

Účinek nanočástic stříbra a zlata na vybrané bakteriální kmeny

Bakalářská práce

Studijní program: B3944 – Biomedicínská technika

Studijní obor: 3901R032 – Biomedicínská technika

Autor práce: **Karina Petříková**

Vedoucí práce: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.

The Effect of Nanoparticles of Silver and Gold on the Selected Bacterial Strains

Bachelor thesis

Study programme: B3944 – Biomedical Technology

Study branch: 3901R032 – Biomedical Technology

Author: **Karina Petříková**

Supervisor: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.

Technická univerzita v Liberci
Fakulta zdravotnických studií
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Karina Petříková**
Osobní číslo: **D14000013**
Studijní program: **B3944 Biomedicínská technika**
Studijní obor: **Biomedicínská technika**
Název tématu: **Účinek nanočástic stříbra a zlata na vybrané bakteriální kmeny**
Zadávající katedra: **Fakulta zdravotnických studií**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíle práce:

- 1) Otestovat účinek nanočástic stříbra a zlata na vybrané bakteriální kmeny klasickými mikrobiologickými metodami a získané výsledky porovnat s výsledky získanými ze záznamníku růstu buněk RTS-1C od firmy BioSan.
- 2) Zjistit, zda se získané výsledky výzkumu shodují s informacemi popsány v literárních zdrojích. Porovnat, zda zvolené testovací metody byly dostačující na to, aby byl vysloven závěr o inhibičních účincích obou testovaných typů nanočástic.
- 3) Prozkoumat rozdíl účinku stříbrných a zlatých nanočástic na testované bakteriální kmeny. Teoretická východiska (včetně výstupu z BP):

Nanočástice stříbra jsou stále více využívány především pro jejich příznivé biologické, optické, katalytické a antibakteriální vlastnosti. Přípravují se převážně redukcí rozpustné stříbrné soli a jejich velikost se pohybuje v řádech nanometrů. Cílem bakalářské práce je studium účinků nanočástic stříbra (různá koncentrace a velikost nanočástic) na inhibici vybraných bakteriálních kmenů, které bude testováno klasickými kvalitativními a kvantitativními mikrobiologickými metodami a zároveň bude vliv nanočástic studován pomocí záznamníku růstu buněk v reálném čase RTS-1C od firmy BioSan. Teoretická část bude věnována přípravě, vlastnostem, velikosti a antibakteriálním účinkům nanočástic stříbra (zlata). V teoretické části budou shrnuty nejnovější poznatky o účincích a aplikaci výše uvedených nanočástic (informace budou primárně čerpány z vědeckých článků ze Science Direct). V praktické části budou získané výsledky shrnuty, okomentovány a zhodnoceny. Bude porovnán i účinek stříbrných a zlatých nanočástic.

Výzkumné otázky:

- 1) Shodují se získané laboratorní výsledky s výsledky z literárních zdrojů?
- 2) Projevil se rozdíl účinku stříbrných a zlatých nanočástic na testované bakteriální kmeny? Pokud ano, jaké faktory se zde projeví?
- 3) Byly zvolené testovací metody dostačující na to, aby byl vysloven závěr o inhibičních účincích obou testovaných typů nanočástic?
- 4) Jaký byl účinek nanočástic stříbra a zlata na vybrané bakteriální kmeny?

Metoda:

Kvalitativní

Technika práce, vyhodnocení dat:

Kvalitativní a kvantitativní mikrobiologické metody (AATCC Test Method: 100-2004 - Antibacterial Finishes on Textile Materials: Assessment of, AATCC Test Method: 147-2004 - Antibacterial Activity Assessment of Textile materials: Parallel Streak Method), spektrofotometrická metoda.

Místo a čas realizace výzkumu:

Fakulta zdravotnických studií Technické univerzity v Liberci, říjen 2016 - leden 2017.

Vzorek:

Vybrané spektrum bakteriálních kmenů, stříbrné a zlaté nanočástice.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

50 - 70

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

viz příloha

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.

Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce:

1. srpna 2016

Termín odevzdání bakalářské práce:

30. dubna 2017



Mgr. Marie Froňková
pověřena vedením fakulty

V Liberci dne 30. listopadu 2016

Příloha zadání bakalářské práce

Seznam odborné literatury:

- 1) ARORA, S. et al. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009, 236(3), 310-318. ISSN 0041-008X.
- 2) FILIPOVÁ, Zuzana et al. *Rizika nanomateriálů*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2012. ISBN 978-80-244-3201-4.
- 3) GAO, W. et al. Effect of gold nanoparticles on glutathione depletion-induced hydrogen peroxide generation and apoptosis in HL7702 cells. *Toxicology Letters*. 2011, 205(1), 86-95. ISSN 0378-4274.
- 4) GREULICH, C. et al. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia*. 2011, 7(1), 347-354. ISSN 1742-7061.
- 5) CHALOUPKA, Karla et al. Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*. 2010, 28(11), 580-588. ISSN 0167-7799.
- 6) CHEN, Jing et al. Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles by carboxymethyl cellulose sodium and silver nitrate. *Materials Chemistry and Physics*. 2008, 108(2-3), 421-424. ISSN 0254-0584.
- 7) CHRISTENSEN, Frans et al. Nano-silver feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature. *Nanotoxicology*. 2010, 4(3), 284-295. ISSN 1743-5404.
- 8) LANKVELD, D.P. et al. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials*. 2010, 31(32), 8350-8361. ISSN 0142-9612.
- 9) NGUYEN, D.T. et al. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron*. 2011, 42(3), 207-227. ISSN 0968-4328.
- 10) VERMA, Shalini et al. Nanomaterials for regenerative medicine. *Nanomedicine*. 2011, 6(1), 157-158. ISSN 1748-6963.

463 03 STRÁŽ NAD NISOU

Č.j.: 17/8515/015866-02

Vážená studentko,

na základě Vaší žádosti ze dne 13. 4. 2017, zaevidované pod č.j.: 17/8515/015866-01, Vám sděluji, že **souhlasím** s ponecháním tématu bakalářské práce „Účinek nanočástic stříbra a zlata na vybrané bakteriální kmeny“ a prodloužením termínu odevzdání do 30. 4. 2018.

S pozdravem

Mgr. Marie Froňková
pověřena vedením fakulty

Technická univerzita v Liberci
Fakulta zdravotnických studií
Studentská 2, 461 17 Liberec 1



Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, 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 (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

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

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 21. 6. 2017

Podpis:



Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Mgr. Ireně Lovětinské-Šlamborové, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, cenné rady a pomoc při zpracování práce. Velice děkuji doc. Ing. Petru Exnarovi, CSc. a laborantce Soně Rothové za pomoc a ochotu při přípravě nanočástic. Dále bych chtěla poděkovat laborantce Marcele Krejčíkové za odborné informace a pomoc při práci na Biosanu RTS-1C. Děkuji Ing. Ivaně Veverkové za výpomoc a čas strávený na Zetasizeru.

Anotace v českém jazyce

Jméno a příjmení autora: Karina Petříková

Institute: Technická univerzita v Liberci, Fakulta
zdravotnických studií

Název práce: Účinek nanočástic stříbra a zlata na vybrané bakteriální
kmeny

Vedoucí práce: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.

Počet stran: 75

Počet příloh: 2

Rok obhajoby: 2017

Souhrn:

Nanočástice stříbra a zlata jsou stále více využívány především pro jejich příznivé biologické, optické, katalytické a antibakteriální vlastnosti. Jejich velikost se pohybuje v řádech nanometrů. Díky tomu mohou být všestranně využívány. Tato bakalářské práce zkoumá vliv nanočástic stříbra a zlata na vybrané bakteriální kmeny klasickými mikrobiologickými metodami a získané výsledky porovnává s výsledky získanými ze záznamníku růstu buněk RTS-1C od firmy Biosan. Zároveň zkoumá rozdíl účinku zlatých a stříbrným nanočástic na bakterie.

Klíčová slova: nanočástice stříbra, nanočástice zlata, příprava, toxicita, použití, bakteriální kmeny

Anotace v anglickém jazyce

Name and surname: Karina Petříková

Institution: Technical university of Liberec, Faculty of Health Studies

Title: The Effect of Nanoparticles of Silver and Gold on the Selected Bacterial Strains

Supervisor: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.

Pages: 75

Apendix: 2

Year: 2017

Summary:

Nanoparticles of silver and gold are increasingly used mainly for their favourable biological, optical, catalytic and antibacterial properties. The size of nanoparticles is in nanometer ranges. For that reason, nanoparticles can be used universally. The bachelor thesis examines the influence of silver and gold nanoparticles on selected bacterial strains using classical microbiological methods. The work compares the results of the research with the results obtained from the Biosan RTS-1C cell growth recorder. The practical part simultaneously explores the difference in the effect of gold and silver nanoparticles on bacteria.

Keywords: silver nanoparticles, gold nanoparticles, preparation, toxicity, use, bacterial strain

Obsah

Seznam použitých zkratk	15
I Úvod	16
II Teoretická část	17
1 Nanočástice stříbra (AgNP)	17
1.1 Příprava AgNP	17
1.2 Historie využívání antibakteriálních účinků stříbra	18
1.3 Mechanismus účinku AgNP na bakterie	18
1.3.1 Účinky AgNP na bakterie v závislosti na jejich tvaru a velikosti	20
1.4 Působení AgNP na viry	20
1.5 Působení AgNP na řasy	20
1.6 Baktericidní a ekotoxické působení AgNP	21
1.7 Toxické působení AgNP na eukaryotní buňky	21
1.7.1 Mechanismy toxického účinku AgNP	22
1.7.2 Oxidativní stres	23
1.7.3 Imunitní odpověď způsobená průnikem nanočástic do organismu	23
1.8 Argyrie – onemocnění způsobené stříbrem	24
1.9 Praktické využití stříbra a AgNP	24
1.10 Využití stříbra a AgNP ve zdravotnictví	25
1.10.1 Zdravotnické prostředky s obsahem stříbra	25
1.10.2 Antimikrobiální hybridní nanovrstvy připravené sol-gel metodou	25
1.10.3 Ochranné hybridní vrstvy působící proti virům	26
1.10.4 Obvazy s ionty stříbra	26
1.10.5 Textilní tkaniny impregnované stříbrem	27
2 Nanočástice zlata (AuNP)	27
2.1 Příprava AuNP	27
2.2 Toxické účinky AuNP	28
2.3 Praktické využití zlata a AuNP	29

3 Testované bakteriální kmeny	30
3.1 <i>Escherichia coli</i>	30
3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.3 <i>Proteus vulgaris</i>	31
3.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
4 Růstová křivka bakteriální populace.....	31
III Výzkumná část.....	33
1 Cíle a výzkumné předpoklady	33
2 Metodika výzkumu	33
2.1 Charakteristika výzkumného vzorku	34
3 Analýza výzkumných dat.....	34
3.1 Použité přístroje a vybavení:.....	34
3.2 Další použité pomůcky a zařízení	35
3.3 Příprava AgNP a AuNP	35
3.5 Testované bakteriální kmeny	39
3.6 Další použité prostředky během testování účinku nanočástic na bakterie.....	39
3.7 Příprava bakteriálního inokula.....	39
3.8 Příprava fyziologického roztoku.....	40
3.9 Příprava živného bujónu (pro BIOSAN RTS-1C).....	40
3.10 Příprava vzorků s obsahem 5 ml Ag1NP pro BIOSAN RTS-1C	40
3.11 Kvantitativní analýza Ag1NP	46
3.12 Příprava vzorků s polovičním objemem Ag1NP pro BIOSAN RTS-1C.....	47
3.13 Kvantitativní analýza se sníženou koncentrací Ag1NP	50
3.14 Příprava vzorků s obsahem 5 ml Au3NP pro BIOSAN RTS-1C	51
3.15 Kvantitativní analýza Au3NP	54
3.16 Příprava vzorků s polovičním objemem Au3NP pro BIOSAN RTS-1C.....	55
3.17 Kvantitativní analýza se sníženou koncentrací Au3NP	58
4 Analýza výzkumných cílů a výzkumných otázek.....	59
4.1 Analýza výzkumného cíle č. 1 a výzkumné otázky č. 4	59

4.2 Analýza výzkumného cíle č. 2 a výzkumné otázky č. 1 a otázky č. 3.....	60
4.3 Analýza výzkumného cíle č. 3 a výzkumné otázky č. 2	61
5 Diskuze	62
6 Návrh doporučení pro praxi.....	63
IV Závěr.....	64
Seznam bibliografických citací.....	65
Seznam tabulek.....	74
Seznam grafů	74
Seznam příloh	75

Seznam použitých zkratek

AgNP	stříbrné nanočástice
ATP	adenosintrifosfát
AuNP	zlaté nanočástice
BSPP	lipid
°C	Celsiův stupeň
CD4	molekula
CFU	kolonie tvořící jednotka
č.	číslo
DLS	dynamický rozptyl světla
DNA	kyselina deoxyribonukleová
dm ³	decimetr krychlový
g	gram
Gp	glykoprotein
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
μg	mikrogram
μl	mikrolitr
μm	mikrometr
mg	miligram
ml	mililitr
nm	nanometr
pH	vodíkový exponent
ROS	reaktivní formy kyslíku

I Úvod

Nanočástice stříbra a zlata jsou stále více využívány v mnoha různých odvětvích. Přidávají se do běžně dostupných prostředků, jako jsou kosmetické přípravky či oděvy. Ve zdravotnictví se užívají například při diagnostice či léčbě některých onemocnění. Zlatými a stříbrnými nanočásticemi se též modifikují lékařské pomůcky. Jsou aktuálním materiálem zejména díky jejich příznivým a unikátním vlastnostem.

Nespočet studií uvádí, že stříbrné a zlaté nanočástice vykazují baktericidní účinky. Tato domněnka by mohla vyřešit problém s bakteriemi a bakteriálními infekcemi ve zdravotnictví. Tyto studie ale zároveň poukazují na možné toxické účinky těchto nanočástic. Právě touto problematikou se tato bakalářská práce zabývá.

V teoretické části je popsána především příprava, biologické působení, toxické účinky a praktické využití stříbrných a zlatých nanočástic. Tato část zahrnuje i informace o přístroji Zetasizer Nano a o testovaných bakteriálních kmenech uvedených níže.

V praktické části jsou nejprve připravovány nanočástice stříbra za použití dusičnanu stříbrného, glukózy a vody. Poté jsou připravovány nanočástice zlata pomocí kyseliny tetrachlorozlatité, glukózy a vody. Tento způsob přípravy byl vybrán proto, aby konečné výsledky byly ovlivněny pouze účinkem stříbrných a zlatých nanočástic, nikoli však látkami, ze kterých byly nanočástice připraveny.

Klíčovým cílem bakalářské práce je prokázat či vyvrátit antibakteriální účinek stříbrných a zlatých nanočástic pomocí klasických mikrobiologických metod. První kvantitativní zvolenou metodou je takzvaný kultivační průkaz. Pomocí této metody je určen počet kolonií neboli CFU na agarových půdách. Zároveň je prováděn kvalitativní výzkum pomocí přístroje zvaného Biosan RTS-1C. Tento přístroj zaznamenává růstovou křivku, rychlost růstu a teplotu při kultivaci bakterií po dobu 24 hod. při 37 °C.

Pro bakalářskou práci byly vybrány 4 bakteriální kmeny (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* a *Pseudomonas aeruginosa*) zahrnující gram-negativní i gram-pozitivní druhy bakterií. Tyto bakteriální kmeny byly zařazeny do výzkumu, protože se jedná o běžně se vyskytující bakterie.

Součástí práce je též porovnání účinku stříbrných a zlatých nanočástic na jednotlivé bakteriální kmeny, stanovení účinku nanočástic na bakterie a porovnání získaných výsledků s literárními údaji.

II Teoretická část

1 Nanočástice stříbra (AgNP)

Drobné částice stříbra jsou označovány jako AgNP. Velikost těchto částic se pohybuje od 1 nm do 100 nm. Nejčastěji se používají a konstruují nanočástice sférického tvaru. V posledních letech jsou AgNP středem zájmu zejména díky jejich odlišným fyzikálním, chemickým a biologickým vlastnostem. (90, 33)

1.1 Příprava AgNP

AgNP mohou být připraveny různými metodami – dispergační metodou produkce nebo kondenzační (odpařovací) metodou produkce. Při užití kondenzační metody dochází ke spojování atomů nebo molekul v homogenních soustavách do větších agregátů. Naopak u dispergační metody se z velkých částic tvoří malé. Dispergační metoda produkce se provádí převážně pomocí laserové ablace. Kondenzační metody se dělí na dvě skupiny a to na metody fyzikální a chemické.

Mezi fyzikální procesy se řadí například příprava nanočástic za použití trubkové pece při atmosférickém tlaku. Tato metoda má však svá úskalí, jelikož trubková pec zaujímá velký prostor, spotřebovává velké množství energie, je zpočátku značně nestabilní a zvyšuje teplotu okolí. (53, 61, 89)

Častější jsou chemické metody přípravy nanočástic. AgNP se vyrábějí například elektrolýzou stříbrných solí nebo vznikají pomocí slabších či silnějších redukčních činidel – monosacharidů (glukóza a galaktóza), disacharidů (maltóza a laktóza), citrátu sodného, borohydridu, rozpouštědel (dimethylformamid), hydrazinu, hydroxylaminu, formaldehydu redukujícího cukry a tak dále. Užití sacharidů je velmi výhodné, protože je ekologické a šetrné k životnímu prostředí. (96, 72, 97)

Ve formě iontů je stříbro velmi dobře redukovatelné. To je způsobeno jeho umístěním v elektrochemické řadě napětí kovů. Stříbrné ionty se většinou redukují ve formě černých sraženin. (24)

Zbarvení nanočástic kovů se odvíjí od jejich velikosti a dielektrické konstanty okolního prostředí. Ve viditelném spektru mají plasmony pouze elektrony s volnými elektrony. To způsobí vznik intenzivních barev. Plasmony ve viditelném spektru má například stříbro, zlato, měď a alkalické kovy. (108)

Velikost a morfologie nanočástic závisí na koncentraci a výběru redukčního činidla a stabilizátoru. Jako redukční činidlo může posloužit například hydrazin, tetrahydridoboritan sodný nebo kyselina askorbová, jako stabilizátor polyvinylalkohol nebo polyvinylpyrrolidon. Pileni a kolektiv – (85) vytvořili při svém výzkumu AgNP různých velikostí a barev změnou koncentrace redukčního činidla. Po zvýšení obsahu hydrazinu v roztoku byly nanočástice větší a jejich optické vlastnosti byly zcela jiné. Vědci zjistili, že barva roztoku se odvíjí od počátečních podmínek syntézy. Zbarvení roztoku může být červené, zelené, žluté až šedé. To závisí na použitém redukčním činidle. (69)

Žlutě zbarvené nanočástice vzniknou při užití stříbrných iontů v kombinaci s tetrahydridoboritanem sodným, zelené nanočástice při použití stříbrným iontů, polyvinylpyrrolidonu a kyseliny askorbové a červené se vytvoří za pomoci stříbrných iontů, polyvinylalkoholu a kyseliny askorbové. (69)

1.2 Historie využívání antibakteriálních účinků stříbra

Již po staletí se stříbro používá na léčbu popálenin a chronických ran. Už v roce 1000 před naším letopočtem se stříbro používalo k čištění vod. (18, 87)

Nejznámější je sloučenina dusičnanu stříbrného (AgNO_3), která byla v roce 1700 používána pro léčbu pohlavních chorob, kostí a perianálních abscesů. AgNO_3 léčil také popáleniny. Dále se ze stříbra začaly vyrábět obvazy a tento kov se začal využívat k léčbě bakteriálních infekcí. (60, 64, 49)

V druhé polovině dvacátého století vědec Moyer zjistil, že stříbro má antibakteriální účinky proti *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. (73, 10) V poslední době je stříbro stále více užíváno v důsledku výskytu rezistence bakterií vůči antibiotikům. (49, 30)

1.3 Mechanismus účinku AgNP na bakterie

Všechny účinky stříbra na bakterie nejsou doposud zcela známé. Nicméně stříbro vykazuje vysoce antibakteriální účinky a dokáže zabít velké množství bakteriálních kmenů. Mezi tyto bakterie se řadí i rezistentní bakterie vůči antibiotikům (*Staphylococcus aureus*). (70)

Antimikrobiální účinky nanočástic jsou způsobeny zejména jejich extrémně velkým povrchem, který poskytuje velmi dobrý kontakt s mikroorganismy. Celý proces začíná tak, že se nanočástice přichytí k buněčné stěně a proniká do bakteriální buňky. Poté tato buňka začne uvolňovat ionty stříbra, které zvyšují baktericidní aktivitu AgNP. Současně začne vytvářet volné radikály, které ničí buněčné funkce. Elektronový přenos mezi enzymy dýchacího řetězce v mitochondriích je blokován a zastavuje se intenzivní metabolismus buňky. Buňka nakonec odumírá.

Ionty stříbra pravděpodobně reagují s peptidoglykany buněčné stěny bakterií, s plazmatickou membránou bakterií, s bakteriálními bílkovinami, s DNA a enzymy zásadními pro vitální funkce buňky. Reaktivita AgNP bude zjevně podobná jako u iontů stříbra. Avšak tento fakt není zcela prozkoumán. (96, 72, 97, 58, 12, 35)

Během kontaktu stříbra s bakteriemi, ale zároveň dochází k morfologickým a strukturálním změnám v bakteriálních buňkách. (60) Grampozitivní bakterie jsou více odolné vůči AgNP než gramnegativní bakterie. To je způsobené stavbou buněčné stěny, viz Obrázek č. 1 a výskytem či absencí extracelulárních polymerů. Buněčná stěna bakterií G^+ obsahuje silnou vrstvu peptidoglykanu. Tato stěna je tlustá asi 20 nm. Tento biopolymer poskytuje buňce pevný a neměnný tvar. Bakterie G^- mají buněčnou stěnu složenou z vnější membránové vrstvy a tenké peptidové vrstvy. (7, 52, 37)

Buněčná stěna bakterie může být poškozena buď samotným působením AgNP nebo uvolněním již zmíněných iontů stříbra. Těmito způsoby může být také narušena tvorba reaktivních kyslíkových forem. (48) Tvorba reaktivních kyslíkových forem je považována za nepřímý mechanismus účinku AgNP. Naopak za přímý mechanismus účinku AgNP je bráno samotné poškození buněčné stěny. (95)

Během komparativní studie AgNP a iontů stříbra bylo odhaleno, že ionty stříbra vykazují nižší antibakteriální účinnost než AgNP. Antibakteriální aktivita AgNP je ovlivněna jejich velikostí, morfologií, povrchem, vlivem rychlosti, mírou aglomerace a velikostí aglomerátů. (79, 82, 46)

Stříbro zpočátku působí pouze bakteriostaticky, tedy zabraňuje růstu mikrobů. Baktericidní účinky AgNP se začnou projevovat až ve chvíli, kdy dojde ke zvýšení koncentrace roztoků s ionty stříbra. (80)

1.3.1 Účinky AgNP na bakterie v závislosti na jejich tvaru a velikosti

AgNP mají velký měrný povrch. Ten hraje důležitou roli zejména při styku s bakteriálními buňkami. Kromě toho mají tyto nanočástice vysoké procento interakcí oproti větším částicím. Nanočástice vytvářejí elektronové efekty, které zvyšují reaktivitu nanočástic s bakteriemi. Nejvíce reaktivní jsou nanočástice, které měří méně než 10 nm. To dokazuje, že antibakteriální účinek je závislý především na velikosti. Velikost aglomerátů je současně klíčovým parametrem ovlivňujícím toxicitu.

