



Posouzení technik pro hodnocení interakce magnetických nanočástic v biologickém prostředí

Bakalářská práce

Studijní program:

B3944 Biomedicínská technika

Studijní obor:

Biomedicínská technika

Autor práce:

Jakub Rohn

Vedoucí práce:

Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.
Katedra materiálů

Konzultant práce:

Ing. Karel Havlíček
Ústav nových technologií a aplikované informatiky





TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta zdravotnických studií ■

Zadání bakalářské práce

Posouzení technik pro hodnocení interakce magnetických nanočástic v biologickém prostředí

Jméno a příjmení: **Jakub Rohn**
Osobní číslo: D18000114
Studijní program: B3944 Biomedicínská technika
Studijní obor: Biomedicínská technika
Zadávající katedra: Fakulta zdravotnických studií
Akademický rok: **2019/2020**

Zásady pro vypracování:

Cíle práce:

1. Navrhnout techniky/metody pro studium a charakterizaci parametrů a vlastností nanočástic (především magnetických).
2. Provést charakterizaci vybraných typů nanočástic (velikost, koncentrace, struktura aj.).
3. Navrhnout metodický postup pro hodnocení toxických účinků nanočástic na bakteriální buňky (především s ohledem na magnetické vlastnosti nanočástic).
4. Experimentálně otestovat různé typy nanočástic (magnetické, paramagnetické a nemagnetické), o různé koncentraci, velikosti a délce expozice na různé bakteriální kmeny.
5. Definovat slabé a silné stránky jednotlivých metod/technik. Navrhnout vhodné techniky/metody pro hodnocení toxicity magnetických nanočástic.
6. Posoudit a stanovit shody/rozdílnosti dosažených výsledků s odbornou literaturou.

Výzkumné předpoklady / výzkumné otázky:

1. Předpokládáme, že jednotlivé typy nanočástic (Fe_3O_4 , Zn, Nd_2O_3) budou vykazovat různé toxické účinky na bakteriální buňky v závislosti na jejich vlastnostech (Fe_3O_4 jako feromagnetické, Nd_2O_3 jako nemagnetické a Zn jako diamagnetické).
2. U nanočástic jsou běžně pozorovány zvýšené toxické účinky. My předpokládáme, že pro magnetické nanočástice tento jev pozorován nebude ani při vyšších koncentracích, a to právě v důsledku vlivu magnetických účinků (magnetismus ovlivňuje bakterie spíše pozitivně).
3. Shodují se dosažené laboratorní výsledky s výsledky v odborných publikacích?
4. Dosáhlo se změny proliferace bakteriálních buněk v přítomnosti nanočástic? Které typy nanočástic ovlivňovali růst buněk spíše pozitivně, které spíše negativně?
5. Jsou zvolené techniky charakterizace nanočástic dostatečně průkazné?
6. Jsou zvolené metodiky hodnocení toxických účinků nanočástic na bakterie dostatečně průkazné? Jaké jsou výhody nebo nedostatky?

Technika práce:

Metodou výzkumu bude realizace srovnávacího experimentu. Měření fyzikálních, chemických a mechanických parametrů (jako využití fluorescenční mikroskopie, SEM mikroskopie, konfokální mikroskopie, respirometrie, kultivační testy, Raman spectroscopy, infrared spectroscopy, Zetasizer analyser apod.). Provede se základní statistické vyhodnocení všech experimentů.

Metoda:

Kvalitativní.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování práce:
Jazyk práce:

tištěná/elektronická
Čeština



Seznam odborné literatury:

1. ZAVISOVA, Vlasta et al. Effect of magnetic nanoparticles coating on cell proliferation and uptake. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2019, **472**, 66-73. DOI 10.1016/j.jmmm.2018.09.116. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885318320183>
2. PEDRAM, Maysam Z., Amir SHAMLOO, Ebrahim GHAFAR-ZADEH a Aria ALASTY. Dynamic analysis of magnetic nanoparticles crossing cell membrane. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2017, **429**, 372-378. DOI 10.1016/j.jmmm.2016.12.114. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885316334941>
3. ORHAN, Hande et al. Bacteria killer enzyme attached magnetic nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. 2019, **94**, 558-564. DOI 10.1016/j.msec.2018.10.003. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493118302352>
4. GHAZZAL, Mohamed Nawfal et al. Magnetic nanoparticle with high efficiency for bacteria and yeast extraction from contaminated liquid media. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2017, **71**, 62-68. DOI 10.1016/j.jtice.2016.12.030. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876107016305405>
5. KARVELAS, E.G., T.E. KARAKASIDIS a I.E. SARRIS. Computational analysis of paramagnetic spherical Fe₃O₄ nanoparticles under permanent magnetic fields. *Computational Materials Science*. 2018, **154**, 464-471. DOI 10.1016/j.commatsci.2018.07.047. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927025618304828>
6. TORRES-MANCERA, María et al. Online Monitoring of Solid-State Fermentation Using Respirometry. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2018, 2018, s. 97-108. DOI 10.1016/B978-0-444-63990-5.00006-2. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444639905000062>
7. DAVIDOVITS, Paul. Nanotechnology in Biology and Medicine. *Physics in Biology and Medicine*. Elsevier, 2019, 2019, s. 293-305. DOI 10.1016/B978-0-12-813716-1.00018-5. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128137161000185>
8. ZAREI, S., M. NIAD a H.RAANAEL. The removal of mercury ion pollution by using Fe₃O₄-nanocellulose: Synthesis, characterizations and DFT studies. *Journal of Hazardous Materials*. 2018, **344**, 258-273. DOI 10.1016/j.jhazmat.2017.10.009. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389417307586>
9. TRINH, Le Huu et al. A novel approach for synthesis of hierarchical mesoporous Nd₂O₃ nanomaterials. *Journal of Rare Earths*. 2017, **35**(7), 677-682. DOI 10.1016/S1002-0721(17)60963-3. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002072117609633>
10. TAMGADGE, Yash Aditya et al. Synthesis and nonlinear optical properties of Zn doped TiO₂ nano-colloids. *Optical Materials*. 2018, **86**, 185-190. DOI 10.1016/j.optmat.2018.09.030. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925346718306517>
11. SINGH, Ranber. Unexpected magnetism in nanomaterials. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2013, **346**, 58-73. DOI 10.1016/j.jmmm.2013.07.005. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885313004812>

Vedoucí práce:

Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.
Katedra materiálů

Konzultant práce:

Ing. Karel Havlíček
Ústav nových technologií a aplikované informatiky

Datum zadání práce: 2. září 2019
Předpokládaný termín odevzdání: 30. června 2020

L.S.

prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA
děkan

V Liberci dne 31. ledna 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

12. listopadu 2020

Jakub Rohn

Vážený pan
Jakub Rohn
D18000114
Na Návsi 47
251 01 Čestlice

Vyřizuje/linka: Čermáková/485 353 194

V Liberci dne 05. října 2020
č. j.: TUL - 20/8511/033175-001

Vyjádření k žádosti o ponechání zadání bakalářské práce

Vážený pane Rohn,

na základě Vaší žádosti ze dne 24. 09. 2020, zaevidované pod č. j.: TUL - 20/8511/033175 Vám sděluji, že **souhlasím** s ponecháním zadání bakalářské práce a s prodloužením termínu odevzdání do 30. 06. 2021.

S pozdravem

prof. MUDr. Karel Cvačovec, CSc., MSc.
děkan

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Lucii Svobodové, Ph.D., za odborné vedení mé bakalářské práce, cenné připomínky a trpělivost při konzultacích poskytnutých ke zpracování této práce. Dále bych chtěl velice poděkovat svému konzultantovi Ing. Karlovi Havlíčkovi za odborné rady, poskytnutí cenných informací a za pomoc při zpracování dat v experimentální části práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině.

Anotace

Autor:	Jakub Rohn
Instituce:	Technická univerzita v Liberci, Fakulta zdravotnických studií
Název práce:	Posouzení technik pro hodnocení interakce magnetických nanočástic v biologickém prostředí
Vedoucí práce:	Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.
Počet stran:	68
Počet příloh:	1
Rok obhajoby:	2021

Anotace: Tato bakalářská práce se zabývá hodnocením charakteristických vlastností a parametrů nanočástic feromagnetických Fe_3O_4 , nemagnetických Nd_2O_3 a diamagnetických Zn. Tyto nanočástice mohou být pro biomedicínské aplikace velice užitečné díky svým charakteristickým vlastnostem (např. jako kontrastní činidla při zobrazování magnetickou rezonancí, magnetické označování buněk apod.). Teoretická část čtenáře seznamuje se základními vlastnostmi nanočástic (velikost, tvar apod.) a s metodami, které zkoumají jejich vlastnosti (mikroskopie, toxicita). Výzkumná část se zabývá experimentálním hodnocením toxických účinků nanočástic na dva vybrané bakteriální kmeny, a to *Escherichia Coli* a *Micrococcus Luteus*. Byly provedeny testy ekotoxicity a respirometrie, ale i testy cytotoxicity (účinek na jaterní karcinom HepG2). Práce se věnuje především technikám a metodám studia a charakterizaci parametrů a vlastností nanočástic. Výsledkem práce je komparativní srovnání chování buněk, které se dostaly do kontaktu s nanočásticemi a návrh na modifikaci nebo aktualizaci těchto metod pro úspěšné studium s ohledem na jejich (ne)magnetické vlastnosti.

Klíčová slova: nanočástice, toxicita, respirometrie, magnetismus, mikroskopie

Annotation

Author: Jakub Rohn

Institution: Technical University of Liberec, Faculty of Health Studies

Title: Assessment of techniques for evaluation of magnetic nanoparticles interaction in biological environment

Supervisor: Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.

Pages: 68

Appendix: 1

Year: 2021

Annotation: This bachelor thesis deals with the evaluation of characteristic properties and parameters of ferromagnetic Fe_3O_4 , non-magnetic Nd_2O_3 and diamagnetic Zn nanoparticles. These nanoparticles can be very useful for biomedical applications due to their characteristic properties (e.g. as contrast agents in magnetic resonance imaging, magnetic cell labeling, etc.). The theoretical part acquaints readers with the basic feature of nanoparticles (size, shape, etc.) and with methods that examine their properties (microscopy) and behavior (toxicity). The research part deals with the experimental evaluation of the toxic effects of nanoparticles on two selected bacterial strains; *Escherichia Coli* and *Micrococcus Luteus*, where tests of ecotoxicity and respirometry were done. Cytotoxicity tests were performed on hepatic carcinoma HepG2. In particular, techniques and methods for studying the properties of nanoparticles were the subject of this work. The result of the work is a set of comparison of the cell behavior that have come into contact with nanoparticles; also several suggestions of these methods (modification or actualization) were submitted for nanoparticle study with respect to their (non)magnetic properties.

Keywords: nanoparticles, toxicity, respirometry, magnetism, microscopy

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů	14
1 Úvod	17
2 Teoretická část	18
2.1 Nanočástice	18
2.1.1 Rozdělení nanočástic	18
2.1.1.1 Nanočástice na bázi uhlíku.....	19
2.1.1.2 Keramické nanočástice.....	19
2.1.1.3 Kovové nanočástice	19
2.1.1.4 Další typy nanočástic	19
2.1.2 Syntéza nanočástic	20
2.1.2.1 Top-down syntéza	20
2.1.2.2 Bottom-up syntéza	21
2.1.3 Fe ₃ O ₄ (oxid železnato-železitý)	21
2.1.4 Nd ₂ O ₃ (oxid neodymitý)	21
2.1.5 Zn (zinek).....	22
2.1.6 Aplikace nanočástic v biomedicině	22
2.1.7 Hodnocení nanočástic	23
2.1.7.1 Tvar nanočástic	23
2.1.7.2 Metody mikroskopie	24
2.1.7.3 Velikost nanočástic	26
2.1.7.4 Hodnocení toxicity nanočástic	27
2.1.8 Další vlastnosti nanočástic.....	30
2.1.8.1 Magnetismus	31
2.2 Biologické prostředí.....	31
2.2.1 Struktura bakteriální buňky	31
2.2.2 Bakteriální kmeny	32
2.2.2.1 <i>Escherichia Coli</i>	32
2.2.2.2 <i>Micrococcus Luteus</i>	33
2.2.3 Vliv magnetismu na populace bakterií	34
3 Výzkumná část.....	36
3.1 Cíle a výzkumné předpoklady	36

3.2	Metodika výzkumu	36
3.3	Materiály a metody	37
3.3.1	Použité nanočástice	37
3.3.2	Bakterie a příprava inokula	37
3.3.3	Disková centrifuga	38
3.3.4	SEM mikroskopie	38
3.3.5	Respirometrie	39
3.3.6	Ekotoxicita	40
3.3.7	Cytotoxicita	40
3.4	Analýza výsledných dat	42
3.4.1	Disková centrifuga	42
3.4.2	SEM mikroskopie	43
3.4.3	Respirometrie	46
3.4.3.1	<i>Micrococcus Luteus</i> a nanočástice Fe_3O_4	46
3.4.3.2	<i>Micrococcus Luteus</i> a nanočástice Nd_2O_3	47
3.4.3.3	<i>Micrococcus Luteus</i> a nanočástice Zn	47
3.4.3.4	<i>Escherichia Coli</i> a nanočástice Fe_3O_4	48
3.4.3.5	<i>Escherichia Coli</i> a nanočástice Nd_2O_3	48
3.4.3.6	<i>Escherichia Coli</i> a nanočástice Zn	49
3.4.4	Ekotoxicita	50
3.4.5	Cytotoxicita	52
4	Diskuze	54
5	Návrh doporučení pro praxi	57
6	Závěr	58
	Seznam použité literatury	60
	Seznam tabulek	66
	Seznam obrázků	67
	Seznam grafů	68
	Seznam příloh	69
	Přílohy	70

Seznam použitých zkratek a symbolů

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	síran amonný
°	stupeň
°C	stupeň celsia
AFM	mikroskopie atomárních sil
BSK	biochemická spotřeba kyslíku
BSM	Basal salt medium (medium podle norem)
CaCl_2	chlorid vápenatý
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	dihydrát chloridu vápenatého
CO_2	oxid uhličitý
CVD	chemical vapour deposition
CXI	ústav pro nanomateriály pokročilé technologie a inovace
DCS	differential centrifugal sedimentation
DMEM	dulbecco modified eagle's medium (medium pro experimenty)
DNA	deoxyribonukleonová kyselina
EC50	polovina maximální efektivní koncentrace
FBS	fetal bovine serum (sérum pro urychlování experimentů)
Fe_2O_3	oxid železitý (maghemit)
Fe_3O_4	oxid železnato-železitý (magnetit)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu železnatého
FS	fakulta strojní
FZS	fakulta zdravotnických studií

g	gram
g/l	gram na liter
HCl	kyselina chlorovodíková
K	kelvin
K ₂ HPO ₄	hydrogenfosforečnan draselný
KCl	chlorid draselný
KH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan draselný
l	liter
LOAEL	lowest observed adverse effect level
m	metr
MgCl ₂ ·6H ₂ O	hexahydrát chlorid hořečnatý
MgSO ₄ ·7H ₂ O	heptahydrát síranu hořečnatého (epsomská sůl)
MnCl ₂ ·4H ₂ O	tetrahydrát chlorid manganatý
NaHCO ₃	hydrogen uhličitán sodný
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	dihydrát molybdenan sodný
NaOH	hydroxid sodný
Nd ₂ O ₃	oxid Neodymitý
NOAEL	no observed adverse effect level
NPs	nanočástice (nanoparticles)
NTA	nanoparticles tracking analysis
O ₂	kyslík
PCA	plate count agar
PVD	physical vapour deposition

SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
T	tesla
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TUL	Technická univerzita v Liberci
UV	ultrafialové
V	volt
Zn	zinek

1 Úvod

Nanočástice jsou v současné době jednou z nejvíce skloňovaných pojmů v řadě vědních oborů. Skýtají díky svým vlastnostem nové možnosti využití v technologickém, strojírenském, biologickém a biomedicínském průmyslu. V poslední době se dostávají do popředí zájmu a dochází ke zvýšení množství aplikací a zlepšení využitelnosti. V oboru biomedicíny ovšem nastává za poslední roky nejvýraznější rozvoj.

Hlavním důvodem rozvoje použití nanočástic je jejich velikost, která odpovídá nebo dokonce je menší než lidské buňky, bakterie, viry nebo proteiny. Díky své velikosti lze snadněji dopravit nanočástice do míst, kde jsou biologicky zapotřebí. Dalším důvodem pro jejich významné využití je magnetismus některých typů částic. Pomocí této vlastnosti je s nanočásticemi snazší manipulace. Lépe se dopraví do místa určení pomocí vnějšího magnetického pole, čehož se využívá například v nanochirurgii, či magnetické rezonanci (kontrastní látky). Další obrovskou výhodou jsou povrchové vlastnosti, kdy se nanočástice slabě obalí biokompatibilní látkou (vzniká tzv. korona) a jsou lépe chráněny před okolním prostředím v organismu (například proti oxidaci apod.).

Vědci neustále zkoumají vliv těchto částic na lidský organismus (cytotoxicita, biokompatibilita, hemokompatibilita, ekotoxicita apod.), zkoumá se vliv velikosti, koncentrace, tvaru, povrchové struktury, povrchového náboje aj. Bohužel se vzrůstajícím zájmem využití nanočástic v biomedicíně nastávají sporné otázky týkající se bezpečnosti jejich využití.

2 Teoretická část

2.1 Nanočástice

Nanočástice jsou částice o rozměrech jedné miliardtiny metru, tedy 10^{-9} m. Mají rozměry na úrovni atomů a molekul. Obvyklá velikost se ovšem pohybuje v rozmezí mezi 1 až 500 nm.

