU experimentálního vzorku:  $4,5 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$

$$\text{Účinnost} = \frac{1,36 \cdot 10^9 - 4,5 \cdot 10^3}{1,36 \cdot 10^9} \cdot 100\% = 99,9996 \%$$

Bakteriální účinek  $> 99,99 \%$  je považován za výborný. [31]

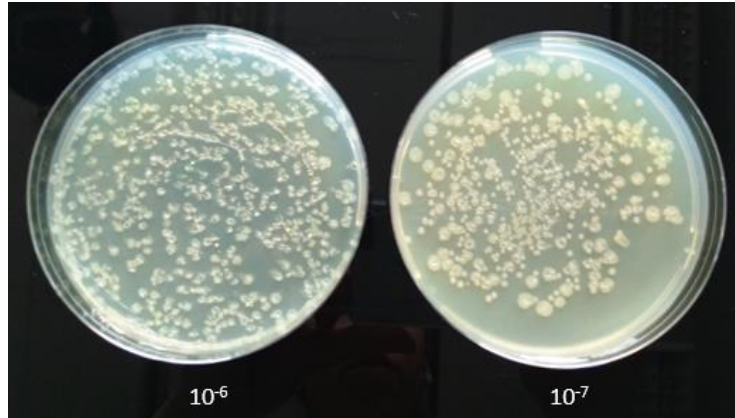


Obrázek 7: Pozitivní výsledek



Obrázek 8: Negativní výsledek





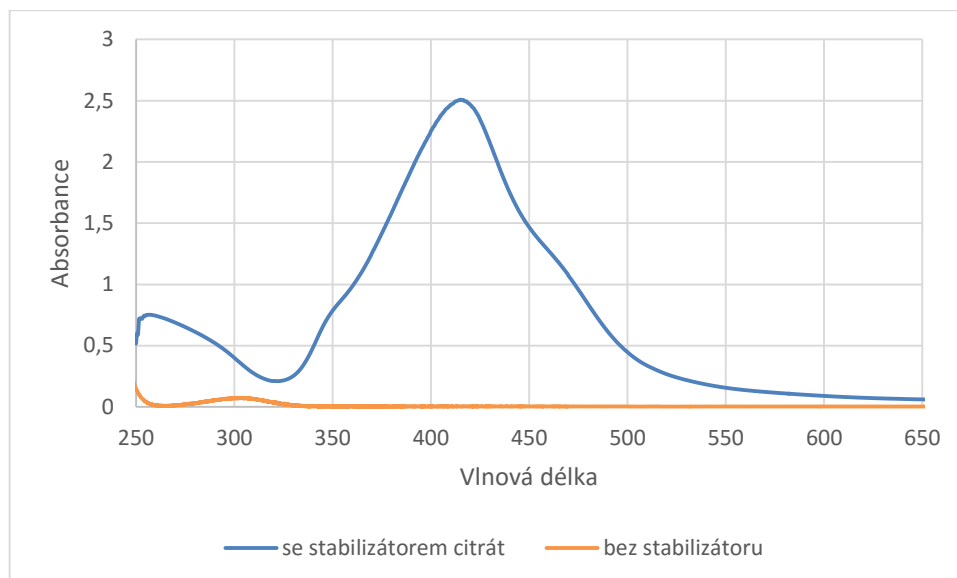
Obrázek 9: Referenční vzorek

## 12 Výsledky

V rámci experimentální části práce byly připraveny různé roztoky lišící se stabilizátorem, koncentrací a dalšími parametry, jejichž vliv byl porovnáván. Pro přehlednost jsou ve výsledcích nejprve prezentovány roztoky s různými stabilizátory a uvedeny jejich charakteristiky – optické spektrum, snímek ze SEM mikroskopu, statistika velikosti nanočástic a bakteriologická účinnost. Poté jsou porovnávány jednotlivé roztoky dle určitých parametrů – přítomnost redukčního činidla, koncentrace a substrát, ze kterého bylo získáno stříbro.

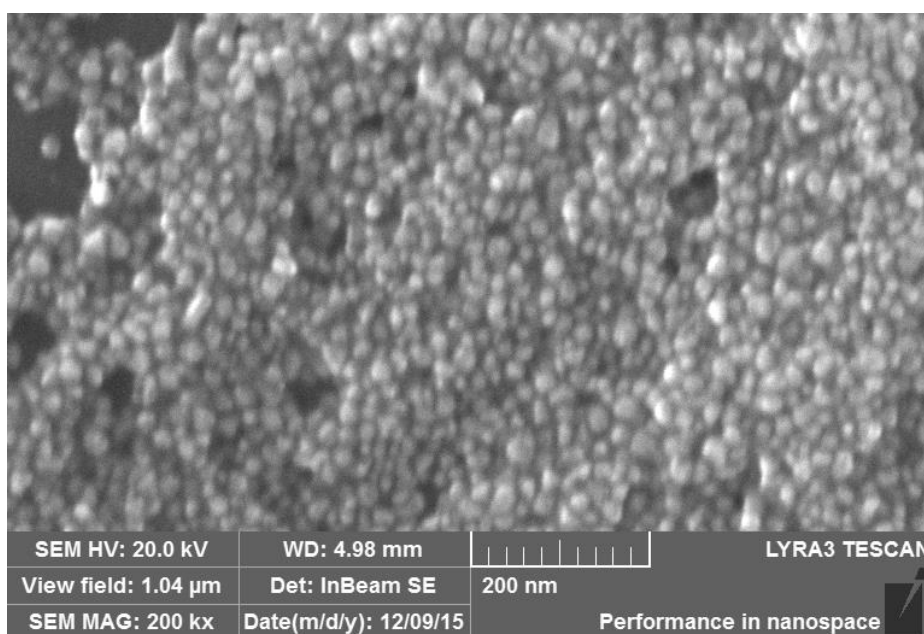
### 12.1 Nanočástice stříbra s citrátem

Pomocí spektrofotometru bylo změřeno optické spektrum roztoku stříbrných nanočástic s citrátovým stabilizátorem. Pro porovnání je ve stejném grafu uvedeno i změřené spektrum dusičnanu stříbrného bez stabilizátoru. Pík spektra určuje kovový charakter roztoku. Kovový charakter částice ji umožní při reakci s bakterií odskočit od jejího povrchu a reagovat opětovně s další. To je teoreticky možné tolikrát, kolik je v částici přítomno atomů stříbra. Tímto způsobem může jedna nanočástice zabít stovky bakterií. Roztok dusičnanu stříbrného bez stabilizátoru má ve svém spektru pouze malý pík, protože je v něm přítomno malé množství kovových nanočástic a většina stříbra zůstala ve formě atomů. Kovové nanočástice v tomto roztoku vznikly důsledkem toho, že atomy stříbra kolem sebe ve vodném roztoku vlivem světelného záření vytvoří malou vrstvu oxidu. Kdyby příprava roztoku proběhla v absolutní tmě, kovové nanočástice by se nevytvořily a pík by nebyl přítomný. Ve spektru roztoku nanočástic stříbra s citrátem naopak můžeme vidět výrazný pík s maximem u vlnové délky 416,5 nm. Při této vlnové délce absorbuje roztok nejvíce světla. Toto absorbované záření leží ve viditelné části spektra, proto se lidskému oku látka jeví barevná a má barvu doplňkovou k barvě absorbovaného světla. V měřeném případě je absorbovaná vlnová délka modrá a látka se jeví jako žlutá. Citrát působí jako elektrofobní látka, která na povrchu částice zředuje koncentraci povrchových elektronů. Díky tomu mají elektrony více volnosti pro kmitání a plazmonová excitace se posouvá k delším vlnovým délkám. Proto je pík spektra se stabilizátorem posunutý více doprava.



Graf 1: Optické spektrum stříbrných nanočástic s citrátem

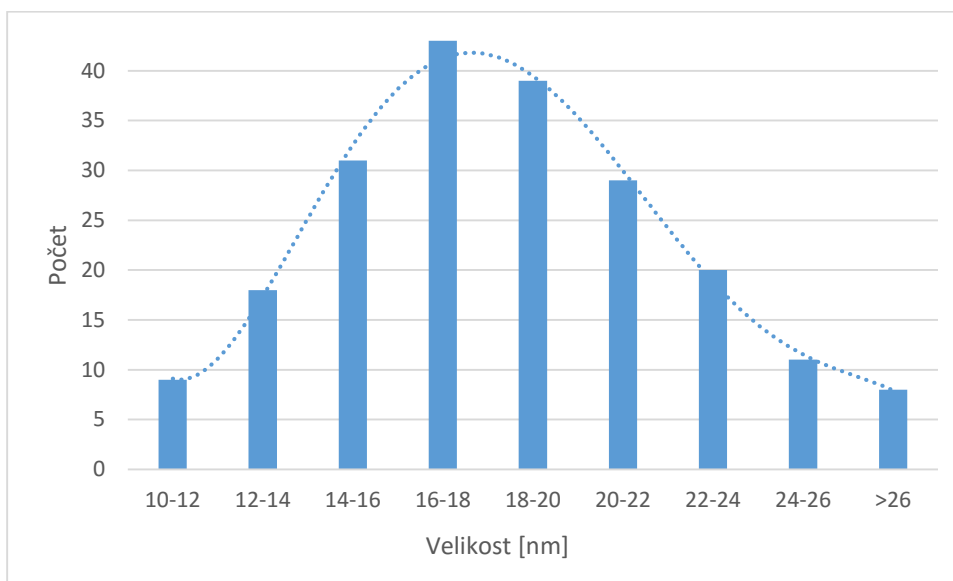
Stříbrné nanočástice s citrátem byly pozorovány pomocí SEM mikroskopu. Na snímku pořízeného SEM mikroskopem (obrázek 10) lze vidět nanočástice stříbra ve formě kuliček. Jednotlivé nanočástice společně vytvářejí shluky.