Antimikrobiální účinek AgNP závisí ale i na jejich tvaru. To potvrzuje studie změn bakteriálního růstu při vložení jinak tvarovaných nanočástic k bakteriím. Zkrácené nanočástice trojúhelníkového tvaru s obsahem 1 µg stříbra zabrzdí růst bakterií. Kdežto nanočástice sférického tvaru zpomalí růst bakterií, až když obsahují 12,5 µg stříbra. Celkový výzkum ukázal, že tvar nanočástic významně ovlivňuje účinky nanočástic na bakteriální buňky. (62, 74, 82, 72, 86)

1.4 Působení AgNP na viry

V posledních letech se výzkumy zaměřily také na antivirové účinky AgNP. Podle studie Elechiguerry a kol. jsou AgNP schopné blokovat virus HIV-1. Velikost nanočástic, které se vážou na virus, se pohybuje v rozmezí od 1 do 10 nm. Místo vzájemného působení nanočástice s virem je vždy přesně dané. AgNP se váže především na glykoprotein gp120. Tato bílkovina se nachází ve vnější vrstvě HIV viru a je značně důležitá pro interakci s molekulou CD4. Pomocné CD4 buňky se vyskytují na povrchu T-lymfocytů a jsou nedílnou součástí lidského imunitního systému. Jejich hlavní funkcí je vysílat signály pro jiné typy imunitních buněk. Glykoproteiny jsou od sebe vzdáleny 28 nm. To pravděpodobně vysvětluje, proč se mohou navázat pouze nanočástice o velikosti 1-10 nm. (11, 13)

Prokázaly se také antivirové účinky AgNP proti viry influenzy H1N1 (hemagglutinin typ 1). Mechanismy působení u tohoto výzkumu však doposud nebyly objasněny. (104)

1.5 Působení AgNP na řasy

AgNP se vyznačují selektivním inhibičním účinkem na řasy a sinice. Primární místo vzájemného působení a bariéru pro vstup nanočástic zajišťuje buněčná stěna řas. Ta se skládá z glykoproteinů, celulózy a polysacharidů. Během interakce nanočástice

s buněčnou stěnou může být narušena cytoplazmatická membrána. (75) Absorpce nanočástic do buněčného povrchu způsobí stínící efekt či zvýšení hmotnosti. Tyto efekty zapříčiní zhoršení fotosyntézy, a poté vznik oxidativního stresu. Buňky podléhající oxidativnímu stresu mají defektní proteiny, nižší mastné kyseliny i DNA a zvýšený podíl peroxidovaných mastných kyselin. Dochází k závažnému poškození či odumření organismu. (80, 39)

1.6 Baktericidní a ekotoxické působení AgNP

Toxický účinek AgNP na bakterie typu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cyanobakterie (fytoplankton)* a jiné se stále více zkoumá. Studie jsou zaměřené především na bakterie, které mají schopnost tvořit biofilm. Biofilm vykazuje velmi vysokou odolnost vůči antibiotikům. K antibakteriální ochraně mohou být použity například nanočástice, které jsou rozmístěny do polymerní matrice. Tato matrice vykazuje dobrou přilnavost k chráněnému povrchu. (93)

Složení antibakteriálních povlaků je velmi důležité z hlediska předcházení nemocničních infekcí. Největším rizikem jsou katetrové infekce, které postihují močový trakt. AgNP by do budoucna mohly těmto problémům zcela předejít, ale přináší pro organismus i možná rizika. Bylo dokázáno, že AgNP narušuje mitochondriální funkci, posiluje tvorbu reaktivního kyslíku a spotřebovává antioxidanty.(2)

1.7 Toxické působení AgNP na eukaryotní buňky

Toxicita stříbra není stále zcela prozkoumána. Přesto většina studií tvrdí, že jsou AgNP netoxické. Zároveň jsou ale nebezpečné pro životní prostředí vzhledem k jejich malým rozměrům a proměnlivým vlastnostem. Aby se o toxicitě zjistilo víc, provádí se stále častěji mnoho výzkumů, studujících reakce tohoto kovu v organismu. (63, 15) Vědci zjistili, že dlouhodobé působení AgNP má na mitochondrie organismů neblahý vliv. Mitochondrie po kontaktu se stříbrnými nanočásticemi byly abnormálně velké, měly nepravidelný tvar a docházelo k jejich smrštění. Mitochondrie jsou charakteristické tím, že zajišťují buněčné dýchání a produkují ATP. (4)

Dále byly provedeny testy na cytotoxicitu keratinocytů a fibroblastů u pěti běžně dostupných obvazů s ionty stříbra. Během výzkumu byly použity obvazy od firmy Acticoat, Aquacel Ag, Contreet pěna, PolyMem Silver a Urgotul SSD. Uvedené obvazy

se od sebe lišily zejména strukturou, složením a obsahem stříbra. Studie cytotoxicity ukázala, že tři z pěti běžně dostupných obvazů s částicemi stříbra mají cytotoxické účinky. To se projevilo především na buňkách pokožky (keratinocytech) a buňkách vazivové tkáně fibroblastech. Jednalo se o obvaz Acticoat, jehož výrobce je SMITH & NEPHEW CONSUMER, Aquacel Ag od firmy Conva Tec a Contreet pěnu též od firmy Conva Tec. Tato studie může zčásti vysvětlovat, proč při užití některých stříbrných obvazů dochází ke zpomalení hojení ran. (15, 16)

Výzkum Lankvelda a kol. odhalil, že ukládání AgNP do tkání a orgánů závisí pravděpodobně na velikosti. Koncentrace stříbra v orgánech byla nižší při použití nanočástic o velikosti 20 nm než při použití nanočástic o velikosti 80 nm. (66)

1.7.1 Mechanismy toxického účinku AgNP

Nanočástice, které proniknou do organismu, mohou vyvolat řadu poškození biologických struktur. Tyto materiály mohou prostupovat do buněk několika způsoby například endocytózou nebo makropinocytózou. (34, 94) Do jádra vnikají malé nanočástice o velikosti 5 nm. Naopak velké nanočástice o velikosti 30 nm a vyšší setrvávají v cytoplazmě. (Frohlich a kol., 2009) Přímo do jádra penetrují difúzí přes jadernou membránu nebo jsou do jádra transportovány přes komplexy jaderných pórů. Také mohou být náhodně uzavřené v jádře při rozpouštění jaderné membrány v průběhu mitózy. Nanočástice uvnitř jádra mohou následně přímo interagovat s molekulami DNA nebo proteiny, která interagují přímo s DNA. Tato interakce způsobí fyzikální poškození genetického materiálu. DNA je ovlivňována nanočásticemi přímo nebo nepřímo. K nepřímému ovlivnění dochází pokud nanočástice interagují s buněčnými proteiny. (94)

Nanočástice v nitru buňky mohou také prostupovat z fagozómů nebo cytosolu do mitochondrií či lysozómů. Záhy po vstupu částice do buňky se zvyšuje produkce přenašečů (vápníku, ROS a ATP) a dochází k aktivaci různých signálních drah. Tyto dráhy vedou k buněčným odezvám. Jednou z nich je vznik oxidativního stresu viz Kapitola 1.7.2 nebo zánětu. V mitochondriích dochází k různým reakcím, které mohou zapříčinit ztrátu potenciálu na mitochondriální membráně neboli spotřebování ATP. (94)

Po vniknutí nanočástice do buňky může po určitém čase docházet k fragmentaci DNA vedoucí k apoptóze, autofagocytóze nebo nekróze. (8)

Ve výjimečných případech buňka nemusí být zcela usmrcena. Vlivem nanočástic může být pozměněna pouze její genetická informace. To může přinášet velmi závažné důsledky pro organismus, protože může docházet k mutacím (trvalým změnám dědičné informace v DNA). Některé mutace mohou vyvolat karcinogenezi nebo mohou ovlivnit plodnost. (94)

1.7.2 Oxidativní stres

Oxidativní stres je na základě většiny studií považován za nejdůležitější mechanismus toxicity nanomateriálů. (8, 94, 76) Mezi parametry homeostázy (stálosti vnitřního prostředí) patří rovnováha, která je velmi důležitá, neboť za vhodných podmínek existuje v organismu rovnováha mezi reaktivními formami kyslíku a antioxidanty. Pokud dojde k porušení této rovnováhy, vzniká takzvaný oxidativní stres. Tento mechanismus toxicity způsobí porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku. Tento stav je zapříčiněn poklesem kapacity antioxidantního systému nebo nadměrnou tvorbou volných kyslíkových radikálů. To jsou molekuly nebo atomy, jejichž valenční sféra má jeden nebo více nespárovaných elektronů. (100)

Reaktivní formy kyslíku se utváří během ozáření ultrafialovým, rentgenovým a gama zářením. Produkují je neutrofily a makrofágy v průběhu zánětu a zároveň mohou být vyvolány exogenními faktory (ozon, xenobiotika), endogenními faktory (fyziologicky) a několika dalšími činiteli. Takovéto reaktivní formy jsou výsledkem reakcí katalyzovaných kovů, a také jsou součástí atmosféry v podobě znečišťujících látek. (100, 8)

1.7.3 Imunitní odpověď způsobená průnikem nanočástic do organismu

Nanočástice je po vstupu do organismu většinou brána jako cizorodá látka – antigen. Poté se na tento antigen naváže takzvané opsoniny, což jsou speciální protilátky či složky komplementu. Díky opsoninům, které jsou rozpoznány pomocí Fc receptoru fagocytů, mohou být nanočástice následně fagocytovány. Zmíněné interakce mají smysl pouze před zahájením zánětlivé reakce. Pokud vstoupí nanočástice do organismu například respirační cestou, jsou nejprve obaleny surfaktantem či jinými látkami, které

obsahuje bronchoalveolární tekutina. Nanočástice pak začnou agregovat a mohou být rozpoznány makrofágy. (8)

1.8 Argyrie – onemocnění způsobené stříbrem

Argyrie je kožní onemocnění způsobené dlouhodobým užíváním velkého množství stříbra. Projevuje se šedomodrým zbarvením kůže. Vyskytuje se převážně u lidí pracujících v továrnách, ve kterých se zpracovává stříbro. Lidé pracující v průmyslové výrobě stříbra mohou dlouhodobě vdechovat stříbrné soli, a tak ohrožovat své zdraví. (51)

Tato nemoc se též může projevit u některých jedinců v důsledku dlouhodobého užívání léků obsahujících stříbrné soli, koloidní stříbro či kapalnou suspenzi mikroskopických částic stříbra. Patří sem například léčiva k léčbě rakoviny, diabetu, oparů a dalších onemocnění. (29, 36)

Stříbro nebo částice sulfidu stříbra se nejprve hromadí v kůži. Následně ale může docházet k akumulaci stříbra v oku či jiných orgánech. (65)

Faktorů, které mohou zapříčinit rozvoj této nemoci je mnoho. Mezi tyto činitele spadají například stříbrné stehy užívané ve zdravotnictví či amalgámové zubní plomby. Argyrie se může též projevit u pacientů s popáleninami v případě, že postižená místa byly léčeny sulfadiazinem stříbrným. (29)

Tato choroba se diagnostikuje pomocí biopsie kožních tkání nebo fluorescentního rentgenového vyšetření. Obsah stříbra v lidském těle se průměrně pohybuje okolo 1 mg. Avšak lidé trpící argyrií mají obsah stříbra v těle nejméně 4 mg.

Argyrie nelze v současné době zcela vyléčit. Léčba se provádí různými depigmentačními prostředky či laserem. Pacienti s touto nemocí by se neměli vystavovat slunečnímu záření, aby nedocházelo ke zhoršování a měli by se vyhnout doplňkům stravy s obsahem stříbra a celkově kontaktu se stříbrem. (14)

1.9 Praktické využití stříbra a AgNP

Vědci se začali zajímat o AgNP zejména kvůli jejich ultra malým rozměrům a neobvyklým vlastnostem. Koloidní částice se vyznačují vynikající elektrickou vodivostí, chemickou stabilitou, katalytickou a antimikrobiální aktivitou. Díky těmto vlastnostem se tyto nanočástice běžně používají při výrobě komerčně dostupných

výrobků. Přidávají se například do textilií, vlhčených ubrousků, plet'ových masek, mycích prostředků, vysavačů, praček a dají se přímo užít pro realizaci třírozměrných mikroelektromechanických systémů a elektrickým obvodů. Mohou také sloužit jako katalyzátory, protože vykazují vysokou povrchovou energii a velký měrný povrch. (17, 92, 91, 28, 68, 84)

1.10 Využití stříbra a AgNP ve zdravotnictví

V klinické praxi se využívá zejména AgNO_3 , který je užíván zejména při kauterizaci. (46) Velmi významný je také sulfadiazin stříbrný. Ten napomáhá při hojení popálenin. AgNP se přidávají například do kostního cementu, obvazů a dezinfekčních gelů. V mnoha případech nahrazují antibiotika. (6, 50)

1.10.1 Zdravotnické prostředky s obsahem stříbra

V posledních letech se zvažuje myšlenka potahovat zdravotnické pomůcky a prostředky AgNP. Povrch zdravotnických prostředků z AgNP by mohl být kvalitnější a odolnější než povrch z iontů stříbra nebo kovového stříbra, protože obě tyto varianty dopadly v klinických testech velmi špatně. Při styku kovového stříbra s plazmou docházelo k jeho inaktivaci. Navíc antimikrobiální aktivita tohoto stříbra nebyla dostačující. Podobně na tom byl i povrch z iontů stříbra. (88)

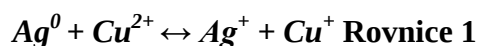
1.10.2 Antimikrobiální hybridní nanovrstvy připravené sol-gel metodou

Základem nejnadějnější antimikrobiální nanovrstvy připravené sol-gel metodou je TMSPM (3-(trimethoxysilyl) propyl methakrylát) obsahující iontově vázaný kationt stříbra, zinku a mědi. Touto ochrannou nanovrstvou může být potažen kterýkoli materiál včetně teflonu, keramiky, skla či tkanin. Působí antibakteriálně proti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* a dalším bakteriálním kmenům. Zároveň má antivirové a antimykotické účinky. Základní funkcí této nanovrstvy je ochrana prostorů a materiálů před rezistentními mikroorganismy (rezistentní *Staphylococcus aureus* nebo Vankomycin-rezistentní *Enterococcus*), kterých v posledních letech stále přibývá. Aplikace této nanovrstvy by mohla zmírnit výskyt nozokomiálních infekcí v nemocnicích. Tento typ povrchové úpravy může být použit

například na operačních sálech, na transplantačních odděleních, v čekárnách, v hospicích, ve školách a obchodech.

Tato nanovrstva je velmi účinným řešením, jelikož kationty stříbra, mědi a zinku vykazují velmi intenzivní antimikrobiální účinky. AgNP deaktivují bakterie dokonce několika způsoby. Takto připravená nanovrstva by měla zajistit výskyt kationtů stříbra, mědi a zinku na povrchu všech materiálů v nemocnicích a tím uchránit všechny prostředky před mikroby.

Měď je schopná za přítomnosti atmosférického kyslíku zoxidovat z měďné formy kationtu Cu^+ do měďnaté formy kationtu Cu^{2+} a zároveň měďnatý kation je schopný zoxidovat atomární stříbro zpět na stříbrné kationty. Tato oxidačně-redukční reakce udržuje antimikrobiální účinky stříbrných kationtů, viz Rovnice 1. Kationt zinku pouze zvyšuje efektivnost této antimikrobiální nanovrstvy zejména proti houbám. (98, 25, 57)



1.10.3 Ochranné hybridní vrstvy působící proti virům

Jedním z nejzávažnějších problémů současné doby jsou infekce získané ve zdravotnických zařízeních. Ročně mají infekce spojené se zdravotní péčí na svědomí nespočet úmrtí. Tyto infekce jsou způsobené patogenními bakteriemi, viry a dalšími mikroorganismy. V posledních letech vzrostl zájem o antibakteriální ochranné vrstvy, kterými se potahují například povrchy umělých kloubů či zubní implantáty.

Ochranné hybridní vrstvy obsahující kationty stříbra, mědi a zinku jsou připravovány prostřednictvím radikálové polymerace sol-gel metodou. Tato anorganicko-organická vrstva se aplikuje na povrch sklíček či na zevnějšek polymethylmethakrylátových desek. Do této vrstvy se po této aplikaci přidá 10 μl jednotlivých typů imunodeficientních virionů (influenza, HIV-1, dengue), a následně se stanoví titrace. Lepší přilnavost mají povrchy, které nejvíce sníží hodnotu titru. (41)

1.10.4 Obvazy s ionty stříbra

V poslední době stále přibývá rezistentních bakterií vůči antimikrobiálním přípravkům. Z tohoto důvodu vznikají nové prostředky, které by tento problém mohly vyřešit. Stříbro je známé tím, že má výborné antibakteriální a antivirové účinky. Proto

se z něj vyrábí obvazy s ionty stříbra a prostředky na povrchové krytí. Na trhu je běžně k dostání obvazový materiál, sterilní krytí a práškový sprej k regeneraci kůže od firmy Askina Calgitrol Ag a primární krytí od firmy Aquacel Ag. (21, 49)

1.10.5 Textilní tkaniny impregnované stříbrem

Stříbro se též využívá při výrobě zdravotnických oděvů, v nichž slouží jako antibakteriální činidlo. Bakterie typu *Staphylococcus* či *Enterococcus* mohou na zdravotnickém oděvu přežívat až několik desítek dní. Nadále mohou být bakterie z oděvu personálu přenášeny na lůžka pacientů či na zdravotnické pomůcky. To přináší velké riziko výskytu infekcí ve zdravotnických zařízeních. (32)

Tento kov má ideální vlastnosti. Díky tomu, že je netoxický a má antibakteriální účinky, mohou být nanokompozitní vlákna obsahující AgNP přidávány do různých textilních látek. Bavlněná vlákna s příměsí AgNP mají velmi vysokou antibakteriální účinnost zejména proti bakterii *Escherichia coli*. (105)

2 Nanočástice zlata (AuNP)

Zlato i stříbro spadá do skupiny d-prvků a rovněž do skupiny mědi. Tento žlutý lesklý kov se vyznačuje inertností a oxidačními čísly 0, I a III. (22)

2.1 Příprava AuNP

Existuje mnoho postupů příprav AuNP. Avšak tyto postupy se rozdělují na dva základní přístupy: top-down a bottom-up. Je nutné vždy vhodně vybrat metodu přípravy podle toho, jak velké mají být požadované nanočástice. Top-down techniky jsou pro přípravu nanočástic méně příhodné, jelikož je velmi obtížné vytvořit nanočástice požadovaného tvaru a velikosti.

Mezi bottom-up techniky přípravy nanočástic kovů patří metoda chemická, která je založena na nukleaci a růstu tuhé fáze. Tento proces je většinou způsoben chemickou redukcí solí kovů. Ke kontrole růstu a k ochraně nanočástic před agregací se užívá mnoho stabilizátorů (thioly a polymery).

Stabilní AuNP o velikosti 2 nm mohou být připraveny redukcí vodného roztoku zlata tetraboritanem sodným v přítomnosti sulfidu uhličitého. Při této syntéze není třeba použít žádný stabilizátor.

AuNP se dají také připravit smícháním kyseliny tetrachlorozlatité s hydroxylaminem v přítomnosti etylenglykolu. Nanočástice mohou být připravovány v zásaditém, neutrálním nebo kyselém prostředí. Barva výsledné směsi bude měnit barvu na základě zvoleného prostředí. V alkalickém prostředí bude mít směs nejprve červenou barvu, která se následně změní na oranžovou. Naopak v kyselém prostředí bude barva modročerná, a pak rubínová.

AuNP se vytvoří také redukcí kyseliny tetrachlorozlatité citrátem, tetrahydridoboritanem sodným či glukózou. Prostřednictvím citrátu vznikají nanočástice rozmanitých velikostí a tvarů. Citrát zde slouží jako stabilizační i redukční činidlo. Jeho koncentrace ovlivňuje celý proces přípravy. Čím je nižší koncentrace citrátu, tím je pomalejší stabilizace a zároveň větší velikost částic. Tvar, velikost a vlastnosti nanočástic závisí také na zvoleném pH směsi.

Další možností je příprava nanočástic pomocí gama záření užitím hovězí bílkoviny. Tento protein slouží jako stabilizátor. Nanočástice připravené touto metodou měří 2-7 nm. (59, 77, 3, 83, 101)

2.2 Toxické účinky AuNP

AuNP, které měří více, než 5 nm se mohou ukládat v orgánech. Podobně tomu tak je i u AgNP. Nanočástice menších rozměrů se inkorporují lépe než nanočástice větších rozměrů. Velké AuNP mají tendenci prostupovat krevně mozkovou bariérou. Zároveň může docházet k akumulaci AuNP v neurální tkáni.

Buňky poškozené AuNP byly nekrotické a apoptické. Avšak během testování AuNP na myších se neprokázaly žádné vedlejší účinky. Velmi zajímavým poznatkem je, že kladně nabitě nanočástice způsobovaly srážení krve a hemolýzu naopak záporně nabitě částice se zdály být zcela netoxické. Nicméně, toxické účinky těchto nanočástic nebyly dosud zcela prokázány. (40, 47, 42, 5, 67)

2.3 Praktické využití zlata a AuNP

Koloidní zlato se čím dál tím víc využívá pro různé biomedicínské aplikace. To zejména díky jeho slibným elektrickým, optickým, magnetickým a strukturálním vlastnostem. Do těchto aplikací se řadí například biosenzory, snímání rakovinových buněk, fototermální terapie, dodávka léků, molekulární diagnostika a radioterapie. (23, 1, 43)

Mnoho studií a článků uvádí, že má zlato antibakteriální účinky. Tyto studie se také domnívají, že menší nanočástice, díky jejich většímu poměru mezi povrchem a objemem, mají silnější antimikrobiální účinek než nanočástice velké. (107)

Některé články zase uvádějí, že AuNP vykazuje antibakteriální aktivitu pouze proti multirezistentním *G⁻* bakteriím. Tento antibakteriální účinek se uplatňuje změnou membránového potenciálu díky inhibici ATP syntetasy. To způsobí snížení hladiny APT a současně dojde ke snížení metabolismu. Antibakteriální aktivita se též může uplatňovat blokací podjednotky ribozomu. (19)

Dle další studie byla potvrzena baktericidní aktivita AuNP proti bakteriím *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Bacillus subtilis* metodou diskové difúze. (44)

Za normálních podmínek je AuNP nestabilní, okamžitě se shlukuje a tvoří agregáty. Tyto částice jsou stabilní pouze tehdy, pokud je k nim připojen ligand. Ligandy se většinou napojují pomocí thiolových skupin, protože tyto skupiny v kontaktu se zlatem vytváří Au-S kovalentní vazby. Takto uměle vytvořené látky se užívají například v aplikacích v diagnostice. (77)

V transmisní elektronové mikroskopii se AuNP z důvodu vysoké hustoty elektronů užívá jako prostředek k detekci biospecifických interakcí. Dále k takzvanému naprašování smínaných vzorků. (38)

AuNP se rovněž používají k modifikaci elektrod či minielektrod. Tato úprava umožňuje snížit mez detekce o několik řádů. Provádí se například cyklickou voltametrií. Elektroda, na jejímž povrchu je navázána poly, mléčná kyselina, vykazuje vysokou selektivnost. (20)

Tyto částice mohou být užívány také při transportu léčiv či v terapii, například při fotodynamické terapii. Tato metoda se používá k léčbě onkologických chorob a určitých kožních a infekčních onemocnění. Mohou též zlepšit průběh léčby nádorů a léčbu infekčních onemocnění pomocí fototermální terapie. Základním principem této metody je ozáření AuNP radioaktivním světlem na odpovídající vlnové délce. Po osvětlení se

tyto nanočástice velmi nažhaví. Pokud se takto rozpálené nanočástice nachází uvnitř či v blízkosti cílových buněk, dochází k jejich odumírání. (99, 56, 103, 31)

AuNP vykazují také imunologické vlastnosti. Během studií na králících bylo zjištěno, že dvě hodiny po intravenózním zavedení 5 ml koloidního zlata do těla králíka vzrostl obsah leukocytů v krvi. Došlo k poklesu leukocytů v mononukleárních formách a naopak k nárůstu v polynukleárních formách. (81)

3 Testované bakteriální kmeny

3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli se řadí mezi Enterobakterie. Bakterie této čeledi se vyznačují tím, že mají respiratorní a fermentativní metabolismus, produkují katalázu a jsou patogenní pro člověka, zvířata, hmyz i rostliny. Fermentativní metabolismus se vyznačuje anaerobním zpracováním glukózy. Enterobakterie jsou gram-negativní, nesporulující, fakultativně anaerobní bakterie tyčinkovitého tvaru. Jejich délka se pohybuje od 2-3 μm a šířka okolo 0,6 μm . Zpravidla vykazují pohyblivé peritrichózní bičíky a pro růst jim stačí jednoduchá kultivační půda. Mezi Enterobakterie se též řadí rod *Klebsiella*, *Salmonella*, *Vibrio* a mnoho dalších rodů.