Za nanočástice lze označit takové částice, které splňují následující podmínky (1):

1. minimálně jeden rozměr nebo vnitřní struktura musí být v intervalu 1–100 nm,
2. chemické nebo fyzikální vlastnosti mají na stejné úrovni jako atomy nebo molekuly,
3. jednotlivé nanočástice se dají kombinovat tak, aby vznikly větší struktury s rozměry mikrosvěta.

Nanočástice jsou 0 dimenzionální nanoobjekty neboli mají rozměr „nano“ ve třech směrech souřadných os. Tyto objekty lze dále dělit podle morfologických znaků na (1):

- nanokrystaly vytvářející povlaky a vrstvy,
- nanopěny a porézní nanomateriály,
- kvantové tečky,
- objemové nanomateriály a nanostroje.

2.1.1 Rozdělení nanočástic

Nanočástice jsou rozděleny do mnoha různorodých kategorií podle jejich vnitřního uspořádání, rozměrů a chemického složení (2).

2.1.1.1 Nanočástice na bázi uhlíku

Na bázi uhlíku jsou založeny tři hlavní třídy: fullereny, uhlíkové nanotrubičky a nanodiamanty. Fullereny jsou molekuly uhlíku ve tvaru duté koule nebo elipsoidu. Mezi jejich významné vlastnosti patří elektrická vodivost, pevnost, a elektronová afinita. Uhlíkové nanotrubičky mají protáhlé, duté struktury. Trubičky mohou být jedno, dvou nebo mnohovévrstvé (2).

2.1.1.2 Keramické nanočástice

Keramické nanočástice jsou anorganické, nekovové pevné látky. Vyskytují se ve formě polykrytalické, bez tvaru, pórovité nebo duté. Tyto nanočástice si našly velké uplatnění při fotokatalýze a barvení fotografií (2).

2.1.1.3 Kovové nanočástice

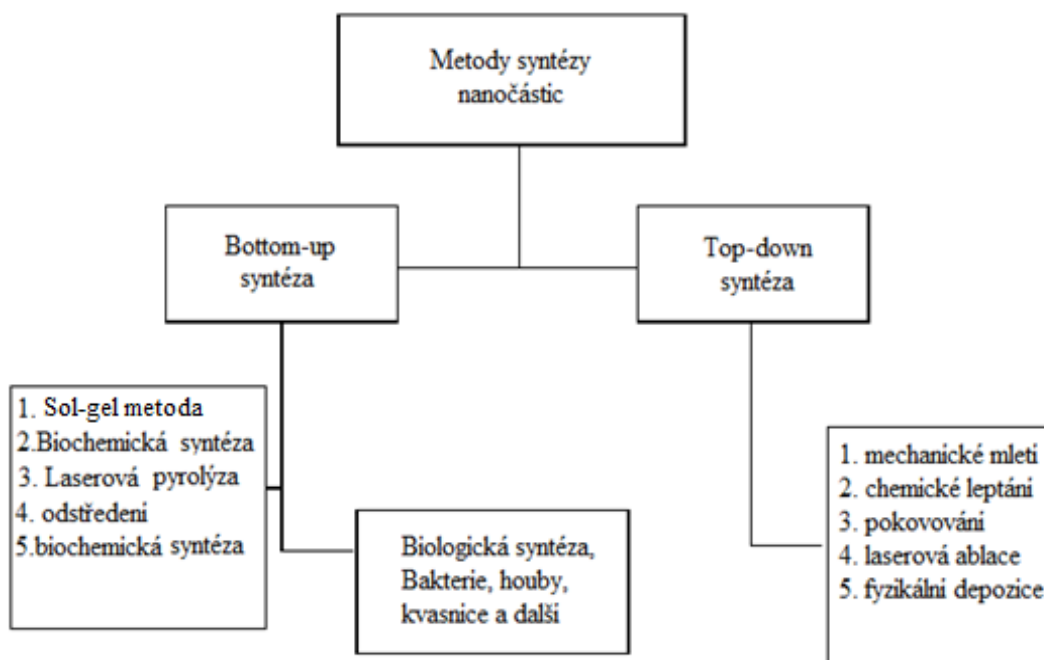
Kovové nanočástice se získávají z prekursorů při chemických reakcích kovů. Jsou významné díky svým optickým a optoelektrickým vlastnostem. Díky svým optickým vlastnostem mají kovové nanočástice velké využití. V současnosti jsou to nejvíce komerčně využívané nanočástice (2). Využívají se nanokrytalické slitiny s vynikajícími mechanickými vlastnostmi (pevnost a elasticita). Nejpoužívanějšími kovovými nanočásticemi jsou vrstvy drahých kovů, jako je zlato, stříbro nebo platina, ale rozšiřuje se využití i dalších kovů (železo, měď nebo hliník) (2).

2.1.1.4 Další typy nanočástic

Polovodičové nanočástice mají vlastnosti mezi kovy a nekovy. Jejich hlavní využití je mezi elektronickými zařízeními a ve fotooptice. Polymerní nanočástice bývají na organické bázi. Obvykle mají tvar nanokuličky nebo nanokapsle.

2.1.2 Syntéza nanočástic

Technologií pro vznik nanočástic existuje mnoho. Rozdělují se na dva hlavní směry výroby: „Bottom-up“ a „Top-down“. Tyto dva směry se dále rozdělují na další podtřídy podle průběhu syntézy, reakčních podmínek apod. Rozdělení metod syntézy nanočástic je vidět na obrázku 1.



Obr. 1 Schéma rozdělení metod pro syntézu nanočástic dle zdroje (2), přeloženo.

2.1.2.1 Top-down syntéza

Při využití této metody dochází k tzv. „destrukci“ molekul. Je to cesta zmenšování molekul, kdy z větších molekul získáme menší, až dosáhneme „nano“ rozměrů. Příkladem této syntézy je chemical vapor deposition (CVD), physical vapor deposition (PVD), drcení, mletí a broušení (2).

Při této syntéze obvykle dochází k zisku velkého množství částic, které mají různý tvar a velikost. Při syntéze může nastat agregace částic, kvůli srážkám při procesu a částice poté difundují a nevratně se spojí. To poté omezuje jejich využití (3).

2.1.2.2 Bottom-up syntéza

Někdy se také nazývá building up syntéza a principem metody je skládání molekul, jelikož nanočástice jsou vytvářeny z relativně jednodušších látek. Začíná se s atomy nebo molekulami, kdy se příslušnou chemickou syntézou získají potřebné nanočástice. Lze využít syntéz, které jsou založené na odlišných principech – sedimentace, sol-gel metoda, biochemická syntéza aj. (2).

Tento typ syntézy má lepší využití, jelikož touto úpravou lze získat potřebný tvar, anebo velikost nanočástic. Nicméně poměr vzniklý Bottom-up syntézou je malý a celý proces je velice náročný, pouhá drobná chyba vede k velkým odchylkám od tvaru a velikosti (3).

2.1.3 Fe₃O₄ (oxid železnato-železitý)

Tento oxid železa je známý také jako magnetit. Jedná se o černě zbarvený oxid, který je silně magnetický. V přírodě se nachází ve velkých krystalech a v rozměrech „nano“ podléhá silné korozi (4). Je využíván organismy (včely nebo řasy) k orientaci v prostředí. Magnetit má velký rozsah využití díky své biokompatibilitě a feromagnetickým vlastnostem, například jako katalyzátor, k imobilizaci proteinu, biosenzor apod. Získává se termální dekompozicí, metodou sol-gel, mechanicky, koprecipitací přímo z roztoku apod (5).

2.1.4 Nd₂O₃ (oxid neodymitý)

Neodym patří mezi vzácné prvky a je významný díky svým vlastnostem – vysoká mechanická pevnost, vodivost kyslíkových iontů, vysoká absorpce UV záření a luminiscence. (6) Je zkoumán jako potencionální lék na léčení rakoviny prsu. Nanočástice mají lehce namodralou barvu. Nejčastěji se získává metodou Sol-gel či hydrotermální syntézou (7).

2.1.5 Zn (zinek)

Nanočástice zinku patří do skupiny mezoporézních nanočástic křemičitanu-vápenatého, které mají veliké využití ve zdravotnictví, hlavně stomatologii. Jsou to bioaktivní materiály s velkou antibakteriální aktivitou (8). Zinek je důležitý prvek pro syntézu proteinů a DNA (9). Jeho ionty inhibují enzymatickou aktivitu při buněčném metabolismu. Nejčastější postup přípravy nanočástic zinku je metoda Sol-gel (10).

2.1.6 Aplikace nanočástic v biomedicině

Rozměry jsou jedním z hlavních důvodů využití nanočástic v biomedicině. Odpovídají úrovni základních stavebních prvků živých organismů, jako jsou aminokyseliny nebo nukleotidové jednotky. Zároveň díky svým rozměrům skýtají nové možnosti. Jednou z nejčastějších aplikací nanočástic je transport léků v krevním řečišti (3).

Díky svým „nano“ rozměrům jsou nanočástice schopny projít skrze kapiláry, a zároveň mají schopnost nést na sobě určité množství chemických látek. K tomu se využívají nanočástice oxidu železa jako magnetit (Fe_3O_4) anebo maghemit (Fe_2O_3), které jsou ideální díky jejich magnetickým vlastnostem, jelikož mají adekvátní reakci v magnetickém poli. Dalším přínosem jsou pro zobrazovací systémy, hlavně u magnetické rezonance, kdy se aplikují jako kontrastní látky (3).

Díky nanočásticím jsme schopni získat anatomické obrazy s vysokým rozlišením. Dále jsou používány při termoterapii, kdy lze nanočástice magnetickou indukcí zahřát v lokalizovaném místě. V lidském těle jsme schopni nanočástice ohřát až na teplotu 46 °C, což způsobuje poškození nebo zničení nádorových buněk, které jsou více citlivé na teplo než normální tkáň. V poslední době se využití nanočástic velmi rozvinulo při diagnózách rakovin (11).

Dalším využitím jsou biosenzory, které pomáhají indikovat různé vazby či interakce v biologickém systému. V poslední době se nanočástice a nanomateriály velmi rozvinuly při aplikaci a výrobě dezinfekčních roztoků a gelů. Různé druhy nanočástic, např. stříbro, jsou velmi toxické pro bakteriální populace a viry. V poslední dekádě se také rozmohl vývoj nanorobotů, kteří mají rozměry až pouhých 50 nm. Nanoroboti se využívají při podpoře imunitních reakcí a poškození mozku. Dále se

využívají v zubním lékařství, kde se aplikují jako lokální anestezie, či k opravám zubní skloviny (12).

Na druhou stranu obrovským problémem při využívání nanočástic bývá jejich toxicita pro různé organismy nebo živé systémy (1).

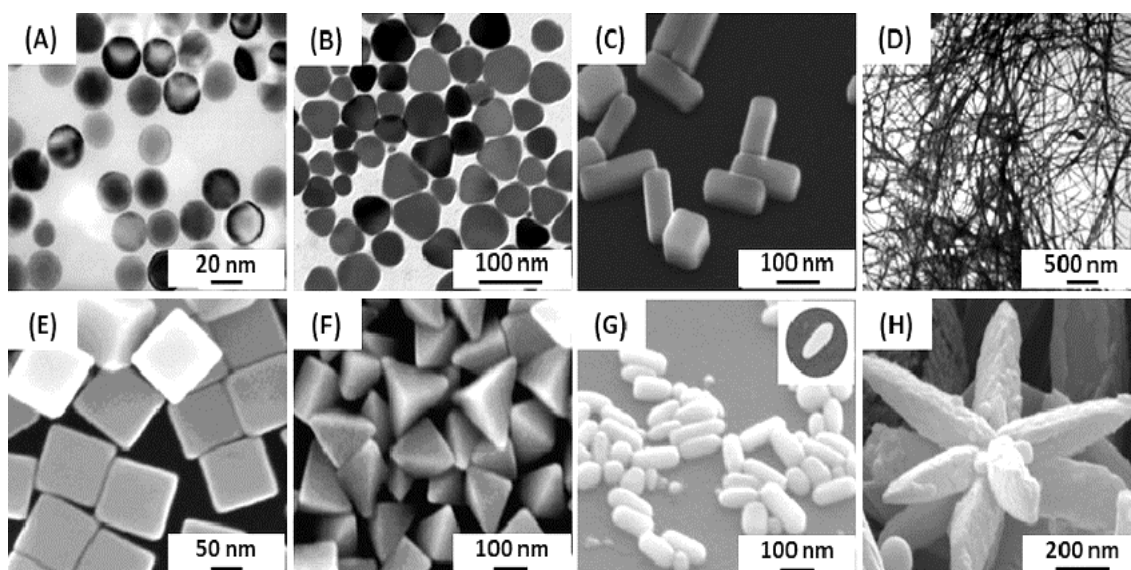
Kvůli nízkému působení gravitace se nanočástice déle udržují ve vzduchu a může docházet k jejich inhalaci (2). Důsledkem nadměrného používání různých zařízení, např. 3D tiskáren, mohou vznikat aerosoly, které nejsou biokompatibilní s lidskými buňkami a mohou způsobovat koagulaci krevních buněk, zánět a další. (3).

2.1.7 Hodnocení nanočástic

Při hodnocení nanočástic sledujeme jejich různé vlastnosti. V této kapitole se budeme věnovat jejich tvaru, velikosti a magnetismu. Budeme také zkoumat, jaké metody se ke sledování využívají.

2.1.7.1 Tvar nanočástic

Morfologie nanočástic popisuje fyzikální tvar a popisuje povrch nanočástic, který může obsahovat různé póry nebo trhliny. Různé morfologie ovlivňují vlastnosti nanočástic jako je disperze, míra adsorpce či toxicita. Pro vyhodnocení tvarů je zapotřebí zobrazení nanočástic pomocí SEM, AFM nebo TEM. Znaky, které sledujeme, nejsou pouze velikost a tvar, ale také poměr stran, kulovitost či kruhovitost, různé diverzity, konvexe anebo fraktální dimenze. Příklady různorodosti tvarů nanočástic vidíme na obrázku 2 (3).



Obr. 2 Snímky z TEM a SEM mikroskopie zachycující různé tvary nanočástic zlata (13)

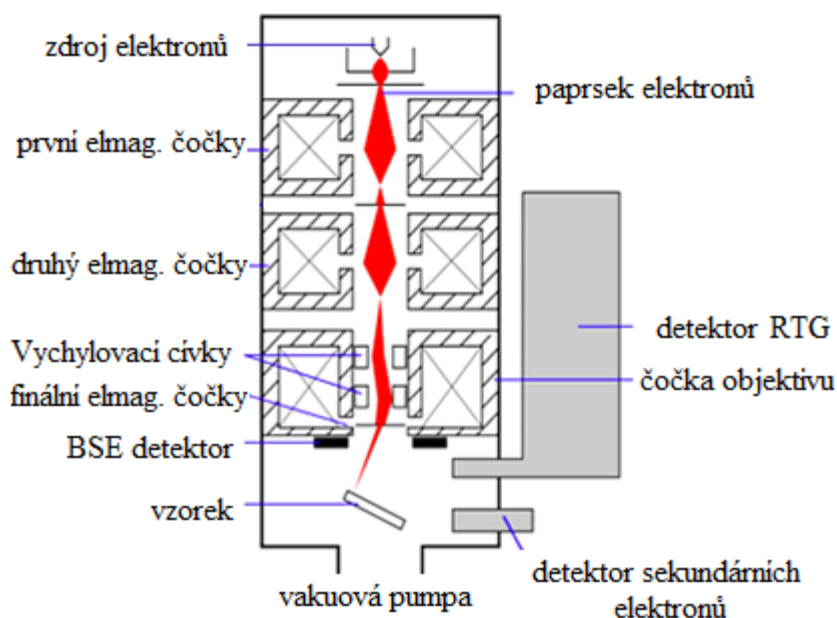
2.1.7.2 Metody mikroskopie

V následující kapitole se budeme zabývat způsoby mikroskopie, které jsme využili v této práci.

SEM mikroskopie

SEM mikroskopie (scanning electron microscopy) neboli rastrovací elektronová mikroskopie je jednou z hlavních zobrazovacích metod, která nejvíce přispěla k vývoji nanočástic. SEM využívá svazek fokusovaných elektronů ke sledování objektů. Mezní rozlišovací schopnost tohoto druhu mikroskopu dosahuje až 1 nm, ale i přesto nelze zachytit jednotlivé atomy nanočástic. Mezní rozlišovací schopnost je dána svazkem elektronu, který je schopen zachytit plochu až o rozměru 0,4 nm (1).

Paprsek je po vzorku posouván pomocí vychylovacích cívek a prochází vzorek po řádcích. Na obrázku 3 je zobrazené schéma rastrovacího elektronového mikroskopu.