Obrázek 10: Nanočástice stříbra s citrátem

Roztok nanočástic stříbra s citrátem obsahuje různě velké částice. Malé nanočástice jsou elektrofilní a mají charakter elektrodonoru. Malá částice proto snadno předá elektron

větší částici, která se stane záporně nabitou a přitahuje k sobě další malé částice, které jsou nabitě záporně. Tento proces se označuje jako Ostwaldův růst.



Graf 2: Rozdělení velikosti nanočástic v roztoku

V grafu 2 je uvedeno statistické rozložení velikosti vzniklých nanočástic. Měření bylo provedeno dle postupu uvedeném v metodice. Je patrné, že velikost nanočástic přibližně odpovídá normálnímu rozdělení.

Statistické údaje:

Průměrná velikost částic:	18,5 nm	Dle vzorce (10.1)
Směrodatná odchylka:	4,1 nm	Dle vzorce (10.2)
Přibližný počet nanočástic v 1 ml:	$3,102 \cdot 10^{11}$	Dle postupu (10.3)
Přibližný počet atomů v jedné nanočástici:	194 165	Dle postupu (10.4)

Připravené roztoky byly testovány, zda účinkují na vybrané kmeny bakterií. Experiment byl proveden dle postupu uvedeného v metodách a výpočet účinnosti je proveden dle vzorce (11.2). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Bakteriální účinnost roztoků nanočástic stříbra s citrátem

Roztok připraven	Pokus proveden	Složení a koncentrace roztoku	Bakterie	Účinnost
13. 3. 2015	18. 3. 2015	$1 \cdot 10^{-4}$ M AgNO <sub>3</sub> + $1 \cdot 10^{-4}$ M citrát	G– E. coli	99,9524 %
			G+ B. subtilis	> 99,9991 %
30. 3. 2015	31. 3. 2015	$1 \cdot 10^{-4}$ M AgNO <sub>3</sub> + $1 \cdot 10^{-4}$ M citrát	G– E. coli	0 %
			G+ B. Subtilis	0 %
30. 3. 2015	1. 4. 2015	$1 \cdot 10^{-3}$ M AgNO <sub>3</sub> + $6 \cdot 10^{-4}$ M citrát	G– KLPN	90 %
			G+ MRSA	99,9998 %
30. 3. 2015	15. 4. 2015	$1 \cdot 10^{-3}$ M AgNO <sub>3</sub> + $6 \cdot 10^{-4}$ M citrát	G– E. coli	100 %
			G+ B. subtilis	< 90 %
4. 12. 2015	16. 12. 2015	$2 \cdot 10^{-4}$ M CH <sub>3</sub> COOAg + $5 \cdot 10^{-4}$ M citrát	G– E. coli	99,9997 %
			G+ B. subtilis	0 %

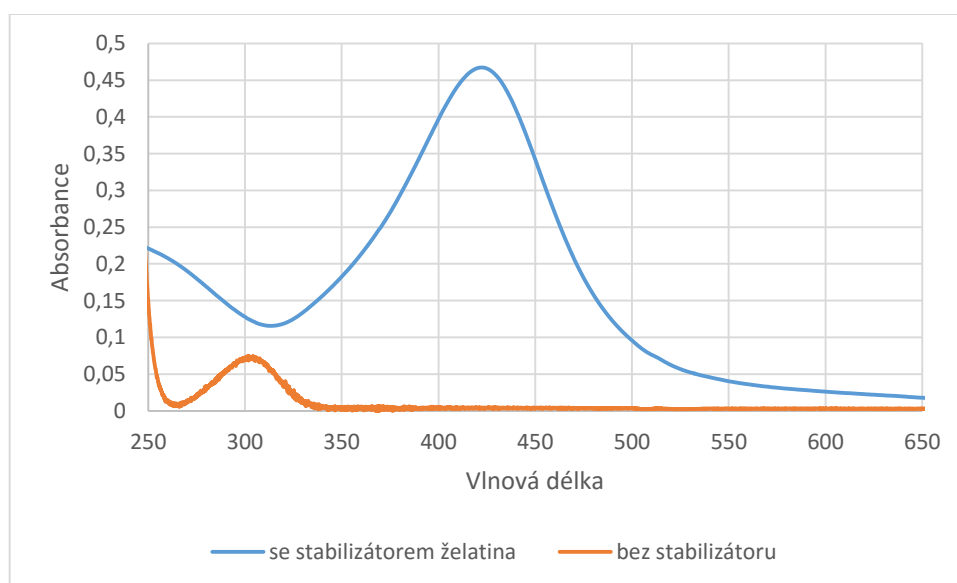
Experiment byl proveden s několika různými roztoky, které se lišily svou koncentrací a datem výroby. Datum provedení pokusu je uveden z důvodu orientace, jak starý byl roztok při provedení experimentu. Z vypočítaných hodnot účinností vyplývá, že kromě jednoho jsou všechny roztoky velmi dobře účinné alespoň na jeden druh bakterie. Významným výsledkem je 99,9998 % účinnost na grampozitivní bakterii MRSA. Tato bakterie, odolná vůči antibiotikům methicilin, byla odebrána při výtěru pacientovi. Stále více bakterií se stává odolnými vůči antibiotikům a tak významná účinnost připravených roztoků jim dává velký potenciál při boji s infekcemi, na které nejsou antibiotika neúčinná. Roztok připravený 13. 3. 2015 měl vynikající účinnost na grampozitivní Bacillus subtilis. Na gramnegativní E. coli působily výborně roztoky připravené 30. 3. 2015 a 4. 12. 2015. Roztok připravený 4. 12. 2015 byl na rozdíl od všech předchozích připraven z citrátu stříbrného místo dusičnanu stříbrného. Citrát stříbrný má méně kovový charakter, jak je podrobněji uvedeno v poslední kapitole výsledků, a proto je biokompatibilnější a pro tělo představuje menší zátěž. Jeho účinnost je tedy také významným zjištěním.

Neúspěch některých experimentů může být přisuzován mnoha faktorům, které se nám doposud nepodařily objasnit. Je možné jej přisuzovat nevhodné velikosti vzniklých částic. Obecně předpokládáme, že čím menší jsou částice, tím větší mají účinnost.

## 12.2 Nanočástice stříbra s želatinou

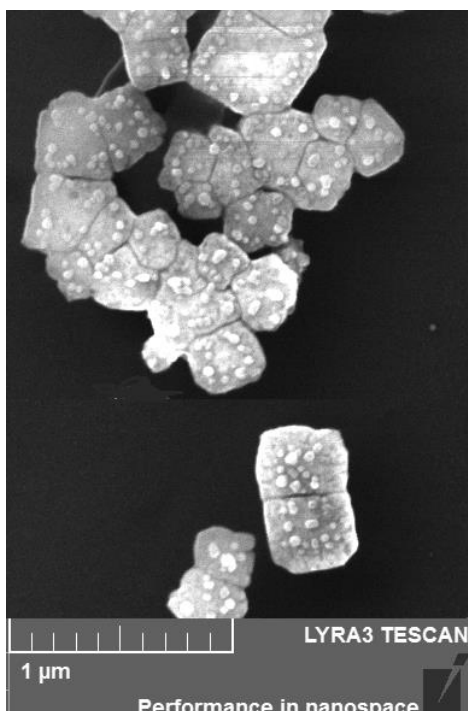
Pomocí spektrofotometru bylo změřeno optické spektrum stříbrných nanočástic se stabilizátorem želatina. Ve stejném grafu je uvedeno i referenční spektrum dusičnanu stříbrného bez stabilizátoru, který má malý pík, což je vysvětleno v minulé kapitole. Pík

spektra roztoku s želatinou dosahuje svého maxima pro vlnovou délku 422 nm. Při této vlnové délce absorbuje roztok nejvíce světla. Toto absorbované záření leží ve viditelné části spektra, proto se lidskému oku látka jeví barevná a má barvu doplňkovou k barvě absorbovaného světla. V měřeném případě je absorbovaná vlnová délka modrá a látka se jeví jako žlutá. Želatina stejně jako citrát působí jako elektrofobní stabilizátor, který na povrchu částice zředuje koncentraci povrchových elektronů. Proto je pík spektra se stabilizátorem posunutý k delším vlnovým délkám, jelikož mají elektrony více volnosti pro kmitání.

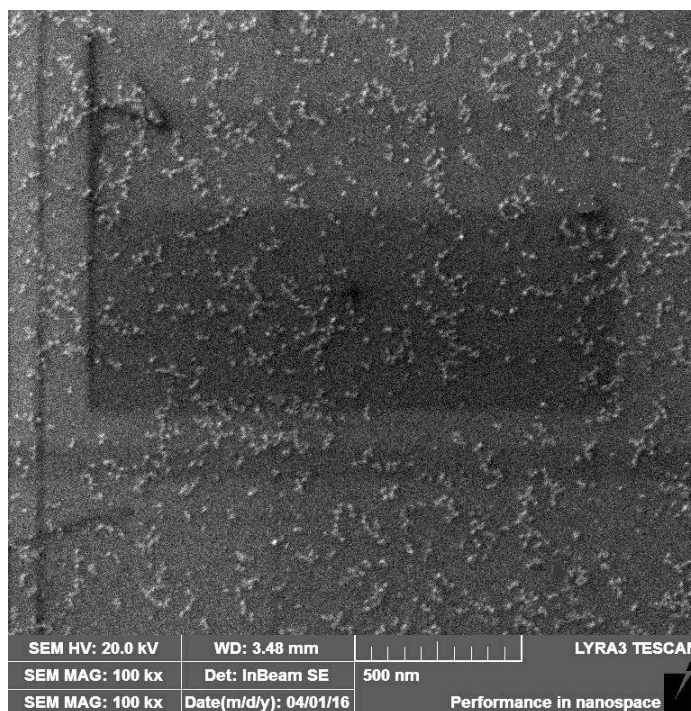


Graf 3: Optické spektrum stříbrných nanočástic s želatinou

Nanočástice stříbra s želatinou byly pozorovány pomocí SEM mikroskopu. Na obrázku 11 lze vidět shluky nanočástic obalené stabilizátorem želatina. Důsledkem toho, že má želatina krystalovou strukturu se vytvořily tvary podobající se n-úhelníkům. Tyto útvary zřejmě vznikly přípravou roztoků před mikroskopováním, jelikož byly pro urychlení sušení vodné složky roztoky ohřáty. Na obrázku 12 lze vidět jednotlivé nanočástice, které zůstaly volně v roztoku.