Escherichia coli se běžně nachází v tlustém střevě člověka. Žije zde jako komenzál. Běžně se používá jako indikátor fekálního znečištění pitné vody. *Escherichia coli* vyvolává extraintestinální onemocnění (infekce močových cest a ran, hnisavé procesy a septická onemocnění) a zároveň způsobuje infekce v intestinálním traktu, které se vyznačují průjmy. (9)

3.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus patří mezi stafylokoky a společně se streptokoky se řadí mezi nejobvyklejší původce hnisavých infekcí či intoxikací některých organismů. Stafylokoky charakterizuje fermentační i respirační typ metabolismu, produkce katalázy (kromě *Staphylococcus saccharolytica* a podruhu *Staphylococcus aurea*) a kyselin. Jsou to velice odolné bakterie, jelikož mohou přežívat ve vysokých teplotách a jsou odolné vůči větším koncentracím NaCl. Bakterie této čeledi jsou gram-pozitivní, nesporulující, nepohyblivé, kokovitého tvaru. Pro růst jim postačí obyčejný živný agar.

U člověka většinou kolonizují na kožních oblastech či sliznicích. Zpravidla napadají jedince s oslabeným organismem. Tyto bakterie mohou snadno proniknout do krevního řečiště a mohou tak zapříčinit vznik sekundární pneumonie, osteomyelitidy, endokarditidy a meningitidy ve kterémkoli orgánu. (9)

3.3 *Proteus vulgaris*

Rod *Proteus* spadá stejně jako bakterie *Escherichia coli* do čeledi enterobakterií, viz Kapitola *Escherichia coli*. *Proteus vulgaris* je typický plazivým růstem, produkcí ureázy a tím, že neutváří uzavřené kolonie. Pomáhá rozkládat organickou hmotu například ve stolici lidí a zvířat. Nejčastěji způsobuje infekci močových cest. Může se též vyskytovat jako sekundární infekce v ranách, zánětu středního ucha či defektů měkkých tkání. (9)

3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Rod *Pseudomonas* jsou striktně anaerobní gram-negativní bakterie tyčinkovitého tvaru. Vyznačují se polárními bičíky, kterými se pohybují. Na rozdíl od předešlých druhů bakterií mají pouze respirační metabolismus a vytváří katalázu i oxidázu. Mohou se množit například v odpadních vodách. Pomáhají při rozkladu organické hmoty. Nachází se zejména na povrchu sliznic respiračního traktu a močových cest. Často se také vyskytuje v nemocnicích především na odděleních, kde se využívají dýchací přístroje, katétry či nebulizátory. Zpravidla se objevuje u jedinců s rozsáhlými popáleninami, po těžkém operativním výkonu, po dlouhodobém zavedení katétru či u pacientů dlouhodobě užívajících imunosupresiva, kortikoidy a antibiotika. (9)

4 Růstová křivka bakteriální populace

Ve výzkumné části byly grafické záznamy růstu jednotlivých bakteriálních kmenů z Biosanu RTS-1C vyhodnoceny podle jednotlivých fází standardní růstové křivky, viz Obrázek č. 2. Standardní růstová křivka má sigmoidní tvar. Skládá se z přípravné fáze, z fáze zrychleného růstu, z exponenciální fáze, z fáze zpomaleného růstu, ze stacionární fáze a z fáze odumírání buněk. Osa x znázorňuje dobu kultivace a osa

y logaritmus počtu živých buněk. Generační doba bakterií se pohybuje okolo 30 minut. (103, 55)

- 1) Přípravná fáze – V této fázi ještě nedochází k rozmnožování bakterií. Bakterie se pouze adaptují na nové podmínky a uvádí do činnosti svůj enzymový systém. (55)
- 2) Fáze zrychleného růstu – Bakterie jsou zcela adaptovány na nové podmínky, ve kterých se následně kultivují. Všechny enzymové reakce dosahují konstantních mezních rychlostí. Poté přecházejí do ustáleného stavu. (55)
- 3) Exponenciální fáze růstu – Rychlost růstu je v této fázi velmi intenzivní, díky dostatečnému množství živin v médiu. Buňky mají nejkratší generační dobu. (55, 102)
- 4) Fáze zpomaleného růstu – V této fázi klesá rychlost rozmnožování bakterií z důvodu nedostatku živin a hromadění toxických metabolitů. (55,102)
- 5) Stacionární fáze růstu – Tato fáze je charakteristická tím, že dochází k zástavě rozmnožování z důvodu vyčerpání živin. Počet bakterií se víceméně nemění. (78)
- 6) Fáze postupného odumírání buněk – V této fázi se bakterie přestávají rozmnožovat. Počet bakterií se snižuje, protože dochází k jejich odumírání. (102)

III Výzkumná část

1 Cíle a výzkumné předpoklady

Tato bakalářská práce měla stanovené 3 výzkumné cíle a 4 výzkumné otázky.

Výzkumné cíle:

1. Otestovat účinek nanočástic stříbra a zlata na vybrané bakteriální kmeny klasickými mikrobiologickými metodami a získané výsledky porovnat s výsledky získanými ze záznamníku růstu buněk RTS-1C od firmy Biosan.
2. Zjistit, zda se získané výsledky výzkumu shodují s informacemi popsány v literárních zdrojích. Porovnat, zda zvolené testovací metody byly dostačující na to, aby byl vysloven závěr o inhibičních účincích obou testovaných typů nanočástic.
3. Prozkoumat rozdíl účinku zlatých a stříbrných nanočástic na testované bakteriální kmeny.

Výzkumné otázky:

1. Shodují se získané laboratorní výsledky s výsledky z literárních zdrojů?
2. Projevil se rozdíl účinku stříbrných a zlatých nanočástic na testované bakteriální kmeny? Pokud ano, jaké faktory se zde projeví?
3. Byly zvolené testovací metody dostačující na to, aby byl vysloven závěr o inhibičních účincích obou testovaných typů nanočástic?
4. Jaký byl účinek nanočástic stříbra a zlata na vybrané bakteriální kmeny?

2 Metodika výzkumu

Ve výzkumné části bylo užito kvalitativní i kvantitativní hodnocení. Hodnocení bylo prováděno pomocí standardních mikrobiologických metod. Počet bakterií byl stanoven pomocí přímé kvantitativní metody, zvané kultivační průkaz. Pomocí této metody byl určen počet kolonií neboli CFU na agarových půdách. Zároveň byl prováděn kvalitativní výzkum pomocí přístroje zvaného Biosan RTS-1C. Tento přístroj

zaznamenával růstovou křivku, rychlost růstu a teplotu při kultivaci bakterií po dobu 24 hod při 37 °C.

Kultivace probíhala v živném bujónu. Níže uvedené vybrané bakteriální kmeny byly testovány vždy samostatně (standardně) a s přidavkem určitého množství připravených AgNP a AuNP. Nejprve bylo během testování použito 5 ml AgNP a AuNP. Poté byl použit poloviční objem AgNP a AuNP. Snížené množství nanočástic mělo ověřit antibakteriální účinky AgNP a AuNP.

Celý výzkum probíhal v zimě roku 2017 v laboratořích Fakulty zdravotnických studií Technické univerzity v Liberci.

2.1 Charakteristika výzkumného vzorku

Prvním výzkumným vzorkem byly **AgNP a AuNP**, které byly připravovány v laboratořích Fakulty zdravotnických studií Technické univerzity v Liberci. Jejich vhodná koncentrace a příprava je popsána dále. Dalším výzkumným krokem bylo **vybrat vhodné bakteriální kmeny**: *Escherichia coli* (CCM 2024), *Staphylococcus aureus* (CCM 226), *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 1956), *Proteus vulgaris* (CCM 1951).

3 Analýza výzkumných dat

3.1 Použité přístroje a vybavení:

Velikost AuNP a AgNP byla měřena přístrojem **Zetasizer Nano (532 nm)** od firmy **Malvern**, viz Obrázek č. 3. Zetasizer Nano stanovuje velikost nanočástic pomocí dynamického rozptylu světla (DLS). Proměřuje Brownův pohyb a zároveň ho uvádí do vztahu s velikostí částic. To provádí prostřednictvím laseru, který osvítl částice a analyzováním fluktuací intenzity v rozptýleném světle. Částice osvětlená laserem rozptyluje světlo ve všech směrech. Malé částice suspendované v kapalině se pohybují rychle, naopak velké částice se pohybují pomalu. To znamená, že rychlost pohybu částice v kapalině určuje velikost této částice. (106) Dále byla měřena koncentrace bakteriálního inokula pomocí **spektrofotometru**. Na závěr byl použit přístroj **Biosan RTS-1C verze 2.7.3.6**. Tento bioreaktor umožňuje sledovat narůst či pokles mikrobů v 50 ml nádobě v reálném čase. Pracuje na principu inovativního míchání v důsledku

zpětného otáčení vzorku kolem jeho vlastní osy. Zaznamenává graficky optickou hustotu (denzitu), rychlost růstu a teplotu.

3.2 Další použité pomůcky a zařízení

Dále byly užity pipety, kádinky, váhy, balónek na pipetování, míchačka, zahřívací lázeň, odměrné baňky, válce, zkumavky, denzitometr, magnetické míchadlo, kontejnery, kličky, termostat, mikrobiologické zkumavky, autokláv a stolní laboratorní přístroj Vortex.

3.3 Příprava AgNP a AuNP

AgNP byly připraveny redukcí dusičnanu stříbrného glukózou. Na přípravu byl použit dusičnan stříbrný (AgNO_3) o koncentraci $0,001 \text{ mol.dm}^{-3}$, 2% roztok glukózy a destilovaná voda.

AuNP byly připraveny též redukcí zlatité soli glukózou. Na přípravu byl použit 2% roztok glukózy, destilovaná voda a kyselina tetrachlorozlatitá (HAuCl_4) o koncentraci $0,001 \text{ mol.dm}^{-3}$.

Použité reagensie při přípravě nanočástic:

- Dusičnan stříbrný (AgNO_3)
- Kyselina tetrachlorozlatitá (HAuCl_4)
- Glukóza ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)
- Destilovaná voda (H_2O)

Předběžné pracovní postupy AgNP a AuNP:

Cílem přípravy nanočástic bylo získat stabilní AgNP a AuNP přijatelné velikosti pro další použití. Velmi důležitým faktorem byla stabilita nanočástic, tedy zamezení aglomerace. Z tohoto důvodu bylo nutné upravit parametry podle efektivnosti. Hledání vhodných podmínek bylo uskutečněno nalezením vhodného objemu glukózy, dusičnanu stříbrného, kyseliny tetrachlorozlatité a destilované vody, viz Tabulka č. 1 a Tabulka č. 2. Zároveň též záleželo na teplotě a délce zahřívání.

Tabulka č. 1 Předběžné postupy přípravy AgNP

Vzorek	AgNO ₃ [ml]	Glukóza [ml]	H ₂ O [ml]	Teplota zahřívání [°C]	Délka zahřívání [min]
Ag1NP	5	5	0	Bez zahřátí	–
Ag1NP	5	5	0	60	10
Ag1NP	5	5	0	60	60
Ag2NP	5	5	0	50	30
Ag3NP	5	3	2	50	30
Ag4NP	5	1	4	50	30

Tabulka č. 2 Předběžné postupy přípravy AuNP

Vzorek	HAuCl ₄ [ml]	Glukóza [ml]	H ₂ O [ml]	Teplota zahřívání [°C]	Délka zahřívání [min]
Au1NP	5	5	0	Bez zahřátí	–
Au2NP	5	5	0	50	30
Au3NP	5	3	2	50	30
Au3NP	5	3	2	60	10
Au3NP	5	3	2	60	60
Au3NP	5	3	2	45	30
Au3NP	5	3	2	55	30
Au3NP	5	3	2	55	60
Au4NP	5	1	4	50	30
Au5NP	5	4	1	50	30
Au6NP	5	2	3	50	30

Na přípravu nanočástic byly použity čtyři různé glukózy (od různých dodavatelů), aby se zjistilo, jestli kvalita glukózy může ovlivnit charakter vzniklých nanočástic. Jak se ukázalo, stabilita a kvalita nanočástic záleží také na použité glukóze, na její chemické čistotě, která se liší dle dodavatele. Nejlepší výsledky poskytla D-glukóza od firmy Chemapol.

Z výsledků získaných na Zetasizeru Nano pro předběžné pokusy se jevil jako nejvhodnější a nejnadějnější vzorek Ag1NP bez zahřívání pro přípravu AgNP, viz Tabulka č. 1 a Obrázek č. 4. Stabilita AuNP byla výrazně horší než stabilita AgNP. Z tohoto důvodu bylo velmi obtížné vybrat vhodný vzorek. Nakonec pro přípravu AuNP byl vybrán vzorek Au3NP zahřátý na 55 °C po dobu 30 minut, viz Tabulka č. 2 a Obrázek č. 5.

Pracovní postupy přípravy vybraných vzorků nanočástic:

Vzorek Ag1NP

Nejprve jsme si do jedné odměrné baňky připravili roztok dusičnanu stříbrného o koncentraci $0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a do druhé odměrné baňky 2% roztok glukózy. Poté jsme odpipetovali do 25 ml kádinky 5 ml připraveného roztoku dusičnanu stříbrného. Do 10 ml kádinky jsme odpipetovali 5 ml roztoku glukózy. Následně jsme do kádinky s roztokem dusičnanu stříbrného vložili poteflonované magnetické míchadlo, umístili ji na elektromagnetickou míchačku a spustili intenzivní míchání. Doprostřed míchaného roztoku jsme přilili odměřené množství glukózy z kádinky a takto připravenou reakční směs jsme nechali ještě asi dvě minuty míchat na elektromagnetické míchačce. Potom bylo z kádinky vyndáno poteflonované míchadélko, její ústí překryto alobalem nebo hodinovým sklem proti vniknutí prachu a kádinka uložena v laboratorním prostředí do druhého dne.

Vzorek Au3NP

Nejprve jsme si do jedné odměrné baňky připravili roztok kyseliny tetrachlorozlatité o koncentraci $0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a do druhé odměrné baňky 2% roztok glukózy. Poté jsme odpipetovali do 25 ml kádinky 5 ml připraveného roztoku kyseliny tetrachlorozlatité a 2 ml destilované vody. Do 10 ml kádinky jsme odpipetovali 3 ml roztoku glukózy. Následně jsme do kádinky s roztokem kyseliny tetrachlorozlatité vložili poteflonované magnetické míchadélko, umístili ji na elektromagnetickou míchačku a spustili intenzivní míchání. Doprostřed míchaného roztoku jsme přilili odměřené množství glukózy z kádinky a takto připravenou reakční směs jsme nechali ještě asi dvě minuty míchat na elektromagnetické míchačce.

Následně jsme roztok přelili do zkumavky a zkumavku s roztokem umístili do předem vyhřáté vodní lázně nastavené na 55 °C. Vodní lázeň musí být vyhřátá předem nejméně 2 hodiny pro dostatečnou stabilizaci teploty. Zkumavku jsme nechali umístěnou v lázni 30 minut, aby se vzorek dostatečně zredukoval. Potom byla zkumavka vyjmuta z lázně, její ústí překryto alobalem proti vniknutí prachu a zkumavka uložena do stojanu v laboratorním prostředí do druhého dne.

3.4 Výsledky ze Zetasizeru Nano

Velikost nanočástic a jejich stabilita u vzorků Ag1NP a Au3NP připravených pro mikrobiologické testy byla kontrolována 1., 2. a 3. den po přípravě, u vzorku Ag1NP také 4. den. Získané výsledky ze Zetasizeru jsou graficky shrnuty na obrázku v přílohách, viz Obrázek č. 6. Průměrné velikosti nanočástic jsou uvedeny v Tabulce č. 3 a v Tabulce č. 4 včetně směrodatné odchylky s_x .

Jak je z výsledků pro Au3NP patrné, reprodukovatelnost a stabilita solů je snížena. Objevují se i velké částice, pravděpodobně vzniklé aglomerací, které u snížené koncentrace a delších časů pravděpodobně dorostly velikosti nad 1000 nm a stačily před dokončením měření sedimentovat.

Naproti tomu u Ag1NP je stabilita solů velmi dobrá a během čtyř dnů od přípravy došlo pouze k nepatrnému nárůstu velikosti nanočástic.

Tabulka č. 3 Průměrná velikost nanočástic Ag1NP v solu podle měření na Zetasizeru

	Základní koncentrace		Snížená koncentrace	
	Průměr [nm]	S_x [nm]	Průměr [nm]	S_x [nm]
První den	153	47	127	36
Druhý den	159	48	131	40
Třetí den	161	54	135	42
Čtvrtý den	158	51	141	47

Tabulka č. 4 Průměrná velikost nanočástic Au3NP v solu podle měření na Zetasizeru (v některých případech je zde přítomnost dvou velikostí částic)

	Základní koncentrace			Snížená koncentrace		
	Průměr [nm]	Sx [nm]	Objemový podíl [%]	Průměr [nm]	Sx [nm]	Objemový podíl [%]
První den	191	62	100	122	65	78
				5100	790	22
Druhý den	172	55	100	188	74	95
				5400	650	5 a
Třetí den	174	72	72	163	74	100
	5400	660	36			a
Poznámky: a = pravděpodobná přítomnost velmi velkých částic (nad 1000 nm), které již sedimentovaly						

3.5 Testované bakteriální kmeny

- *Escherichia coli* (CCM 2024)
- *Staphylococcus aureus* (CCM 226)
- *Proteus vulgaris* (CCM 1956)
- *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 1951)

Bakteriální kmeny byly zakoupeny v České sbírce mikroorganismů, Masarykovy univerzity v Brně.

3.6 Další použité prostředky během testování účinku nanočástic na bakterie

- Fyziologický roztok (příprava viz Kapitola 3.8)
- Petriho misky s krevním agarem (dodané firmou BIO-RAD, Praha)
- Tekutá živná půda pro kultivaci bakterií – bujón (příprava viz Kapitola 3.9)

3.7 Příprava bakteriálního inokula

Bakteriální inokulum o koncentraci 10^8 CFU/ml bylo připraveno přenesením malého množství bakteriální kultury do menšího množství fyziologického roztoku (cca 10 ml). Tento roztok byl zvortexován a přeměřen na spektrofotometru, který stanovuje

koncentraci určité látky v roztoku. Cílem bylo, aby spektrofotometr ukázal hodnotu $1 \pm 0,1$. Pokud hodnota byla vyšší než 1,1, bylo do roztoku přidáno potřebné množství bakteriální kultury, naopak pokud hodnota byla nižší než 0,9, byl do roztoku přidán fyziologický roztok.

Bakteriální inokulum o koncentraci 10^6 CFU/ml bylo připraveno odebráním 0,1 ml bakteriálního inokula o koncentraci 10^8 CFU/ml do 10 ml fyziologického roztoku.

Bakteriální inokulum o koncentraci 10^5 CFU/ml bylo připraveno odebráním 1 ml bakteriálního inokula o koncentraci 10^6 CFU/ml do 9 ml fyziologického roztoku.

3.8 Příprava fyziologického roztoku

Fyziologický roztok byl připraven z 8,5 g NaCl rozpuštěného v 1 litru destilované vody. Následně byl tento roztok tyčinkou důkladně promíchán. Poté byl vložen do autoklávu a sterilizován při teplotě $100\text{ }^{\circ}\text{C}/15$ minut.

3.9 Příprava živného bujónu (pro BIOSAN RTS-1C)

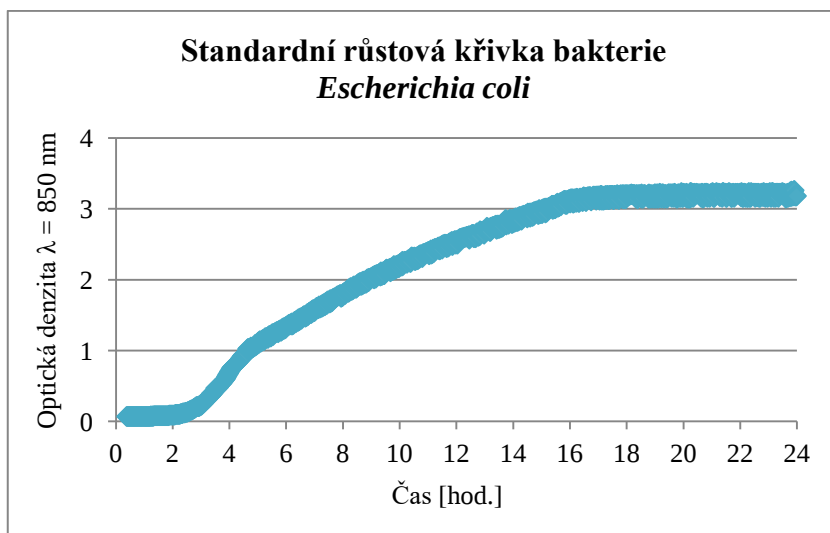
Živné médium pro bakterie bylo připraveno z 10 g peptonu, 10 g masového extraktu, 5 g chloridu sodného a z 1 litru destilované vody. Takto připravený roztok byl vařen asi 10 minut. Bylo zkontrolováno pH, jehož hodnota by se měla pohybovat v rozmezí $7,3 \pm 0,2$. Nakonec byl roztok sterilizován při $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut.

3.10 Příprava vzorků s obsahem 5 ml Ag1NP pro BIOSAN RTS-1C

- 1) První vzorek, který byl vložen do přístroje, byl připraven z 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Escherichia coli* 10^8 CFU/ml a z 5 ml Ag1NP.
- 2) Druhý vzorek obsahoval 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/ml a 5 ml Ag1NP.
- 3) Třetí vzorek byl připraven z 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Proteus vulgaris* 10^8 CFU/ml a z 5 ml Ag1NP.
- 4) Čtvrtý vzorek byl vytvořen z 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Pseudomonas aeruginosa* 10^8 CFU/ml a z 5 ml Ag1NP.

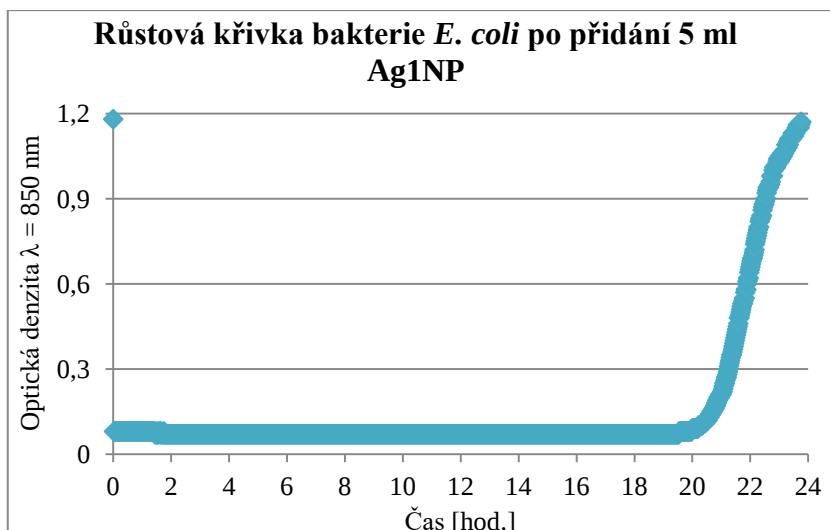
Takto připravené vzorky byly jednotlivě vkládány do Biosanu. Biosan byl nastaven na 37 °C, objem vzorku na 30 ml, otáčky na 1500 min⁻¹, vlnová délka měření na 850 nm, lhůta zpětného otáčení na 3 sekundy a frekvence měření na 1 min⁻¹. V tomto přístroji byly vzorky ponechány po dobu 24 hodin (některé i déle z důvodu zaznamenání opětovného nárůstu). Následně byly testovány. Z každého vzorku byl odebrán 1 ml a vyočkován na Petriho misku s krevním agarem. Poté byly Petriho misky vloženy do termostatu, který byl nastaven na 37 °C. Po 24 hodinách bylo odečteno u bakterie *Escherichia coli* 5 kolonií, viz Obrázek č. 7. U všech ostatních bakterií byl po 24 hodinách kompaktní výsev.