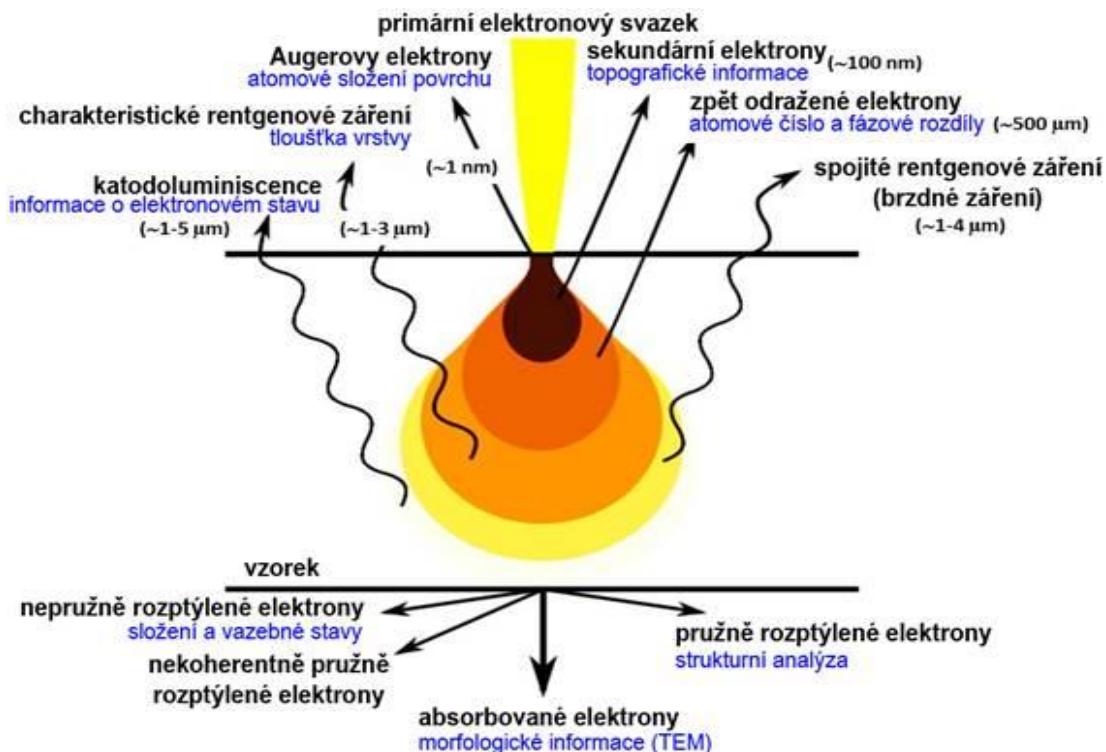
Obr. 3 Schéma konstrukce SEM mikroskopu (14)

Vzorek je skenován bod po bodu, dokud není obraz kompletní. Elektrony a atomy spolu vzájemně reagují a vytvářejí sekundární a zpětně odražené elektrony, které se dají detekovat a snímat. Pomocí počítače se k danému bodu přiřadí příslušná hodnota jasu obrazu. Dále se na daném místě svazek vychýlí na následující bod vzorku a proces se opakuje. V komoře, kde se nachází sledovaný vzorek, je vhodné mít vakuum, jelikož ve vakuu se lépe pohybují příslušné elektrony se správnou funkcí (14).

Pro vyobrazení snímku je zapotřebí snímat sekundární a zpětně odražené elektrony. Získávají se pomocí termoemisních zdrojů, které využívají tepelnou energii. Další možnost zdroje je žhavené wolframové vlákno, které je nejpoužívanějším zdrojem (dosahující teploty až 2 800 K). Dále se využívá Shottkyho emisní zdroj, který je téměř stejný jako zdroj s wolframem, ale na žhavené vlákno je nanášena vrstva oxidu zirkonu, která snižuje potřebnou teplotu žhavení.

Při snímání signálu rozlišujeme elektrony na: sekundární (SE), zpětně odražené elektrony (BSE) a Augerovy elektrony. Schéma emitovaných elektronů je ukázané na obrázku 4. Interakce primárních elektronů se vzorkem způsobuje zisk SE a BSE elektronů. Sekundární elektrony dávají informaci o topografii povrchu (14). Zpětně odražené elektrony jsou elektrony odražené a rozptýlené pod úhlem větším, než je 90°. Tyto elektrony udávají informaci o fázovém rozhraní vzorku. Augerovy elektrony se

využívají k analýze chemického složení, jelikož každý prvek má určité hodnoty pro Augerovy elektrony.



Obr. 4 Schéma interakce elektronového svazku a vzorku v průběhu SEM mikroskopie (14)

Ke snímání signálů jsou zapotřebí detektory. Everhart-Thornley detektor je určen k detekci elektronů SE a BSE. Jedná se o scintilační detektor, který je uzavřen ve Faradayově kleci. Ke snímání sekundárních elektronů se využívá SE detektor, na který je přivedeno napětí o velikosti od 80 až do 200 V. Jako poslední je BSE detektor, kdy na Faradyovu klec je přivedeno záporné napětí, které poté odpuzuje elektrony. Tyto elektrony nemá detektor snímat (14).

2.1.7.3 Velikost nanočástic

Nanočástice nelze zobrazit pomocí konvenčních optických mikroskopů. Z tohoto důvodu se ke sledování a popisování vlastností využívají elektronové mikroskopy s vysokou rozlišovací schopností (1). Nejčastěji se využívají metody transmisní elektronové mikroskopie (TEM) nebo rastrovací elektronové mikroskopie (SEM).

Pro ještě lepší zobrazení a charakterizaci se ve spojení se elektronovou mikroskopií využívá spektroskopie. Spektroskopie je metoda využívající elektromagnetického záření působícího na vzorek. Pomocí spektroskopie se lépe zjišťuje koncentrace, tvar a velikost nanočástic.

Diferenciální odstředivá sedimentace (z anglického DCS – Differential centrifugal sedimentation)

DCS je metoda sloužící k analýze distribuce velikosti částic. Pomocí této metody jsme schopni rozlišit částice o rozměrech od 5 nm do 75 μm . K měření se používá disková centrifuga. Přístroj využívá sedimentaci v odstředivém poli a monochromatický světlený paprsek. V komoře je zapotřebí přítomnost kapaliny, nejlépe s nízkým hustotním gradientem. Do středu rotujícího disku, který musí být průhledný, se aplikuje zředěný vzorek s částicemi, které chceme měřit (15). Částice vytvoří na povrchu kapaliny tenký film, a až poté začnou postupně sedimentovat. Monochromatický světelný paprsek je umístěn v přesně dané vzdálenosti od osy otáčení. Paprsek prochází komorou a po průchodu je pomocí detektoru detekována jeho intenzita. Automatický software pomocí intenzity získá rozdělení velikosti částic. Software využívá *Stokesův zákon a Mieho rozptyl* (16).

2.1.7.4 Hodnocení toxicity nanočástic

Zásadní roli při hodnocení toxicity nanočástic hraje jejich povrch. Působení nanočástic může způsobovat v mnoha případech poškození biologického systému (chemicky i mechanicky) a může vést až k ovlivnění nebo úplné změně funkcí biologických látek. Například při účinku nanočástic niklu na DNA dochází k mutagenním či genotoxickým efektům (17).

Průnik nanočástic do organismu je možný mnoha způsoby: dýchacími cestami, kůží, trávicím traktem apod. Při vstupu nanočástic do organismu hraje velkou roli jejich velikost a tvar. Kůže díky svým parametrům, zejména hydrofilitě a hydrofobicitě povrchu, není příliš propustná. Při průniku nanočástic dýchacími cestami dochází k absorpci na sliznici. Další roli při průniku nanočástic hraje jejich náboj. Při různých testech bylo zjištěno, že nejlépe pronikají částice neutrální a kationty. Nejvíce také

pronikají nanočástice sférické (17). Nejčastěji nanočástice mají toxické účinky při interakci s proteiny a bílkovinami, kdy se nanočástice obalí proteiny a poté je obtížné pro další interagující buňky rozpoznat nanočástice (18).

Respirometrie

Principem respirometrie je sledování a měření spotřeby kyslíku, produkce oxidu uhličitého a případně dalších plynů u aerobních (nebo anaerobních) procesů (19). Z respirometrického měření můžeme určit (vypočítat) řadu parametrů, které charakterizují daný systém: biochemická spotřeba kyslíku, produkce oxidu uhličitého, doba trvání jednotlivých fází růstu mikroorganismů (LAG, exponenciální a plato fáze) či rychlosti sledovaných procesů (20).

Biochemická spotřeba kyslíku (BSK) je hodnota udávající koncentraci kyslíku, který se spotřebuje při biochemické oxidaci organických látek mikroorganismy za daných podmínek. Celková spotřeba kyslíku je závislá na době inkubace (19). Nejčastěji se pro experimenty využívá inkubační doba o délce 5 až 28 dnů. Celková hodnota biochemické spotřeby kyslíku se získává podle rovnice 1.

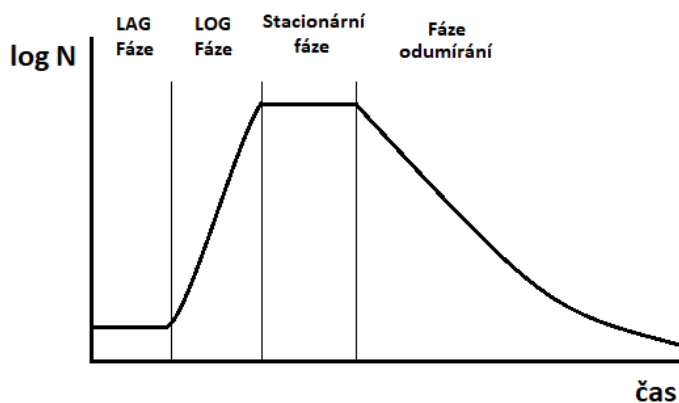
$$BSK_S = \frac{BSK_C - BSK_{blank}}{c_{vz}} \quad \text{Rovnice 1}$$

Kde BSK_S je výsledná biochemická spotřeba kyslíku, BSK_C je naměřená biochemická spotřeba kyslíku získaná v definovaném čase, BSK_{blank} je naměřená biochemická spotřeba kyslíku kontrolního měření a c_{vz} je hmotnostní koncentrace zkoušené látky. Výsledná hodnota se zpravidla udává v mg/l (3) (20).

Fáze růstu bakteriální populace

Růst populace je rozdělen do několika kroků – klidová (LAG) fáze, exponenciální (LOG) fáze, stacionární (plato) fáze a fáze odumírání buněk. Během LAG fáze bakterie nerostou, pouze se připravují k množení a přizpůsobují se prostředí (19). Podle délky LAG-fáze lze usuzovat o toxicitě prostředí (nebo látek přítomných v prostředí). V průběhu exponenciální fáze růstu prochází bakterie zvětšováním objemu, syntetizují různé enzymy na podporu růstu a rychle se množí. Konečná fáze růstu populace (někdy označena jako dead fáze) udává míru/průběh odumírání buněk. Buňky v tomto čase

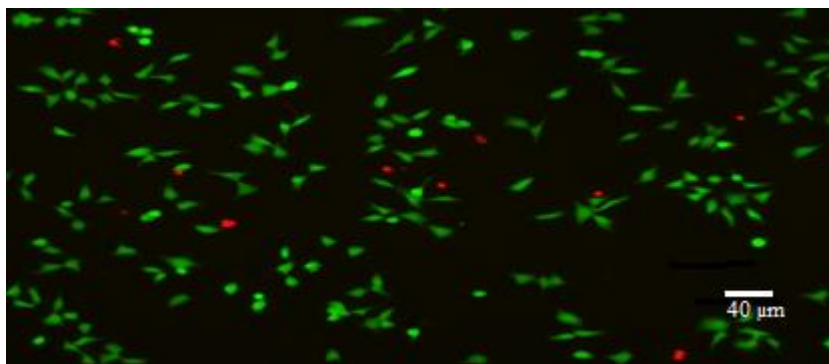
ztrácí objem a enzymy porušují buněčnou stěnu, vytvářejí se klidová stádia a kvůli nepříznivým podmínkám pomalu odumírají. Na základě stanovení počáteční fáze odumírání lze vypočítat dobu, jak dlouho trvalo bakteriím zužítkovat/spotřebovat substrát přítomný v prostředí. Na obrázku 5 je vyobrazena křivka růstu bakterií a jednotlivé fáze vývoje (20).



Obr. 5 Křivka bakteriálního růstu (21)

Metoda Live/dead

Live/dead test je rychlá metoda hodnocení podílu mrtvých a živých buněk ve sledované preparátu. Tento test je široce využíván díky své přesnosti a rychlosti. Využívá se fluorescenčních barviv, která jsou snímána pomocí fluorescenčního mikroskopu. Barviva mají specifickou vazbu k DNA a mají odlišné vlastnosti v závislosti na způsobu průchodu skrz cytoplazmatickou membránu buněk. Nejčastěji se využívá barvivo *Propidium jodid*, které proniká pouze poškozenou membránou mrtvých buněk a zabarvuje je tak do červené barvy. Aby vznikl kontrast mezi buňkami, využívá se ještě druhé barvivo (např. SytoGreen 9), které je schopno proniknout membránou živých i mrtvých buněk. Z tohoto důvodu ve výsledku vidíme zeleně buňky s neporušenou membránou a považujeme je jako živé, zatímco červeně buňky s porušenou membránou, považujeme jako mrtvé. Viditelný rozdíl pod fluorescenčním mikroskopem vidíme na obrázku 6 (22).



Obr. 6 Mikroskopické zobrazení LIVE/DEAD nervových kmenových buněk: Živé buňky jsou obarveny zeleně, zatímco mrtvé buňky obarveny červeně (23)

Cytotoxicita

Cytotoxicita je definována jako schopnost látek (buněk nebo prostředí) ničit živé buňky. Studie cytotoxicity je počáteční krok ke stanovení buněčné odpovědi zkoušené látky a pro studium možného využití nanočástic v biomedicíně; jedná se o jedno z nejdůležitějších testování (24). Metod pro zkoušení cytotoxicity nanočástic je mnoho, mezi nejčastější patří testování pomocí barviv (trypanová modř, Coomassie apod.). Buňky se diferencují podle absorpce barviv na živé a mrtvé buňky. Dalšími testy jsou MTT a XTT, kdy se využívají kolorimetrická barviva, která se v živých buňkách přetvářejí na krystaly formazanu. Zatímco v mrtvých buňkách se toto barvivo nevytvoří, což vede k poklesu absorbance (25).

Ekotoxicita

Testováním ekotoxicity rozumíme zkoumání působení cizorodých látek na živé organismy a životní prostředí. Sledují se různé ekotoxikologické ukazatele (NOAEL, LOAEL, EC50) a poté reakce na organismus (jako je například smrt jedince, inhibice růstu nebo pohybu apod.). Při testování se organismy (nejčastěji plody nebo semena rostlin, jako například hořčice, pšenice apod.) vystavují různým koncentracím testovaných látek. Ekotoxicita určuje vliv chemických látek či jiných směsí a odpadů na životní prostředí nebo jeho složky (26).

2.1.8 Další vlastnosti nanočástic

V této kapitole se budeme zabývat další vlastností nanočástic.

2.1.8.1 Magnetismus

Jednou z hlavních vlastností nanočástic, které jsou v biomedicínském odvětví sledovány, je jejich magnetismus (4). V současné době už se dají syntetizovat nanočástice s přesně danými magnetickými vlastnostmi. Dělíme je na tři základní skupiny podle celkového magnetického momentu na nemagnetické, diamagnetické a feromagnetické (5).

Diamagnetické látky projevují magnetismus pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole a látka je lehce magnetickým polem odpuzována a zeslabuje ho. Tyto látky jsou složeny z částic s nulovým magnetickým momentem (4). Patří mezi ně například **zinek**, uhlík, měď nebo síra. *Feromagnetické látky* projevují spontánní magnetizaci. Tyto látky projevují magnetismus stále. Pokud se látka nenachází v magnetickém poli, její magnetický moment je roven nule, ale jsou-li vloženy do vnějšího magnetického pole, dojde ke značnému zesílení tohoto pole. Nejčastějšími zástupci feromagnetik jsou **železo**, nikl a kobalt. Jako *nemagnetické látky* se označují takové látky, které mají magnetický moment roven nule, i když jsou vloženy do vnějšího magnetického pole. Mezi zástupce nemagnetických látek patří **oxid neodymitý**, hliník, zlato apod. (5).

2.2 Biologické prostředí

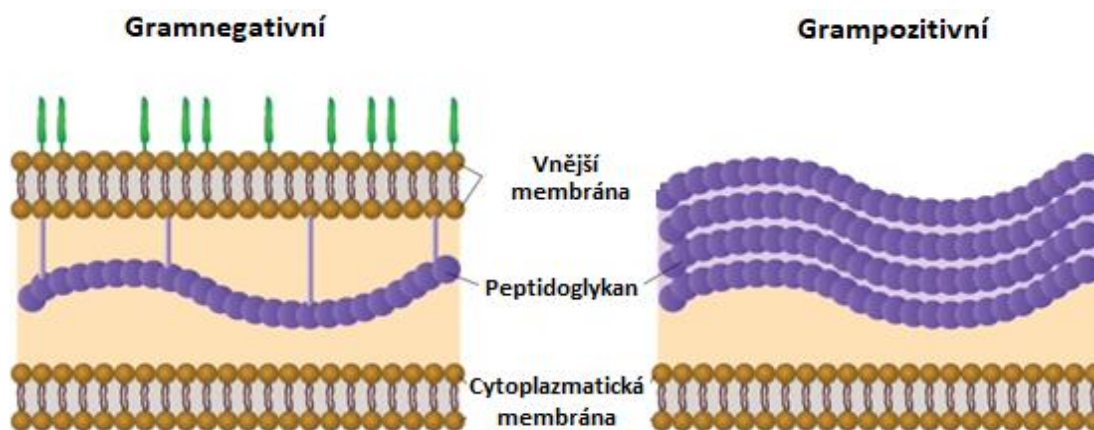
2.2.1 Struktura bakteriální buňky

Bakterie je prokaryotní buňka a stavebně jednodušší než eukaryotická buňka. Na povrchu buněk se nachází cytoplazmatická membrána, která je polopropustná. Membrána ohraničuje vnitřní prostředí a vnější prostředí buňky. Pomocí membrány buňka kontroluje pohyb látek do buňky a naopak, zároveň působí jako ochranná vrstva. Pod cytoplazmatickou membránou se nachází buněčná stěna. Ta působí jako ochrana a opora buňky. Je tvořena především z peptidoglykanů, fosfolipidů, bílkovin a lipopolysacharidů. Buňka je vyplněna cytoplazmou, která obsahuje různé enzymy, ionty a meziprodukty metabolismu. Nejvýznamnější strukturou uvnitř buňky je nukleoid, který obsahuje jednu molekulu DNA. Mezi další struktury uvnitř buňky patří ribozomy, které slouží k syntéze bílkovin, plazmidy, obsahující molekulu DNA

k replikaci, proteiny a další. Některé bakterie mají další struktury, jako jsou bičíky, fimbrie, inkluze apod. (27).