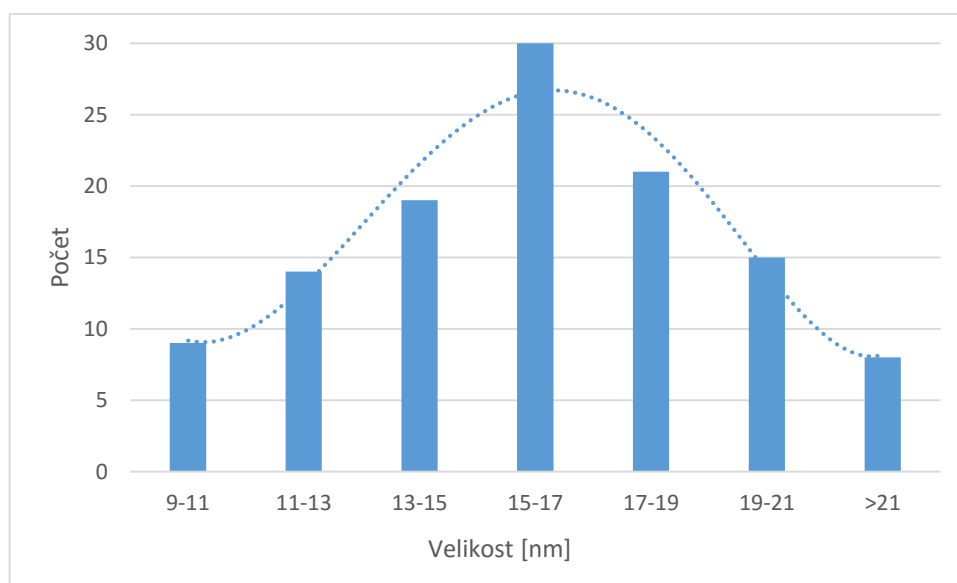


Obrázek 11: Shluky nanočástic stříbra s želatinou



Obrázek 12: Nanočástice stříbra s želatinou

Roztok nanočástic stříbra s želatinou obsahuje různě veliké částice, proto je v grafu 4 uvedeno statistické rozložení jejich velikosti. Je patrné, že velikost nanočástic přibližně odpovídá normálnímu rozdělení.



Graf 4: Rozdělení velikosti nanočástic v roztoku

Statistické údaje:

Průměrná velikost nanočástic:	16,1 nm	Dle vzorce (10.1)
Směrodatná odchylka:	3,4 nm	Dle vzorce (10.2)
Přibližný počet nanočástic v 1 ml:	$4,676 \cdot 10^{11}$	Dle postupu (10.3)
Přibližný počet atomů v jedné nanočástici:	128 816	Dle postupu (10.4)

Připravené roztoky byly testovány, zda účinkují na vybrané kmeny bakterií. Experimenty byl proveden dle postupu uvedeného v metodách a výpočet účinnosti je proveden dle vzorce (11.2). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Účinnost roztoků nanočástic stříbra s želatinou

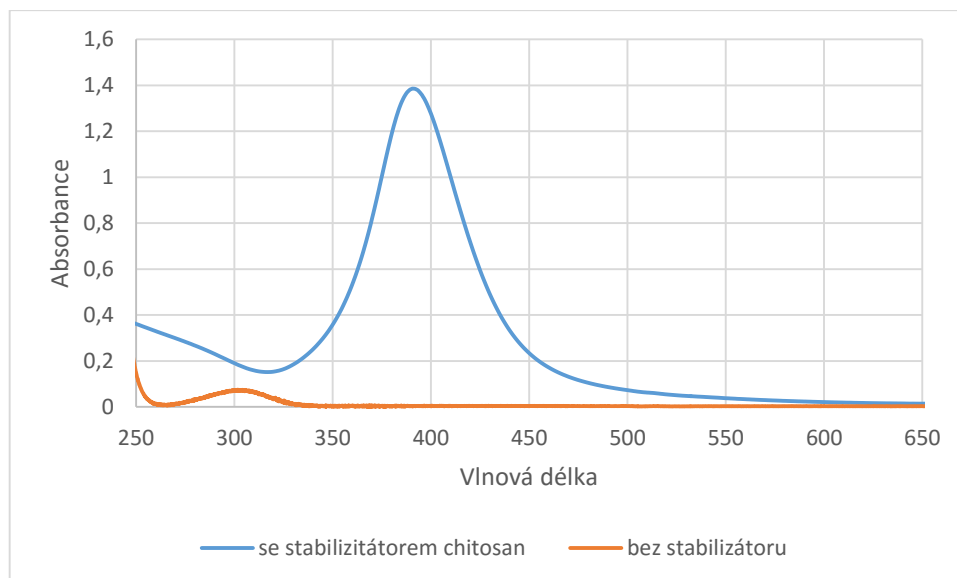
Roztok připraven	Pokus proveden	Složení a koncentrace roztoku	Bakterie	Účinnost
13. 3. 2015	18. 3. 2015	$1 \cdot 10^{-4}$ M AgNO <sub>3</sub> + 2 · 10 <sup>-3</sup> % želatina	G– E. coli	0 %
			G+ B. subtilis	0 %
13. 3. 2015	15. 4. 2015	$1 \cdot 10^{-4}$ M AgNO <sub>3</sub> + 2 · 10 <sup>-3</sup> % želatina převařený	G– E. coli	100 %
			G+ B. subtilis	99,9996 %

Experiment byl proveden opakovaně s jedním roztokem. Při prvním pokusu se vzorky jeví jako neúčinné. Usoudili jsme, že sám roztok může být nějakou bakterií kontaminován, roztoky proto byly převařeny. Při dalším pokusu se účinnost roztoků se poté projevila. Lze tedy konstatovat, že připravený roztok účinkuje velmi dobře jak na grampozitivní, tak na gramnegativní bakterie.

### 12.3 Nanočástice stříbra s chitosanem

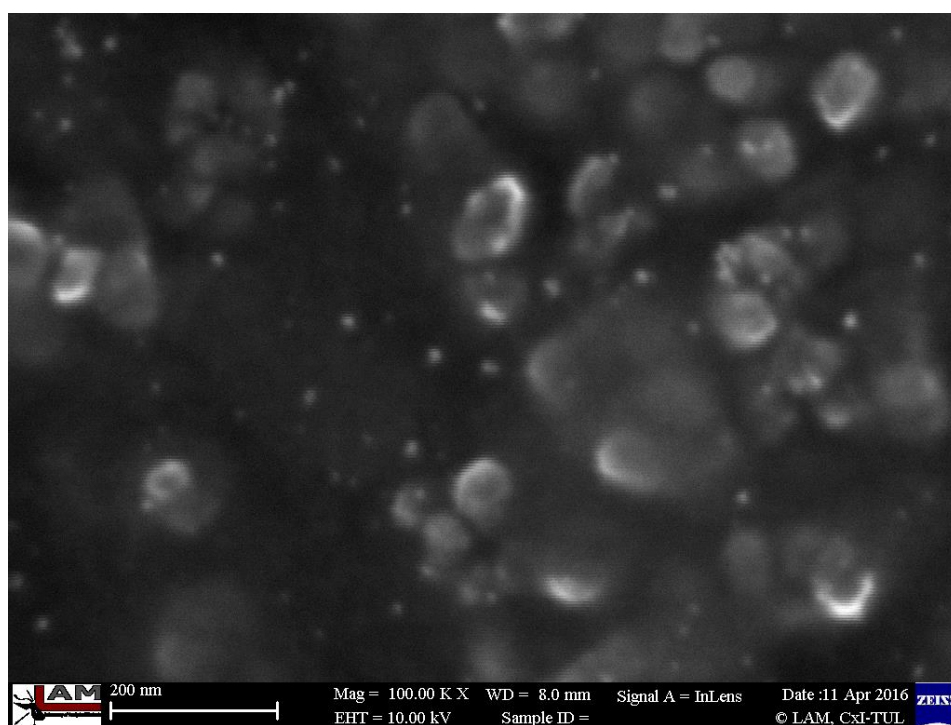
Pomocí spektrofotometru byla změřena optická spektra roztoků stříbrných nanočástic se stabilizátorem chitosan. Pro porovnání je ve stejném grafu uvedeno i referenční spektrum dusičnanu stříbrného bez stabilizátoru. Pík grafu roztoku s chitosanem je velmi úzký a dosahuje svého maxima pro vlnovou délku 391 nm. To je u kratší vlnové délky než u stabilizátorů citrát a chitosan, uvedených výše. Z toho plyne, že chitosan je více elektrofilní a ubírá méně elektronů atomům stříbra.





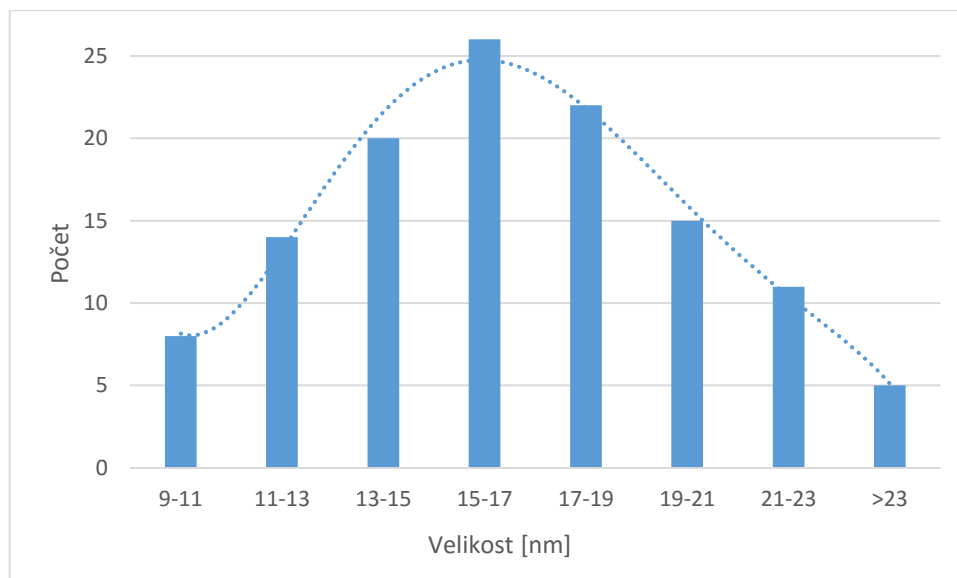
Graf 5: Optické spektrum stříbrných nanočástic s chitosanem

Nanočástice stříbra s chitosanem byly pozorovány pomocí SEM mikroskopu.