Testování prvního vzorku s obsahem 5 ml Ag1NP a *Escherichia coli*:



Graf č. 1 Standardní optická densita bakterie *Escherichia coli*

Přípravná fáze trvala 2 hodiny. Mezi 2. až 3. hodinou nastala fáze zrychleného růstu. Vlastní exponenciální fáze probíhala mezi 3. až 16. hodinou. Nejintenzivnější fáze množení bakteriálních buněk tedy trvala 18 hodin. Od 17. hodiny je viditelná stacionární fáze.

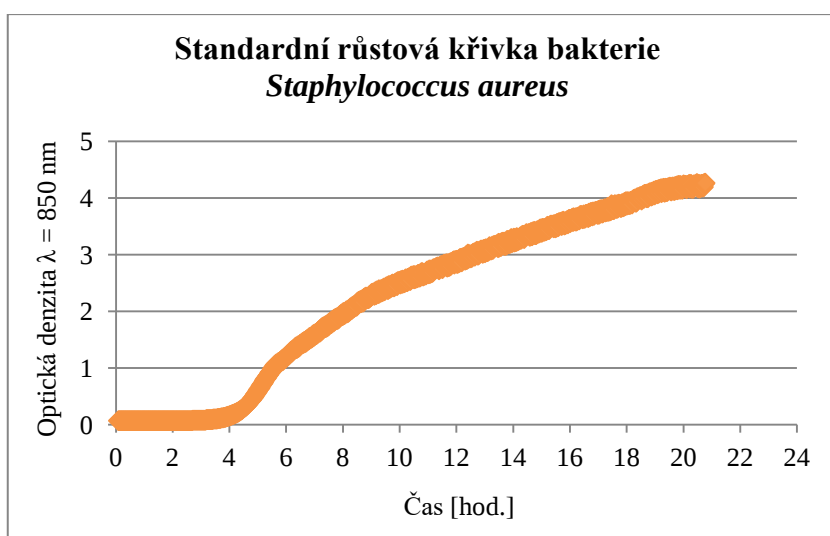


Graf č. 2 Optická densita prvního vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Po kontaktu *Escherichia coli* s Ag1NP byla, narozdíl od standardní křivky, přípravná fáze velmi dlouhá (trvala 19,5 hod). Fáze zrychleného růstu byla zaznamenána mezi 19,5. hod – 21. hod testování. Poté nastala fáze exponenciálního růstu, která přechází ve fázi stacionární a následuje fáze postupného odumírání bakteriálních buněk.

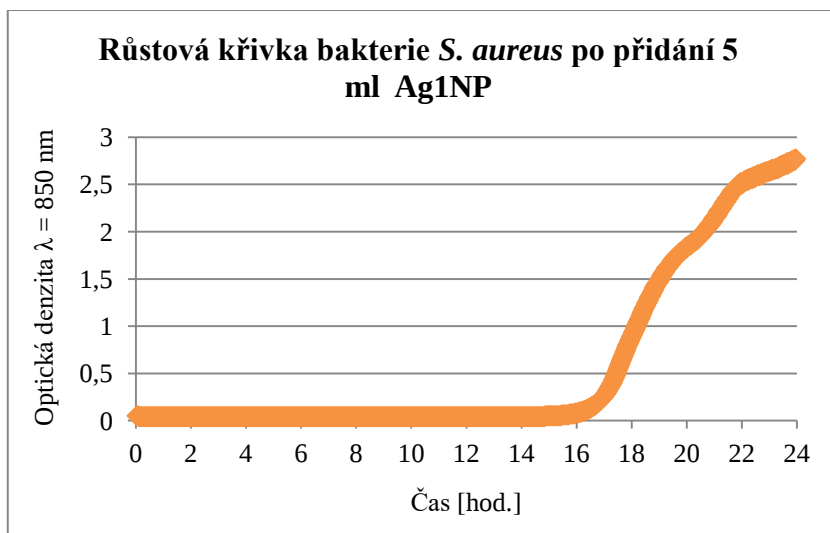
Rychlost růstu bakterie *Escherichia coli* je zaznamenána na grafu rychlosti růstu, který je umístěn v přílohách, viz Graf č. 3.

Testování druhého vzorku s obsahem 5 ml Ag1NP a *Staphylococcus aureus*:



Graf č. 4 Standardní optická densita bakterie *Staphylococcus aureus*

Přípravná fáze zde probíhala asi 3,5 hodiny. Poté následovala fáze zrychleného růstu. Okolo 5. hodiny začala fáze exponenciálního růstu. Ta probíhala asi 6 hodin. V 11 hodin na ni navázala fáze zpomaleného růstu. Ve 21 hodin je zde viditelný začátek stacionární fáze růstu.

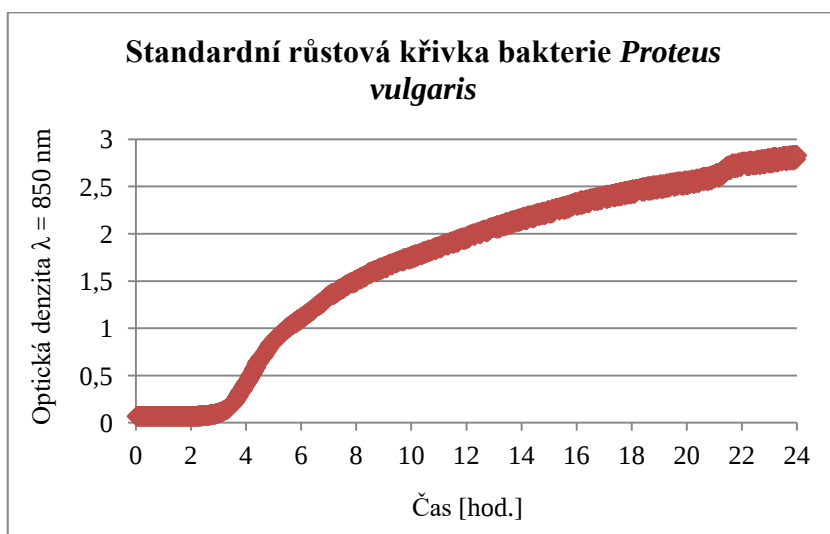


Graf č. 5 Optická densita druhého vzorku po kontaktu 5 ml Ag1NP

Po kontaktu *Staphylococcus aureus* s Ag1NP trvala přípravná fáze skoro 16 hodin. Těsně před 16. hodinou začala fáze zrychleného růstu. Tato fáze probíhala přibližně 1 hodinu. Následovala fáze exponenciálního růstu, která se přibližně ve 20 hodin přeměnila ve fázi zpomaleného růstu.

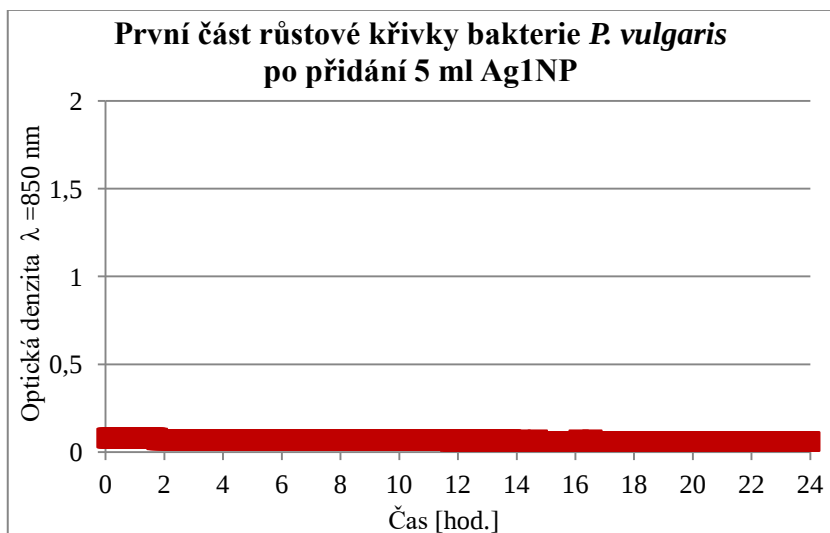
Rychlost růstu bakterie *Staphylococcus aureus* je vyobrazena na grafu v přílohách, viz Graf č. 6.

Testování třetího vzorku s obsahem 5 ml Ag1NP a *Proteus vulgaris*:

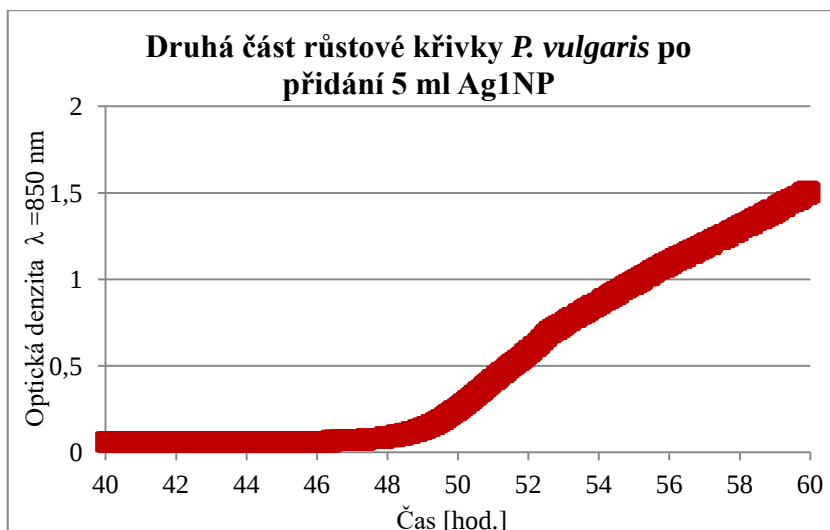


Graf č. 7 Standardní optická densita bakterie *Proteus vulgaris*

Přípravná fáze vzorku obsahujícího bakterii *Proteus vulgaris* trvala pouze 3 hodiny. Následovala téměř hodinová fáze zrychleného růstu. Následně na ni navázala exponenciální fáze růstu, která přetrvávala 3,5 hodiny. V 8 hodin začala fáze zpomaleného růstu, která těsně před 22. hodinou lehce zakolísala.



Graf č. 8 První část optické denzity třetího vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

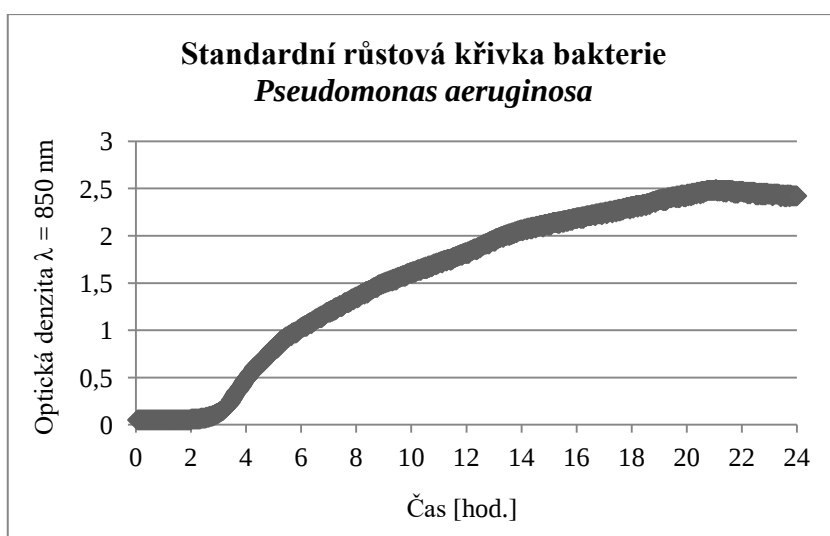


Graf č. 9 Druhá část optické denzity třetího vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Tato křivka se výrazně lišila od standardní křivky růstu bakterie *Proteus vulgaris*. Přípravná fáze vzorku s obsahem Ag1NP a bakterie *Proteus vulgaris* trvala necelých 47 hodin. Poté začala fáze zrychleného růstu. Ta setrvala po dobu 90 minut. Po 50 hodinách se dostavila fáze exponenciálního růstu. Tato fáze se mezi 52. a 53. hodinou změnila ve fázi zpomaleného růstu.

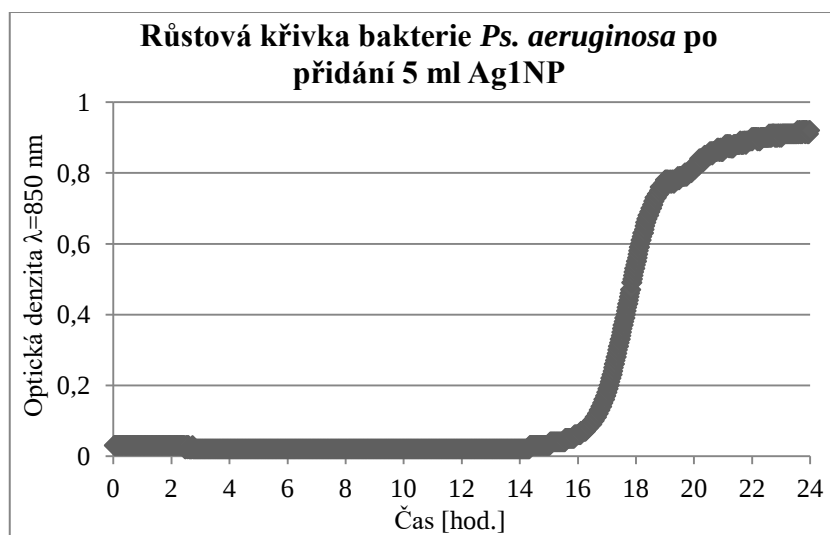
Rychlost růstu bakterie *Proteus vulgaris* je zaznamenána na grafu rychlosti růstu, který je umístěný v přílohách, viz Graf č. 10.

Testování čtvrtého vzorku s obsahem 5 ml Ag1NP a *Pseudomonas aeruginosa*:



Graf č. 11 Standardní optická denzita bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

Přípravná fáze standardní růstové křivky trvala 3 hodiny. Následovala hodinová fáze zrychleného růstu. Ve 4 hodiny se dostavila exponenciální fáze, která se v 6 hodin změnila ve fázi zpomaleného růstu. Stacionární fáze růstu probíhala přesně ve 21 hodin a byla velmi krátká. Na konci grafu je viditelná fáze postupného odumírání buněk.



Graf č. 12 Optická densita čtvrtého vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Přípravná fáze, díky účinkům Ag1NP, trvala téměř 15 hodin. Dále probíhala 1 hodinu fáze zrychleného růstu. Po 17. hodinách začala exponenciální fáze, která přetrvávala až do 19 hodin. V tu chvíli na ni navázala fáze zpomaleného růstu. Na konci křivky je vidět začátek stacionární fáze růstu.

3.11 Kvantitativní analýza Ag1NP

Nejprve jsme si přichystali prázdný sterilní mikrobiologický kontejner, do kterého jsme odpipetovali 100 mikrolitrů bakteriálního inokula 10^5 CFU/ml a 100 mikrolitrů Ag1NP. Poté jsme tento roztok zvortexovali a vložili jej na 24 hodin do termostatu, který byl nastaven na 37 °C. To bylo provedeno pro každý bakteriální kmen.

Po 24 hodinách jsme roztok opět zvortexovali a přidali do něj 10 ml fyziologického roztoku. Následně jsme roztok opět zvortexovali.

Poté jsme odpipetovali 1 ml z připraveného roztoku a zaočkovali jej na krevní agar. To jsme provedli pro každý bakteriální kmen třikrát (triplet). Nakonec jsme misky s krevním agarem a roztokem vložili do termostatu nastaveného na 37 °C. Druhý den jsme vyhodnotili výsledky.

Vyhodnocení výsledků z tripletů za 24 hodin:

Tabulka č. 5 Počet kolonií na Petriho miskách (5 ml Ag1NP)

Název	Počet kolonií na 1. misce	Počet kolonií na 2. misce	Počet kolonií na 3. misce	Průměrný počet kolonií
<i>Escherichia coli</i>	30	10	0	13,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	0	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	0	10	10
<i>Proteus vulgaris</i>	10	10	0	6,7

Z tabulky je patrné, že počty kolonií jsou téměř zanedbatelné. U bakterie *E. coli* bylo průměrně odečteno 13,3 CFU, viz Obrázek č. 11, u bakterie *S. aureus* 10 CFU, viz Obrázek č. 10, u bakterie *Ps. aeruginosa* 10 CFU, viz Obrázek č. 8 a u bakterie *P. vulgaris* 6,7 CFU, viz Obrázek č. 9.

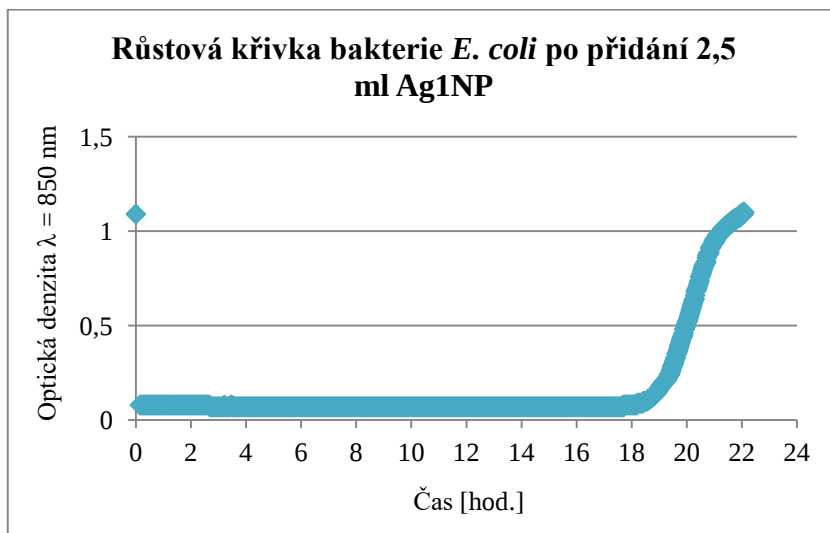
3.12 Příprava vzorků s polovičním objemem Ag1NP pro BIOSAN RTS-1C

- 1) První vzorek, který byl vložen do přístroje, byl připraven z 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Escherichia coli* 10^8 CFU/ml a z 2,5 ml Ag1NP.
- 2) Druhý vzorek obsahoval 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/ml a 2,5 ml Ag1NP.
- 3) Třetí vzorek byl připraven z 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Proteus vulgaris* 10^8 CFU/ml a z 2,5 ml Ag1NP.
- 4) Čtvrtý vzorek byl vytvořen z 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Pseudomonas aeruginosa* 10^8 CFU/ml a z 2,5 ml Ag1NP.

Připravené vzorky byly opět jednotlivě vloženy do Biosanu. Biosan byl nastaven na 37 °C, objem vzorku na 27 ml, otáčky na 1500 min^{-1} , vlnová délka měření na 850 nm, lhůta zpětného otáčení na 3 sekundy a frekvence měření na 1 min^{-1} . V něm byly vzorky ponechány po dobu 24 hodin (některé i déle). Následně byly testovány. Z každého

vzorku byl odebrán 1 ml roztoku na Petriho misku s krevním agarem. Poté byly tyto misky vloženy do termostatu, který byl nastaven na 37 °C. Po 24 hodinách byl u všech testovaných bakterií nalezen kompaktní výsev.

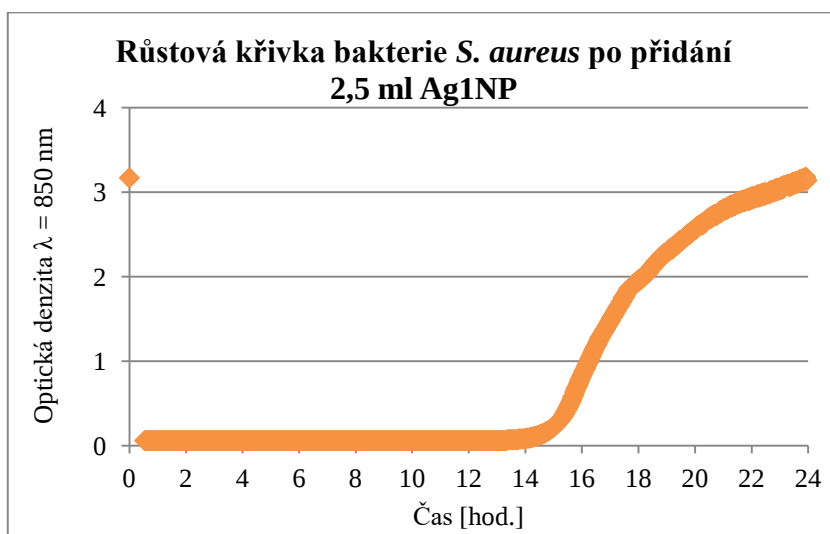
Testování prvního vzorku s obsahem 2,5 ml Ag1NP a *Escherichia coli*:



Graf č. 13 Optická denzita prvního vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP

Přípravná fáze vzorku se sníženou koncentrací Ag1NP trvala 18 hodin. Teprve pak začala fáze zrychleného růstu. Následovala exponenciální fáze růstu, která byla zaznamenána až do 20,5. hodiny testování. Na konci křivky je vidět fáze zpomaleného růstu.

Testování druhého vzorku s obsahem 2,5 ml Ag1NP a *Staphylococcus aureus*:

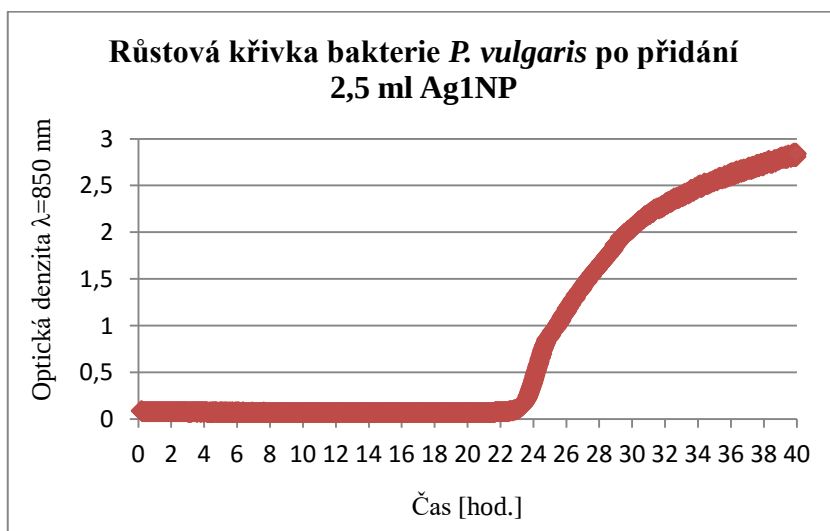


Graf č. 14 Optická denzita druhého vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP

Přípravná fáze trvala přibližně 14,5 hodiny. Na ni navázala hodinová fáze zrychleného růstu. Těsně před 16. hodinou začala probíhat fáze exponenciálního růstu, která se v 18 hodin přeměnila ve fázi zpomaleného růstu.