2.2.2 Bakteriální kmeny

V této práci jsme použili dva bakteriální kmeny. Ty se lišily od sebe vlastnostmi buněčné stěny – grampozitivní a gramnegativní (identifikaci pomocí Gramova barvení), přičemž rozdělení je založeno na stavbě bakteriální buněčné stěny, které je zobrazeno na obrázku 7. Grampozitivní bakterie mají buněčnou stěnu složenou převážně z polysacharidů, peptidoglykanu a kyseliny teichoové, zároveň jim chybí vnější membrána a lipopolysacharidová vrstva. Tloušťka buněčné stěny grampozitivních bakterií je přibližně 20 nm. Při Gramově barvení se bakterie zabarvují modrofialově (28). Buněčná stěna bakterií gramnegativních je na povrchu překryta druhou membránou a buněčná stěna je tvořena z lipopolysacharidů a peptidoglykanu a dosahuje tloušťky okolo 15 nm. Zbarvení těchto bakterií při Gramově testování je růžové (28).



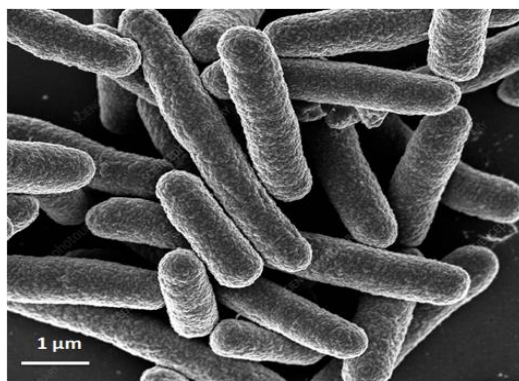
Obr. 7 Znázornění G+ a G- bakteriální buněčné stěny (29)

2.2.2.1 *Escherichia Coli*

Bakterie *Escherichia Coli* je bakteriální kmen patřící mezi gramnegativní, má tyčinkovitý tvar a pohybuje se pomocí bičíku. Šířka bývá obvykle 0,5 μm a na délku dosahují zhruba 2 μm . Její tvar je zobrazen na obrázku 8 a patří do kmene *Proteobacteria* a čeledi *Enterobacteriaceae*. Nachází se běžně ve střevní mikroflóře

a jsou tedy fakultativně anaerobní. Bakterie hraje důležitou roli při tvorbě vitamínů B a K. Také chrání střevní sliznici před dalšími bakteriemi. Vyskytuje se v trávicím traktu téměř hned po porodu. Bakterie se vyskytuje i v jiných místech, ovšem v mnohem nižším množství, aby nezpůsobovala žádné potíže. Pokud dojde ke zvýšenému výskytu v netypických místech, může docházet k patologiím jako infekce, sepse ran, záněty močových cest apod. Při poranění střev a průniku bakterie do břišní dutiny dochází k zánětu, který je bez lékařského zákroku smrtelný.

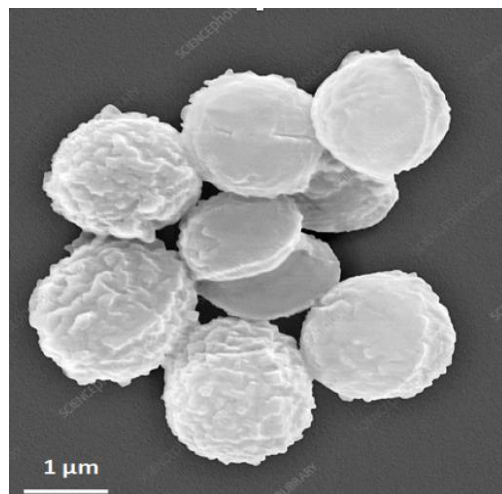
Obvyklý zdroj nákazy *Escherichia Coli* je kontaminovaná voda a potraviny, špatně tepelně upravené hovězí maso apod. Další zvýšené riziko nákazy je možné v rozvojových zemích. Patří mezi jednu z nejlépe prozkoumaných bakterií, proto se nejvíce používá při pokusech v mikrobiologii a biomedicíně (30).



Obr. 8 Fotografie *Escherichia Coli* zobrazená pomocí SEM mikroskopie (31)

2.2.2.2 *Micrococcus Luteus*

Bakterie *Micrococcus Luteus* je na rozdíl od *Escherichia Coli* grampozitivní. Dosahuje rozměrů 0,9–1,8 μm a je kulovitěho tvaru. Její tvar je zobrazen na obrázku 9. Pochází z čeledi *Micrococcaceae*, kmen *Actinobacteria*. Bakterie se vyskytuje běžně ve vodě, vzduchu i půdě. V lidském těle se přirozeně vyskytuje ve sliznici horních dýchacích cest, úst a je součástí mikroflóry pokožky. Bakterie způsobuje zápach u lidí, jelikož je schopná štěpit potní složky. Jedná se o aerobní bakterii, takže k životu potřebuje kyslík na rozdíl od *Escherichia Coli*. Bakterie vytváří kolonie, které jsou charakteristické svou barvou, žluté nebo kalně oranžové. Barvu získávají kvůli obsahu karotenoidních barviv. Toto barvivo chrání bakterii proti ultrafialovému záření, které je pro ni letální.



Obr. 9 Fotografie *Micrococcus Luteus* zobrazená pomocí SEM mikroskopie (32)

Micrococcus Luteus za běžných podmínek není patogenní bakterie. U osob s oslabenou imunitou nebo novorozenců však může vyvolávat onemocnění nebo infekce. Bakterie jsou nepohyblivé a seskupují se do tetrad. Nachází se v prostředí, kde se teplota pohybuje okolo 25–37 °C, lidské tělo tedy plně vyhovuje jejímu přežití. Dále jim vyhovuje prostředí s vysokou koncentrací solí a nižším množstvím vody (30).

2.2.3 Vliv magnetismu na populace bakterií

Vliv působení magnetického pole na živé organismy se odvíjí především od vlastností, jako jsou frekvence, amplituda a doba působení magnetického pole. Bylo zjištěno, že již slabé magnetické pole, v řádech mT, má prokazatelný vliv na buňky (33). Zkoumají se změny iontového transportu, aktivace různých enzymů apod. Magnetické pole může ovlivnit různé vlastnosti buněk (funkce buněčné stěny, změna tvaru buňky, změna iontového toku přes membránu apod.). Nastalé změny mohou být jak trvalé, tak pouze dočasné (35).

Vliv magnetického pole se sleduje např. pomocí kultivačních testů a sledování rychlosti růstu bakterií. Bylo zjištěno, že rychlost růstu bakteriální populace se snižuje s rostoucí silou magnetického pole. Vědci z Akademie věd a Masarykovy univerzity zjistili, že nízkofrekvenční magnetické pole působící na bakterii *Escherichia Coli* snižuje její růst oproti kontrolnímu měření (vzorek nebyl vystaven žádnému magnetickému poli). Ovšem účinky byly pouze krátkodobé a po odstranění magnetického pole se schopnost

růstu bakteriím vrátila. Magnetické pole má tedy prokazatelný vliv na bakterie, ovšem jeho účinky nejsou ještě dostatečně prozkoumány (36).

Berg ve své práci uvedl, že pole musí mít sílu minimálně 12 mT, aby došlo k interakci s buňkami (36). V roce 2005 italský tým vědců zkoumal vliv magnetických polí od slabých, (menších, než je 1 mT), až po silné pole (přesahující 1 T). Studie se nejvíce zabývala zkoumáním středně silného magnetického pole o velikostech mezi 1 mT a 1 T. Pole střední intenzity má velký vliv na bakteriální populaci, nejvíce ovlivňuje procesy v buněčné membráně. Toto pole je schopno způsobit i trvalé změny funkční nebo strukturní. Může se jednat o změnu tvaru cytoskeletu, změnu iontového toku přes cytoplazmatickou membránu apod. (34).

Další podobná studie zkoumala vliv slabého magnetického pole na bakteriální populace *Escherichia Coli* a *Paracoccus denitrificans*. Při těchto pokusech se zkoumal vliv na stavbu bakterií. Magnetické pole působilo na bakteriální populaci 60 minut. Při experimentu nemělo pole žádný vliv a nedošlo k žádným změnám (37). V podobné studii, kdy ovšem sledovali bakterie *Escherichia Coli* a *Pseudomonas putida*, nechali magnetické pole působit 20 hodin. Poté hodnotili, zda došlo ke změnám růstu bakterií. Při experimentu došlo k inhibici růstu, ovšem po odstranění magnetického pole se růst bakteriální populace navrátil k normálu (38). Stále není průkazně dokázáno, že by účinky magnetického pole na bakteriální populaci byly fatální. Naopak bylo prokázáno, že pole o vyšší intenzitě může způsobit inhibici růstu bakteriálních kolonií (38).

Mezi faktory ovlivňující magnetismus nanočástic patří chemické složení, krystalová mřížka, tvar a velikost. Magnetické chování a závislost na velikosti je řízena doménovou strukturou nanočástic. S rostoucími hodnotami velikosti nanočástic je lze klasifikovat na superparamagnetické, jednodoménové a vícedoménové. Obecně lze říct, že magnetické momenty se budou zvětšovat s velikostí a objemem částic. Nárůst magnetických momentů je náhle zastaven při vytvoření více magnetických domén (39).

3 Výzkumná část

3.1 Cíle a výzkumné předpoklady

Cílem práce je navrhnout metody a techniky pro studium a charakterizaci parametrů a vlastností nanočástic. Jedná se především o magnetické nanočástice. U vybraných typů nanočástic provést charakterizaci, především jejich velikost, strukturu apod. Navrhnout metodický postup pro hodnocení toxických účinků nanočástic na bakteriální buňky. Experimentálně otestovat různé typy nanočástic o různých vlastnostech na bakteriální kmeny.

Pro tyto experimenty byly vybrány kmeny *Escherichia Coli* a *Micrococcus Luteus*. U těchto experimentů posoudit a definovat silné a slabé stránky jednotlivých metod. Na závěr posoudit a stanovit shody dosažených výsledků s odbornou literaturou.

Předpokládáme, že jednotlivé typy nanočástic, budou vykazovat různé toxické účinky na bakteriální buňky v závislosti na jejich vlastnostech. Nanočástice běžně prokazují zvýšené toxické účinky.

Předpokládáme, že pro magnetické nanočástice tento jev pozorován nebude ani při vyšších koncentracích, a to právě v důsledku vlivu magnetických účinků (magnetismus ovlivňuje bakterie spíše pozitivně).

3.2 Metodika výzkumu

Výzkum byl zrealizován v laboratoři biologie a molekulární biologie CxI TU v Liberci, v laboratoři mikroskopie na Katedře materiálu FS TU v Liberci a v laboratořích biotechnologie FZS. Měření probíhalo v době mezi zářím 2019 a zářím 2020. Jedná se o kvalitativní výzkum.

3.3 Materiály a metody

3.3.1 Použité nanočástice

Pro všechny experimenty jsme používali 3 druhy nanočástic (Fe_3O_4 , Nd_2O_3 a Zn). Nanočástice Fe_3O_4 jsou od firmy Sigma Aldrich s výrobcem udávanou velikostí v rozmezí 50–100 nm. Hustota nanočástic při teplotě 25 °C je 4,8–5,1 g/ml a bod tání je 1 528 °C. Registrační číslo CAS je 1317-61-9. Výrobce udává molekulární hmotnost 231,53 g/mol.

Zinek je také od firmy Sigma Aldrich (s velikostí nanočástic 40–60 nm). Hustota nanočástic při teplotě 25 °C je 7,133 g/ml a bod tání je 420 °C. Nanočástice mají registrační číslo CAS 7440-66-6. Výrobce udává molekulovou hmotnost 65,38 g/mol.

Nd_2O_3 byl vyroben laboratorní syntézou na katedře chemie na Technické univerzitě v Liberci. Velikost těchto nanočástic je mezi 50–1 000 nm.

3.3.2 Bakterie a příprava inokula

V průběhu práce byly použity dva bakteriální kmeny, bakterie *Escherichia Coli*, CCM 3954 a *Micrococcus Luteus*, CCM 732.

Bakterie jsme naočkovali na agar v Petriho misce. Agar byl připraven v 300 ml destilované vody, do které bylo přidáno 6,3 g PCA agaru od firmy Biorad. Poté jsme bakteriální kolonii pomocí inokulační kličky setřeli z Petriho misky a přenesli aseptickým způsobem do média (typ média je uveden u jednotlivých metod níže). Koncentraci bakterií v médiu jsme měřili pomocí absorbance. Absorbanci jsme stanovili pomocí spektrofotometru DR 2900 od firmy Hach-Lange. Kalibraci přístroje jsme provedli s čistým médiem. Software uložil hodnotu intenzity světelného záření prošlého skrz čisté médium v kyvetě. Pomocí této intenzity se přeměňuje hodnota absorbance s bakteriální suspenzí (metodou srovnání transmitance vzorkem). Hodnota pH bakteriální suspenze byla 7 (změřeno pH sondou s kapalným elektrolytem).

BSM médium bylo připraveno následovně: do 2 000 ml odměrné baňky jsme odlili 1 000 ml destilované vody a přidali 0,344 g KH_2PO_4 , 0,264 g K_2HPO_4 , 1,424 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a 0,680 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Poté jsme do odměrné baňky odpipetovali 2 ml roztoků $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci 1 g/l, CaCl_2 o koncentraci 0,196 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci 0,6 g/l a $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci 2 g/l. Tuto směs jsme doplnili destilovanou vodou do 2 000 ml po rysku a řádně promíchali. Hodnotu pH média jsme poté upravovali pomocí roztoku NaOH na požadovaných pH 7.

3.3.3 Disková centrifuga

Přístroj prošel kalibrací při standardu o známé velikosti částic. Jako médium pro experiment byla použita destilovaná voda. Koncentrace testovaných nanočástic odpovídala 50 mg/l, nanočástice byly během přípravy ultrazvukovány po dobu 30 minut. Těsně před měřením opět ultrazvukováno, abychom dosáhli větší disperze nanočástic v roztoku (zvýšení homogenity, snížení aglomerace částic). Rychlost centrifugy jsme nastavili na 7 560 otáček za minutu. Do již zkalibrovaného a běžícího disku jsme injekční stříkačkou postupně aplikovali medium s nanočásticemi. Software nám poté automaticky vyhodnotil naměřená data.

3.3.4 SEM mikroskopie

SEM mikroskopie byla provedena na zařízení od firmy Carl Zeiss. Jedná se o model UHR FE-SEM ultra plus. Přístroj má zvětšení 12 až 1 000 000 $\times$. Nanočástice jsme naprášili na terčík (holder vhodný pro SEM mikroskopii) a bez dalších úprav jsme je vložili do vakuové komory mikroskopu. Nanočástice díky své elektrické vodivosti nebylo potřeba speciálně upravovat.

Parametry nanočástic byly dále hodnoceny pomocí analýzy obrazu, a to v programu ImageJ. Software ImageJ je open source program (Java) pro zpracování obrazu inspirovaný ‘NIH Image’. ImageJ má pevně zavedenou uživatelskou základnu, obsahuje až tisíce pluginů a maker pro provádění nejrůznějších specifických úkolů. Na webových stránkách <https://imagej.net/Download.html> je k dispozici podrobný popis instalace a uživatelský manuál. Pomocí analýzy obrazu SEM

mikroskopie jsme získali i hodnoty solidity. Solidita je měřítkem morfologické drsnosti. Je definována jako oblast obrazu A a rozdělení konvexní oblasti trupu A_c (2). Hodnoty se vypočítají pomocí rovnice:

$$S = \frac{A}{A_c} \quad \text{Rovnice 2}$$

3.3.5 Respirometrie

K měření byl využit multikanálový respirometr Micro-Oxymax, což je plně automatizovaný systém, který kontinuálně detekuje koncentrace kyslíku, oxidu uhličitého a metanu. Vzorky jsou umístěny ve skleněné láhvi a umístěné na míchadle za účelem neustálého promíchávání vzorků. Celý měřicí systém (vzorek, láhev, detektory) je koncipován jako jedna uzavřená smyčka (jednotlivé části jsou spojeny teflonovými hadičkami). Kyslíkový detektor funguje na principu paramagnetické rezonance. Detektor methanu a oxidu uhličitého funguje na principu infračervené spektroskopie.

Pro respirometrické testy jsme využili BSM (basal salt medium) médium (složení uvedeno výše) a bakteriální suspenzi.