Obrázek 13: Nanočástice stříbra s Chitosanem

Na obrázku 13 lze vidět jednotlivé nanočástice obalené tenkou vrstvou stabilizátoru a dále větší útvary, které zřejmě vznikly koagulací částic.



Graf 6: Rozdělení velikosti nanočástic v roztoku

Roztok nanočástic stříbra s chitosanem obsahuje různě velké částice. Z grafu 5 je patrné, že rozložení výskytu částic o různé velikosti odpovídá normálnímu rozdělení.

Statistické údaje:

Průměrná velikost částic:	16,6 nm	Dle vzorce (10.1)
Směrodatná odchylka:	3,7 nm	Dle vzorce (10.2)
Přibližný počet nanočástic v 1 ml:	$4,323 \cdot 10^{11}$	Dle postupu (10.3)
Přibližný počet atomů v jedné nanočástici:	139 322	Dle postupu (10.4)

Připravené roztoky byly testovány, zda účinkují na vybrané kmeny bakterií. Experimenty byly provedeny dle postupu uvedeného v metodách a výpočet účinnosti je proveden dle vzorce (11.2). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

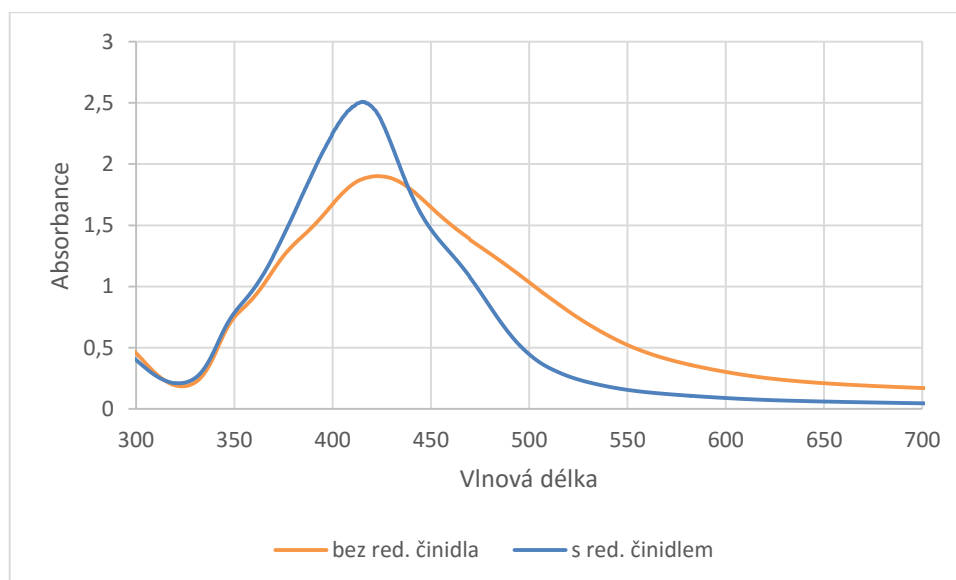
Tabulka 3: Účinnost roztoků nanočástic stříbra s chitosanem

Roztok připraven	Pokus proveden	Složení a koncentrace roztoku	Bakterie	Účinnost
30. 3. 2015	1. 4. 2015	$1 \cdot 10^{-3}$ M AgNO <sub>3</sub> + $5 \cdot 10^{-2}$ % chitosan	G– KLPN	99,9900 %
			G+ MRSA	> 99,9998 %
30. 3. 2015	15. 4. 2015	$1 \cdot 10^{-3}$ M AgNO <sub>3</sub> + $5 \cdot 10^{-2}$ % chitosan	G– E. coli	99,9994 %
			G+ B. subtilis	< 90 %

Experiment byl proveden opakovaně s jedním roztokem stříbra s chitosanem, který velmi dobře účinkoval. Opět je největším úspěchem vysoká účinnost na grampozitivní bakterii MRSA. Na gramnegativní bakterii Klebsiella (KLPN) roztok účinkoval o něco méně, výsledek je však stále považován za výborný. Při druhém pokusu naopak z výsledků vyplývá, že roztok působil mnohem lépe na gramnegativní bakterii E. coli a na grampozitivní B. subtilis byl účinný málo. Je možné se domnívat, že roztok ovlivnilo jeho stáří nebo že B. subtilis je proti danému roztoku více odolný než MRSA.

## 12.4 Porovnání roztoků $\text{AgNO}_3$ s citrátem s a bez redukčního činidla

Byly porovnávány dva vzorky nanočástic stříbra s citrátem spektrofotometricky a pomocí SEM mikroskopu a na základě snímků z něj byly vypočítány statistické údaje. Oba roztoky měly stejné složení:  $1 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{AgNO}_3$  +  $1 \cdot 10^{-3}$  M citrát a liší se pouze přidáním malého množství redukčního činidla  $\text{NaBH}_4$ . Redukční činidlo způsobí zastavení shlukování atomů a vytvoří se menší částice, kterých je v roztoku více.



Graf 7: Spektrum roztoků s a bez redukčního činidla

Ze spekter roztoků je zřejmé, že vzorek obsahující redukční činidlo má vyšší a užší pík. Má tedy větší kovový charakter a částice v něm jsou dle předpokladu menší. Pík roztoku s redukčním činidlem dosahuje svého maxima při vlnové délce 415 nm. Pík roztoku bez redukčního činidla dosahuje svého maxima při vlnové délce 430 nm.

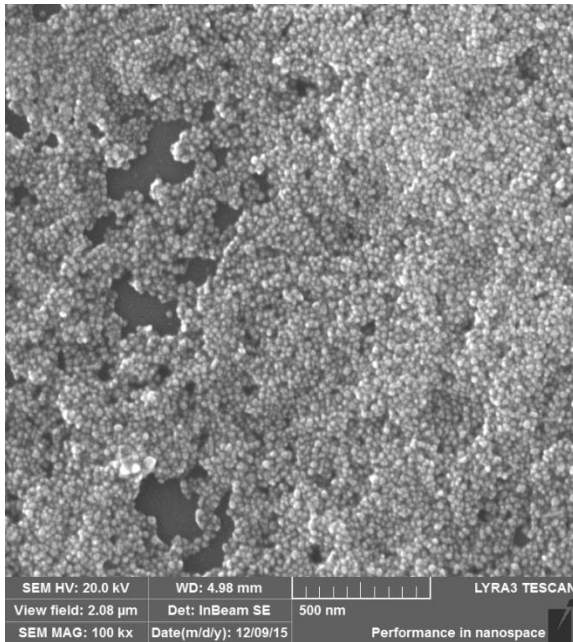
roztoku bez redukčního činidla je nižší, širší a má své maximum při vlnové délce 422 nm. V nezredukovaném roztoku je stabilizátor více elektrofobní a více zředí koncentraci povrchových elektronů. Díky tomu mají elektrony více volnosti pro kmitání a plazmonová excitace se posouvá k větším vlnovým délkám a není tak výrazná. Čím je pík posunutý k delším vlnovým délkám, tím jsou částice větší.

Redukční činidlo způsobí redukci roztoku, která se projeví barevnou změnou. Roztok se změní z bezbarvého na žlutý.

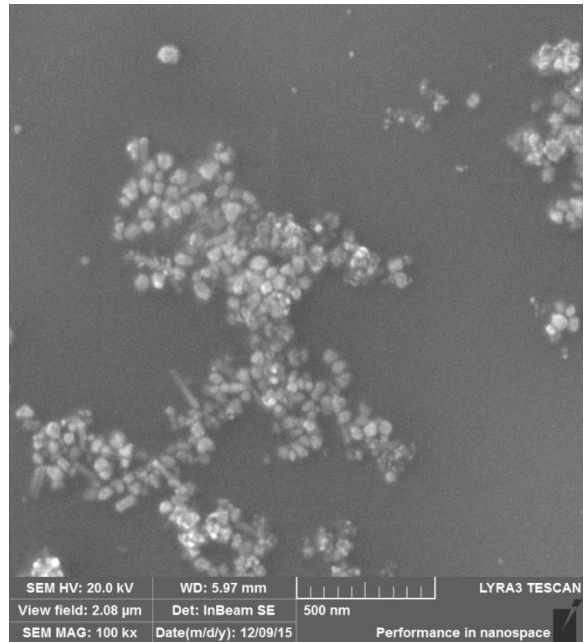


Obrázek 14: Roztok s red. činidlem (vlevo), roztok bez red. činidla (vpravo)

Roztoky byly pozorovány pomocí SEM mikroskopu. Poloměr nanočástic v roztoku bez redukčního činidla je menší, čímž se potvrdil předpoklad získaný ze změřených spekter roztoků. Redukční činidlo způsobí zastavení shlukování atomů a vytvoří se menší částice, kterých je v roztoku více. Tento fakt je také patrný ze snímků.