Rychlost růstu bakterie *Staphylococcus aureus* je vyobrazena na grafu v přílohách, viz Graf č. 15.

Testování třetího vzorku s obsahem 2,5 ml Ag1NP a *Proteus vulgaris*:

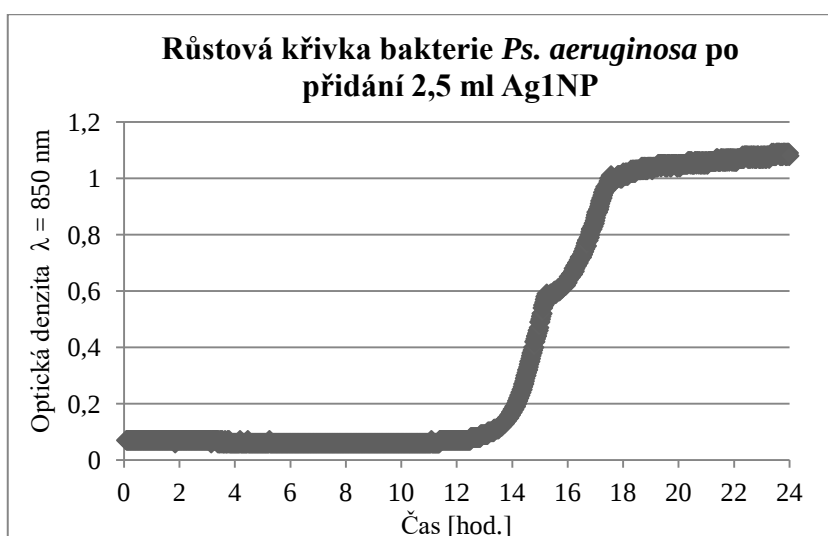


Graf č. 16 Optická denzita třetího vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP

Přípravná fáze skončila po 23 hodinách. Navázala na ni fáze zrychleného růstu. Po 24 hodinách testování nastala fáze exponenciálního růstu. Po 30 hodinách se tato fáze změnila ve fázi zpomaleného růstu. Na konci růstové křivky je zřejmá stacionární fáze růstu.

Rychlost růstu bakterie *Proteus vulgaris* je vyobrazena na grafu v přílohách, viz Graf č. 17.

Testování čtvrtého vzorku s obsahem 2,5 ml Ag1NP a *Pseudomonas aeruginosa*:



Graf č. 18 Optické denzity čtvrtého vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP

Přípravná fáze, po kontaktu *Pseudomonas aeruginosa* s Ag1NP, trvala 13 hodin. Od 13. hodiny začala hodinová fáze zrychleného růstu. Následovala fáze exponenciálního růstu. Po 15 hodinách nastala fáze zpomaleného růstu, která plynule přešla ve fázi stacionárního růstu.

Rychlost růstu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je vyobrazena na grafu v přílohách, viz Graf č. 19.

3.13 Kvantitativní analýza se sníženou koncentrací Ag1NP

Nejprve jsme si přichystali prázdný kontejner, do kterého jsme vlili 100 mikrolitrů bakteriálního inokula 10^5 CFU/ml a 50 mikrolitrů Ag1NP. Poté jsme tento roztok zvortexovali a vložili jej na 24 hodin do termostatu, který byl nastaven na 37°C . To bylo provedeno pro každý bakteriální kmen.

Po 24 hodinách jsme roztok opět zvortexovali a přidali do něj 10 ml fyziologického roztoku. Následně jsme roztok opět zvortexovali.

Poté jsme odpipetovali 1 ml připraveného roztoku a zaočkovali jej na krevní agar. To jsme provedli pro každý bakteriální kmen třikrát (triplet). Nakonec jsme misky s krevním agarem a roztokem vložili do termostatu nastaveného na 37 °C. Druhý den jsme vyhodnotili výsledky.

Vyhodnocení výsledků z tripletů za 24 hodin:

Tabulka č. 6 Počet kolonií na Petriho miskách (2,5 ml Ag1NP)

Název	Počet kolonií na 1. misce	Počet kolonií na 2. misce	Počet kolonií na 3. misce	Průměrný počet kolonií
<i>Escherichia coli</i>	0	0	10	3,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	10	3,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	20	0	10
<i>Proteus vulgaris</i>	10	0	0	3,3

Z tabulky je patrné, že počty kolonií jsou téměř zanedbatelné. U bakterie *E. coli* bylo průměrně odečteno 3,3 CFU, u bakterie *S. aureus* 3,3 CFU, u bakterie *Ps. aeruginosa* 10 CFU a u bakterie *P. vulgaris* 3,3 CFU.

3.14 Příprava vzorků s obsahem 5 ml Au3NP pro BIOSAN RTS-1C

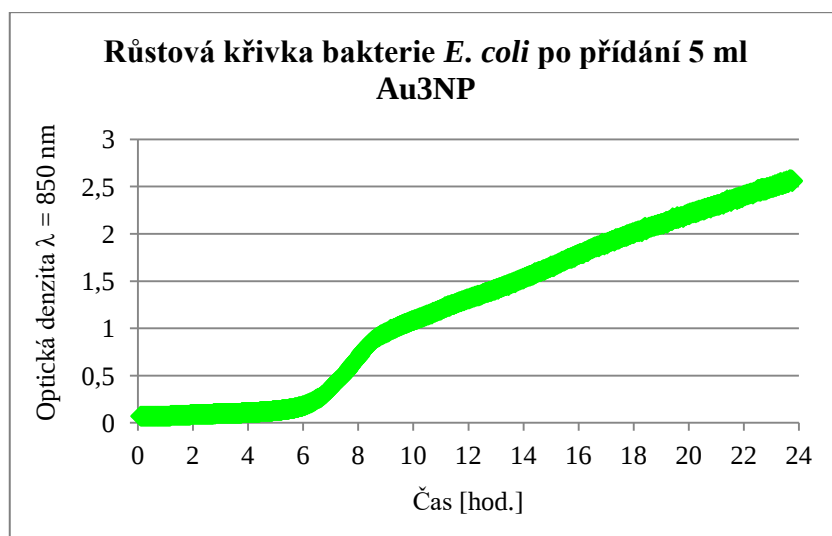
Příprava vzorků, které obsahovaly 5 ml Au3NP, se shodovala s přípravou vzorků s obsahem 5 ml Ag1NP, viz Kapitola 3.10. Ag1NP se pouze vyměnily za Au3NP.

- 1) První vzorek, který byl vložen do přístroje, byl připraven z 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Escherichia coli* 10⁸ CFU/ml a z 5 ml Au3NP.

- 2) Druhý vzorek obsahoval 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/ml a 5 ml Au3NP.
- 3) Třetí vzorek byl připraven z 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Proteus vulgaris* 10^8 CFU/ml a z 5 ml Au3NP.
- 4) Čtvrtý vzorek byl vytvořen z 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Pseudomonas aeruginosa* 10^8 CFU/ml a z 5 ml Au3NP.

Takto připravené vzorky byly jednotlivě vkládány do Biosanu. V tomto přístroji byly ponechány po dobu 24 hodin (některé i déle). Následně byly testovány. Z každého vzorku byl odebrán 1 ml roztoku na Petriho misku s krevním agarem. Poté byly Petriho misky vloženy do termostatu, který byl nastaven na 37 °C. U všech bakteriálních kmenů byl po 24 hodinách na miskách nalezen kompaktní výsev.

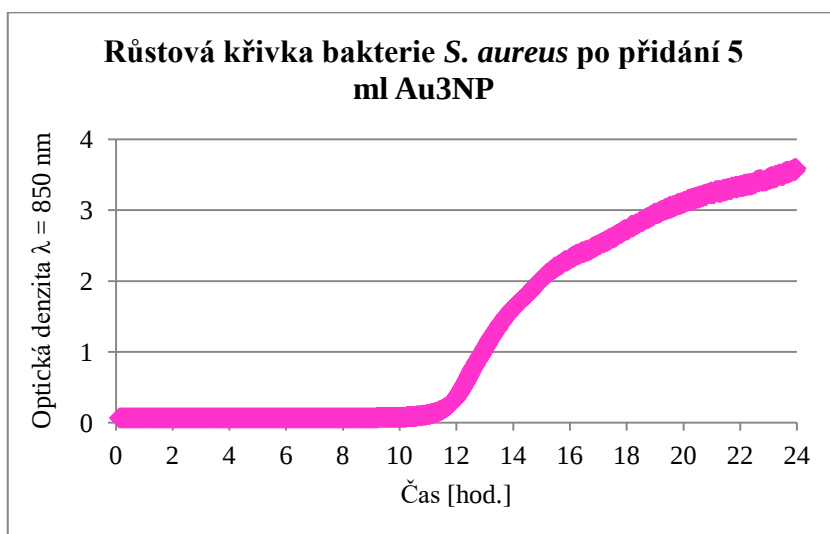
Testování prvního vzorku s obsahem 5 ml Au3NP a *Escherichia coli*:



Graf č. 20 Optická densita prvního vzorku po kontaktu s 5 ml Au3NP

Během testování účinku nanočástic zlata na bakterii *E. coli* probíhala přípravná fáze čtyři hodiny. Dále na tuto fázi navázala fáze zrychleného růstu. V 6 hodin začala fáze exponenciálního růstu. Bakterie se v této fázi nejvíce množily a měly nejkratší generační dobu. Mezi 8. až 9. hodinou začala fáze zpomaleného růstu, která je charakteristická tím, že v ní klesá rychlost rozmnožování bakterií. Tato křivka se velmi podobá standardní růstové křivce bakterií.

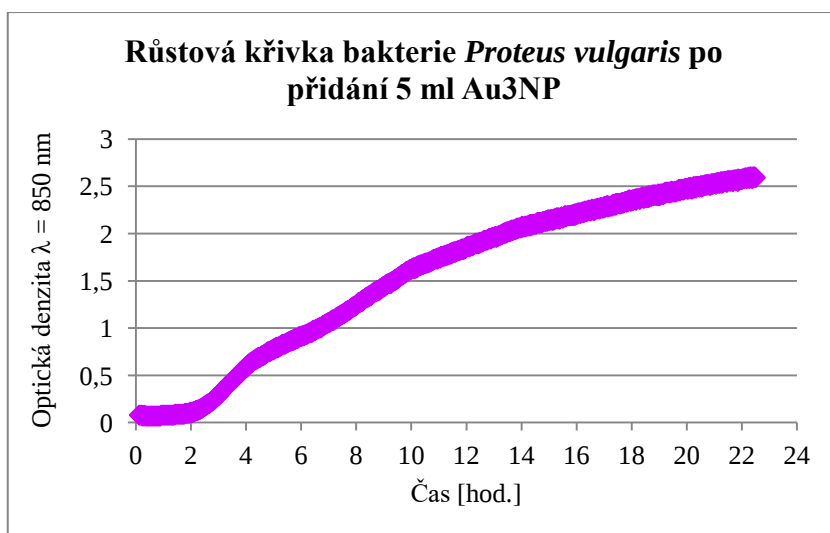
Testování druhého vzorku s obsahem 5 ml Au3NP a *Staphylococcus aureus*:



Graf č. 21 Optická densita druhého vzorku po kontaktu s 5ml Au₃NP

Přípravná fáze trvala asi 11 hodin. U standardní optické denzity probíhala přípravná fáze pouze 4 hodiny. Poté nastala fáze zrychleného růstu. Po 12. hodině se tato fáze změnila ve fázi exponenciálního růstu, která probíhala až do 16. hodiny testování. V 16 hodin se dostavila fáze zpomaleného růstu.

Testování třetího vzorku s obsahem 5 ml Au3NP a *Proteus vulgaris*:



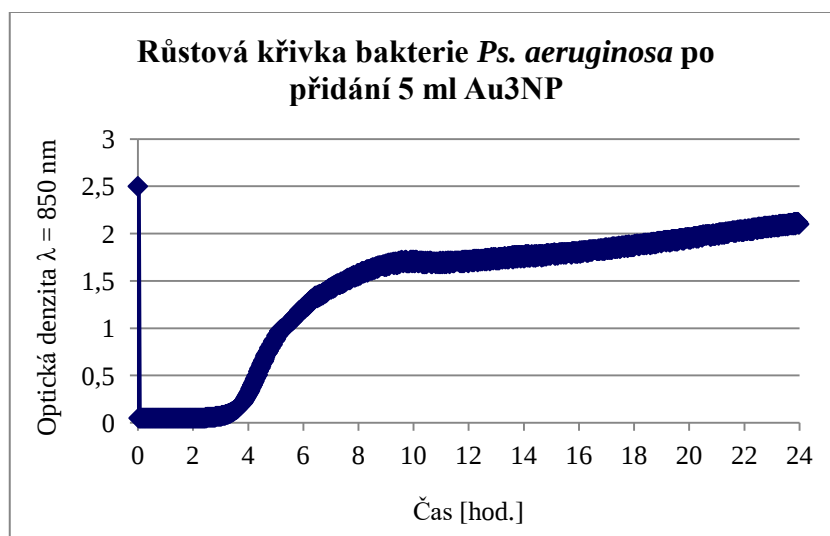
Graf č. 22 Optická densita třetího vzorku po kontaktu s 5 ml Au₃NP

Přípravná fáze tohoto vzorku trvala necelé 2 hodiny. Dále se dostavila fáze zrychleného růstu. Okolo třetí hodiny začala fáze exponenciálního růstu, která trvala

skoro 8 hodin. Mezi 10. a 11. hodinou začala fáze zpomaleného růstu. Na konci křivky je vidět začátek stacionární fáze růstu. Tato křivka je téměř totožná se standardní křivkou.

Rychlost růstu bakterie *Proteus vulgaris* je vyobrazena na grafu v přílohách, viz Graf č. 23.

Testování čtvrtého vzorku s obsahem 5 ml Au3NP a *Pseudomonas aeruginosa*:



Graf č. 24 Optická densita čtvrtého vzorku po kontaktu s 5 ml Au3NP

Přípravná fáze trvala opět pouze tři hodiny. Po 3 hodinách testování se změnila ve fázi zrychleného růstu. V rozmezí 4. a 5. hodiny se dostavila fáze exponenciálního růstu, která se v 9 hodin změnila ve fázi zpomaleného růstu.

Rychlost růstu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je vyobrazena na grafu v přílohách, viz Graf č. 25.

3.15 Kvantitativní analýza Au3NP

Postup kvantitativní analýzy se opět shodoval s postupem užitým u Ag1NP, viz Kapitola 3.11.

Nejprve jsme si přichystali prázdný kontejner, do kterého jsme odpipetovali 100 mikrolitrů bakteriálního inokula 10^5 CFU/ml a 100 mikrolitrů Au3NP. Poté jsme tento roztok zvortexovali a vložili jej na 24 hodin do termostatu, který byl nastaven na 37°C . To bylo provedeno pro každý bakteriální kmen.

Po 24 hodinách jsme roztok opět zvortexovali a přidali do něj 10 ml fyziologického roztoku. Následně jsme roztok opět zvortexovali.

Poté jsme odpipetovali 1 ml připraveného roztoku a zaočkovali jej na krevní agar. To jsme provedli pro každý bakteriální kmen třikrát (triplet). Nakonec jsme misky s krevním agarem a roztokem vložili do termostatu nastaveného na 37 °C. Druhý den jsme vyhodnotili výsledky.

Vyhodnocení výsledků z tripletů za 24 hodin:

Tabulka č. 7 Počet kolonií na Petriho miskách (5 ml Au3NP)

Název	Počet kolonií na 1. misce	Počet kolonií na 2. misce	Počet kolonií na 3. misce	Průměrný počet kolonií
<i>Escherichia coli</i>	30	20	0	16,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	20	30	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	20	0	13,3
<i>Proteus vulgaris</i>	20	40	0	16,7

Z tabulky je patrné, že počty kolonií jsou téměř zanedbatelné, ale vyšší než u AgNP. U bakterie *E. coli* bylo průměrně odečteno 16,7 CFU, u bakterie *S. aureus* 20 CFU, u bakterie *Ps. aeruginosa* 13,3 CFU a u bakterie *P. vulgaris* 16,7 CFU.

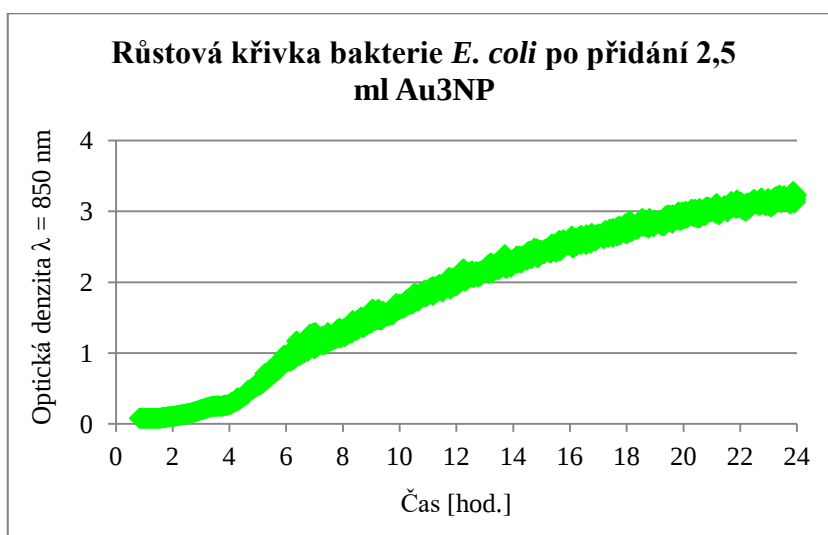
3.16 Příprava vzorků s polovičním objemem Au3NP pro BIOSAN RTS-1C

- 1) První vzorek, který byl vložen do přístroje, byl připraven z 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Escherichia coli* 10⁸ CFU/ml a z 2,5 ml Au3NP.
- 2) Druhý vzorek obsahoval 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Staphylococcus aureus* 10⁸ CFU/ml a z 2,5 ml Au3NP.
- 3) Třetí vzorek byl připraven z 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Proteus vulgaris* 10⁸ CFU/ml a z 2,5 ml Au3NP.

- 4) Čtvrtý vzorek byl vytvořen z 20 ml živného bujónu, 5 ml bakteriálního inokula *Pseudomonas aeruginosa* 10^8 CFU/ml a z 2,5 ml Au3NP.

Připravené vzorky byly opět jednotlivě vloženy do Biosanu. V něm byly ponechány po dobu 24 hodin (některé i déle). Následně byly testovány. Z každého vzorku byl odebrán 1 ml roztoku na Petriho misku s krevním agarem. Poté byly tyto misky vloženy do termostatu, který byl nastaven na 37 °C. Po 24 hodinách byl u všech testovaných bakterií nalezen kompaktní výsev.

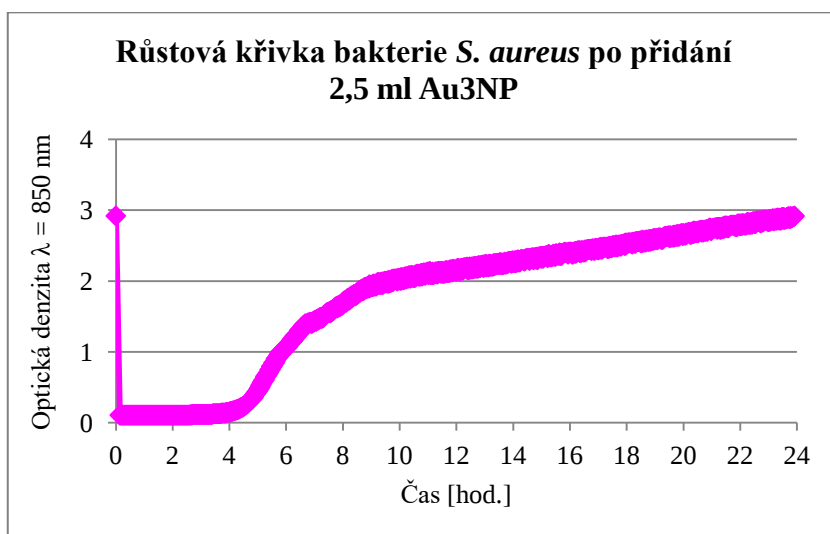
Testování prvního vzorku s obsahem 2,5 ml Au3NP a *Escherichia coli*:



Graf č. 26 Optická densita prvního vzorku po kontaktu s 2,5 ml Au3NP

Přípravná fáze trvala pouze dvě hodiny. Pak probíhala dvouhodinová fáze zrychleného růstu. Během čtvrté hodiny nastala fáze exponenciálního růstu. Ta trvala pouze asi 3 hodiny. Po 6. hodině ji vystřídala fáze zpomaleného růstu. Tento graf je téměř shodný se standardní růstovou křivkou bakterií.

Testování druhého vzorku s obsahem 2,5 ml Au3NP a *Staphylococcus aureus*:

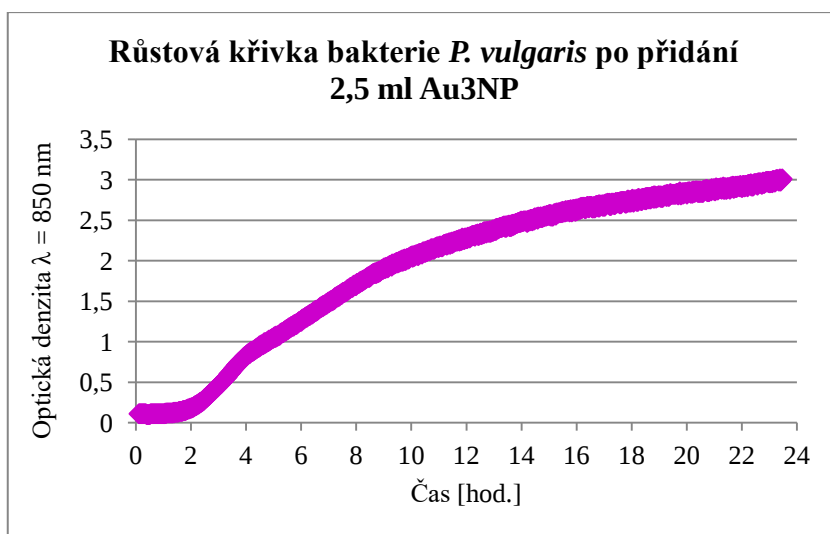


Graf č. 27 Optická denzita druhého vzorku po kontaktu 2,5 ml Au3NP

Celý proces začal přípravnou fází, která přetrvávala skoro 4 hodiny. Před 4. hodinou se tato fáze změnila ve fázi zrychleného růstu. Asi v 5 hodin začala probíhat fáze exponenciálního růstu. Ta trvala asi 4 hodiny. V 9 hodin na ni navázala fáze zpomaleného růstu.

Rychlost růstu bakterie *Staphylococcus aureus* je vyobrazena na grafu v přílohách, viz Graf č. 28.

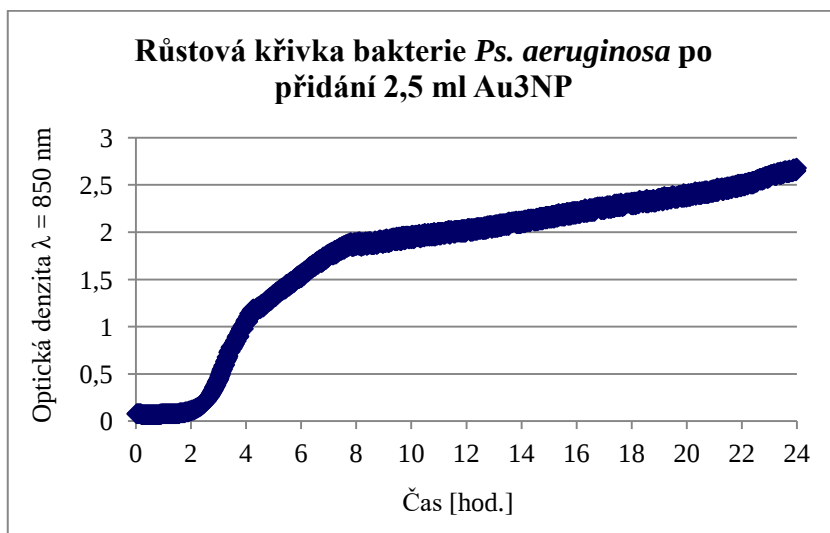
Testování třetího vzorku s obsahem 2,5 ml Au3NP a *Proteus vulgaris*:



Graf č. 29 Optická denzita třetího vzorku po kontaktu s 2,5 ml Au3NP

Na začátku růstové křivky je zaznamenána hodinová přípravná fáze. Dále na ni navázala šedesátiminutová fáze zrychleného růstu. Po 3 hodinách testování začala exponenciální fáze, která trvala opět pouze hodinu. Ve 4 hodiny se dostavila fáze zpomaleného růstu, která přetrvala až do konce zaznamenané křivky.