V průběhu experimentu jsme testovali 6 koncentrací nanočástic: 50, 100, 150, 300, 400 a 600 mg/l a souběžně jedno kontrolní měření (tj. bez nanočástic). Měření jsme prováděli vždy v duplikátech ve Fisherových lahvích, které byly umístěny po celou dobu na třepačce. Celkový objem vzorku činil 20 ml, kde 18 ml bylo BSM médium (popis viz. výše), 1,5 ml bakteriální suspenze (popis viz. výše) a 0,5 ml glukóza (o koncentraci 1 g/l). Teplota během měření byla udržována mezi 20 a 21 °C. Hodnoty O_2 a CO_2 byly automaticky snímány v pravidelných intervalech. Pro bakterii *Escherichia Coli* to bylo každých 93 minut a pro *Micrococcus Luteus* každých 66 minut.

3.3.6 Ekotoxicita

Při testování ekotoxicity jsme jako testovací organismus použili *Pšenici setou* (*Triticum aestivum*). Jedná se o jednoletou nebo dvouletou trsnatou travu z čeledi *Lipnicovitých*. Je to jedna z nejrozšířenějších obilnin a jedním z nejdůležitějších zdrojů proteinu. Největší využití rostliny je v potravinářském průmyslu. Dále jsme použili médium, které obsahuje chemikálií ze zásobních roztoků. Zásobní roztoky obsahovaly: 5,88 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,47 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,3 g/l NaHCO_3 a 0,12 g/l KCl. Na přípravu média jsme do odměrné baňky o objemu 1 l použili 25 ml od každého zásobního roztoku. Poté jsme doplnili destilovanou vodu na objem 1 l. Hodnota pH byla v rozmezí $7,8 \pm 0,2$.

Souběžně bylo provedeno kontrolní měření pouze s médiem a semen *Pšenice*. Finální koncentrace nanočástic v médiu byla 0,1 g/l, 0,01 g/l a 0,001 g/l. Do Petriho misek jsme vložili vždy 5 semen testované *Pšenice* a přilili 10 ml média s danou koncentrací nanočástic. Petriho misky jsme následně vložili do inkubátoru CLW 1 000 od firmy Pol-eko.

Doba expozice byla 120 hodin, kdy se v průběhu testu střídala teplota následovně: 14 hodin bylo zařízení nastaveno na 30 °C, poté byla na 10 hodin nastavena teplota na 20 °C. Nastavení světla bylo nastaveno jako simulace denního svícení, kdy 14 hodin bylo zapnuté světlo, a dalších 10 hodin byla simulovaná noc. V zařízení byla nastavena vlhkost na 70 %. Celé měření bylo provedeno v duplikátech. Hodnotí se procento vyklíčených semen a nárůst kořene klíčících rostlinek v porovnání s kontrolou kultivovanou pouze v přítomnosti živného média.

3.3.7 Cytotoxicita

Experiment probíhal výluhem podle normy ČSN EN ISO10993-5. Vzorky jednotlivých nanočástic byly naváženy na 0,1 g/l a poté ponechány po dobu 24 hodin v kultivačním médiu. Nanočástice jsme před provedením experimentu sterilizovali pomocí UV-C záření a za využití ultrazvuku, který zároveň sloužil k dispergaci a dezintegraci nanočástic v roztoku. Poté jsme provedli kolorimetrický metabolický test. Pro testování cytotoxicity jsme použili jako médium DMEM low glucose, 10 % FBS (fetal bovine serum) a 0,1 % ATB. DMEM low glucose je médium obsahující

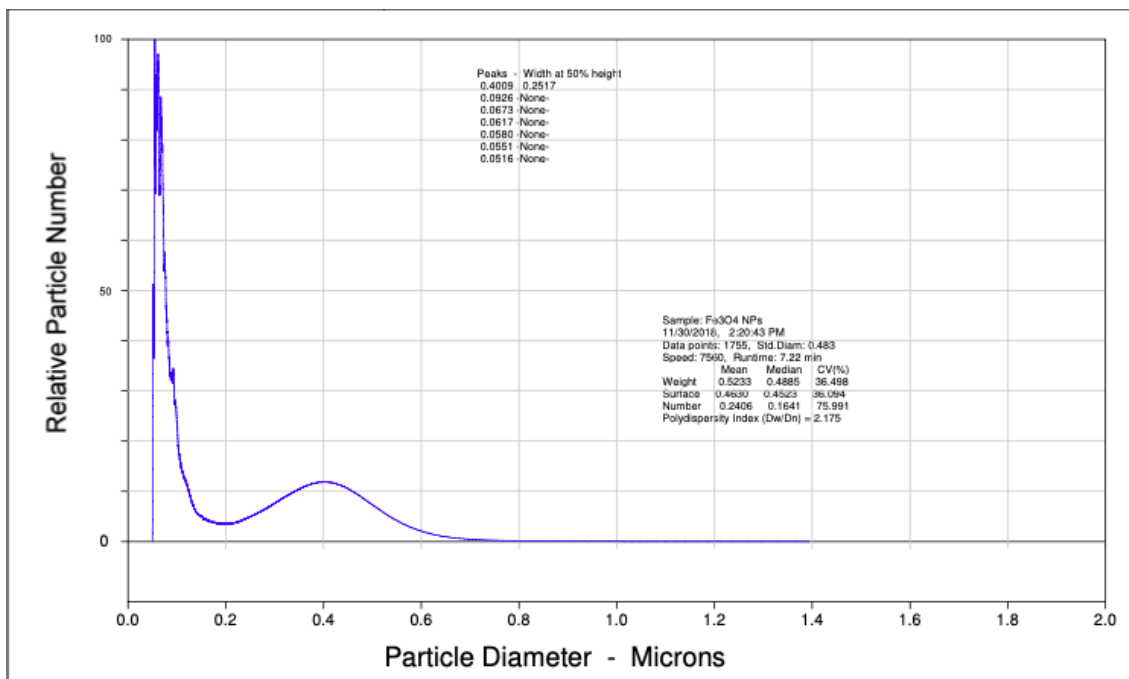
glukózu, hydrogenuhličitan sodný, L-glutamine, pyruvát sodný a fenolovou červeň. FBS se využívá k urychlení experimentu (mezi hlavní komponenty patří proteiny, vitamíny, růstový faktor, hormony a další).

Metoda testování se nazývá Alamar blue. Princip testu je založen na schopnosti živých buněk redukovat barvivo resazurin na resorufin. K redukci barviva dochází při spotřebě kyslíku metabolismem buněk díky mitochondriálním enzymům. Při redukci vzniká růžové fluorescentní barvivo. Resorufin můžeme detekovat spektrofotometricky (absolutní maximum při $\lambda = 570 \text{ nm}$) či fluorometricky (excitace při $\lambda = 570 \text{ nm}$ a emise při $\lambda = 585 \text{ nm}$). Hodnoty absorbance byly průměrovány z 6 hodnot.

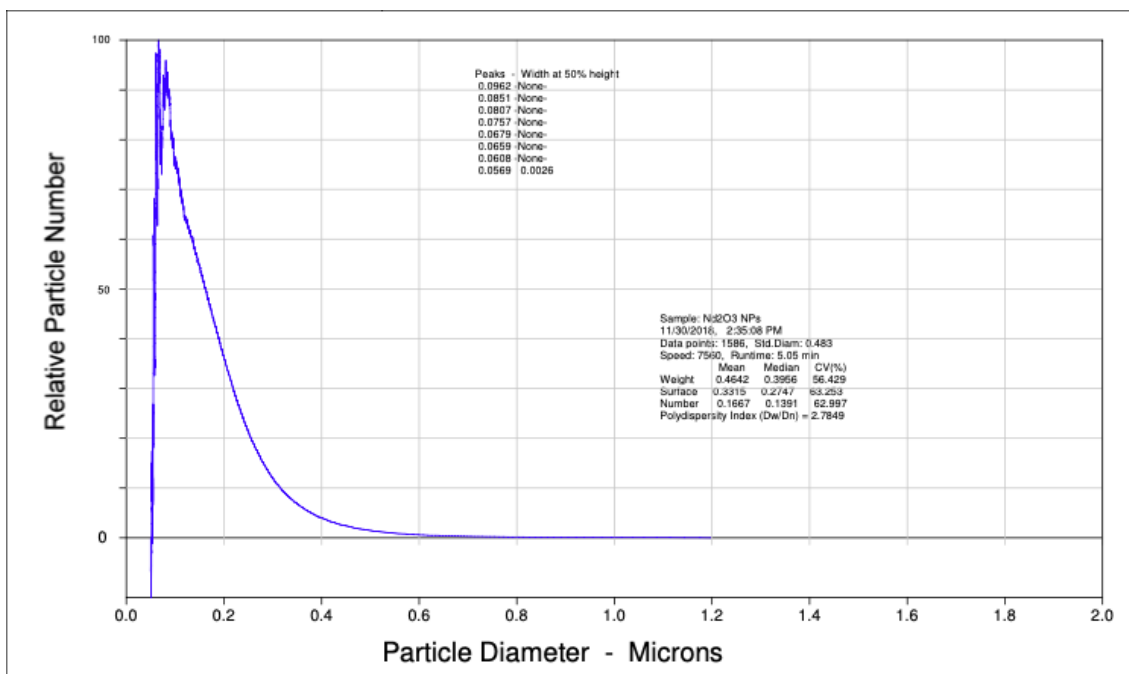
Buňky, na kterých jsme test prováděli, byly HepG2 – lidský jaterní karcinom. První den jsme buňky nasadili do jamek. Napipetovali jsme objem 100 μl na jednu jamku ($4 \cdot 10^4$ buněk/96well). Druhý den jsme nanočástice vysterilizovali pomocí ultrazvuku a UV-C záření a připravili výluhy (pro měření jsme použili 3 koncentrace výluhu, 100 %, 50 % a 10 %). 100 μl výluhu jsme připipetovali do každé jamky. Třetí den jsme provedli kolorimetrický test metodou Alamar blue. Vzorky byly měřeny v triplikátech.

3.4 Analýza výsledných dat

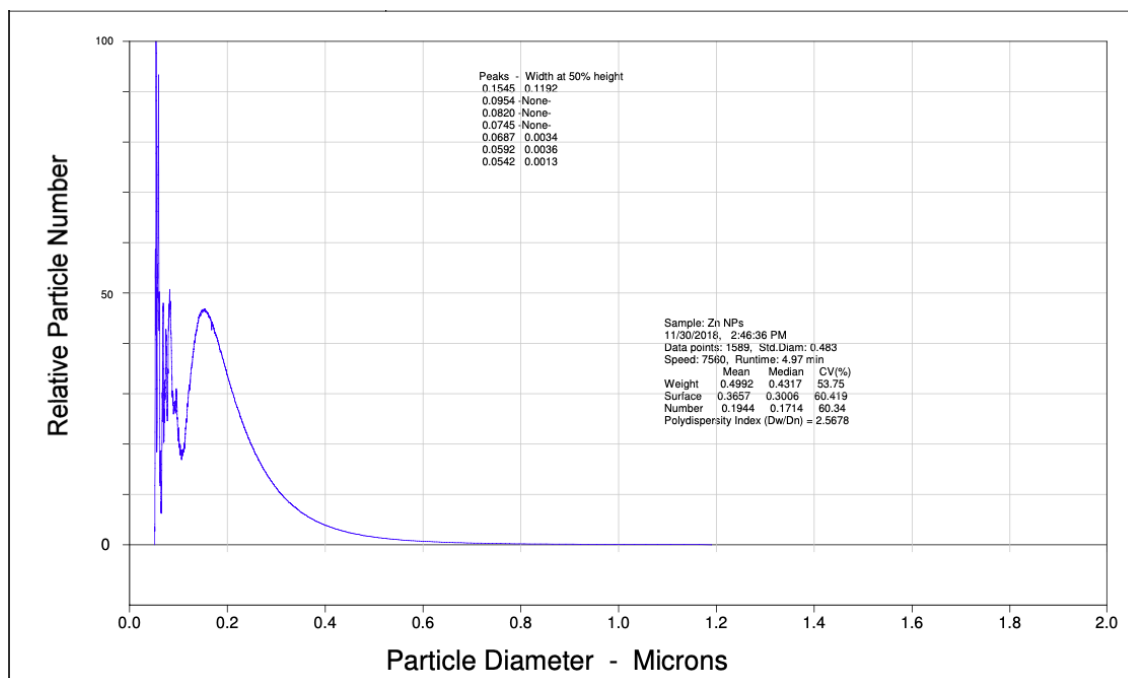
3.4.1 Disková centrifuga



Graf 1 Distribuce velikosti nanočastic Fe₃O₄



Graf 2 Distribuce velikosti nanočastic Nd₂O₃

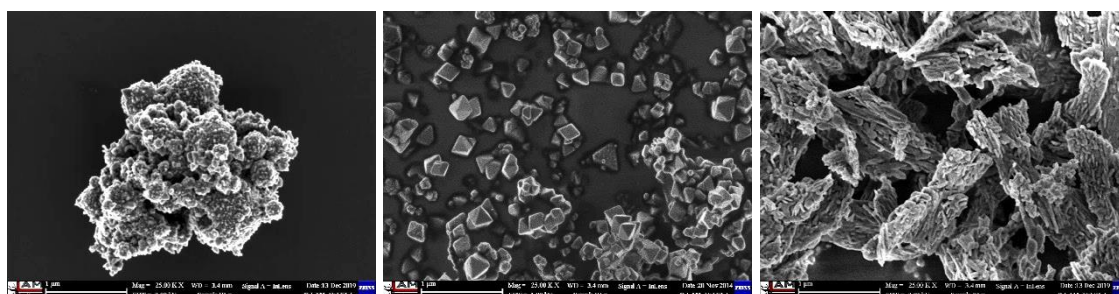


Graf 3 Distribuce velikosti nanočástic Zn

Na grafech 1, 2 a 3 je znázorněna distribuce velikostí jednotlivých částic. Na všech třech grafech vidíme, že hodnoty ani jednou nepřekročily hodnotu 600 nm. Nejčtenější zastoupení velikosti částic se nachází v okolí hodnot 100 nm, což odpovídá informacím uvedených od výrobce.

Na grafu 1, nanočástice Fe_3O_4 , vidíme lehký nárůst na hodnotách 400 nm; což může být dáno agregací částic.

3.4.2 SEM mikroskopie



Obr. 10 Fotografie ze SEM mikroskopie (a) zinek, (b) oxid železnato-železitý, (c) oxid neodymitý; měřítko na snímcích odpovídá 1 µm a zvětšení bylo 25 000×

Na obrázku 10 jsou zobrazeny snímky SEM pro nanočástice zinku, oxidu železnato-železitého a oxidu neodymitého. Z fotografie je patrné, že nanočástice zinku

se shlukují do aglomerátů, tzn., shluky jsou náhodně spojeny dohromady, dají se oddělit například ultrazvukem. Tvarem se jedná o nanočástice sférické, připomínající tvar koule. Podle morfologie se nanočástice oxidu železnato-železitého řadí mezi kubické částice s tetraedrickou symetrií. Na obrázku 10 vidíme, že nanočástice má tvar téměř pravidelného osmistěnu. Částice se příliš neshlukují, pouze v malé míře tvoří aglomeráty, které jsou způsobeny feromagnetickými vlastnostmi oxidu železnato-železitého a nízkou povrchovou energií částic.

Na obrázku 10 (c) jsou zobrazeny nanočástice oxidu neodymitého. Částice oxidu neodymitého má tvar protáhlé tyčinky. Nanočástice se shlukují do agregátů, tzn., tvoří shluky a jeden celek.

Tab. 1 Získané hodnoty ze SEM mikroskopu

		Fe₃O₄	Nd₂O₃	Zn
Rozměr kratší osy	(průměr) (nm)	169,95	39,11	16,27
	(odchylka) (nm)	27,45	3,74	1,84
Rozměr delší osy	(průměr) (nm)	265,72	199,79	37,55
	(odchylka) (nm)	38,51	55,84	7,24
Poměr stran	(průměr)	1,41	4,59	1,57
	(odchylka)	0,10	0,94	0,27
Kruhovitost (0–1)	(průměr)	0,82	0,29	0,67
	(odchylka)	0,07	0,08	0,11
Solidita (0–1)	(průměr)	0,93	0,83	0,81
	(odchylka)	0,01	0,04	0,05

Během analýzy obrazu SEM mikroskopických snímků byla pozornost věnována vždy jednotlivým částicím (bez ohledu, zda byly přítomny v agregátu nebo volně rozptýleny).

Rozměr jedné nanočástice zinku se pohybuje v průměru okolo 16×38 nm. Z tabulky 1 zjistíme, že kruhovitost nanočástice se blíží 1 a tím pádem můžeme potvrdit, že její tvar je kulovitý. To můžeme určit z poměru stran, který je 1,57, tedy blízko jedničky. Solidita nanočástice je rovna 0,81, což značí hladký povrch bez pórů a pevnost nanočástic.

Rozměr nanočástice oxidu železnato-železitého je průměrně 170×266 nm. Poměr stran je 1,41 a kruhovitost je vysoká rovna 0,82. Nanočástice se řadí mezi pevné, jelikož její solidita je velmi blízko 1, což značí, že nanočástice jsou téměř bez pórů a mají hladký povrch.

Rozměr nanočástice oxidu neodymitého je cca 200×39 nm. Z poměru stran, který je roven 4,59, můžeme potvrdit, že se jedná o tyčinky. Kruhovitost je nízká, pouze 0,29, nebude se tedy jednat o nanočástici kulovitého tvaru. Její solidita je vysoká rovna 0,82.