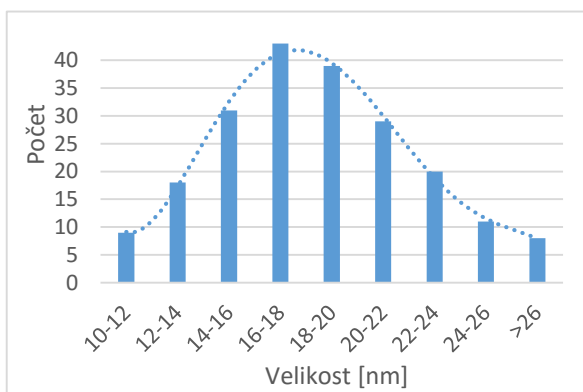


Obrázek 15: Roztok s redukčním činidlem  $\text{NaBH}_4$

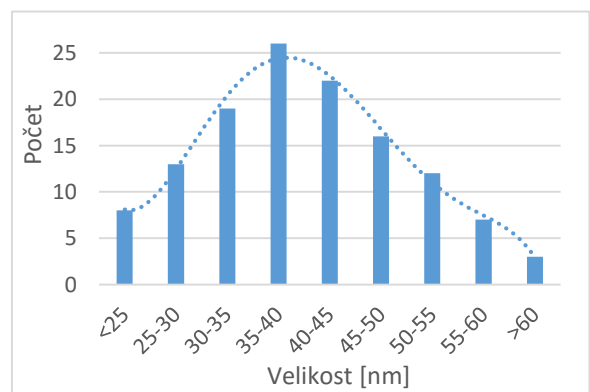


Obrázek 16: Roztok bez redukčního činidla  $\text{NaBH}_4$

V roztoku s redukčním činidlem se vytvořily částice ve tvaru kuliček na rozdíl od roztoku bez redukčního činidla, které jsou nepravidelné. Nepřítomnost redukčního činidla způsobila, že částice neměly do všech směrů stejnou rychlost růstu a vznikly konglomeráty.



Graf 8: Rozdělení velikosti částic v roztoku s redukčním činidlem



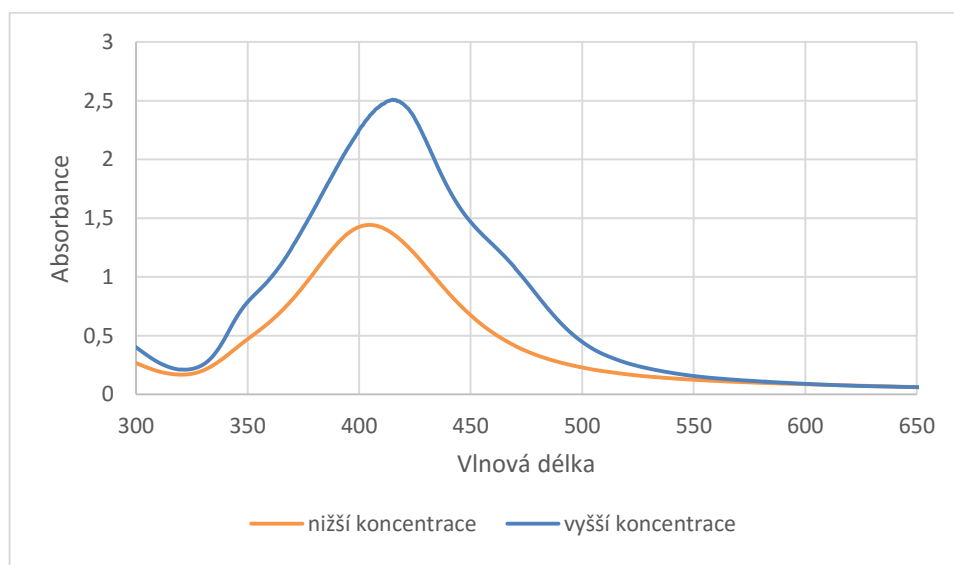
Graf 9: Rozdělení velikosti částic v roztoku bez redukčního činidla

Statistické rozložení velikosti vzniklých částic, které jsou znázorněny v grafech 8 a 9, přibližně odpovídá normálnímu rozdělení. Průměrná velikost vzniklých nanočástic odpovídá předpokladům získaných ze spekter roztoků.

Statistické údaje	Roztok s redukčním činidlem	Roztok bez redukčního činidla
Průměrná velikost částic:	18,5 nm	39,9 nm
Směrodatná odchylka:	4,1 nm	10,1 nm
Přibližný počet nanočástic v 1 ml:	$3,104 \cdot 10^{11}$	$3,093 \cdot 10^{10}$
Přibližný počet atomů v jedné nanočástici:	194 045	1 947 447

## 12.5 Porovnání roztoků $\text{AgNO}_3$ s citrátem o různých koncentracích

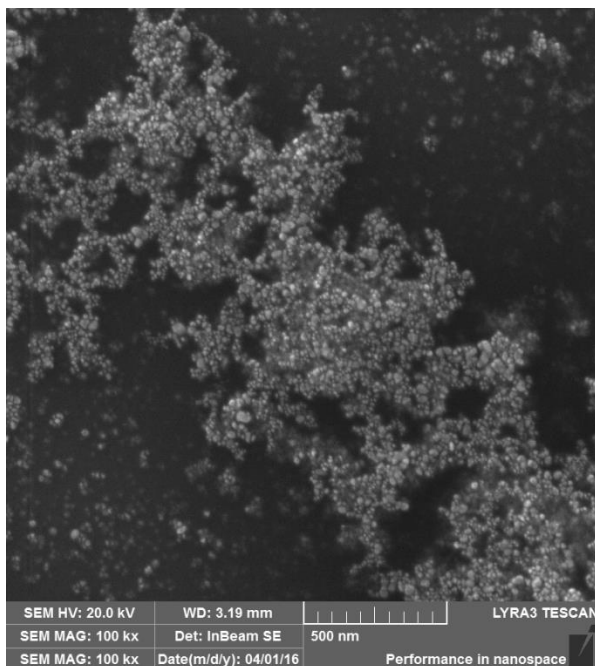
Porovnání dvou roztoků, které se liší svou koncentrací dusičnanu stříbrného i stabilizátoru. Jedná se o roztoky  $1 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{AgNO}_3$  +  $1 \cdot 10^{-3}$  M citrát a  $1 \cdot 10^{-4}$  M  $\text{AgNO}_3$  +  $1 \cdot 10^{-4}$  M citrát.



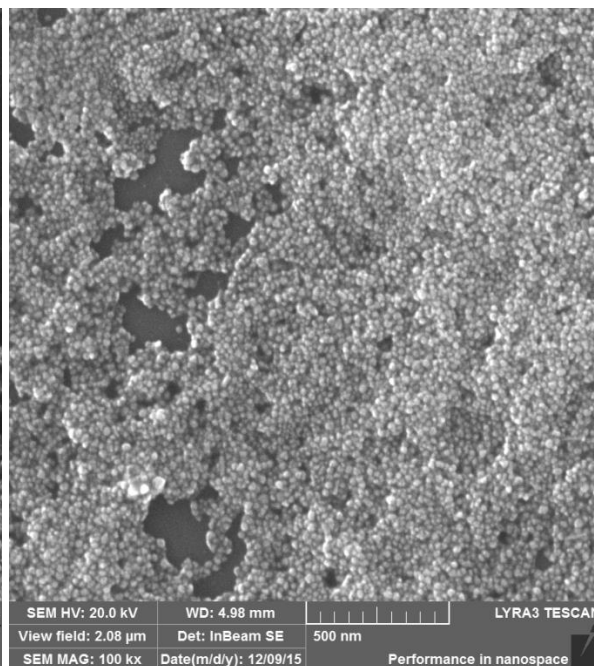
Graf 10: Spektrum roztoků s rozdílnou koncentrací

Graf 10 ukazuje porovnání optických spekter roztoků. Roztok s vyšší koncentrací má ve spektru vyšší pík, který dosahuje svého maxima v hodnotě 415 nm na rozdíl od roztoku s nižší koncentrací, který má své maximum při vlnové délce 404 nm. V roztoku s vyšší koncentrací se zredukuje relativně menší počet částic než v roztoku s nižší

koncentrací. Efekt stabilizátoru je proto v roztoku s vyšší koncentrací větší, protože ho větší část zůstala nevyužitá a na zredukované částice se ho naváže o to víc. Koncentrace stabilizátoru je o řád větší, tudíž se více ředí povrchový plazmon, který díky tomu kmitá v delších vlnových délka a pík se posouvá více doprava. V roztoku s menší koncentrací dochází k více reakcím a stabilizátor je více využitý. Plazmonová excitace je proto menší a pík spektra se nachází u kratších vlnových délek.

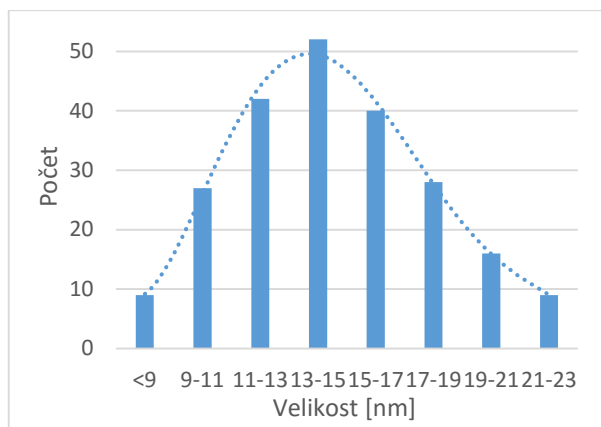


Obrázek 17: Roztok s nižší koncentrací

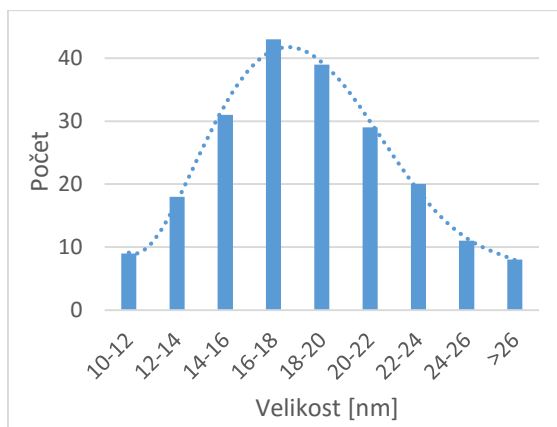


Obrázek 18: Roztok s vyšší koncentrací

Pomocí SEM mikroskopu byly pozorovány připravené roztoky. V roztoku o nižší koncentraci se vytvořily menší částice než v roztoku o vyšší koncentraci. To potvrzuje předpoklad získaný ze spekter roztoků.



