

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyzikální chemie



**Vliv přítomnosti volných stříbrných iontů na biologické
vlastnosti nanočástic stříbra**

Bakalářská práce

Autor:
Studijní program:
Studijní obor:
Forma studia:

Jana Procházková
B14407 – Chemie
Ekochemie
Prezenční

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Olomouc 2013

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením pana RNDr. Aleše Panáčka, Ph.D. Veškeré zdroje, které jsem při sepisování práce využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Alešovi Panáčkovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi v průběhu vypracovávání bakalářské práce poskytl a zároveň také za čas strávený odborným vedením a konzultacemi. Ráda bych také poděkovala Mgr. Anně Balzerové za odborné připomínky a rady v rámci experimentálního měření. V neposlední řadě chci také poděkovat Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za provedení testů antibakteriální aktivity.

Bibliografická identifikace

Autor	Jana Procházková
Název práce	Vliv přítomnosti volných stříbrných iontů na biologické vlastnosti nanočástic stříbra
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta
Vedoucí práce	RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013

Abstrakt Cílem bakalářské práce bylo studium antibakteriální aktivity koloidních částic stříbra v závislosti na koncentraci iontového stříbra uvolňovaného z koloidních částic a její možné ovlivnění různými aminokyselinami a halogenidy.

Koloidní stříbro bylo připraveno modifikovaným Tollensovým procesem, kdy dochází k redukci diammin stříbrného komplexu D-maltosou v přítomnosti roztoku hydroxidu sodného. Připravená disperze obsahovala částice o velikosti okolo 27 nm.

Ke sledování ovlivnění volných stříbrných iontů byly z aminokyselin vybrány cystein, glycin a lysin. Z halogenidů pak jodid draselný, bromid draselný a chlorid draselný o různých koncentracích v koloidu stříbra. Vzorky byly proměřeny potenciometricky.

Antibakteriální aktivita vzorků koloidního stříbra s různými koncentracemi aminokyselin a halogenidů byla testována standardní diluční metodou vedoucí k určení minimální inhibiční koncentrace MIC látky.

Výsledky ukázaly, že nejvíce koncentraci volných stříbrných iontů v koloidu a tím jeho antibakteriální aktivitu ovlivňovaly přídavky cysteinu a jodidu draselného. Ostatní aminokyseliny a halogenidy také ovlivňují koncentrace Ag^+ iontů a antibakteriální aktivitu, ale ne tak výrazně.

Klíčová slova	nanočástice stříbra, antibakteriální aktivita, cystein, glycin, lysin, chlorid draselný, jodid draselný, bromid draselný
Počet stran	57
Jazyk	Český

Bibliographic identification

Author	Jana Procházková
Title	Effect of free ionic silver on antibacterial properties of silver nanoparticles
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Physical Chemistry, Faculty of Science
Supervisor	RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	The goal of this work was to study the antibacterial activity of colloidal silver particles, its dependence on concentration of silver ion released from the colloidal particles and its possible influence by various amino acids and halides. Colloidal silver was prepared by modified Tollens process, which leads to reduction of the silver diammin complex by D-maltose in the presence of sodium hydroxide. Prepared dispersion contains particles with a size of about 27 nm. Amino acids cysteine, glycine and lysine and halides potassium iodide, bromide and chloride as halides were used to monitor their influence on ionic silver concentration in colloidal silver. Concentration of ionic silver was determined using voltmeter. The antibacterial activity of silver colloids with different concentrations of amino acids and halides were tested by standard dilution method, which enables to determine minimum inhibitory concentration (MIC) of tested substance. The most binding effect of free silver ions, released by silver nanoparticles, had cysteine and potassium iodide. Other amino acids and halides also affect the concentration of Ag^+ ions, but not of such extent.
Keywords	silver nanoparticles, antibacterial activity, cysteine, glycine, lysine, potassium chloride, potassium iodide, potassium bromide
Number of pages	57
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	DISPERZNÍ SOUSTAVY	9
2.1	ROZDĚLENÍ DISPERZNÍCH SOUSTAV	9
3	KOLOIDNĚ DISPERZNÍ SYSTÉMY	10
3.1	KLASIFIKACE KOLOIDNÍCH SOUSTAV	11
3.2	KINETICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV	11
3.2.1	<i>Brownův pohyb.....</i>	<i>11</i>
3.2.2	<i>Difúze v koloidních soustavách</i>	<i>12</i>
3.2.3	<i>Osmóza</i>	<i>12</i>
3.2.4	<i>Sedimentace.....</i>	<i>13</i>
3.3	OPTICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV	13
3.3.1	<i>Absorpce světla</i>	<i>14</i>
3.3.2	<i>Rozptyl světla.....</i>	<i>14</i>
3.4	ELEKTRICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV	15
3.4.1	<i>Elektrokinetické jevy.....</i>	<i>15</i>
3.5	STABILITA KOLOIDNÍCH SOUSTAV	18
3.5.1	<i>Stérická stabilizace.....</i>	<i>19</i>
3.5.2	<i>Elektrostatická stabilizace.....</i>	<i>20</i>
3.6	METODY PŘÍPRAVY KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ	20
3.6.1	<i>Metody dispergační</i>	<i>20</i>
3.6.2	<i>Metody kondenzační</i>	<i>21</i>
4	KOLOIDNÍ STŘÍBRO	22
4.1	METODY PŘÍPRAVY KOLOIDNÍCH ČÁSTIC STŘÍBRA	22
4.2	BIOLOGICKÉ ÚČINKY NANOČÁSTIC STŘÍBRA.....	23
4.3	HALOGENIDY	24
4.3.1	<i>Chlorid stříbrný</i>	<i>25</i>
4.3.2	<i>Jodid stříbrný</i>	<i>25</i>
4.3.3	<i>bromid stříbrný.....</i>	<i>26</i>
4.4	AMINOKYSELINY	26
4.4.1	<i>Cystein.....</i>	<i>27</i>
4.4.2	<i>glycin.....</i>	<i>27</i>
4.4.3	<i>Lysin.....</i>	<i>27</i>
4.4.4	<i>vliv aminokyselin a halogenidů na nanočástice stříbra</i>	<i>28</i>
4.5	APLIKACE NANOČÁSTIC STŘÍBRA	29