Disková centrifuga je velmi přesná metoda, která popisuje velikost nanočástic. Sledování nanočástic pomocí diskové centrifugy nám dává adekvátnější popis jejich velikosti (distribuci velikosti) pro větší objem sledovaného vzorku. Metoda neřeší orientaci ani další parametry částic, nicméně jednoduše a rychle poskytuje výsledky pro hodnocení četnosti velikosti částic v definovaném kapalném médiu (které je možné měnit podle požadavků, například voda, olej apod.). Pomocí SEM mikroskopie dostáváme informace ohledně velikosti nanočástic velice zkreslené, jelikož není možné měřit vzorek v kapalině. Na druhou stranu jsme ze snímků schopni získat (pomocí metod analýzy obrazu) dané parametry částic, jako poměr stran, kruhovitost, tvar a další. Sledování pomocí SEM mikroskopie nám sice dává přesnější charakteristiku nanočástic, nicméně jsme omezeni měřicí plochou (resp. počtem sledovaných částic), která je pro vyšší rozlišení velice malá. Z toho důvodu je často nutné zajistit vyšší počet snímků, což ale není vždy časově nebo finančně možné. Pro kompletní charakterizaci SEM snímků je nutné znát metody analýzy obrazu, což není v možnostech každého pracoviště.

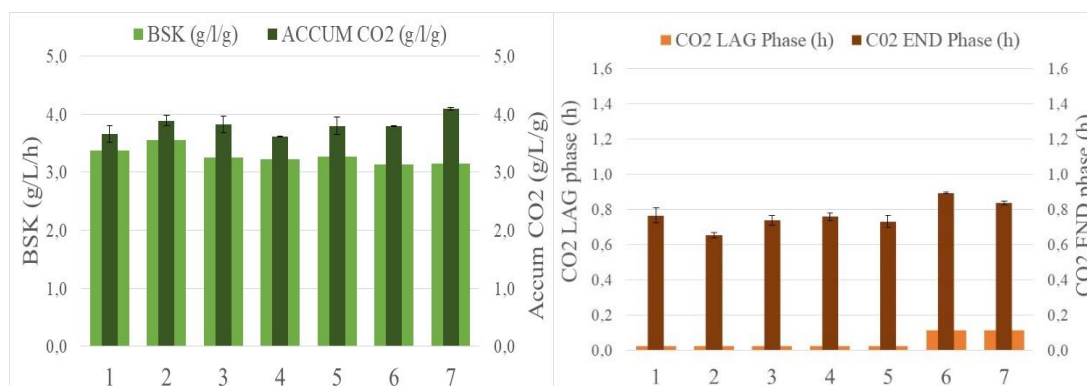
3.4.3 Respirometrie

V následující kapitole jsme pro větší přehlednost hodnoty na ose x označili číslicemi 1–7, kde vždy:

Tab. 2 Označení hodnot pro testování respirometrie

Označení vzorku	Koncentrace nanočástic [mg/l]
1	kontrolní měření = 0
2	50
3	100
4	150
5	300
6	400
7	600

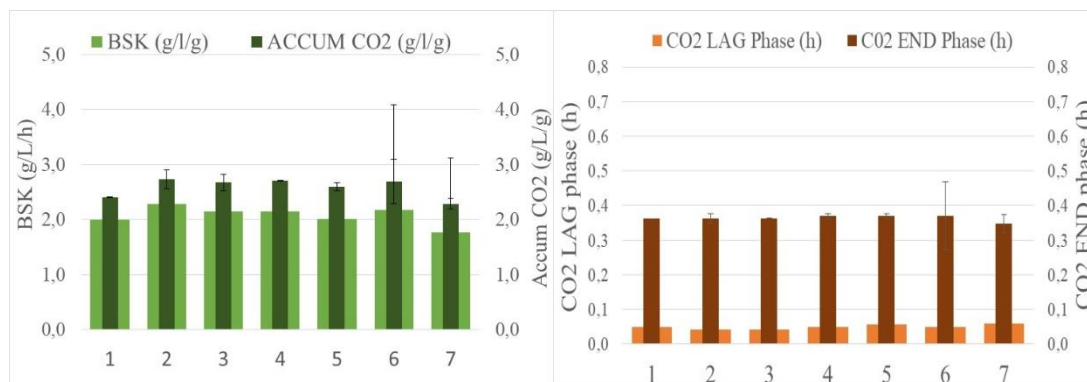
3.4.3.1 *Micrococcus Luteus* a nanočástice Fe₃O₄



Graf 4 Hodnocení produkce CO₂, LAG fáze a END fáze

Při pohledu na graf 4 vidíme, že u bakteriální populace *Micrococcus Luteus* se produkce CO₂ pohybuje přibližně na stejné hodnotě pro všechny koncentrace nanočástic Fe₃O₄. Můžeme tedy usoudit, že nepozorujeme vliv nanočástic na růst populace. Z grafu 4 můžeme dále vyvodit, že rozdíly mezi hodnotami END fáze jsou také minimální, ale u koncentrací 400 a 600 mg/l je vidět nárůst hodnoty END fáze o 14,2 %. Tedy, nízké koncentrace nanočástic Fe₃O₄ (do 400 mg/l) nejsou pro bakteriální populaci toxické (LAG-fáze se neprodloužila a produkce CO₂ jsou obdobné). Při vyšších koncentracích (nad 400 mg/l) již dochází k prodloužení LAG-fáze o 355 % a také k prodloužení END fáze růstu; přičemž produkce CO₂ zůstává neměnná.

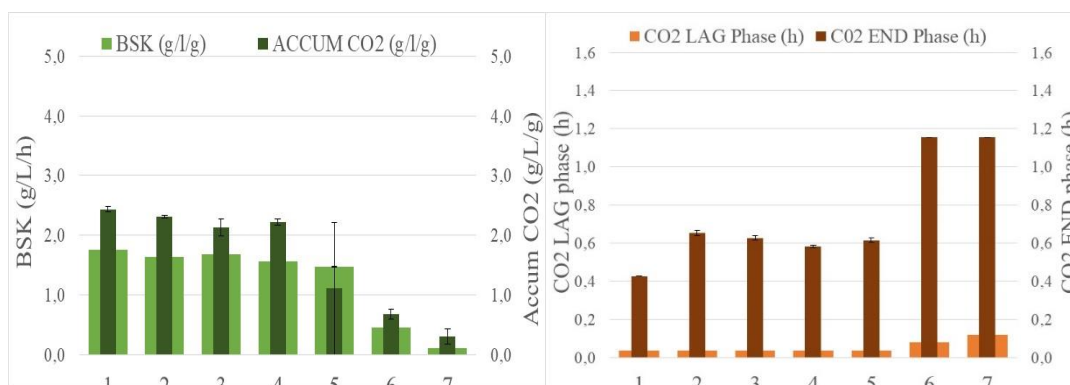
3.4.3.2 *Micrococcus Luteus* a nanočástice Nd₂O₃



Graf 5 Hodnocení produkce CO₂, LAG fáze a END fáze

Z grafu 5 je patrné, že hodnoty produkce CO₂ v porovnání s kontrolním měřením narůstají už u koncentrace 50 mg/l (vzorek 2) o 13,2 %. U koncentrace 600 mg/l (vzorek 7) produkce CO₂ klesá o 5,2 %. V grafu 5 vidíme, že hodnoty LAG fáze i hodnoty END fáze jsou téměř totožné s kontrolním měřením a můžeme tedy říct, že nanočástice Nd₂O₃ také nepůsobí na bakteriální populaci toxicky.

3.4.3.3 *Micrococcus Luteus* a nanočástice Zn

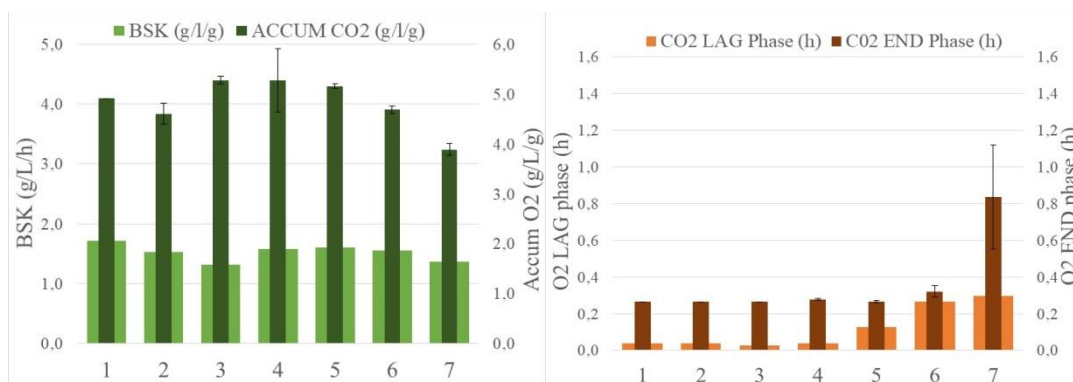


Graf 6 Hodnocení CO₂, LAG fáze a END fáze

V grafu 6 vidíme, že pro nižší koncentrace v porovnání s kontrolním měřením jsou zanedbatelné rozdíly v produkci CO₂. Ovšem při koncentraci 300 mg/l (vzorek 5) je vidět znatelný pokles o 54,5 % a u koncentrací 400 a 600 mg/l je prudký pokles produkce CO₂ o 87,7 %. Z grafu 6 můžeme vypořadovat, že END fáze narůstá už u nižších koncentrací nanočástic zinku. U koncentrací 400 a 600 mg/l vidíme až trojnásobný nárůst END fáze.

LAG fáze má také nárůst při koncentracích 400 a 600 mg/l o 116,7 % a 216,7 %. Z hodnot grafů můžeme usoudit, že nanočástice zinku mají na bakteriální populaci *Micrococcus Luteus* toxické účinky.

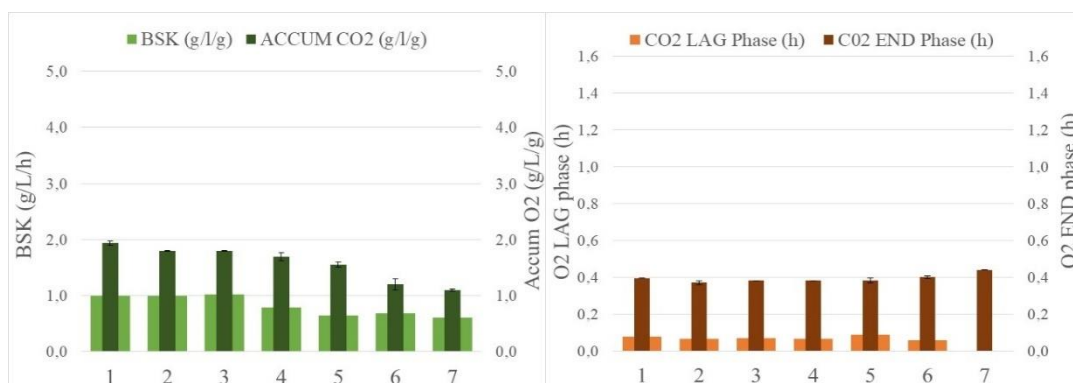
3.4.3.4 *Escherichia Coli* a nanočástice Fe₃O₄



Graf 7 Hodnocení CO₂, LAG fáze a END fáze

U bakteriálního kmene *Escherichia Coli* je produkce CO₂ v porovnání s kontrolním měřením bez významného rozdílu. Pouze u koncentrace 600 mg/l je lehký pokles produkce o 20,8 %. Dále na grafu 7 lze pozorovat nárůst END fáze u koncentrace 600 mg/l o 216,7 % a postupný nárůst LAG fáze už u koncentrací 300 mg/l. LAG fáze u koncentrace 600 mg/l má nárůst o 683,3 %.

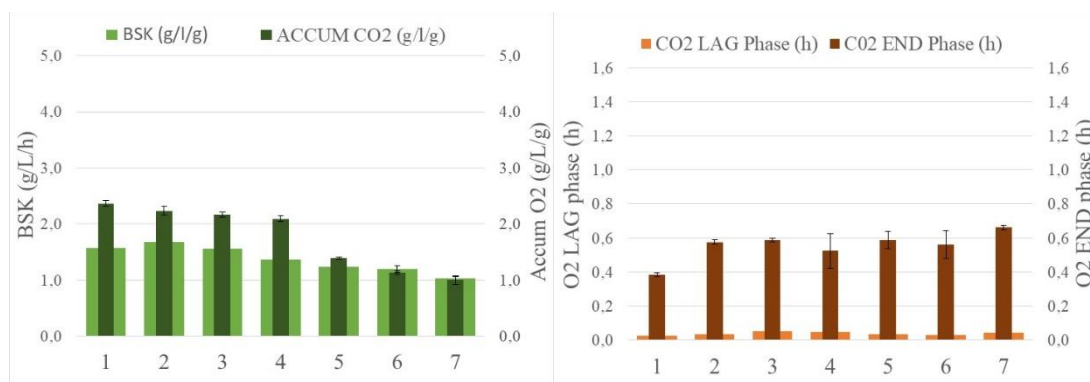
3.4.3.5 *Escherichia Coli* a nanočástice Nd₂O₃



Graf 8 Hodnocení CO₂, LAG fáze a END fáze

V grafu 8 je znatelný pokles úrovně produkce CO₂ u koncentrace 300 mg/l (vzorek 5) a více. Pokles je o 19,7 %. Rozdíly v hodnotách LAG fáze a END fáze v porovnání s kontrolním měřením v grafu 8 jsou zanedbatelné.

3.4.3.6 *Escherichia Coli* a nanočástice Zn



Graf 9 Hodnocení CO₂, LAG fáze a END fáze

Produkce CO₂ při působení nanočástic Zn klesá při hodnotě 300 mg/l a hodnoty produkce CO₂ u koncentrace 600 mg/l jsou poloviční oproti kontrole. Na grafu 9 je vidět nárůst END fáze skoro na dvojnásobek již u koncentrace 50 mg/l. Nárůst hodnot END fáze při koncentraci 600 mg/l je o 72,4 %. Hodnoty LAG fáze jsou u všech koncentrací obdobné. Můžeme tedy říct, že nanočástice zinku při vyšších koncentracích působí toxicky na bakterie *Escherichia Coli*.

Hodnoty toxicity v tabulkách 3 a 4 jsme počítali podle rovnice 3.

$$\frac{\text{Koncentrace nanočástic} - \text{kontrolní měření}}{\text{kontrolní měření}} \cdot 100 = \text{nárůst/pokles} \quad \text{Rovnice 3}$$

Tab. 3 Přepočtené hodnoty toxicity (dle respirometrického měření) pro bakteriální kmen *Escherichia Coli*

Koncentrace	Fe ₃ O ₄		Nd ₂ O ₃		Zn	
	Produkce CO ₂ [%]	LAG fáze [%]	Produkce CO ₂ [%]	LAG fáze [%]	Produkce CO ₂ [%]	LAG fáze [%]
50 mg/l	-6,30	0,00	-7,09	-16,67	-5,55	25,00
100 mg/l	7,43	-33,33	-6,99	-8,33	-8,36	100,00
150 mg/l	7,43	0,00	-12,46	-16,67	-11,42	75,00
300 mg/l	5,01	233,33	-19,66	16,67	-40,98	25,00
400 mg/l	-4,68	600,00	-37,95	-24,77	-52,26	11,76
600 mg/l	-20,84	683,33	-43,12	-100,00	-57,75	56,74

Poznámka: Hodnoty jsou vztaženy ke kontrolnímu vzorku, který odpovídá vždy 0 % (v tabulce není uvedeno)

Tab. 4 Přepočtené hodnoty toxicity (dle respirometrického měření) pro bakteriální kmen *Micrococcus Luteus*

Koncentrace	Fe ₃ O ₄		Nd ₂ O ₃		Zn	
	Produkce CO ₂ [%]	LAG fáze [%]	Produkce CO ₂ [%]	LAG fáze [%]	Produkce CO ₂ [%]	LAG fáze [%]
50 mg/l	6,46	0,00	13,23	-14,21	-5,22	0,00
100 mg/l	4,51	0,00	10,85	-14,21	-12,73	0,00
150 mg/l	-1,09	0,00	12,16	-0,26	-8,82	0,00
300 mg/l	3,96	0,00	7,72	13,95	-54,53	0,00
400 mg/l	3,97	355,00	11,75	-0,26	-72,11	116,67
600 mg/l	12,18	355,00	-5,16	20,64	-87,70	216,67

Poznámka: Hodnoty jsou vztaheny ke kontrolnímu vzorku, který odpovídá vždy 0 % (v tabulce není uvedeno)

Při pohledu do tabulek 3 a 4 vidíme značné rozdíly v působení nanočástic na bakteriální kmeny. U nanočástic Fe₃O₄ je při nižších koncentracích do 150 mg/l minimální rozdíl. U vyšších koncentrací vidíme prodloužení LAG fáze a bakterie *Escherichia Coli* má téměř dvojnásobné hodnoty než *Micrococcus Luteus*, tj. *E. Coli* se v prostředí s přítomností nanočástic Fe₃O₄ přizpůsobuje dvojnásobně delší dobu než *M. Luteus*.