Graf 11: Rozdělení velikosti částic v roztoku s nižší koncentrací



Graf 12: Rozdělení velikosti částic v roztoku s vyšší koncentrací

Roztoky obsahují různě velké částice. Z grafu 11 a 12 je patrné, že rozložení výskytu částic o různé velikosti odpovídá normálnímu rozdělení.

Statistické údaje	Roztok s nižší koncentrací	Roztok s vyšší koncentrací
Průměrná velikost částic:	14,4 nm	18,5 nm
Směrodatná odchylka:	3,5 nm	4,1 nm
Přibližný počet nanočástic v 1 ml:	$6,525 \cdot 10^{11}$	$3,104 \cdot 10^{11}$
Přibližný počet atomů v jedné nanočástici:	92 308	194 045

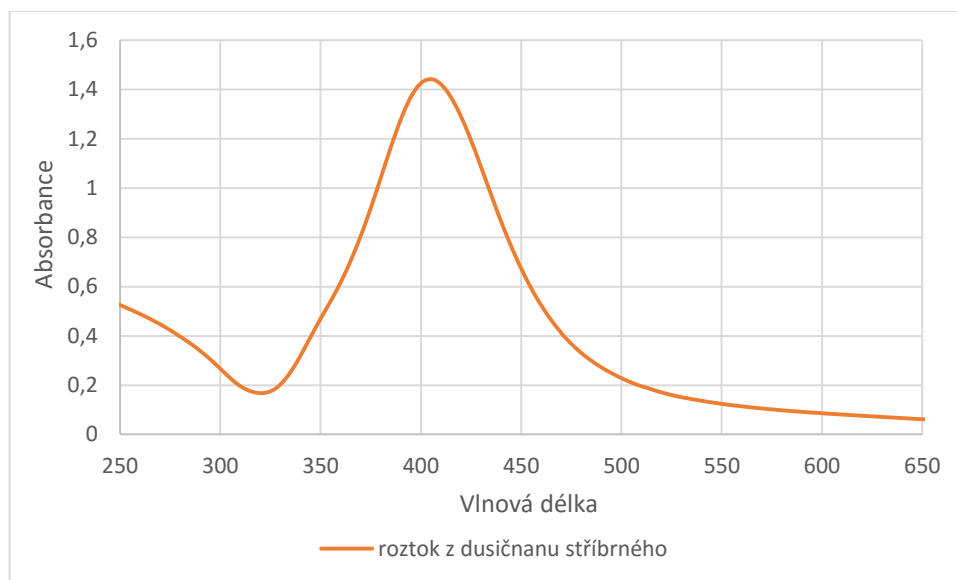
## 12.6 Porovnání roztoků z $\text{AgNO}_3$ a $\text{CH}_3\text{COOAg}$

Porovnání dvou roztoků nanočástic stříbra se stabilizátorem citrát, které se liší sloučeninou, ze které bylo získáno stříbro. Jedná se o roztoky  $2 \cdot 10^{-4}$  M  $\text{CH}_3\text{COOAg}$  +  $5 \cdot 10^{-4}$  M citrát a  $1 \cdot 10^{-4}$  M  $\text{AgNO}_3$  +  $1 \cdot 10^{-4}$  M citrát. V obou roztocích je dále obsaženo redukční činidlo  $\text{NaBH}_4$ .

Graf 13 ukazuje porovnání optických spekter roztoků. Roztok z dusičnanu stříbrného má vyšší a užší pík, který dosahuje maxima pro vlnovou délku 404,5 nm. Pík citrátu stříbrného je široký a nízký, to je způsobeno tím že, citrát je slabá kyselina a tedy není 100% disociovaný a pufruje. Pík dosahuje svého maxima pro vlnovou délku 384 nm. Dusičnan stříbrný má tedy více kovový charakter, což podporuje jeho bakteriální účinnost.

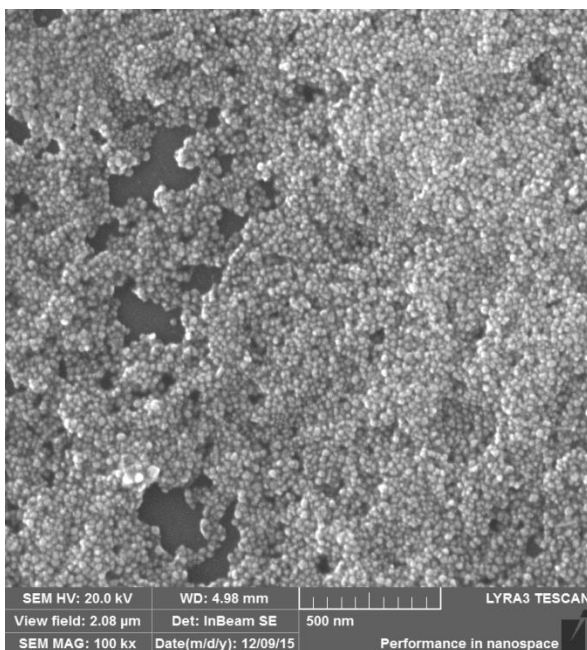


Dusičnany jsou ale více toxické než acetáty. Acetát stříbrný je tedy biologicky lepší složkou a jak je zřejmé z výsledků bakteriální účinnosti v Tabulce 1 jeho účinnost na gramnegativní bakterii *E. coli* je srovnatelná s roztoky z dusičnanu stříbrného.

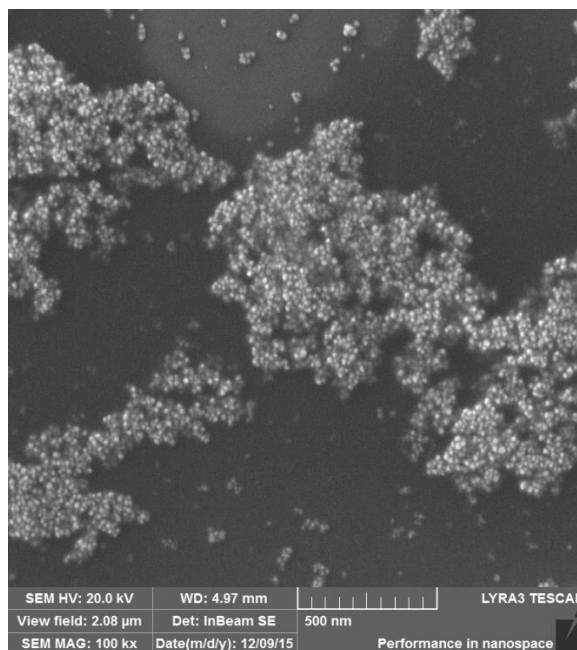


Graf 13: Spektrum roztoků z  $\text{AgNO}_3$  a  $\text{CH}_3\text{COOAg}$

Připravené roztoky byly pozorovány pomocí SEM mikroskopu. Ze snímků se opticky zdá, že částic v roztoku připraveného z dusičnanu stříbrného je víc, což potvrzuje také výsledek výpočtu množství nanočástic v 1 ml. Průměrná velikost nanočástic se liší o dva nanometry.



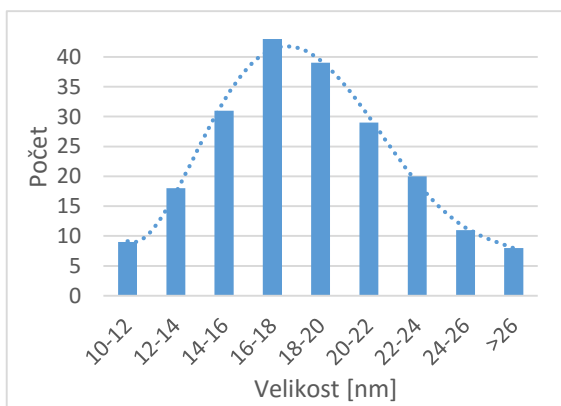
Obrázek 19: Roztok z  $\text{AgNO}_3$



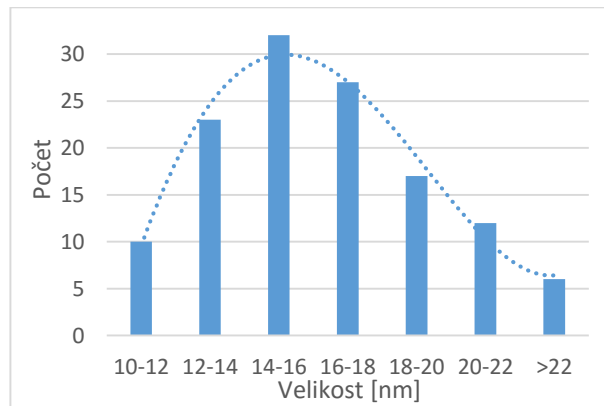
Obrázek 20: Roztok z  $\text{CH}_3\text{COOAg}$

Statistické rozložení velikosti vzniklých částic jsou znázorněny v grafech 14 a 15.

Z grafů je patrné, že rozložení výskytu částic o různé velikosti odpovídá normálnímu rozdělení.



Graf 14: Rozdělení velikosti částic v roztoku z  $\text{AgNO}_3$



Graf 15: Rozdělení velikosti částic v roztoku z  $\text{CH}_3\text{COOAg}$

Statistické údaje	Roztok z AgNO <sub>3</sub>	Roztok z CH <sub>3</sub> COOAg
Průměrná velikost částic:	14,4 nm	16,4 nm
Směrodatná odchylka:	3,5 nm	3,3 nm
Přibližný počet nanočástic v 1 ml:	$6,525 \cdot 10^{11}$	$4,488 \cdot 10^{11}$
Přibližný počet atomů v jedné nanočástici:	92 308	134 199

## 13 Diskuse

Bakalářská práce se zabývá využitelností antiseptických nanostruktur pro biomedicínské aplikace. Už v minulosti bylo známo, že stříbro působí antisepticky, proto jsou v této práci zkoumány parametry roztoků právě stříbrných nanočástic. Roztoky byly připravovány metodou bottom-up, zkoumány spektrofotometrem, pozorovány pomocí SEM mikroskopu a byla testována jejich bakteriální účinnost. Vlastnosti roztoků byly určovány použitými stabilizátory. Lišily se i v několika dalších parametrech, jejichž vliv byl porovnáván.