5	MATERIÁL A METODY	30
5.1	CHEMIKÁLIE	30
5.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	30
5.3	PRACOVNÍ POSTUPY.....	31
5.3.1	<i>Příprava koloidního stříbra.....</i>	<i>31</i>
5.3.2	<i>Příprava a měření vzorků pro vytvoření kalibrační křivky.....</i>	<i>31</i>
5.3.3	<i>Vliv vybraných aniontů na koncentraci iontového stříbra uvolňovaného z koloidních částic Ag.....</i>	<i>32</i>
5.3.4	<i>Testování antibakteriální aktivity.....</i>	<i>32</i>
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	33
6.1	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE NANOČÁSTIC STŘÍBRA	33
6.2	KALIBRAČNÍ KŘIVKA	33
6.3	VLIV GLYCINU NA KOLOIDNÍ STŘÍBRO	35
6.4	VLIV LYSINU NA KOLOIDNÍ STŘÍBRO.....	36
6.5	VLIV CYSTEINU NA KOLOIDNÍ STŘÍBRO.....	37
6.6	VLIV JODIDOVÉHO IONTU NA KOLOIDNÍ STŘÍBRO	38
6.7	VLIV BROMIDOVÉHO IONTU NA KOLOIDNÍ STŘÍBRO	39
6.8	VLIV CHLORIDOVÉHO IONTU NA KOLOIDNÍ STŘÍBRO	40
6.9	VLIV PŘÍTOMNOSTI AMINOKYSELIN A HALOGENIDŮ NA ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITU KOLOIDNÍCH ČÁSTIC STŘÍBRA	41
7	ZÁVĚR	50
8	SUMMARY	52
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53

1 ÚVOD

V dnešní době je stále více diskutované téma přípravy nanočástic a nanomateriálů a jejich aplikační využití. Do popředí zájmu se dostávají zejména nanočástice stříbra díky jejich antibakteriální aktivitě, která je využitelná v mnoha různých oborech. Svě dominantní postavení zaujímají tyto nanomateriály především ve zdravotnictví. Díky stále rostoucím rezistentním schopnostem mikrobů se dnešní antibiotika stávají stále méně účinná a je proto nutné hledat jiné způsoby jak bakteriím a virům zabránit v jejich šíření. Možným způsobem řešení tohoto problému je právě studium nanočástic stříbra a jejich vlastností.

Jedním z mechanismů jak nanočástice stříbra vykazují svoji antibakteriální aktivitu je uvolňování stříbrných iontů, kterými dochází k ovládnutí antibakteriální aktivity. Nabízí se otázka, zda nelze za pomoci různých látek ovlivnit tuto koncentraci iontů a tím antibakteriální aktivita koloidního stříbra.

Příprava nanočástic stříbra je relativně jednoduchý a levný proces, při kterém lze využít různých metod. Jednou z možností přípravy je modifikovaný Tollensův proces, kdy vytvořený komplexní kation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ se redukuje různými sacharidy, jako například maltosou, galaktosou, fruktosou nebo glukosou [16].