Testování čtvrtého vzorku s obsahem 2,5 ml Au₃NP a *Pseudomonas aeruginosa*:



Graf č. 30 Optická densita čtvrtého vzorku po kontaktu s 2,5 ml Au₃NP

Přípravná fáze po kontaktu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* s Au₃NP trvala skoro dvě hodiny. Následovala fáze zrychleného růstu. Okolo 3. hodiny začala velmi krátká fáze exponenciálního růstu. Dále na ni navázala fáze zpomaleného růstu, která přetrvala až do konce záznamu.

3.17 Kvantitativní analýza se sníženou koncentrací Au₃NP

Nejprve jsme si přichystali prázdný sterilní mikrobiologický kontejner, do kterého jsme odpipetovali 100 mikrolitrů bakteriálního inokula 10⁵ CFU/ml a 50 mikrolitrů Au₃NP. Poté jsme tento roztok zvortexovali a vložili jej na 24 hodin do termostatu, který byl nastaven na 37 °C. To jsme provedli pro každý bakteriální kmen.

Po 24 hodinách jsme roztok opět zvortexovali a přidali do něj 10 ml fyziologického roztoku. Následně jsme roztok opět zvortexovali.

Poté jsme odpipetovali 1 ml připraveného roztoku a zaočkovali jej na krevní agar. To jsme provedli pro každý bakteriální kmen třikrát (triplet). Nakonec jsme misky

s krevním agarem a roztokem vložili do termostatu nastaveného na 37 °C. Druhý den jsme vyhodnotili výsledky.

Vyhodnocení výsledků z tripletů za 24 hodin:

Tabulka č. 8 Počet kolonií na Petriho miskách (2,5 ml Au3NP)

Název	Počet kolonií na 1. misce	Počet kolonií na 2. misce	Počet kolonií na 3. misce	Průměrný počet kolonií
<i>Escherichia coli</i>	20	0	30	16,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	0	0	6,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0,0
<i>Proteus vulgaris</i>	10	20	20	16,7

Z tabulky je patrné, že počty kolonií jsou téměř zanedbatelné. U bakterie *E. coli* bylo průměrně odečteno 16,7 CFU, u bakterie *S. aureus* 6,7 CFU, u bakterie *Ps. aeruginosa* 0,0 CFU a u bakterie *P. vulgaris* 16,7 CFU.

4 Analýza výzkumných cílů a výzkumných otázek

4.1 Analýza výzkumného cíle č. 1 a výzkumné otázky č. 4

S cílem číslo 1 Otestovat účinek nanočástic stříbra a zlata na vybrané bakteriální kmeny klasickými mikrobiologickými metodami a získané výsledky porovnat s výsledky získanými ze záznamníku růstu buněk RTS-1C od firmy Biosan se pojila výzkumná otázka č. 1. Z výsledků **kvalitativní analýzy** je patrné, že výraznější inhibiční účinky mají AgNP. AuNP ovlivnily průběhy růstu testovaných bakteriálních kmenů pouze zanedbatelně, což se primárně projevilo dobou přípravné fáze. Získané výsledky se prakticky shodují s délkou přípravné fáze bez přítomnosti AuNP, tedy růstové křivky bez i s obsahem AuNP jsou si velmi podobné.

Přípravná fáze u AgNP se časově pohybovala od 15 hod do 49 hod u testované koncentrace 5 mg AgNP. U nižší testované koncentrace AgNP 2,5 mg byl výsledek od 13 hod do 23 hod. Z těchto výsledků vyplývá, že obě zvolené koncentrace AgNP stačí k inhibici testovaných bakteriálních kmenů.

Účinek nanočástic (tedy AgNP i AuNP) byl testován modifikací klasické mikrobiologické metody: Metoda AATCC Method 100 – 2004 (**kvantitativní hodnocení** antibakteriálního účinku), pomocí které se stanoví % redukce testovaného bakteriálního kmene. Výsledky tohoto typu testu nemají vypovídající hodnotu, protože % redukce u AgNP i AuNP (u obou testovaných koncentrací) se pohybuje v rozmezí od 99,8% do 100%, tedy výsledky jsou velmi podobné. Ukázalo se tedy, že tato modifikovaná metoda není k vyslovení závěrů o účincích testovaných nanočástic vhodná. Pravděpodobně je to způsobeno následným zhředěním testovaného bakteriálního inokula. Dalším důvodem může být nevhodně zvolený objem nanočástic. Je nutné si také uvědomit, že tato metoda pracuje s fyziologickým roztokem, kdežto metoda kvalitativní s živným bujónem. Jedná se tedy o růstové živiny v testovaných médiích, které mají na výsledný růst bakteriálních buněk vliv.

4.2 Analýza výzkumného cíle č. 2 a výzkumné otázky č. 1 a otázky č. 3

Cíl číslo 2 Zjistit, zda se získané výsledky výzkumu shodují s informacemi popsány v literárních zdrojích a porovnat, zda zvolené testovací metody byly dostačující na to, aby byl vysloven závěr o inhibičních účincích obou testovaných typů nanočástic souvisel s otázkou číslo 1 a 3. Většina literárních zdrojů uvádí, že AgNP i AuNP vykazují antibakteriální účinky. Toto tvrzení předložená bakalářské práce vyvrací, protože přítomnost nanočástic AuNP u testovaných bakteriálních kmenů neinhibuje bakterie tak, aby bylo výrazně omezeno jejich množení. Tento fakt podporují informace o podrobně zmapovaných účincích AgNP na vybrané bakteriální buňky.

Celý proces účinku AgNP začíná tak, že se nanočástice přichytí k buněčné stěně a pronikne do bakteriální buňky. Následně tato buňka začne uvolňovat ionty stříbra, které zvyšují baktericidní aktivitu AgNP. Ionty stříbra, jakožto nejmenší forma stříbra, má nejrychlejší a nejrazantnější schopnost průniku do bakterie. Bakterie současně začne vytvářet volné radikály, které ničí buněčné funkce. Elektronový přenos mezi enzymy dýchacího řetězce v mitochondriích je blokován a zastavuje se metabolismus buňky a buňka hyne. V neposlední řadě ionty stříbra pravděpodobně reagují s peptidoglykany

buněčné stěny bakterií, s plazmatickou membránou bakterií, s proteiny, DNA a enzymy, které jsou pro život buňky rozhodující.

Zvolená kvalitativní metoda (záznamník růstu buněk RTS-1C), která vedla k získání naprosto unikátních a dosud nepublikovaných výsledků, potvrdila námi předpokládané výsledky, které byly podloženy literárními zdroji. Jedná se o potvrzení výše popsaných účinků AgNP na spektrum vybraných bakteriálních patogenních kmenů.

4.3 Analýza výzkumného cíle č. 3 a výzkumné otázky č. 2

Na stanovený cíl číslo 3 Prozkoumat rozdíl účinku zlatých a stříbrných nanočástic na testované bakteriální kmeny, navazovala otázka číslo 2. Přípravné fáze, po kontaktu všech bakteriálních kmenů s Ag1NP, byly velmi dlouhé. U standardních růstových křivek trvaly přípravné fáze maximálně několik hodin. Nejdéle probíhala přípravná fáze bakteriálního kmene *Proteus vulgaris*. Tato fáze probíhala skoro 47 hodin po kontaktu bakterie *Proteus vulgaris* s 5 ml Ag1NP a 23 hodin po kontaktu bakterie *Proteus vulgaris* s 2,5 ml AgNP. Ag1NP nejméně působily na bakteriální kmen *Pseudomonas aeruginosa*. Přípravná fáze tohoto kmene trvala 15 hodin během testování s vyšší koncentrací Ag1NP a 13 hodin během testování s nižší koncentrací Ag1NP. Nanočástice značně prodloužily dobu, než se bakterie začaly rozmnožovat, tedy oddálily začátek růstu bakterií. Během kontaktu bakterií s AgNP dochází k uvolňování iontů stříbra a k vytváření volných radikálů, které ničí buněčné funkce.

Po kontaktu bakterií s Au3NP se standardní růstové křivky téměř shodovaly s růstovými křivkami ovlivněnými Au3NP. Přípravné fáze probíhaly po kontaktu bakterií s Au3NP od 2 do 11 hodin. Největší vliv Au3NP byl zaznamenán u bakteriálního kmene *Staphylococcus aureus*. U standardní růstové křivky bakterie *Staphylococcus aureus* byla tato fáze zaznamenána po dobu 3 hodin. Přípravná fáze růstové křivky při testování vyšší koncentrace Au3NP trvala 11 hodin a při testování nižší koncentrace trvala skoro 4 hodiny. Z toho je patrné, že při snižování koncentrace Au3NP se zároveň snižoval účinek Au3NP na bakterie. Zajímavé je, že tento účinek byl pozorován u bakterie *Staphylococcus aureus*, což je zástupce gram-pozitivní bakterie. Z toho by se dalo usuzovat, že AuNP mají nepatrný vliv především na gram-pozitivní bakterie. Tato domněnka se však vylučuje s informacemi uvedenými v některých

literárních zdrojích, které tvrdí, že AuNP vykazují antibakteriální účinky vůči gram-negativním bakteriím.

Během kontaktu bakterií s AuNP se na rozdíl od AgNP neuvolňují ionty. Antibakteriální účinek je pravděpodobně způsoben změnou membránového potenciálu díky inhibici enzymu ATP syntetasy. To způsobí snížení hladiny ATP a současně dojde ke snížení metabolismu. Antibakteriální aktivita se též může uplatňovat blokací podjednotky ribozomu, tedy dochází inhibici proteosyntézy.

5 Diskuze

V posledních letech se na trhu objevuje stále více zdravotnických a léčivých prostředků, kosmetických prostředků a dalších materiálů, které obsahují AgNP a AuNP, proto je toto téma velmi aktuální. Z tohoto důvodu je zapotřebí, aby zmíněné nanočástice byly studovány a zkoumány, neboť se dostávají do přímého kontaktu s lidským organismem a ovlivňují tak mnoho jeho biologických funkcí. Otázkou ovšem je, jaký směrem je ovlivňují a zdali mohou člověku uškodit.

Výsledky kvantitativního i kvalitativního výzkumu potvrdily, že AgNP vykazují antimikrobiální účinek vůči *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* a *Pseudomonas aeruginosa*. Baktericidní účinky se během výzkumu projevíly při užití nižší i vyšší koncentrace AgNP. To znamená, že již v malém množství jsou AgNP antibakteriálně účinné.

Některé články uvádějí (86, 72), že antibakteriální aktivita AgNP je závislá na jejich velikosti. Nejvíce reaktivní jsou nanočástice, které měří méně než 10 nm. Velikost námi připravených Ag1NP během testování se průměrně pohybovala okolo 145 nm. Jednalo se tedy o větší nanočástice, které i přes jejich větší rozměry vykazovaly velmi dobré baktericidní účinky.

Výsledky práce, které prokázaly baktericidní účinky AgNP se shodují informacemi popsány v většinou literárních zdrojů. Například Mauter a kol. (70), Sondi a kol. (96) či Guang a kol. (35) popisují ve svých článcích antibakteriální účinky stříbra.

Výsledky výzkumné části také odhalily, že AuNP baktericidní účinky vůči *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Proteus vulgaris* prakticky nevykazují. Některé studie se však domnívají, že tyto účinky AuNP mají. Například v odborném článku Zhanga a kol. (107) je uvedeno, že zlato zabíjí bakterie a tlumí jejich růst. Tento literární zdroj také uvádí, že intenzita antibakteriálního účinku

AuNP závisí na velikosti AuNP. Menší nanočástice, díky jejich většímu poměru mezi povrchem a objemem, mají silnější antimikrobiální účinek než nanočástice velké. Tato práce však tuto domněnku nepotvrdila. Připravené AuNP během výzkumu práce byly sice poměrně velké ($\varnothing$ 168 nm), ale i tak by měly vykazovat u všech bakteriálních kmenů alespoň malý antibakteriální účinek, který se však ve většině případů neprojevil.

V jiném článku, který zveřejnil Cui a kol. (19) je psáno, že AuNP působí baktericidně pouze proti multirezistentním G^- bakteriím. Nicméně, bakalářská práce tuto úvahu opět popírá, jelikož AuNP měly největší vliv na G^+ bakterii *Staphylococcus aureus*.

6 Návrh doporučení pro praxi

Z praktického hlediska je používání AgNP díky jejich antibakteriální aktivitě velmi výhodné. Prvním možným rizikem, které se musí brát v úvahu je jejich možná toxicita na eukaryotní buňky. Z tohoto důvodu by se AgNP neměly nekontrolovatelně přidávat do všech komerčně dostupných prostředků, jako jsou ortopedické vložky, masti, krémy, zubní pasty či odličovací tampony. Měly by se využívat pouze v nezbytně nutných případech ve zdravotnictví. Je vhodné s nimi modifikovat povrchy některých zdravotnických pomůcek či impregnovat s nimi zdravotnické oděvy, aby se zabránilo šíření bakteriálních infekcí ve zdravotnictví.

Nadměrné užívání AgNP může mít také negativní dopad na životní prostředí. To přináší další možné riziko. AgNP se mohou objevit například v čistírnách odpadních vod, kde agregují nebo se rozpouštějí. Je zapotřebí, aby AgNP byli vždy recyklovány a neohrožovaly tak životní prostředí.

Přidávání AuNP do zdravotnických či komerčně dostupných prostředků je pravděpodobně bezvýznamné, jelikož téměř nevykazují dle výzkumu práce baktericidní účinky.

IV Závěr

Předložená bakalářská práce se zabývá účinkem nanočástic stříbra a zlata na vybrané bakteriální kmeny. Práce je složena z teoretické a výzkumné části. První kapitola teoretické části se zabývá především přípravou, mechanismem účinku, toxicitou a využitím stříbrných nanočástic. Druhá kapitola je zaměřená na přípravu, toxicitu a využití zlatých nanočástic. Třetí kapitola popisuje vybrané bakteriální kmeny, které jsou následně testovány ve výzkumné části. Čtvrtá kapitola obsahuje informace o růstové křivce bakterií, tedy o životních fázích bakterie.

Ve výzkumné části byl užit kvantitativní a kvalitivní výzkum. Výsledky kvalitativní analýzy prokázaly antibakteriální účinky nanočástic stříbra. Tato vlastnost se též projevila při užití snížené koncentrace stříbrných nanočástic. Nejvíce se baktericidní aktivita stříbra ukázala během testování bakterie *Proteus vulgaris*. Přípravná fáze růstové křivky bakterie *Proteus vulgaris*, po kontaktu s 5 ml Ag1NP, trvala necelých 47 hodin. To potvrdilo, že nanočástice stříbra potlačují rozmnožování a růst bakterií. *Proteus vulgaris* je gram-negativní bakterie, která se řadí mezi Enterobakterie společně s bakterií *Escherichia coli*.

Naopak nanočástice zlata během kvalitativního výzkumu antibakteriální účinky prakticky neprokázaly, přestože většina studií tvrdí, že tyto účinky zlaté nanočástice mají. Negativní výsledky mohly být ovlivněné velikostí nanočástic zlata, která se průměrně pohybovala okolo 168 nm. Dle literárních zdrojů by měly být reaktivnější menší nanočástice. Navíc připravené nanočástice nebyly zcela stabilní.

Standardní růstové křivky jednotlivých bakteriálních kmenů se téměř shodovaly s růstovými křivkami bakterií, které byly v kontaktu s Au3NP. I když Au3NP téměř nevykazovaly antibakteriální aktivitu, byly testovány stejným způsobem jako Ag1NP, aby oba vzorky měly při testování stejné podmínky.

Výsledky kvantitativní metody nemají vypovídající hodnotu, protože % redukce u AgNP i AuNP (u obou testovaných koncentrací) se pohybuje v rozmezí od 99,8% do 100%, tedy výsledky jsou velmi podobné. Lze konstatovat, že tato modifikovaná metoda není k vyslovení závěrů o účincích testovaných nanočástic vhodná. Důvodem může být nevhodně zvolený objem nanočástic nebo nevhodně vybrané živné médium či obsah fyziologického roztoku.

Seznam bibliografických citací

- 1) ABDELHALIM, M. A. et al. Renal tissue alterations were size-dependent with smaller ones induced more effects and related with time exposure of gold nanoparticles. *Lipids in Health and Disease*. 2011, **10**(163). ISSN 1476-511X.
- 2) AHAMED, M. et al. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008, **233**, 404. ISSN 0041-008X.
- 3) AKHAVAN, A. et al. Radiation synthesis and characterization of protein stabilized gold nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*. 2010, **159**(1-3), 230-235. ISSN 1385-8947.
- 4) ALBERTS, Bruce et al. The molecular Biology of the cell. 4. vyd. New York: Garland Science, 2002. ISBN 0-8153-3218-1.
- 5) ALKILANY, A. M. et al. Gold nanarods: their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, **64**(2), 190-199. ISSN 0169-409X.
- 6) ALT, V. et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*. 2004, **25**(18), 4383-4391. ISSN 0142-9612.
- 7) AMBROŽOVÁ, J. Aplikovaná a technická hydrobiologie. 2. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. ISBN 80-7080-521-8.
- 8) BAENZA-SQUIBAN, A. et al. Exposure, uptake and barriers. In Houdy P., Kajmani M., Marano E.: *Nanoethics and Nanotoxicology*. 2011, 37-61. ISSN 1211-6920.
- 9) BEDNÁŘ, Marek et al. Lékařská mikrobiologie. *Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. ISBN 859-4-315-0528-0.
- 10) BELLINGER, C. G. Et al. Effects of silver nitrate and sulfamylon on epithelial regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1970, **45**, 582-585. ISSN 1529-4242.
- 11) BERNARD, A. et al. Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories. 1. vyd. Berlin: Springer, 1984. ISBN 978-3-642-68859-1.

- 12) BING, W. et al. Comparative ecotoxicities of nano-zno particles under aquatic and aerosol exposure modes. *Environmental and Science Technology*. 2010, **44**(10), 1484-1489. ISSN 1520-5851.
- 13) BRADY, R. L. et al. Crystal structure of domains 3 and 4 of rat CD4: relation to the NH2-terminal domains. *Science*. 1993, **260**(5110), 979-983. ISSN 1095-9203.
- 14) BRANDT, D. et al. Argyria secondary to ingestion of homemade silver solution. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005, **53**(2), 105-107. ISSN 0190-9622.
- 15) BRANDICH-STOLLE, L. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germ line stem cells. *Toxicology Science*. 2005, **88**, 412-419. ISSN 1880-3989.
- 16) BURD, A. et al. A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound Repair Regeneration*. 2007, **15**, 94-104. ISSN 1524-475X.
- 17) BUZEA, C. et al. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007, **2**, 17-172. ISSN 1934-8630.
- 18) CASTELLANO, J. J. et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *International Wound Journal*. 2007, **4**(2), 114-122. ISSN 1742-481X.
- 19) CUI, Y. et al. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli. *In Biomaterials*. 2012, **33**(7), 2327-2333. ISSN 0142-9612.
- 20) CUSHINK, B. L. et al. Recent advances in the liquid-phase syntheses on inorganic nanoparticles. *Chemical Reviews*. 2004, **104**(9), 3893-946. ISSN 0009-2665.
- 21) DURÁN, Nelson et al. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Produced by Fungal Process of Textile Fabrics and Their Effluent Treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2007, **3**, 203-208. ISSN 1752-6418.
- 22) DVOŘÁČKOVÁ, Svatava. Rychlokurz chemie. *Od základní školy k přijímacím zkouškám na vysokou školu*. 1. vyd. Olomouc: Rubico, 2003. ISBN 80-85839-42-3.
- 23) EUSTIS, S. et al. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society reviews*. 2006, **35**(3), 209-217. ISSN 0306-0012.

- 24) EXNAR, Petr. Interní návody pro laboratorní práce z předmětu Chemie povrchů a příprava tenkých vrstev
- 25) FANDERLIK, Ivan. Optické vlastnosti skel. *Optical properties of glass*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1979. ISBN 0444996524.
- 26) FENG, et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002, **52**(4), 662-668. ISSN 1552-4965.
- 27) FROHLICH, E. et al. Cytotoxicity of nanoparticles independent from oxidative stress. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2009, **34**(4), 363-375. ISSN 0388-1350.
- 28) FULLER, E. J. et al. Ink-jet printed nanoparticle microelectromechanical systems. *Journal of Microelectromechanical Systems*. 2002, **11**(1), 54. ISSN 1057-7157.
- 29) FUNG, M. C. et al. Silver products for medical indications: risk benefits assessment. *Journal of Toxicology*. 1996, 119-126. ISSN 0731-3810.
- 30) GEMMELL, C. G. Et al. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006, **57**(4), 589-608. ISSN 0305-7453.
- 31) GHOSH, P. et al. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, **60**(11), 1307–1315. ISSN 0169-409X.
- 32) GOTTESMAN, R. et al. Sonochemical coating of paper by microbiocidal silver nanoparticles. *Langmuir*. 2011, **27**(2), 720-726. ISSN 0743-7463.
- 33) GRAF, Christina et al. A general method to coat colloidal particles with silica. *Langmuir*. 2003, **19**(7), 6693-6700. ISSN 0743-7463.
- 34) GREULICH, C. et al. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia*. 2011, **7**(1), 347-354. ISSN 1742-7061.
- 35) GUANG, Y. et al. Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*. 2012, **87**, 839-845. ISSN 0144-8617.
- 36) GULBRANSON, S. H. et al. Argyria following the use of dietary supplements containing colloidal silver protein. *Cutis*. 2000, **66**(5), 373-374. ISSN 0011-4162.
- 37) GUZMAN, M. et al. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine*. 2012, **8**(1), 37-45. ISSN 1549-9634.

- 38) HAYAT, M. A. et al. Colloidal gold. *Principles, Methods, and Applications*. 1. vyd. Londýn: ACADEMIC PRESS, 1989. ISBN 0-12-333927-8.
- 39) HIRIART-BAER, V. P. et al. Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: Influence of thiosulphate. *Aquatic Toxicology*. 2006, **78**, 136-148. ISSN 0166-445X.
- 40) HIRN, S. et al. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011, **77**(3), 407-416. ISSN 0939-6411.
- 41) HODEK, Jan et al. Protective hybrid coating containing silver, copper and zinc cations effective against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *BMC Microbiology*. 2016, **16**(1-56). ISSN 1471-2180.
- 42) HOŠEK, Jan. Úvod do nanotechnologie. 1. vyd. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2010. ISBN 978-80-01-04555-8.
- 43) HUANG, Xiaohua et al. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *Journal of the American Chemical Society*. 2006, **128**(6), 2115-2120. ISSN 0002-7863.
- 44) HUANG, X. et al. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in medical science*. 2008, **23**(3), 217-228. ISSN 0268-8921.
- 45) HUBBS, A. F. et al. Nanotoxicology – a pathologist's perspectives. *Toxicologic Pathology*. 2011, **39**, 301-324. ISSN 0192-6233.
- 46) CHALOUPKA, Karla et al. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. In *Trends in Biotechnology*. 2010, **28**(11), 580-588. ISSN 0167-7799.
- 47) CHITHRANI, B. D. et al. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters*. 2007, **7**(6), 1542-1550. ISSN 1530-6984.
- 48) CHOI, O. et al. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*. 2008, **42**(12), 3066-3074. ISSN 0043-1354.
- 49) CHOPRA, I., The Increasing Use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007, **59**(4), 587-590. ISSN 0305-7453.