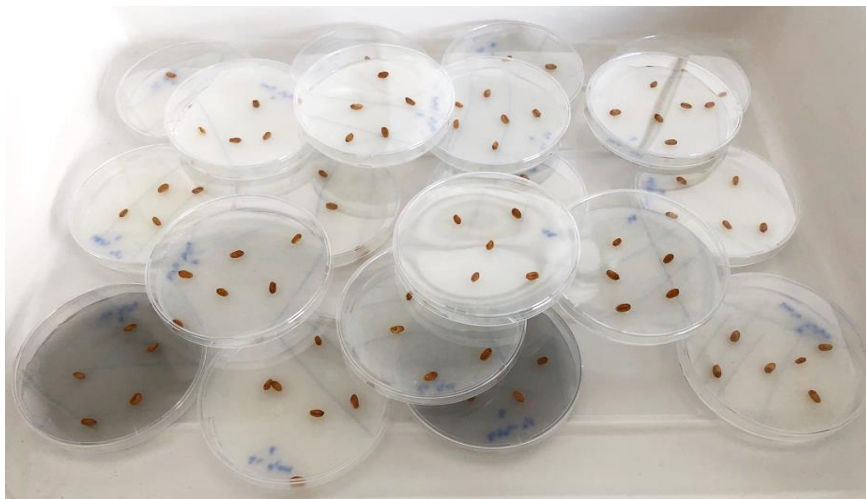
Nanočástice Nd₂O₃ způsobují snížení produkce CO₂ u bakterií *Escherichia Coli*, ale u *Micrococcus Luteus* vidíme nárůst produkce CO₂ u všech koncentrací s výjimkou koncentrace 600 mg/l. U LAG fáze nevidíme příliš rozdílné hodnoty, pouze u vyšších koncentrací od 400 mg/l vidíme vyšší pokles LAG fáze u bakterií *Escherichia Coli* než u bakterií *Micrococcus Luteus*.

U nanočástic Zn vidíme největší rozdíly v působení na bakteriální kmeny. Při nižších koncentracích do 300 mg/l hodnoty produkce CO₂ mají přibližně stejné hodnoty. Hodnoty LAG fáze u bakterie *Micrococcus Luteus* zůstaly nulové, oproti tomu u bakterie *Escherichia Coli* je vidět znatelný nárůst. U vyšších koncentrací od 400 mg/l je naopak vidět vysoký nárůst LAG fáze u bakterie *Micrococcus Luteus*, zatímco u *Escherichia Coli* se hodnoty nezvyšují.

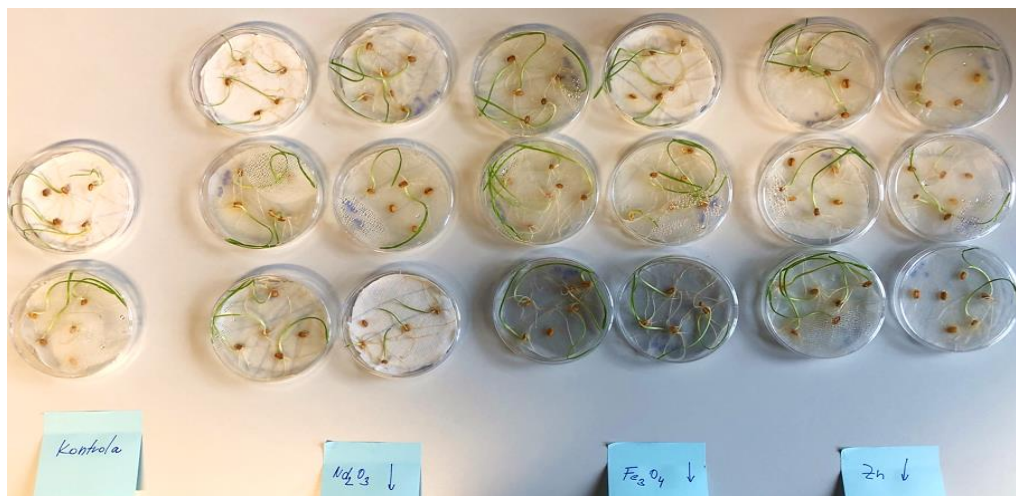
3.4.4 Ekotoxicita

Při testech ekotoxicity hodnotíme počet vyklíčených semen a délku kořene vyklíčených semen. Nevyklíčené semeno nemusí znamenat ekotoxické působení látek, ale může značit jeho poškození. Průměrnou délku kořene jsme naměřili z jednotlivých

výrůstků každého semena pšenice. Do výsledků jsme zahrnuli chybu měření získanou odečtením hodnot a chyby průměru hodnot.



Obr. 11 Fotografie Petriho misek před provedením experimentu



Obr. 12 Fotografie Petriho misek po experimentu

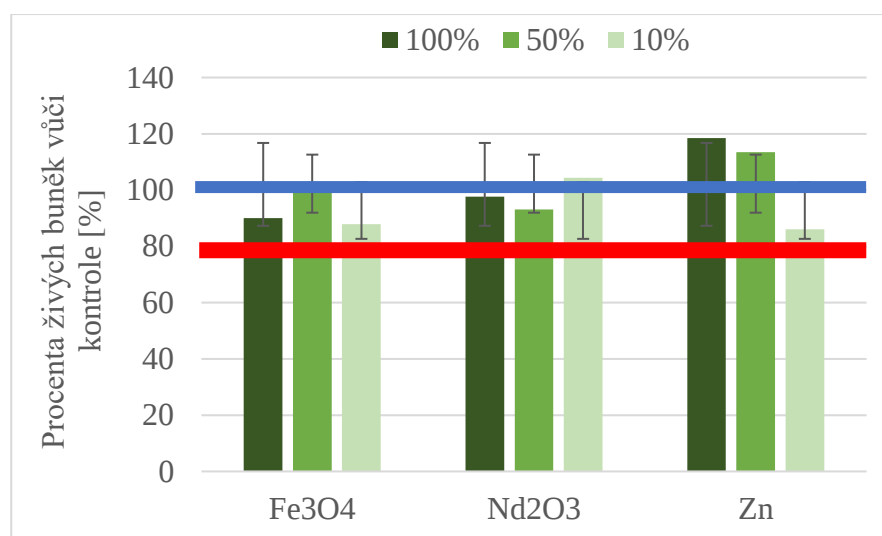
Tab. 5 Procentuální hodnocení počtu vyklíčených semen a délky kořene

Vzorek	Hodnota klíčivosti semen (%)	Průměrná délka kořene (%)
Fe_3O_4 0,1 g/l	100 %	99 %
Fe_3O_4 0,01 g/l	100 %	99 %
Fe_3O_4 0,001 g/l	$90 \pm 0,5$ %	$99 \pm 0,5$ %
Zn 0,1 g/l	$70 \pm 1,5$ %	$52 \pm 1,5$ %
Zn 0,01 g/l	$70 \pm 0,5$ %	$81 \pm 0,5$ %
Zn 0,001 g/l	$70 \pm 0,5$ %	$89 \pm 0,5$ %
Nd_2O_3 0,1 g/l	$90 \pm 0,5$ %	$89 \pm 0,5$ %
Nd_2O_3 0,01 g/l	$70 \pm 0,5$ %	$90 \pm 0,5$ %
Nd_2O_3 0,001 g/l	100 %	94 %

Při pohledu do tabulky 5 je zřejmé, že u nanočástic Fe_3O_4 je vliv pro vyšší koncentrace téměř nulový a nanočástice nepůsobí toxicky, výjimkou je nejnižší koncentrace 0,001 g/l, která způsobila inhibici růstu kořene o 10 %. Oproti tomu u nanočástic Zn lze pro všechny koncentrace sledovat shodný pokles v klíčivosti semen a dále s rostoucí koncentrací Zn lze pozorovat větší inhibici růstu kořene. Zejména u koncentrace 0,1 g/l vidíme v tabulce 5 pokles růstu kořene o 48 %. Za přítomnosti nanočástic Nd_2O_3 je vidět v tabulce 5 u koncentrace 0,1 g/l procentuální rozdíl o 11 % pro inhibici růstu kořene a o 10 % vliv na snížení klíčivosti semene.

Na obrázku 11 jsou vyfocena semena před započítím experimentu, na obrázku 12 vidíme semena již vyklíčená po experimentu.

3.4.5 Cytotoxicita



Graf 10 Výsledky hodnocení cytotoxicity

Na grafu 10 jsou uvedené hodnoty z měření cytotoxicity. Sledujeme rozdíl hodnot vzhledem k hodnotě 100 %, která odpovídá kontrolnímu měření (v grafu uvedeno tlustou modrou čarou). Pro konkrétní druh nanočástic (označeno na ose-x) je vždy první sloupec pro 100 % koncentraci média s nanočásticemi (odpovídá 0,1 g/l), druhý sloupec pro 50 % koncentraci a třetí sloupec pro 10 % koncentraci. Při pohledu na graf vidíme, že hodnoty nanočástic Fe_3O_4 se pohybují mezi hodnotami 80 % (červená linka) a 100 % (modrá linka). Nejvíce buněk přežilo při koncentraci 50 %. Můžeme tedy říct, že nanočástice za definovaných podmínek nevyvolávají cytotoxické účinky.

U nanočástic Nd_2O_3 o koncentraci výluhu 100 % a 50 % se toxicita pohybuje lehce pod 100 % a hodnoty pro koncentraci výluhu 10 % přesahují kontrolní hodnotu. Z výsledků vidíme, že nanočástice nepůsobí toxicky na testované buňky.

U zinku vidíme u výluhu o koncentraci 100 % a 50 % nárůst testovaných buněk až k hodnotám 120 % (došlo tedy k navýšení životnosti/počtu buněk až o 20 %). Při koncentraci výluhu 10 % byl vyhodnocen mírný pokles nárůstu buněk. Hodnota ovšem neklesla pod hodnotu 80 % (červená linka) a můžeme tedy usoudit, že působení nanočástic na testované buňky je jen mírně toxické.

4 Diskuze

V této práci jsme se zabývali hodnocením charakteristických vlastností nanočástic Fe_3O_4 , Nd_2O_3 a Zn. Hodnotili jsme jejich toxicitu s ohledem na jejich magnetické vlastnosti, na základě prováděných testů cytotoxicity, ekotoxicity a respirometrie. Při hodnocení cytotoxicity žádný ze sledovaných druhů nanočástic neměl negativní vliv na testované tkáňové buňky, jelikož žádná hodnota neklesla pod hodnotu 80 % (nanočástice nezpůsobily ani mírnou toxicitu). Při testování nanočástic pomocí testu ekotoxicity se u nanočástic Fe_3O_4 neprojevila toxicita (hodnoty byly téměř totožné s kontrolním měřením). Výjimkou byla koncentrace 0,001 g/l, kdy došlo ke snížení klíčivosti o 10 %. Ovšem zde snížení klíčivosti může být způsobeno vadou semen, nikoliv vlivem nanočástic. Nanočástice Nd_2O_3 také nevykázaly toxické účinky, ovšem u vyšší sledované koncentrace 0,1 g/l byl znatelný rozdíl délky kořene o 11 %. Výrazný vliv na ekotoxicitu projevily nanočástice zinku, kde již při nižší koncentraci 0,001 g/l byl pozorován velký rozdíl v růstu kořene a počet vyklíčených semen se snížil o 30 %. U koncentrace 0,1 g/l klesla dokonce délka kořene o 48 % a počet vyklíčených semen se snížil o 70 %.

Na univerzitě Andhra v Indii se zabývali shrnutím různých studií zabývajících se toxicitou nanočástic na organismy. V jedné ze studií (40) se sledovaly toxické účinky nanočástic Fe_3O_4 na buňky A549 myších samců pomocí testů životaschopnosti buněk. Využili nanočástice o rozměrech 15 nm a 225 nm. Výsledky testování neprokázaly inherentní toxicitu nanočástic. V další studii (40) použili nanočástice Nd_2O_3 o rozměrech menších než 100 nm a o koncentraci větších než 2 g/l. Provedli test stanovení buněčné respirace, test cytotoxicity pomocí spektrofotometru a Amesův test, kde použili jako testovací organismus embrya *Dánia pruhovaného*. Při testování došlo k inhibici růstu embryí o 48 % (nanočástice prokázaly toxický vliv).

V další studii na Teheránské univerzitě v Iránu zkoumali toxicitu nanočástic oxidů železa. Použili metodu MTT, kde nanočástice o rozměrech 15 nm způsobily ve více než 90 % vzorků značnou redukci nárůstu buněk lidského hepatomu, SMMC-7721, o 35 % už při nízké koncentraci 0,01 g/l. Při vyšší koncentraci, která činila 0,16 g/l došlo k vyšší redukci nárůstu buněk na 65 % (41). V naší práci jsme prováděli stanovení

cytotoxicity se stejným typem nanočástic. Ovšem v našem případě nanočástice nepůsobily toxicky, pravděpodobně v důsledku použití větších rozměrů částic.

Dále jsme v práci zkoumali charakteristické vlastnosti nanočástic jako je například velikost, tvar a struktura. K tomu jsme využili metodu SEM a diskovou centrifugu. Výsledky získané měřením na diskové centrifuze ukázaly, že distribuce velikostí všech testovaných typů nanočástic byla přibližně od 50 do 200 nm. U nanočástic Fe_3O_4 jsme naměřili širší distribuci hodnot od 50 do 400 nm, vyšší hodnoty mohou být pravděpodobně způsobeny agregací nanočástic. Při žádném měření jsme nepřekročili hodnotu 600 nm a můžeme tedy říci, že jsme dosáhli pozitivních výsledků, jelikož rozměry odpovídají údajům stanovených výrobcem.

Pomocí SEM jsme zkoumali velikost, tvar, kruhovitost a soliditu nanočástic. Nanočástice zinku mají sférický tvar a dosahují rozměrů $16,3 \times 37,6$ nm. Nanočástice oxidu neodymitého odpovídají tvaru protáhlé trubičky a jejichž rozměr je $199,8 \times 39,1$ nm. Nanočástice oxidu železnato-železitého jako jediné z nich patří mezi nanočástice kubické, symetrie tetraedru, a mají tvar pravidelného osmistěnu, kde rozměr těchto nanočástic je v průměru okolo $170 \times 265,7$ nm. Tvar nanočástic hraje důležitou roli v míře jejich toxicity. Nanočástice sférické působí více toxicky než nanočástice kubického tvaru (42).

Studie prováděná ve společnosti NanoSight Ltd. ve Velké Británii (43), zkoumala rozměry nanočástic pomocí NTA (Nanoparticle tracking analysis), což je analytická metoda velice podobná diskové centrifuze. Metoda využívá k určení velikosti nanočástic rozptyl světla a Brownův pohyb. Měření probíhá v kapalně suspenzi. Částice v suspenzi rozptylují světlo, které je zachyceno ultramikroskopem s CCD čipem. Brownův pohyb částic je analyzován v reálném čase a každá částice je sledována specifickým softwarem. Difúzní koeficient se počítá pomocí *Stokes-Einsteinovy* rovnice a velikost částic lze vypočítat za předpokladu kulovitěho tvaru. Ve studii se zkoumala velikost nanočástic a výsledky dopadly úspěšně a velice přesně, jelikož se distribuce nanočástic pohybovala v rozmezí 5 % od velikostí dané výrobcem.

Studie (44) prováděná na chemické fakultě Jagellonské univerzity v polském Krakově zkoumala interakci mezi kovovými nanočásticemi a bakteriemi. Absorpci nanočástic do bakterií pozorovali pomocí SEM a TEM mikroskopie a vypožorovali, že nanočástice nepronikají do bakteriálních buněk, ale ulpívají na buněčných stěnách bakterií.

K vyhodnocení využili program Java open-source ImageJ software 1,51 k. Pomocí snímku hodnotili průměrnou plochu a počet absorbovaných částic.

Díky studii (44) jsem tedy došel k závěru, že při posuzování toxicity v mém experimentu došlo při měření respirometrie k vyšším toxickým účinkům u grampozitivních bakterií (o 11 %), jelikož mají pouze jednu vrstvu buněčné stěny, zatímco gramnegativní mají dvojí vrstvu. Dalšími faktory ovlivňující toxicitu nanočástic jsou povrchový náboj (pozitivně nabitě nanočástice lépe pronikají grampozitivními bakteriemi díky negativně nabitým glykoproteinům), tento parametr určitě doporučuji, aby byl v dalších postupech této práce studován a měřen. Další faktory výrazně ovlivňující toxicitu nanočástic jsou velikost, tvar, specifický povrch apod.

Magnetismus hraje roli v určování toxicity. Magnetické nanočástice vykazují menší toxické účinky než nanočástice nemagnetické. Na univerzitě v Chung Yuan na Tchaj-wanu (45) zkoumali právě tento vliv. Superparamagnetismus nanočástic je hlavní charakteristika vyskytující se u látek feromagnetických. Tyto nanočástice setrvávají magnetické i při odstranění mimo magnetické pole. Superparamagnetismus hraje důležitou roli při tvorbě aglomerací nanočástic. Magnetické nanočástice mají menší pravděpodobnost tvorby aglomerátů.

5 Návrh doporučení pro praxi

Tato bakalářská práce poskytuje informace ohledně vlastností daných nanočástic jako je velikost, tvar a struktura. Dále se zabývá toxicitou daných nanočástic na bakteriální buňky, semena rostlin a buněčnou linii rakoviny jater. Doporučuji v práci pokračovat a doplnit práci o další měření nanočástic, kde můžeme sledovat vliv povrchového náboje, absorpce, krystalizace a agregace na toxicitu nanočástic. V praxi je využití magnetických nanočástic časté. V oblasti medicíny se aplikují jako kontrastní činidla při vyšetření magnetickou rezonancí, kdy se nanočástice využívají ke značení buněk. Další využití magnetických nanočástic je k doručení látek v lidském těle do oblasti nádoru, kdy se používá vnější magnetické pole k přesné lokalizaci. Dále lze přenášet energii z vnějšího magnetického pole na magnetické nanočástice. Tato metoda se využívá k tepelné destrukci nádorových buněk.

6 Závěr

Bakalářská práce se zabývá hodnocením charakteristických vlastností nanočástic Fe_3O_4 , Nd_2O_3 a Zn, zejména velikostí, tvarem a jejich toxicitou. Na začátku práce jsme si stanovili šest cílů. Prvním cílem bylo navrhnout vhodné metody pro studium a charakterizaci parametrů nanočástic. Využili jsme k tomu metody SEM mikroskopie a diskovou centrifugu. Druhým cílem bylo provést charakterizaci vybraných typů nanočástic. Sledovali jsme jejich velikost a koncentraci opět pomocí diskové centrifugy a SEM mikroskopie. Metodou SEM mikroskopie jsme navíc sledovali tvar a strukturu nanočástic. Nanočástice Fe_3O_4 se řadí mezi nanočástice kubické, nanočástice Nd_2O_3 mezi sférické a nanočástice Zn mezi jehličkovité.