Stabilizátory želatina, citrát a chitosan mění vlastnosti roztoků, slouží ke stabilizaci velikosti částic v čase a určují, do jakého prostředí je vhodné nanostruktury aplikovat. Všechny námi použité stabilizátory mají hydrofilní charakter, protože jsou to roztoky určené k aplikaci do biologických systémů. Želatina je vhodná při aplikaci do krve, tkáňových systémů, střevní flóry apod. Chitosan lze využít při aplikaci do kostí a chrupavek. Citrát je nejuniverzálnějším stabilizátorem a je určený k všeobecnému použití, proto se stal součástí největšího počtu experimentů. Stabilizátor by měl být intaktní, což znamená, že stabilizuje velikost částice, ale neměl by ovlivňovat chemickou strukturu částice. Vrstva stabilizátoru musí být dostatečně tenká a "řídká", aby bakterie mohla být v kontaktu přímo s částicí. Stabilizátor vytvoří klec, do které je částice chycena, a způsobí, že se jednotlivé částice nespojí, nekoagulují. Díky tomu se vytvoří kulovité částice s kovovým charakterem, který je charakterizován specifickým píkem ve spektru získaném pomocí spektrofotometru.

Přítomnost kovových nanočástic zajistí antiseptické účinky roztoků. Ty byly testovány na čtyřech druzích bakterií, na gramnegativní *E. coli* a *Klebsiellu* a grampozitivní *B. subtilis* a MRSA. Účinky jsou uvedeny v tabulkách 1, 2 a 3. U všech skupin roztoků, tříděných dle stabilizátorů, byla zjištěna pozitivní antiseptická účinnost. U roztoků s citrátem byla opakovaně velmi dobrá účinnost nad 99,9 % na gramnegativní *E. coli*, bez ohledu na koncentraci nebo stáří roztoku. Pouze v jednom případě se roztok projevil jako neúčinný, což může být dáno rozličnými faktory, které se doposud nepodařilo objasnit. Neúspěch je možné přisuzovat nevhodné velikosti vzniklých částic. Obecně předpokládáme, že čím menší jsou částice, tím větší mají účinnost. Pozoruhodná je vysoká účinnost na grampozitivní bakterii MRSA. Tato skupina bakterií je rezistentní vůči antibiotikům, což je v poslední době stále častěji zmiňováno jako hrozba, a nanočástice stříbra jsou možným řešením. Roztok se želatinovým stabilizátorem nejprve neúčinkoval

ani na jeden z testovaných druhů bakterií. Na základě domněnky, že sám roztok je kontaminován nežádoucí látkou, byl roztok převařen. Poté jeho účinnost dosahovala pro oba druhy bakterií účinnost nad 99,999 %. Roztok se želatinou je ze všech připravených nejvíce viskózní, proto by jej případně bylo možné využít jako příměs do nátěrů, které by se staly baktericidními a mohly by být účinným nástrojem do prostorů, kde je potřeba zajistit nadstandardní čistotu. Roztok se stabilizátorem chitosan byl testován na všechny čtyři druhy bakterie, z nichž pouze na grampozitivní *B. subtilis* při druhém pokusu účinkoval málo, ostatní výsledky jsou výborné. Nízká účinnost zde mohla být způsobena stářím roztoku nebo tím, že *B. subtilis* je proti danému roztoku odolnější než MRSA, zástupce stejné skupiny bakterií dle Grammova barvení. Právě účinek tohoto roztoku na grampozitivní bakterii MRSA je velkým úspěchem, a to ze stejných důvodů jako u roztoku s citrátem. Z výsledků tedy vyplývá, že sám stabilizátor nemá na antiseptickou účinnost roztoků vliv.

Připravené roztoky byly porovnávány z hlediska přítomnosti a absence redukčního činidla. Přítomnost redukčního činidla zmenšuje velikost jednotlivých částic a také zajistí jejich pravidelný kulatý tvar. Na velikost vzniklých částic má vliv i různá koncentrace roztoků. V roztoku o nižší koncentraci se vytvořily menší částice než v roztoku s vyšší koncentrací. V roztoku s vyšší koncentrací se zredukuje relativně menší počet částic než v roztoku s nižší koncentrací. Efekt stabilizátoru je tedy v roztoku s vyšší koncentrací větší, protože ho větší část zůstala nevyužitá a na zredukované částice se ho naváže víc. To způsobí, že se více zředí povrchový plazmon, který díky tomu kmitá v delších vlnových délkách a pík spektra se posouvá doprava. Porovnány byly také roztoky, z nichž jeden byl připraven z dusičnanu stříbrného a druhý z citrátu stříbrného. Dusičnany jsou více toxickou látkou než acetáty, které jsou proto biokompatibilnější. Bakteriální účinnost roztoku z acetátu stříbrného na gramnegativní bakterii *E. coli*, je srovnatelná s roztoky z dusičnanu stříbrného, což dává prostor pro další zkoumání a pro reálné využití v biomedicínské praxi. Nabídka je opravdu velká. Například je možné napuštění textilií, ze kterých se šijí zdravotnické potřeby, pláště, prostěradla nebo krycí obvazy. V prostorech, kde je třeba zajistit nadstandardní čistotu, jako jsou operační sály, sterilizační místnosti apod., lze roztok rozprašovat. Je také možná jeho aplikace při léčbě diabetické nohy. Již probíhá testování na bakterii, která způsobuje onemocnění Antrax. Nevýhodou je, že stříbro je ekonomicky nákladné.

## 14 Závěr

Cílem práce bylo připravit roztoky nanočástic, studovat jejich vlastnosti a možnosti využití v biomedicínských oborech. Byly vybrány nanočástice stříbra pro jejich významné antibakteriální vlastnosti. V rámci experimentální části práce byly připraveny nanočástice stříbra metodou bottom-up. Připravené roztoky se lišily použitým stabilizátorem citrát, želatina a chitosan. Tyto látky mění vlastnosti roztoků a určují, do jakého prostředí je vhodné nanostruktury aplikovat. Vzniklé nanočástice byly zkoumány pomocí spektrofotometru a pozorovány SEM mikroskopem. Pomocí spektrofotometru byla změřena optická spektra vzorků. Ve všech roztocích se stabilizátorem je patrný výrazný pík. Ten určuje kovový charakter nanočástic. Pro porovnání jsou uvedena spektra roztoků bez stabilizátoru, kde se částice kovového charakteru nevytvořily, a pík je nevýrazný. Všechny vzniklé nanočástice mají tvar kuliček a jsou velikosti v desítkách nanometrů. Z výsledků vyplývá, že na velikost částic má vliv koncentrace stříbra i stabilizátoru roztoku. Bakteriologická účinnost byla testována na čtyřech druzích bakterií, na gramnegativní *E. coli* a *Klebsiella* a grampozitivní *B. subtilis* a MRSA. Roztoky byly účinné na grampozitivní i gramnegativní bakterie. Byly porovnány parametry roztoků. Přítomnost redukčního činidla zmenšuje velikost jednotlivých částic a také zajistí jejich pravidelný kulatý tvar. Koncentrace roztoků má vliv na velikost vzniklých částic. Z porovnání dusičnanu stříbrného a citrátu stříbrného vyplývá, že citrát stříbrný má méně kovový charakter, což je výhodou pro aplikaci do biologických struktur, ale na bakteriální účinnost to nemá vliv.

## Citovaná literatura

- [1] HOŠEK, Jan. *Úvod do nanotechnologie*. Vyd. 1. V Praze: České vysoké učení technické, 2010. ISBN 9788001045558.
- [2] FOJTÍK, Anton. Nano - fascinující fenomén současnosti: nanočástice, nanostruktury a nanotechnologie - důmyslné formy hmoty: od objevu fenoménu po biomedicínské aplikace. 1. vyd. Praha [i.e. Dobruška]: COMTES FHT, 2014. ISBN 9788026071358.
- [3] FOJTÍK, Anton, Kateřina PIKSOVÁ, Marie WEISEROVÁ a Vladimír BENCKO. Nanočástice a nanostruktury v biomedicínských aplikacích. *Praktický lékař* [online]. 2012, 92(8), 440-444 [cit. 2016-03-29]. ISSN 1805-4544. Dostupné z: [http://www.prolekare.cz/prakticky-lekar-clanek/nanocastice-a-nanostruktury-v-biomedicinskyh-aplikacich-39110?confirm\\_rules=1](http://www.prolekare.cz/prakticky-lekar-clanek/nanocastice-a-nanostruktury-v-biomedicinskyh-aplikacich-39110?confirm_rules=1)
- [4] KVÍTEK, Libor. *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra* [online]. Olomouc, 2008 [cit. 2016-04-29]. Dostupné z: [http://www.zdravestibro.cz/admin/data/img/uploads/HP\\_Kvitek.pdf](http://www.zdravestibro.cz/admin/data/img/uploads/HP_Kvitek.pdf). Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.
- [5] ŘEZANKA, Pavel. Nanočástice I. *Ksicht: Korespondenční seminář inspirovaný chemickou tematikou* [online]. 2009, 7(1), 1-11 [cit. 2016-02-25]. Dostupné z: <http://ksicht.natur.cuni.cz/pdf/ksicht-serial-7-1.pdf>
- [6] LIBOR, Kvítek. *Kovové nanomateriály pro praxi: Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů* [online]. Olomouc, 2013 [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/3079307-Kovove-nanomaterialy-pro-praxi.html>
- [7] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010 [cit. 2016-04-29]. ISBN 9788070807453. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid\\_isbn-978-80-7080-745-3](http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-745-3)
- [8] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie* [online]. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007 [cit. 2016-04-29]. ISBN 9788024416694. Dostupné z: <http://fch.upol.cz/wp-content/uploads/2015/07/Kolonoidni-chemie-text.pdf>
- [9] PRUCEK, Robert, Libor KVÍTEK, Aleš PANÁČEK, Jana SOUKUPOVÁ, Radek ZBOŘIL a Martina KILANOVÁ. Nanočástice stříbra pro biologické a katalytické aplikace. *Chemické*