- 50) JAIN, J. et al. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Molecular Pharmaceutics*. 2009, **6**(5), 1388-1401. ISSN 1543-8384.
- 51) JAMES, WILLIAM D. et al. Andrews' diseases of the skin: clinical dermatology. *Saunders Elsevier*. 2006, **858**, ISSN 0020-0190.
- 52) JUNG, W. K. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology*. 2008, **74**, 2171-2178. ISSN 00447897.
- 53) JUNG, Jae Hee et al. Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area. *Elsevier*. 2006, **37**(12), 1662-1670. ISSN 0020-0190.
- 54) KALÁBOVÁ, Jana. Studium antimikrobiálního účinku vybraných druhů koření. 1. vyd. BRNO: VUT, 2012-2013.
- 55) KAŠTÁNEK, František. Bioinženýrství. 1. vyd. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200-0768-7.
- 56) KENNEDY, L. C. et al. A new era for cancer treatment: gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. *Small*. 2011, **7**(2), 169-183. ISSN 1613-6829.
- 57) KIM, H. et al. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011, **39**(1), 77-85. ISSN 1598-642X.
- 58) KIM, S. H. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007, **3**(1), 95-101. ISSN 1549-9634.
- 59) KIMLING, J. et al. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, **110**(32), 15700-15707. ISSN 1520-6106.
- 60) KLASSEN, H. J. et al. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early use. *Burns*. 2000, **26**(2), 117-130. ISSN 0305-4179.
- 61) KREIBIG, U. et al. In handbook of surfaces and interfaces of materials. *Surface and interface phenomena*. 1. vyd. San Diego: Academic Press, 2001. ISBN 9780080533827.
- 62) KREIBIG, U. et al. Optical properties of metal clusters. 1. vyd. Berlin: Springer, 1995. ISBN 978-3-662-09109-8.
- 63) KRYSTEK, Petra. A review on approaches to bio distribution studies about gold and silver engineered nanoparticles by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal*. 2012, **105**, 39-43. ISSN 0026-265X.

- 64) LANDSDOWN, A. B. Silver. I: its antibacterial properties and mechanism of action. *Journal Wound Care*. 2002, **11**(4), 125-138. ISSN 0969-0700.
- 65) LANKVELD, D. P. et al. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials*. 2010, **31**(32), 8350-8361. ISSN 0142-9612.
- 66) LANDSDOWN, A. B. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Current Problems in Dermatology*. 2006, **33**, 17-34. ISSN 1421-5721.
- 67) LASAGNA-REEVES, C. et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, **393**(4), 649-655. ISSN 0006-291X.
- 68) MAGDASSI, Shlomo et al. Silver nanoparticles as pigments for water-based ink-jet inks. *Chemistry of Materials*. 2003, **15**(11), 2208-2217. ISSN 0897-4756.
- 69) MAILLARD, Mathieu et al. Tuning the size of silver nanodisks with similar aspect ratios: synthesis and optical properties. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2003, **107**(11), 2466-2470. ISSN 1520-6106.
- 70) MAUTER, et al. Antifouling ultrafiltration membranes via post-fabrication rafting of biocidal nanomaterials. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2011, **3**, 2861-2868. ISSN 1944-8244.
- 71) MIMS, C. A. et al. Medical mikrobiology. 1. vyd. Mosby, 1993.
- 72) MORONES, J. R. et al. The bacterial effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005, **16**(10), 2346-2353. ISSN 0957-4484.
- 73) MOYER, C. A. et al. Treatment of large human burns with 0,5% silver nitrate solution. *Arch. Surgery*. 1965, **90**(6), 812-867. ISSN 0305-4403.
- 74) MULVANEY, P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir*. 1996, **12**, 788-800. ISSN 0743-7463.
- 75) NAVARRO, E. et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants and fungi. *Ecotoxicology*. 2008, **17**, 372-386. ISSN 0963-9292.
- 76) NEL, A. et al. Toxic potential of materials at nanolevel. *Science*. 2006, **311**, 622-627. ISSN 0036-8075.
- 77) NGUYEN, D. et al. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron*. 2011, **42**(3), 207-227. ISSN 0968-4328.
- 78) OKOH, O. O. et al. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and

- solvent free microwave extraction methods. *Food chemistry*. 2010, **1**(20), 308-312. ISSN 0308-8146.
- 79) OPRŠAL, Jakub et al. Vliv aglomerace stříbrných nanočástic na výsledky testů ekotoxicky na vodních organismech. *Chemické Listy*. 2013, **107**, 386-392. ISSN 1213-7103.
- 80) OUKARROUM, A. et al. Temperature influence on silver nanoparticles inhibitory effect on photosystem II photochemistry in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2011, **19**(5), 1755-1762. ISSN 0944-1344.
- 81) PACHECO, G.. Studies on the Action of Metallic Colloids on Immunisation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1925, **18**, 119-149. ISSN 1678-8060.
- 82) PAL, S. et al. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticles? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiology*. 2007, **27**(6), 1712-1720. ISSN 1098-5336.
- 83) PATUNGWASA, W. et al. pH tunable morphology of the gold nanoparticles produced by citrate reduction. *Materials Chemistry and Physics*. 2008, **108**(1), 45-54. ISSN 0254-0584.
- 84) PILLAI, V. et al. Preparation of nanoparticles of silver halides, superconductors and magnetic materials using water-in-oil microemulsions as nano-reactors. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1995, **55**, 241-269. ISSN 0001-8686.
- 85) PILENI, M. et al, *Langmuir*. 1997, **13**, 3266. ISSN 0743-7463.
- 86) RAIMONDI, F. et al. Nanoparticles in energy technology: examples from electrochemistry and catalysis. *Angew. Chem*. 2005, **44**, 2190-2209. ISSN 1521-3773.
- 87) RICHARD, J. W. et al. Acticoat versus silverlon: the truth. *Journal of Burns and Surgery Wound Care*. 2002, **1**, 11-20. ISSN 1547-1551.
- 88) RILEY, E. P. et al. Abnormalities of the corpus callosum in children prenatally exposed to alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1995, **19**(5), 1198-1202. ISSN 1530-0277.
- 89) ROMANSKA, D. et al. Electrochemical preparation of thiol-coated silver nanostructures on highly oriented pyrolytic graphite. *Langmuir*. 2003, **19**(11), 4532-4534. ISSN 0743-7463.
- 90) SAHOO, SK. et al. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine*. 2007, **3**(1), 20-31. ISSN 1549-9634.

- 91) SHIRAISHI, Y. et al. Oxidation of ethylene catalyzed by colloidal dispersions of poly (sodium acrylate) – protected silver nanoclusters. *Colloids and Surfaces a: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2000, **169**(1), 59-66. ISSN 0927-7757.
- 92) SHIRAISHI, Y. et al. Colloidal silver catalysts for oxidation of ethylene. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical*. 1999, **141**(1), 187. ISSN 1381-1169.
- 93) SCHWARZ, F. P. et al. *Surface and Coatings Technology*. 2011, **205**, 4850. ISSN 0257-8972.
- 94) SINGH, N. et al. Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 2009, **30**, 3891-3914. ISSN 0142-9612.
- 95) SIRIPATTANAKUL-RATPUKDI, S. et al. Review: issues of silver nanoparticles in engineered environmental treatment systems. *Water Air Soil Pollut Journal*. 2014, 225-1939. ISSN 0049-6979.
- 96) SONDI, et al. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. Coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal Colloid Interface Science*. 2004, **275**, 177-182. ISSN 0021-9797.
- 97) SONG, H. Y. et al. Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms. *European Cells and Materials*. 2006, **11**(1), 58. ISSN 1473-2262.
- 98) ŠLAMBOROVÁ, I. et al. New type of protective hybrid and nanocomposite hybrid coatings silver and copper with an excellent antibacterial effect especially against MRSA. *Materials Science and Engineering*. 2013, **33**(1), 213-219. ISSN 0921-5093.
- 99) TUCHIN, V. Valery. Handbook of Photonics for Biomedical Science. *Series in Medical Physics and Biomedical Engineering*. 1. vyd. Boca Raton: CRC Press, 2010. ISBN 978-1-4398-0628-9.
- 100) VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006, **160**(1), 1-40. ISSN 0009-2797.
- 101) VARGAS-HERNANDES, M. M. Mariscal et al. A synthesis route of gold nanoparticles without using reducing agent. *Applied Physics Letters*. 2010, **96**(21), 213115. ISSN 0003-6951.
- 102) VESELÝ, Martin. Bioinženýrství I, II. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1999.
- 103) WANG, S. et al. Photothermal effects of supramolecularly assembled gold nanoparticles for the targeted treatment of cancer cells. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010, **49**(22), 3777-3781. ISSN 1521-3773.

- 104) XIANG, D. X. et al. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. *Journal of Virological Methods*. 2011a, **178**(1-2), 137-142. ISSN 0166-0934.
- 105) YEO, S. Y. et al. Preparation of nanocomposite fibers for permanent antibacterial effect. *Journal of Materials Science*. 2003, **38**, 2143-2147. ISSN 0022-2461.
- 106) ZETASIZER NANO SERIES. *User manual*. 4. vyd. United Kingdom: Malvern Instruments Ltd., 2013.
- 107) ZHANG, Y. et al. Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2008, **325**(2), 371-376. ISSN 0021-9797.
- 108) ZHANG, Wanzhong et al. Synthesis of silver nanoparticles – effect of concerned parameters in water/oil microemulsion. *Materials Science and Engineering B*. 2007, **142**, 1-15. ISSN 0921-5107.

Seznam tabulek

Tabulka č. 1 Předběžné postupy přípravy AgNP

Tabulka č. 2 Předběžné postupy přípravy AuNP

Tabulka č. 3 Průměrná velikost nanočástic Ag1NP v solu podle měření na Nanosizeru

Tabulka č. 4 Průměrná velikost nanočástic Au3NP v solu podle měření na Nanosizeru
(v některých případech je zde přítomnost dvou velikostí částic)

Tabulka č. 5 Počet kolonií na Petriho miskách (5 ml Ag1NP)

Tabulka č. 6 Počet kolonií na Petriho miskách (2,5 ml Ag1NP)

Tabulka č. 7 Počet kolonií na Petriho miskách (5 ml Au3NP)

Tabulka č. 8 Počet kolonií na Petriho miskách (2,5 ml Au3NP)

Seznam grafů

Graf č. 1 Standardní optická denzita bakterie *Escherichia coli*

Graf č. 2 Optická denzita prvního vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Graf č. 3 Rychlost růstu prvního vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Graf č. 4 Standardní optická denzita bakterie *Staphylococcus aureus*

Graf č. 5 Optická denzita druhého vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Graf č. 6 Rychlost růstu druhého vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Graf č. 7 Standardní optická denzita bakterie *Proteus vulgarit*

Graf č. 8 První část optické denzity třetího vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Graf č. 9 Druhá část optické denzity třetího vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Graf č. 10 Rychlost růstu třetího vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Graf č. 11 Standardní optická denzita bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

Graf č. 12 Optická denzita čtvrtého vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Graf č. 13 Optická denzita prvního vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP

Graf č. 14 Optická denzita druhého vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP

Graf č. 15 Rychlost růstu druhého vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP

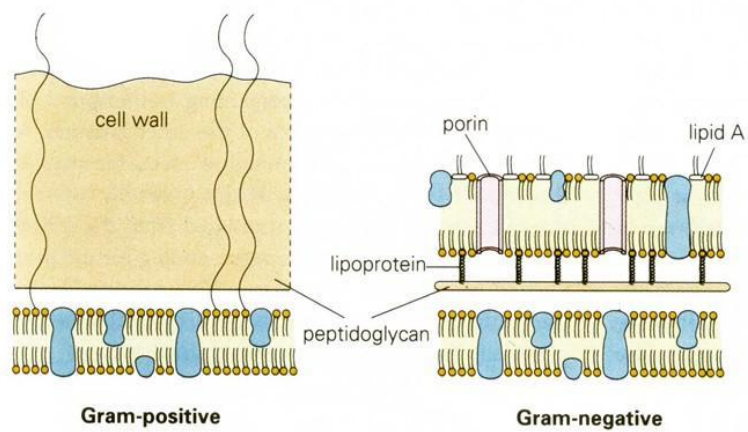
Graf č. 16 Optická denzita třetího vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP
Graf č. 17 Rychlost růstu třetího vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP
Graf č. 18 Optické denzity čtvrtého vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP
Graf č. 19 Rychlost růstu čtvrtého vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP
Graf č. 20 Optická denzita prvního vzorku po kontaktu s 5 ml Au3NP
Graf č. 21 Optická denzita druhého vzorku po kontaktu s 5ml Au3NP
Graf č. 22 Optická denzita třetího vzorku po kontaktu s 5 ml Au3NP
Graf č. 23 Rychlost růstu třetího vzorku po kontaktu s 5 ml Au3NP
Graf č. 24 Optická denzita čtvrtého vzorku po kontaktu s 5 ml Au3NP
Graf č. 25 Rychlost růstu čtvrtého vzorku po kontaktu s 5 ml Au3NP
Graf č. 26 Optická denzita prvního vzorku po kontaktu s 2,5 ml Au3NP
Graf č. 27 Optická denzita druhého vzorku po kontaktu 2,5 ml Au3NP
Graf č. 28 Rychlost růstu druhého vzorku po kontaktu s 2,5 ml Au3NP
Graf č. 29 Optická denzita třetího vzorku po kontaktu s 2,5 ml Au3NP
Graf č. 30 Optická denzita čtvrtého vzorku po kontaktu s 2,5 ml Au3NP

Seznam příloh

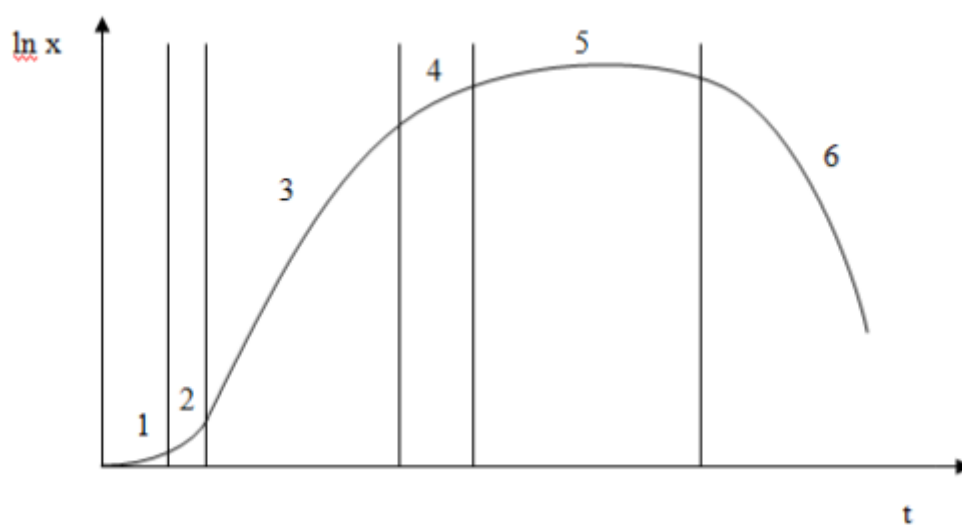
Příloha č. 1 Obrázky

Příloha č. 2 Grafy

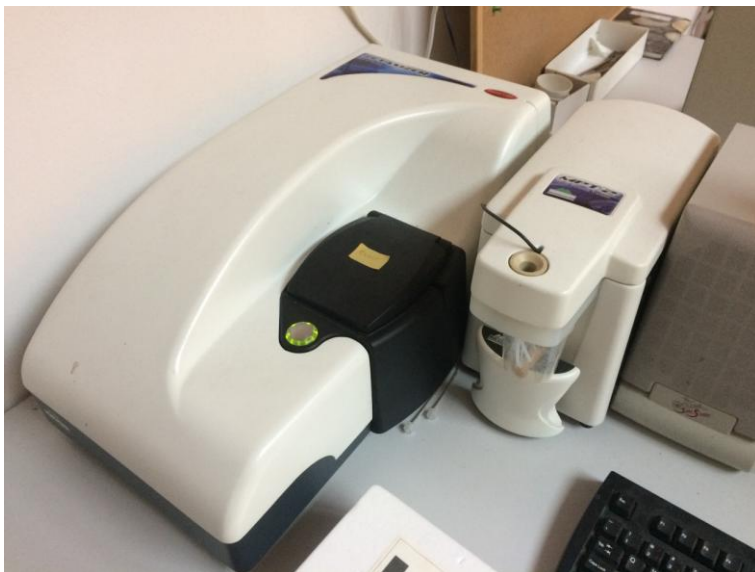
Příloha č. 1 Obrázky



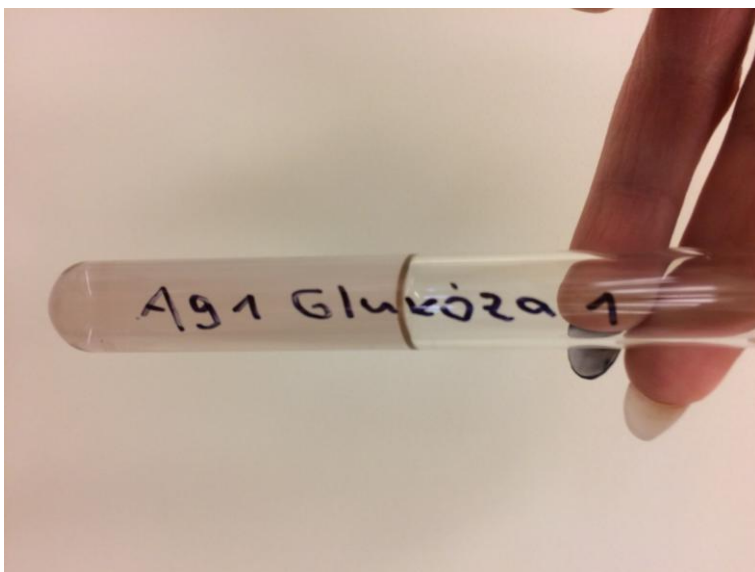
Obrázek č. 1 Stavba buněčné stěny G+ a G- mikrobů (Mims CA et al, 1993)



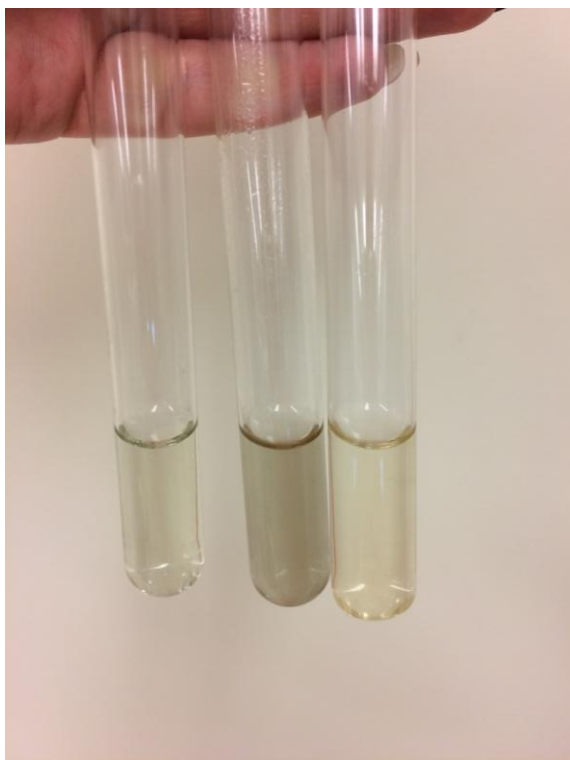
Obrázek č. 2 Standardní růstová křivka (Kalábová, 2012-2013)



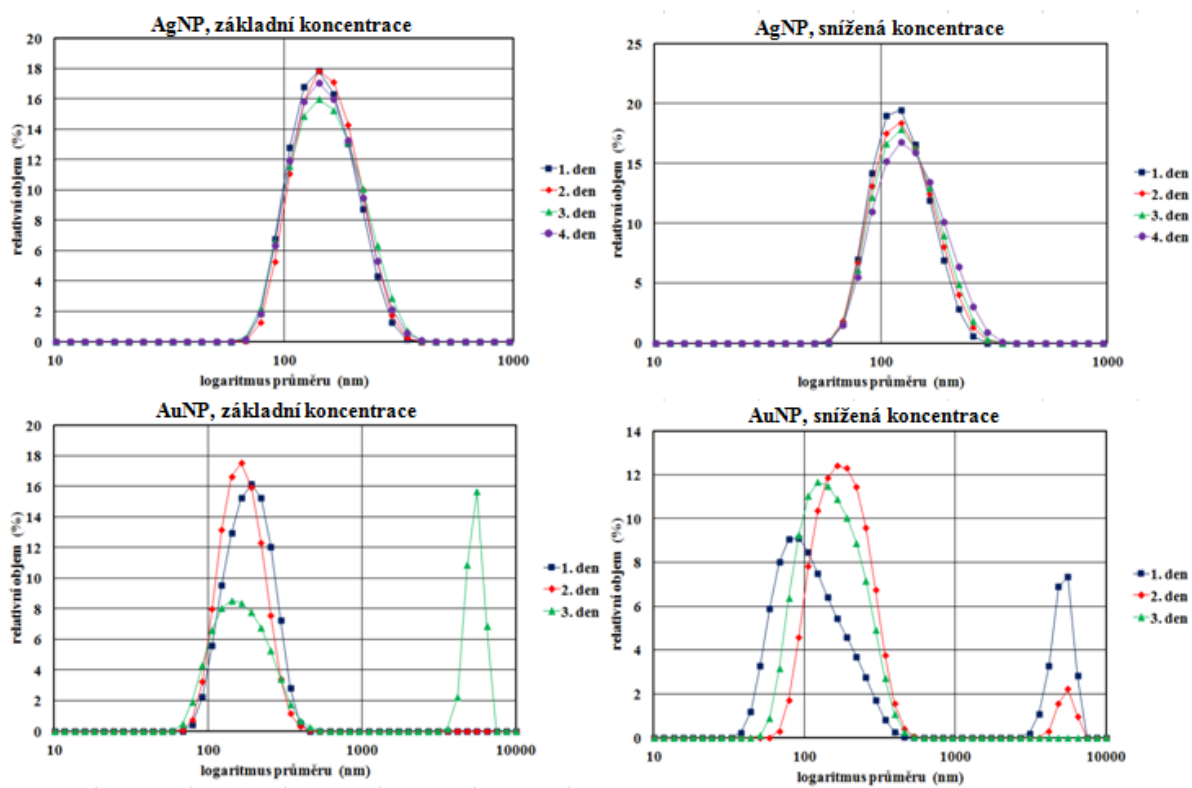
Obrázek č. 3 Zetasizer Nano (Karina Petříková, 2016)



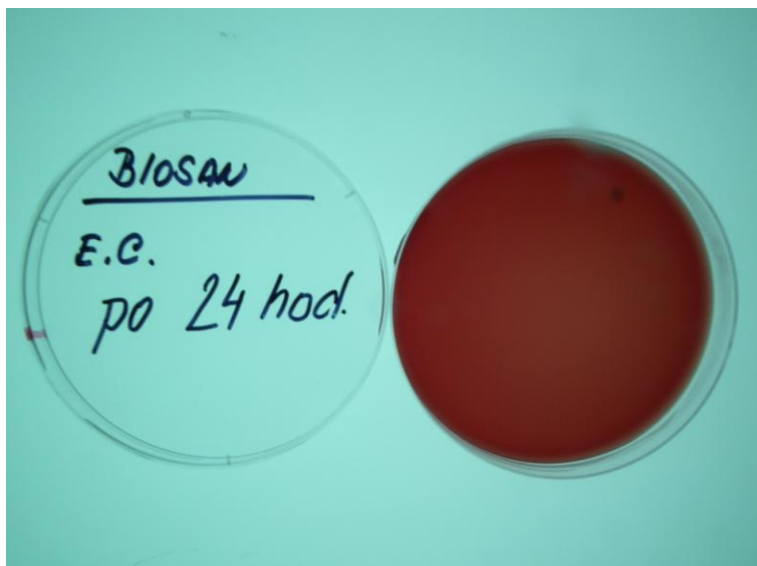
Obrázek č. 4 Vzorek Ag1NP (Karina Petříková, 2017)