Třetím cílem práce bylo navrhnout metodický postup pro hodnocení toxických účinků nanočástic na bakteriální buňky. Navrhli jsme tři metody testování pomocí testů respirometrie, ekotoxicity a cytotoxicity. Čtvrtým cílem bylo testování toxických účinků různých typů nanočástic. U respirometrického testování jsme vybrali bakteriální kmeny *Escherichia Coli* a *Micrococcus Luteus*. Zjistili jsme, že nanočástice Fe_3O_4 nepůsobí toxicky při nižších koncentracích do 300 mg/l. Při vyšších koncentracích od 400 mg/l mají nanočástice lehké toxické účinky. Nanočástice Nd_2O_3 neprokázaly žádné toxické účinky. Ovšem nanočástice Zn začaly prokazovat toxické účinky již při nízkých koncentracích od 100 mg/l. Testování ekotoxicity nám ukázalo, že nanočástice Fe_3O_4 neprokázaly toxicitu a Nd_2O_3 prokázaly nízkou toxicitu. Jako jediné se toxicky projeví nanočástice Zn. Posledním testem toxicity, který jsme provedli, byl test stanovení cytotoxicity. Při provedení tohoto experimentu se žádné nanočástice neprojevily cytotoxicky.

Pátým cílem bylo definování silných a slabých stránek prováděných metod. Disková centrifuga udává velmi přesné hodnoty velikosti nanočástic pro velký objem vzorku. Metoda ale neřeší žádné další parametry. Oproti tomu SEM mikroskopie udává více parametrů jako je poměr stran, kruhovitost, tvar a další. Údaje jsou ale velice zkreslené, jelikož se vzorek neměří v kapalině a jsme omezeni měřící plochou. Je tedy nutné provádět vyšší počet měření, což je finančně a časově náročné. Mezi hlavní výhodu měření respirometrie oproti měření ekotoxicity a cytotoxicity je souběžné měření mnoha parametrů charakterizující biologický systém. Z měření získáme velké

množství dat, které se dají matematicky zpracovat. Další výhodou je schopnost měření jak pevných, tak kapalných vzorků o velkých objemech. Jelikož se jedná o uzavřený systém, tak můžeme při měření eliminovat vnější vlivy prostředí, na rozdíl od měření ekotoxicity. Na druhou stranu měření respirometrie je finančně náročné na provoz a servis a vzorky jsou náročné na přípravu. Z důvodu práce s bakteriální suspenzí je vždy nutné perfektně vyčistit celý přístroj.

Posledním cílem bylo stanovení shody nebo rozdílnosti výsledků s odbornou literaturou, což je popsáno v kapitole s názvem Diskuze.

Seznam použité literatury

- (1) HOŠEK, Jan. *Úvod do nanotechnologie*. Praha: České vysoké učení technické, 2010. ISBN 9788001045558.
- (2) KHAN, I., K. SAEED, I. KHAN. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019, 7(12), 908–931. ISSN 18785352. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.
- (3) NEVES, Rute Ana a Reis SALETTE. *Nanoparticles in life sciences and biomedicine*. Jenny Stanford Publishing, 2018. ISBN 9781351207331.
- (4) SHIXIANG, Liu et al. Preparation, surface functionalization and application of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface science*. 2020, **281**, 102165. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868620300956>
- (5) SHARIFIANJAZI, Fariborz et al. Magnetic CoFe₂O₄ nanoparticles doped with metal ions: a review. *Ceramics international*. 2020, **46**, 18391–18412. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884220311469>
- (6) LIQIN, Qin et al. Nanocrystalline Nd₂O₃: Preparation, phase evolution, and kinetics of thermal decomposition of precursor. *Ceramics International*. 2014, **40**(2), 3003–3009. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884213012510>
- (7) YUVAKKUMAR, Rathinam a S.I. HONG. Nd₂O₃: Novel synthesis and characterization. *Journal of Sol-gel science and technology*. 2015, **73**, 511–517. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/s10971-015-3629-0>
- (8) STURIKOVA, Helena et al. Zinc, zinc nanoparticles and plants. *Journal of hazardous materials*. 2018, **349**, 101–110. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389418300402>
- (9) LENG, Diya et al. The Antibiofilm Activity and Mechanism of Nanosilver- and Nanozinc-Incorporated Mesoporous Calcium-Silicate Nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2020, **15**, 3921–3936. Dostupné také z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S244686>

- (10) ZHU, Jie et al. Effects of nanosilver and nanozinc incorporated mesoporous calcium-silicate nanoparticles on the mechanical properties of dentin. *Plos one*. 2017, **12**(8). Dostupné také z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0182583>
- (11) KRISHAN, Kannan M. Biomedical nanomagnetism: A spin through possibilities in imaging, diagnostics and therapy. *IEEE transactions on magnetics*. 2010, **46**(7), 2523–2558. ISSN 0018-9464. Dostupné také z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5439840/>
- (12) KANAPARTHY, Rosaiah a Rosaiah KANAPARTHY. The changing face of dentistry: nanotechnology. *International journal of nanomedicine*. 2011, **6**, 2799–2804. ISSN 1178-2013. Dostupné také z: <http://www.dovepress.com/the-changing-face-of-dentistry-nanotechnology-peer-reviewed-article-IJN>
- (13) TEM images of silver nanoparticles with different shapes. ResearchGate GmbH. *Researchgate* [online]. Researchgate [10.8.2020] Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/TEM-images-of-silver-nanoparticles-with-different-shapes-A-nanospheres-B_fig3_333697844
- (14) BELL, C. David a Natasha ERDMAN. *Low voltage electron microscopy: principles and applications*. Cambridge: Wiley, 2012. ISBN 978-111-9971-115.
- (15) NEUMANN, A. et al. New method for density determination of nanoparticles using a CPS disc centrifuge. *Colloids and surface B: Biointerfaces*. 2013, **104**, 27–31. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.11.014>
- (16) Disc centrifuge. CPS instruments Europe. *CPS instruments Europe* [online]. CPS instrument, [18.9.2020] Dostupné z: <http://www.cpsinstruments.eu/centrifuge.html>
- (17) DOHNALOVÁ, Lucie a Vlastimil DOHNAL. Nanočástice a jejich toxicita. *Chemické listy*. 2015, **109**(6), 444–450. Dostupné také z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/360/360>
- (18) KUČÍRKOVÁ, Lucie et al. Toxicita magnetických nanočástic. *Chemické listy*. 2015, **109**, 693–700. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_09_693-700.pdf

- (19) DŘÍMAL, Pavel a Jaromír HOFFMANN. Automatizovaný systém kontinuálního sledování aerobního biologického rozkladu látek ve vodním i půdním prostředí. *Chemické listy*. 2008, **102**, 139–147. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_02_139-147.pdf
- (20) VAŇKOVÁ, Svatava, I. ŘEZNÍČKOVÁ a J. HOFFMAN. Respirometrie sledování inhibičních vlivů xenobiotik na aerobní respiraci mikroorganismů aktivovaného kalu. *Chemické listy*. 2000, **94**, 48–53. Dostupné také z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2000_01_08.pdf
- (21) ALLEN, J. Rosalind a Bartomolej Waclaw. Bacterial growth: a statistical physicist's guide. *Europe PMC funders group*. 2019, **82**(1). doi: 10.1088/1361-6633/aae546. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6330087/>
- (22) ZHOU, S., Z. CUI a J. URBAN. Dead cell counts during serum cultivation are underestimated by the fluorescent live/dead assay. *Biotechnology journal*. 2011, **6**(5), 513–518. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201000254>
- (23) Live/Dead Quantification Using Fiji – Step-By-Step Guide *Allevi* [online]. Allevi [19.9.2020]. Dostupné z: <https://www.allevi3d.com/livedead-assay-quantification-fiji/>
- (24) MUKHERJEE, K. Pulok. Bioassay-Guided Isolation and Evaluation of Herbal Drugs. *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*. 2019, 515–537. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813374-3.00013-2>
- (25) DEJOUS, Corine et al. Using microsensors to promote the development of innovative therapeutic nanostructures. *Nanostructures for Novel Therapy*. 2017, 539–566. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46142-9.00020-7>
- (26) MA, H., P. L. WILLIAMS a S. A. DIAMOND. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles – A review. *Environmental pollution*. 2013, **172**, 76–85. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749112003958>
- (27) COUFALOVÁ, Adéla. *Posouzení biokompatibility tenkých vrstev nanosených metodou PVD napařování elektrickým obloukem a jejich funkcionalizace*.

- Liberec, 2018. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci, Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií. Dostupné také z: <https://dspace.tul.cz/handle/15240/151992>
- (28) LINOJ, P. Samuel et al. Multicenter assessment of gram stain error rates. *Journal of clinical mikrobiology*. 2016, **54**(6), 1442–1447. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4879281/>
- (29) A new spin on the old gram stain. C&EN. *Cen.acs.org* [online]. [27.9.2020] Dostupné z: <https://cen.acs.org/articles/93/web/2015/04/New-Spin-Old-Gram-Stain.html>
- (30) JULÁK, Jaroslav. *Klinicky významné bakterie*. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-588-6.
- (31) Escherichia Coli, SEM. Science photo library. *Science photo* [online]. Science photo. [1.9.2020]. Dostupé z: <https://www.sciencephoto.com/media/1003530/view/escherichia-coli-sem>
- (32) Micrococcus Luteus, coccus prokaryote, SEM. Science photo library. *Science photo* [online]. Science photo. [1.9.2020]. Dostupé z: <https://www.sciencephoto.com/media/873978/view/micrococcus-luteus-coccus-prokaryote-sem>
- (33) KOHNO, Masahiro et al. Effect of static magnetic fields on bacteria: Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli. *Pathophysiology*. 2000, **7**(2), 143–148. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/S0928-4680\(00\)00042-0](https://doi.org/10.1016/S0928-4680(00)00042-0)
- (34) DINI, Luciana a Luigi ABBRO. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron*. 2005, **36**(3), 195–217. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2004.12.009>
- (35) BERG, Hermann. Problems of weak electromagnetic field effects in cell biology. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1999, **48**(2), 355–360. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(99\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(99)00012-4)

- (36) STRAŠÁK, L., V. VETTERL a J. ŠMARDÁ. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. *Bioelectrotechnology*. 2002, **55**(1–2), 161–164. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(01\)00152-9](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(01)00152-9)
- (37) FILIPIČ, Jasmina et al. Effects of low-density static magnetic fields on the growth and activities of wastewater bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Bioresource technology*. 2012, **120**, 225–232. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412009273>
- (38) FOJT, Lukáš et al. 50 Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria. *Micron*. 2009, **40**(8), 9118–922. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0968432809000936>
- (39) PODARU, George et al. Magnetic Nanomaterials. *Smart Materials Series*, 2017, 2017, 1–24. ISBN 978-1-78262-788-3. Dostupné také z: doi: <https://pubs.rsc.org/en/content/chapterhtml/2017/bk9781782627883-00001?isbn=978-1-78262-788-3&sercode=bk#cit8>
- (40) CHEN, Yu et al. Nd₂O₃ Nanoparticles Induce Toxicity and Cardiac/Cerebrovascular Abnormality in Zebrafish Embryos via the Apoptosis Pathway. *Dovepress*. 2019, **22**, 387–400. Dostupné také z: <https://www.dovepress.com/nd2o3-nanoparticles-induce-toxicity-and-cardiac-cerebrovascular-abnormality-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>
- (41) BAHADAR, Haji et al. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iranian biomedical journal*. 2016, **20**(1), 1–11. DOI: 10.7508/ibj.2016.02.001. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689276/>
- (42) SUKHANOVA, Alyona et al. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale research letters*. 2018, **13**(1). ISSN 1931-7573. Dostupné také z: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/s11671-018-2457-x#citeas>
- (43) HOLE, Patrick et al. Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticles tracking analysis (NTA). *Journal of*

- nanoparticle research*. 2013, **15**(12). ISSN 1388-0764. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-013-2101-8>
- (44) PAREJSKI, Wojciech et al. Attachment efficiency of gold nanoparticles by gram-positive and gram-negative bacterial strains governed by surface charges. *Journal of nanopartricles research*. 2019, **21**. DOI: 10.1007/s11051-019-4617-z. Dostupné také z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-019-4617-z>
- (45) MALHOTRA, Nemi et al. Potential toxicity of iron oxide magnetic nanoparticles: a review. *Molecules*. 2020, **25**(14), 3159. DOI: 10.3390/molecules25143159. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7397295/>
- (46) ŠIMŮNEK, Ondřej, Jonatan ŠERCL a Pavel STANĚK. *Průvodce světem nanočástic*. Česko: 2017. ISBN 9788027032242.
- (47) VONDRÁČKOVÁ, Nikola. *Stanovení cytotoxicity nanočástic*. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Dostupné také z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/70775/VondrackovaN_Stanoeni_cytotoxicity_ZB_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- (48) ORDAZ, Alberto et al. Characterization of kinetic parameters and mass transfer resistance aerobic fixed-bed reactor by *in-situ* respirometry. *Biochemical Engineering journal*. 2019, **146**, 194–202. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X19301093?via%3Di%3Dhub>
- (49) PEREIRA-DA-SILVA, Marcelo a Fabio A. FERRI. Scanning electron microscopy. *Micro and nano technologies*. 2017, 1–35. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323497787000011>
- (50) YANG, Wu et al. Synthesis of Nd₂O₃ nanopowders by sol-gel auto-combustion and their catalytic esterification activity. *Materials chemistry and physics*. 2004, **84**, 52–57. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254058403004607>

Seznam tabulek

Tab. 1 Získané hodnoty ze SEM mikroskopu.....	44
Tab. 2 Označení hodnot pro testování respirometrie	46
Tab. 3 Přepočtené hodnoty toxicity pro bakteriální kmen <i>Escherichia Coli</i>	49
Tab. 4 Přepočtené hodnoty toxicity pro bakteriální kmen <i>Micrococcus Luteus</i>	50
Tab. 5 Procentuální hodnocení počtu vyklíčených semen a délky kořene	51

Seznam obrázků

Obr. 1 Schéma rozdělení metod pro syntézu nanočástic	20
Obr. 2 Snímky z TEM a SEM mikroskopie zachycující různé tvary nanočástic zlata...	24
Obr. 3 Schéma konstrukce SEM mikroskopu.....	25
Obr. 4 Schéma interakce elektronového svazku a vzorku v průběhu SEM mikroskopie	26
Obr. 5 Křivka bakteriálního růstu	29
Obr. 6 Znázornění metody LIVE/DEAD: Živé buňky jsou slabě fluoreskující, zatímco mrtvé buňky jasně fluoreskují.....	30
Obr. 7 Znázornění G+ a G- bakteriální buněčné stěny	32
Obr. 8 Fotografie Escherichia Coli zobrazená pomocí SEM mikroskopie.....	33
Obr. 9 Fotografie Micrococcus Luteus zobrazená pomocí SEM mikroskopie.....	34
Obr. 10 Fotografie ze SEM mikroskopie (a) zinek, (b) oxid železnato-železitý, (c) oxid neodymitý	43
Obr. 11 Fotografie Petriho misek před provedením experimentu	51
Obr. 12 Fotografie Petriho misek po experimentu	51

Seznam grafů

Graf 1 Distribuce velikosti nanočástic Fe_3O_4	42
Graf 2 Distribuce velikosti nanočástic Nd_2O_3	42
Graf 3 Distribuce velikosti nanočástic Zn	43
Graf 4 Hodnocení produkce CO_2 , LAG fáze a END fáze	46
Graf 5 Hodnocení produkce CO_2 , LAG fáze a END fáze	47
Graf 6 Hodnocení CO_2 , LAG fáze a END fáze	47
Graf 7 Hodnocení CO_2 , LAG fáze a END fáze	48
Graf 8 Hodnocení CO_2 , LAG fáze a END fáze	48
Graf 9 Hodnocení CO_2 , LAG fáze a END fáze	49
Graf 10 Výsledky hodnocení cytotoxicity	52

Seznam příloh

Příloha A Získané hodnoty ekotoxicity

Příloha B Obsah přiloženého CD

Přílohy

Příloha A Získané hodnoty ekotoxicity

Vzorek	Počet vyklíčených semen	Průměrná délka kořene
Fe ₃ O ₄ 0,1 g/l	5	10 ± 0,5 cm
Fe ₃ O ₄ 0,01 g/l	5	10 ± 0,5 cm
Fe ₃ O ₄ 0,001 g/l	5 ± 0,5	10 ± 0,5 cm
Zn 0,1 g/l	4 ± 1,5	5,3 ± 0,5 cm
Zn 0,01 g/l	4 ± 0,5	8,3 ± 0,5 cm
Zn 0,001 g/l	4 ± 0,5	9 ± 0,5 cm
Nd ₂ O ₃ 0,1 g/l	5 ± 0,5	9 ± 0,5 cm
Nd ₂ O ₃ 0,01 g/l	4 ± 0,5	9,1 ± 0,5 cm
Nd ₂ O ₃ 0,001 g/l	5	9,5 ± 0,5 cm
Kontrola 1 (bez NPs)	5	10,2 ± 0,1 cm

Příloha B Obsah přiloženého CD

Text bakalářské práce

- bakalarska_prace_2020_Jakub_Rohn.pdf