*listy* [online]. 2012, 56(106), 536-540 [cit. 2016-03-13]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012\\_06\\_536-540.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_06_536-540.pdf)

- [10] PRUCEK, Robert a Martina KILIANOVÁ. *Cvičení ze základů nanomateriálové chemie* [online]. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013 [cit. 2016-04-29]. ISBN 9788024437521. Dostupné z: <http://docplayer.cz/9761424-Cviceni-ze-zakladu-nanomaterialove-chemie-univerzita-palackeho-v-olomouci-prirodovedecka-fakulta-katedra-fyzikalni-chemie.html>
- [11] ŘEZNÍČKOVÁ, Alena, Zdeňka NOVOTNÁ, Zdeňka KOLSKÁ, Pavel ULBRICH a Václav ŠVORCÍK. Příprava, funkcionalizace a roubování nanočástic ušlechtilých kovů na aktivovaný polymer. *Chemické listy* [online]. 2014, (108), 865-874 [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2014\\_09\\_865-874.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2014_09_865-874.pdf)
- [12] ZÍTKA, Ondřej (ed.). *Moderní nanotechnologie na počátku 21. století: kolekce učebních textů projektu OPVK NANOTEAM*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2013. ISBN 9788021448025.
- [13] KRÍŽENECKÁ, Sylvie a Václav SYNEK. *Základy analytické chemie* [online]. Vyd. 1. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014 [cit. 2016-04-29]. ISBN 9788074148040. Dostupné z: [http://envimod.fzp.ujep.cz/sites/default/files/skripta/48e\\_final\\_tisk.pdf](http://envimod.fzp.ujep.cz/sites/default/files/skripta/48e_final_tisk.pdf)
- [14] TURCHICHOVÁ, Martina. Laboratorní technika. Optické metody - Spektrofotometrie. [přednáška]. Praha: ČVUT FBMI, 2016-03-03
- [15] Spektrofotometr. *WikiSkripta* [online]. 2008- [cit. 2016-03-23]. ISSN 18046517. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Spektrofotometr&oldid=342138>
- [16] NOVÁKOVÁ, Martina. *Využití nanočástic pro radiofrekvenční ablaci a hypertermii v onkologických aplikacích*. Praha, 2015. Disertační práce. FBMI. Vedoucí práce Jan Vrba.
- [17] SINGH, Mritunjai, Shinjini SINGH, S. PRASAD a I. S. GAMBHIR. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of Silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* [online]. 2008, 3(3), 115-122 [cit. 2016-03-26]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Mritunjai\\_Singh/publication/256463087\\_Nanotechnology\\_in\\_medicine\\_and\\_antibacterial\\_effect\\_of\\_silver\\_nanoparticles/links/0046352275f3d28b30000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Mritunjai_Singh/publication/256463087_Nanotechnology_in_medicine_and_antibacterial_effect_of_silver_nanoparticles/links/0046352275f3d28b30000000.pdf)



- [18] MAITI, Swarnali, Deepak KRISHNAN, Gadadhar BARMAN, Sudip Kumar GHOSH a Jayasree Konar LAHA. Antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from *Lycopersicon esculentum* extract. *Journal of Analytical Science and Technology* [online]. 2014, 5 - 40 [cit. 2016-04-29]. DOI: 10.1186/s40543-014-0040-3. Dostupné z: <http://jast-journal.springeropen.com/articles/10.1186/s40543-014-0040-3>
- [19] KUNC, Martin. *Nanostříbro a studium jeho vlivu na bezobratlé živočichy*. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie. Brno, 2013. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie. Vedoucí práce Mgr. Monika Dušková, Ph.D.
- [20] KIM, Jun Sung, Eunye KUK, Kyeong Nam YU a Jong-Ho KIM. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* [online]. 2007, 3(1), 95-101 [cit. 2016-04-29]. Dostupné z: [http://www.nanomedjournal.com/article/S1549-9634\(06\)00346-7/abstract](http://www.nanomedjournal.com/article/S1549-9634(06)00346-7/abstract)
- [21] BENCKO, Vladimír. *New smart metal structures with bactericidal effect for biomedical and environmental practical application*
- [22] SCHIERHOLZ, J. M., L. J. LUCASJ, A. RUMP a G. PULVERER. Efficacy of silver-coated medical devices. *Journal of Hospital Infection* [online]. 1998, 40(4), 257-262 [cit. 2016-03-20]. Dostupné z: [http://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701\(98\)90301-2/abstract](http://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701(98)90301-2/abstract).
- [23] FOJTÍK, Anton, F. NOVOTNÝ a K. STYNDLOVÁ. Metal nanoparticles in statu nascendi: From embryonic stage of Ag nanoparticles to the metal nanoclusters. In: *Nano '06 International Conference* [online]. Brno, Czech Republic: Vysoké učení technické v Brně Fakulta strojního inženýrství, 2006, s. 112-116. ISBN ISBN 80-214-3331-0.
- [24] RAI, Mahendra, Alka YADAV a Aniket GADE. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* [online]. 2009, 27, 76 - 83 [cit. 2016-03-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975008000918>
- [25] Dvoupaprskové UV-Vis spektrofotometry pro náročná měření Specord PLUS 200/210/250 [obrázek] [www.chromspec.cz](http://www.chromspec.cz). *ChromSpec*. [Online] CHROMSPEC spol. s r.o. [Citace: 20. 4 2016.] <http://www.chromspec.cz/produkty/detail.php?name=specordplus>.
- [26] WEISEROVÁ, Marie. [ústní sdělení]. Praha: AVČR MBÚ, 2016-04-14

- [27] Bacillus subtilis. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco: Wikipedie: Otevřená encyklopedie., 2001 [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Speci%C3%A1ln%C3%AD%3ACitovat&page=Bacillus+subtilis>
- [28] MRSA. *WikiSkripta* [online]. 2008- [cit. 2016-04-15]. ISSN 18046517. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=MRSA&oldid=287200>
- [29] Escherichia coli. *WikiSkripta* [online]. 2008- [cit. 2016-04-15]. ISSN 18046517. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Escherichia\\_coli&oldid=346147](http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Escherichia_coli&oldid=346147)
- [30] RYAN, Kenneth J, C RAY a John C SHERRIS. Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases [online]. 4th ed. New York: McGraw-Hill, c2004 [cit. 2016-04-15]. ISBN 0838585299.
- [31] 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: Metody přípravy kovových nanočástic .....	4
Obrázek 2: Rozložení a počty atomů na povrchu nanočástice .....	10
Obrázek 3: Spektrofotometr Specord 210 PLUS .....	17
Obrázek 4: Lyra 3 Tescan .....	18
Obrázek 5: FEG SEM Zeiss Ultra Plus .....	18
Obrázek 6: Znázornění experimentu.....	22
Obrázek 7: Pozitivní výsledek .....	23
Obrázek 8: Negativní výsledek.....	23
Obrázek 9: Referenční vzorek .....	24
Obrázek 10: Nanočástice stříbra s citrátem .....	26
Obrázek 11: Shluky nanočástic stříbra s želatinou .....	30
Obrázek 12: Nanočástice stříbra s želatinou.....	30
Obrázek 13: Nanočástice stříbra s Chitosanem .....	32
Obrázek 14: Roztok s red. činidlem (vlevo), roztok bez red. činidla (vpravo) .....	35
Obrázek 15: Roztok s redukčním činidlem NaBH <sub>4</sub> .....	36
Obrázek 16: Roztok bez redukčního činidla NaBH <sub>4</sub> .....	36
Obrázek 17: Roztok s nižší koncentrací .....	38
Obrázek 18: Roztok s vyšší koncentrací.....	38
Obrázek 19: Roztok z AgNO <sub>3</sub> .....	41
Obrázek 20: Roztok z CH <sub>3</sub> COOAg .....	41

## Seznam grafů

Graf 1: Optické spektrum stříbrných nanočástic s citrátem.....	26
Graf 2: Rozdělení velikosti nanočástic v roztoku.....	27
Graf 3: Optické spektrum stříbrných nanočástic s želatinou .....	29
Graf 4: Rozdělení velikosti nanočástic v roztoku.....	30
Graf 5: Optické spektrum stříbrných nanočástic s chitosanem.....	32
Graf 6: Rozdělení velikosti nanočástic v roztoku.....	33
Graf 7: Spektrum roztoků s a bez redukčního činidla .....	34
Graf 8: Rozdělení velikosti částic v roztoku s redukčním činidlem.....	36
Graf 9: Rozdělení velikosti částic v roztoku bez redukčního činidla .....	36
Graf 10: Spektrum roztoků s rozdílnou koncentrací.....	37
Graf 11: Rozdělení velikosti částic v roztoku s nižší koncentrací .....	39
Graf 12: Rozdělení velikosti částic v roztoku s vyšší koncentrací .....	39
Graf 13: Spektrum roztoků z $\text{AgNO}_3$ a $\text{CH}_3\text{COOAg}$ .....	40
Graf 14: Rozdělení velikosti částic v roztoku z $\text{AgNO}_3$ .....	41
Graf 15: Rozdělení velikosti částic v roztoku z $\text{CH}_3\text{COOAg}$ .....	41

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Bakteriální účinnost roztoků nanočástic stříbra s citrátem.....	28
Tabulka 2: Účinnost roztoků nanočástic stříbra s želatinou .....	31
Tabulka 3: Účinnost roztoků nanočástic stříbra s chitosanem.....	33