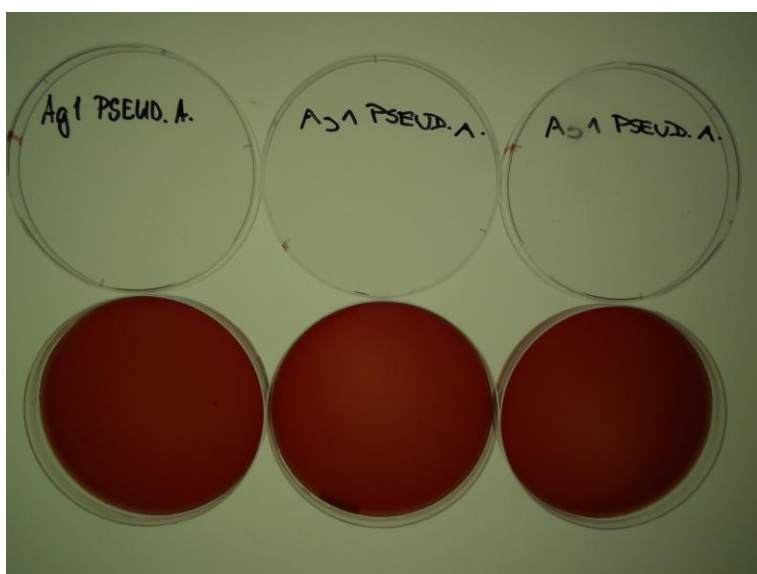
Obrázek č. 5 Vzorek Au₃NP zahřátý na tři různé teploty (Karina Petříková, 2017)



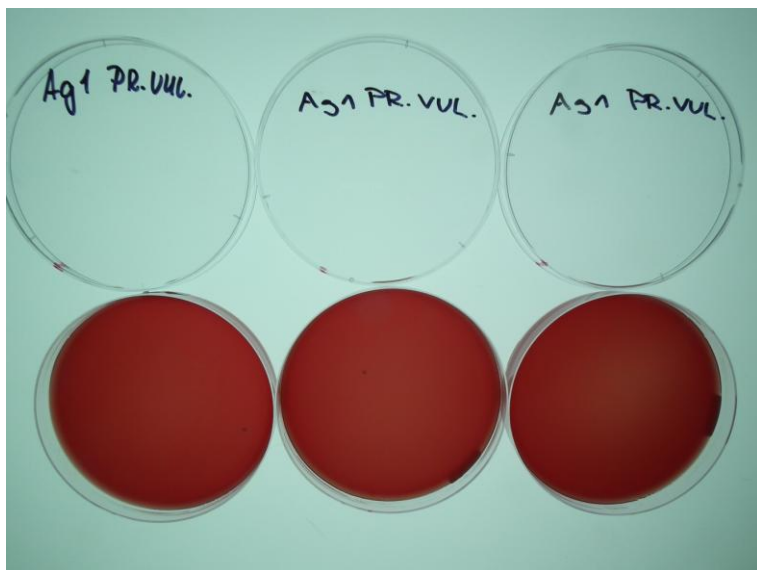
Obrázek č. 6 Grafické vyjádření výsledků měření nanočástic na Zetasizeru pro časové závislosti stability solů (Karina Petříková, 2017)



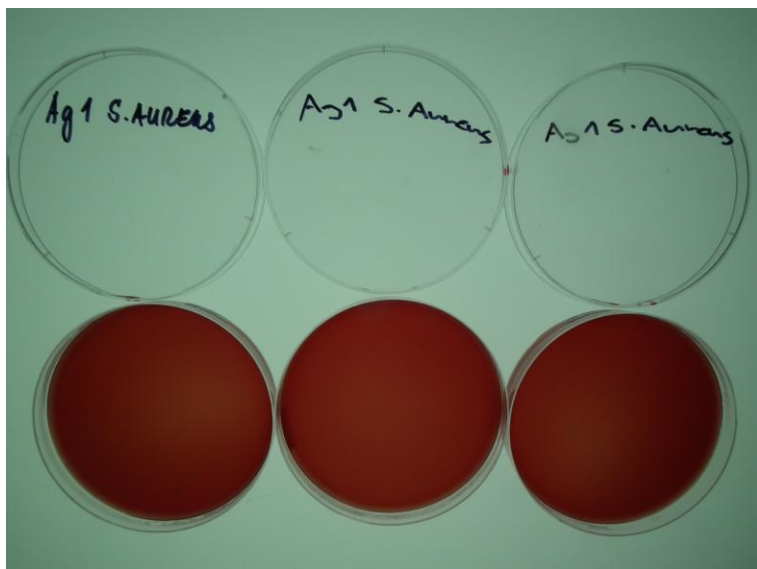
Obrázek č. 7 *Escherichia coli* na Petriho misce po 24 hodinách (Karina Petříková, 2017)



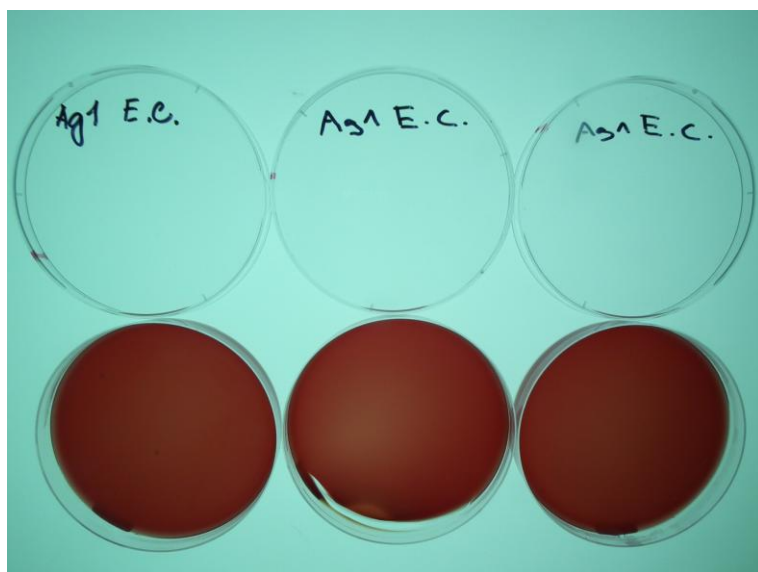
Obrázek č. 8 *Pseudomonas aeruginosa* na Petriho miskách - 5 ml Ag1NP (Karina Petříková, 2017)



Obrázek č. 9 *Proteus vulgaris* na Petriho miskách – 5 ml Ag1NP (Karina Petříková, 2017)



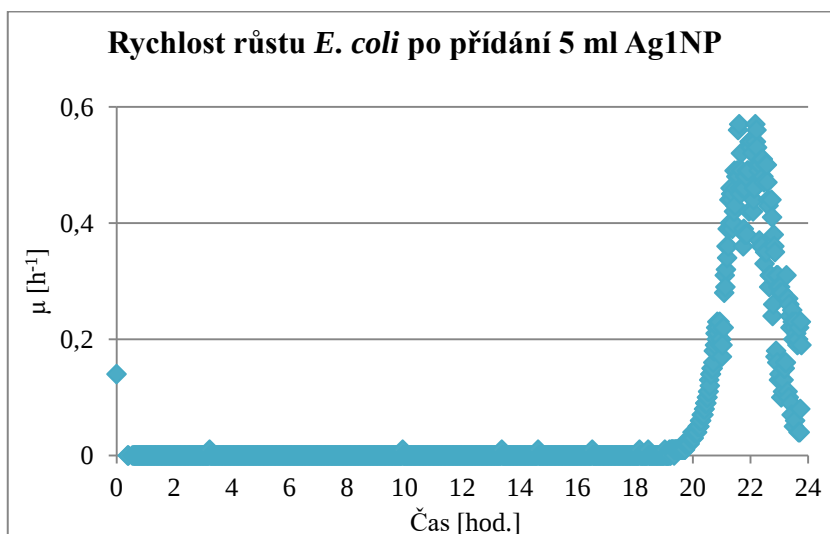
Obrázek č. 10 *Staphylococcus aureus* na Petriho miskách – 5 ml Ag1NP (Karina Petříková, 2017)



Obrázek č. 11 *Escherichia coli* na Petriho miskách – 5 ml Ag1NP (Karina Petříková, 2017)

Příloha č. 2 Grafy

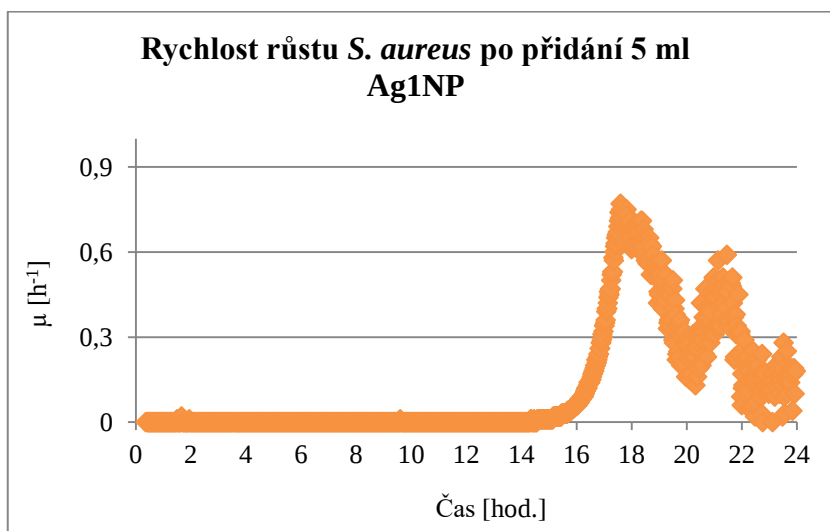
Graf rychlosti růstu bakterie *E. coli* po kontaktu s 5 ml Ag1NP:



Graf č. 3 Rychlost růstu prvního vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Z tohoto grafu je patrné, že rychlost růstu bakterií začala od 22. hodiny značně klesat. Počet bakterií se tedy začal výrazně snižovat, přestože na předešlém grafu optické denzity to nebylo vůbec znatelné.

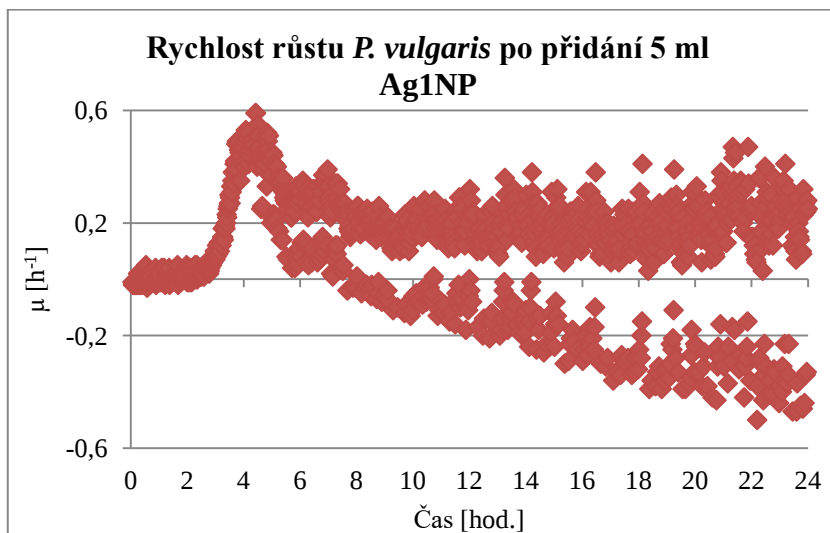
Graf rychlosti růstu bakterie *S. aureus* po kontaktu s 5 ml Ag1NP:



Graf č. 6 Rychlost růstu druhého vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Rychlost růstu začala klesat již po 17,5 hodinách testování. Okolo 20. hodiny začala rychlost opět prudce stoupat. Nicméně po 21. hodině začala rychlost opětovně klesat. Záznam změn rychlosti růstu není z křivky optické denzity vůbec patrný.

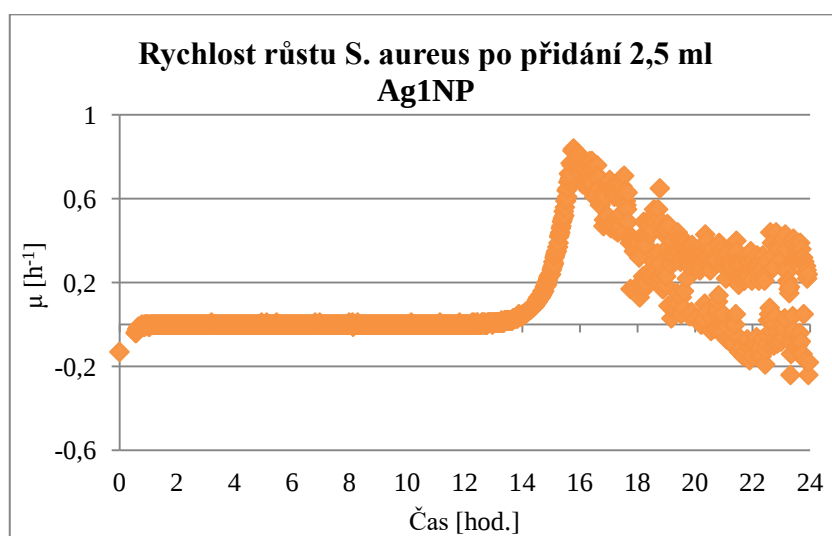
Graf rychlosti růstu bakterie *P. vulgaris* po kontaktu s 5 ml Ag1NP:



Graf č. 10 Rychlost růstu třetího vzorku po kontaktu s 5 ml Ag1NP

Rychlost růstu dosahovala maxima po 5 hodinách testování. V tu dobu se přeměnila fáze zrychleného růstu na exponenciální fázi růstu, viz Graf č. 7. Potom rychlost růstu začala prudce klesat. Tento údaj křivka optické denzity nezaznamenala.

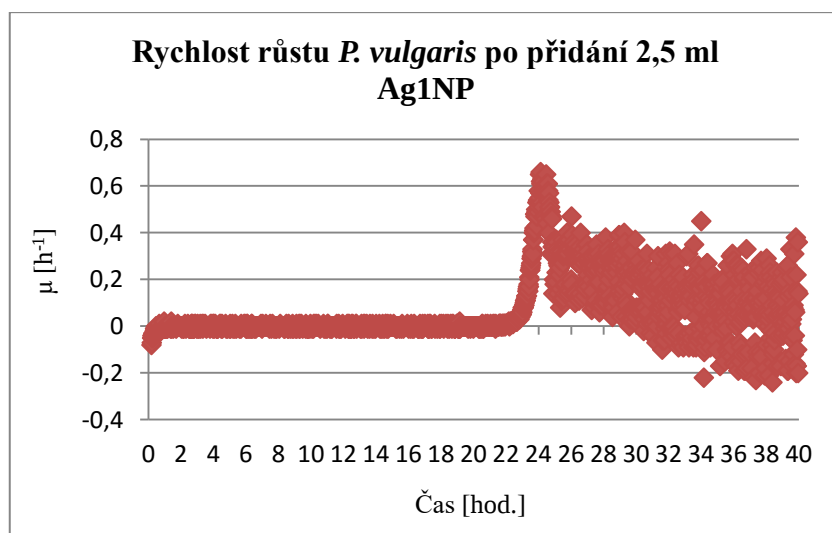
Graf rychlosti růstu bakterie *S. aureus* po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP:



Graf č. 15 Rychlost růstu druhého vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP

Rychlost růstu byla maximální po necelých 16 hodinách testování. V tento okamžik začala probíhat fáze exponenciálního růstu, viz Graf č. 15. Následně se rychlost růstu kolísavě snižovala.

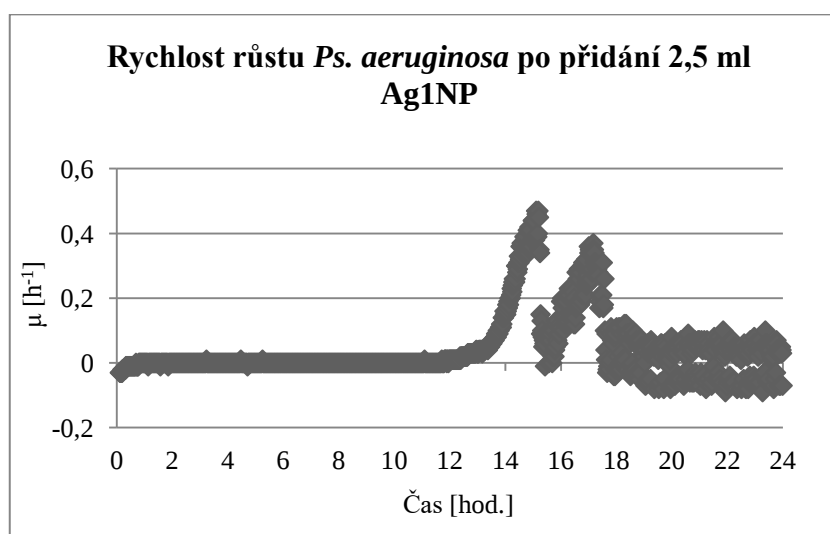
Graf rychlosti růstu bakterie *P. vulgaris* po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP:



Graf č. 17 Rychlost růstu třetího vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP

Rychlost růstu začala klesat již od 25. hodiny testování. Křivka optické denzity pokles zaznamenala až po 30 hodinách testování.

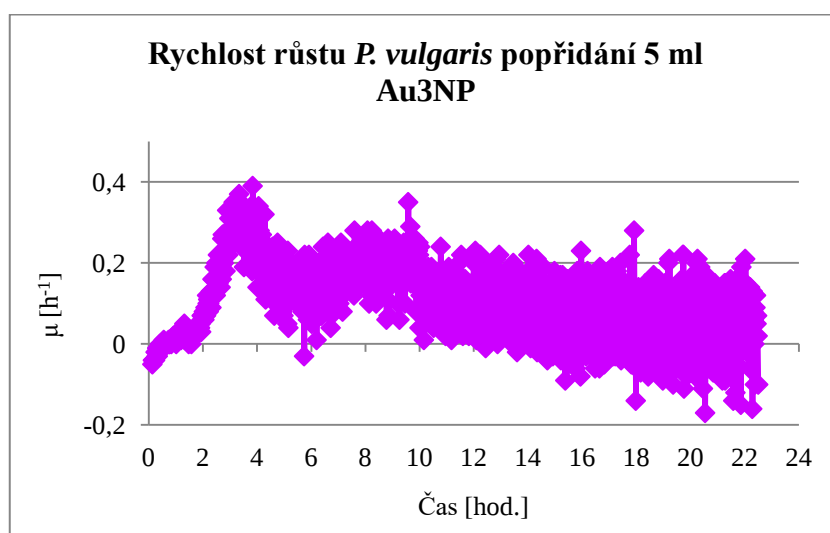
Graf rychlosti růstu bakterie *Ps. aeruginosa* po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP:



Graf č. 19 Rychlost růstu čtvrtého vzorku po kontaktu s 2,5 ml Ag1NP

Maximální rychlost růstu byla zaznamenána v 15 hodin. To odpovídalo exponenciální fázi růstu. Následně se začala rychlost růstu snižovat. Od 19. hodiny byla rychlost růstu víceméně nulová. To odpovídá i grafům optické denzity.

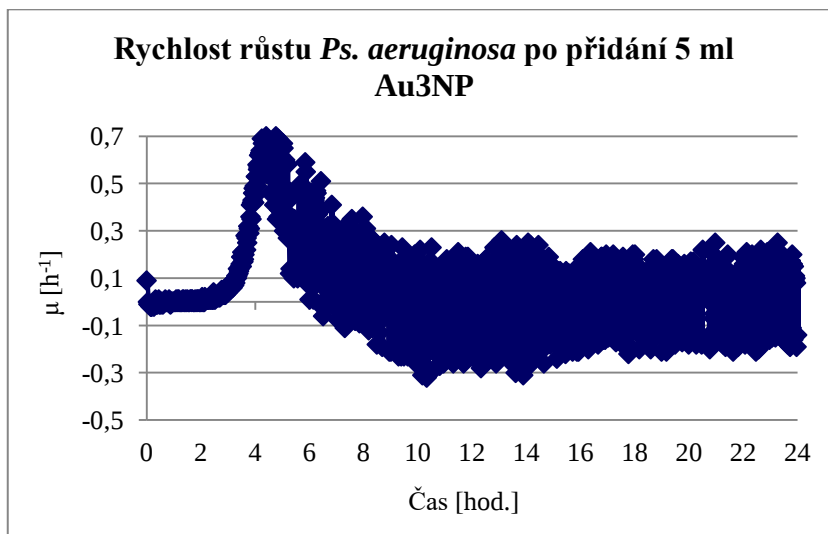
Graf rychlosti růstu bakterie *P. vulgaris* po kontaktu s 5 ml Au3NP:



Graf č. 23 Rychlost růstu třetího vzorku po kontaktu s 5 ml Au3NP

Rychlost růstu dosahovala maxima již před 4. hodinou. Následně se rychlost začala kolísavě snižovat. Snižování rychlosti v tento čas není z grafu optické denzity znatelné.

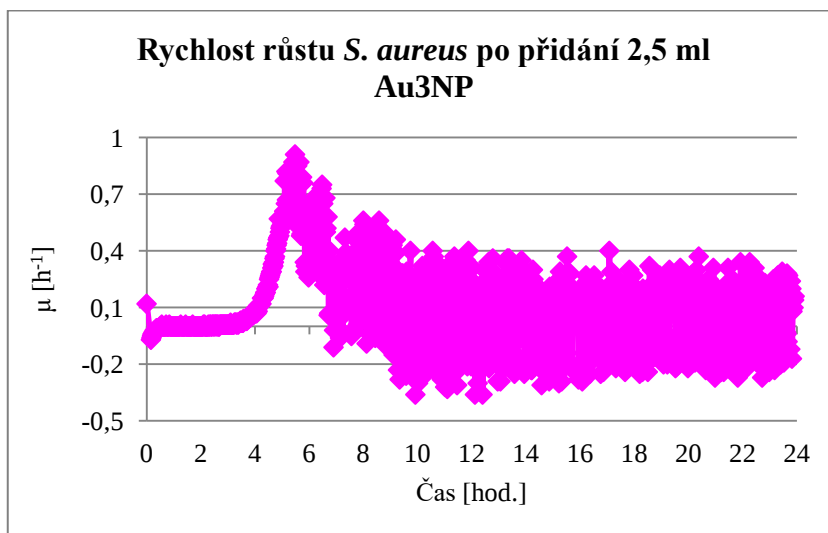
Graf rychlosti růstu bakterie *Ps. aeruginosa* po kontaktu s 5 ml Au3NP:



Graf č. 25 Rychlost růstu čtvrtého vzorku po kontaktu s 5 ml Au3NP

Z tohoto grafu je patrné, že pokles rychlosti růstu začal již od 5. hodiny testování. Na předešlém grafu optické denzity není pokles v tento čas zaznamenán.

Graf rychlosti růstu bakterie *S. aureus* po kontaktu s 2,5 ml Au3NP:



Graf č. 28 Rychlost růstu druhého vzorku po kontaktu s 2,5 ml Au3NP

Maximální rychlost růstu byla zaznamenána před 6. hodinou testování. Z grafu optické denzity je zřejmé, že v tuto chvíli probíhala exponenciální fáze. Od 6 hodin se rychlost růstu snižovala.