Cílem předkládané bakalářské práce je studium antibakteriální aktivity nanočástic stříbra, způsobené uvolňováním volných stříbrných iontů a zjištění, zda lze různými aminokyselinami (cystein, glycin, lysin) a halogenidy (chlorid draselný, jodid draselný, bromid draselný) ovládat tuto koncentraci volných stříbrných iontů a tím tedy jejich antibakteriální aktivitu.

TEORETICKÁ ČÁST

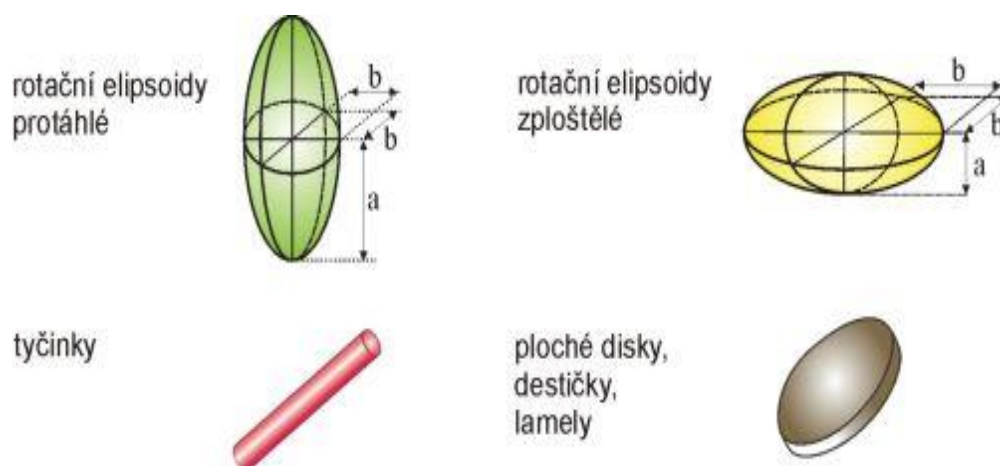
2 DISPERZNÍ SOUSTAVY

Disperzní soustava je termodynamický systém, který si lze představit jako soustavu složenou alespoň ze dvou základních částí a to z disperzní fáze, nazývané též jako disperzní podíl či dispersum a disperzního prostředí nazývaném také jako dispergens. Tyto dvě části obvykle představují dvě chemicky odlišné složky popřípadě směsi složek. Disperzní fáze je rovnoměrně rozptýlena = dispergována ve formě částic dané velikosti a tvaru v disperzním prostředí, které tvoří spojitou část disperzní soustavy [1, 2].

2.1 ROZDĚLENÍ DISPERZNÍCH SOUSTAV

Jelikož existuje mnoho typů disperzních soustav, klasifikujeme je podle různých hledisek. Podle počtu fází lze disperzní systémy dělit na homogenní a heterogenní, kdy homogenní (stejnorodá) soustava obsahuje dvě složky a jednu fázi, z nichž jedna složka tvoří disperzní fázi a druhá disperzní prostředí. V tomto případě nelze uvažovat o rozhraní mezi částicemi a disperzním prostředím, neboť složka disperzního fazeu je rozptýlena ve složce tvořící disperzní prostředí v příliš drobných částicích. Jako příklad si můžeme uvést rozpuštěný cukr ve vodě (jednofázový, dvousložkový systém). Jako soustavu heterogenní (nestejnorodou) označujeme disperzní soustavu obsahující dvě fáze, kdy jedna tvoří disperzní fázi a druhá disperzní prostředí. Existuje zde určitá hranice mezi částicemi dispergované fáze a prostředím, které je obklopuje, nazývané též jako fázové rozhraní. Příkladem heterogenní soustavy může být menší množství oleje ve vodě [1, 3].

Dle tvaru dispergovaných částic můžeme rozeznat systémy korpuskulárně disperzní, které obsahují izometrické částice kulovitého tvaru, laminárně disperzní, jejichž anizometrické částice mají tvar destiček nebo lamel a fibrilárně disperzní, obsahující anizometrické částice tyčinkovitého nebo vláknitého tvaru. Nachází-li se nám v soustavě částice stejného tvaru, označujeme tuto soustavu jako homodisperzní. V případě výskytu různých tvarů částic, nazýváme soustavu jako heterodisperzní [1, 3].



Obr.1: Modely anizometrických částic [5]

Za pomoci tzv. stupně disperzity – poměr povrchu částic k jejich objemu (převrácená hodnota lineárního rozměru částice) můžeme vyjadřovat velikost částic soustavy. Čím jemněji bude disperzní fáze rozptýlena, tím bude mít vyšší stupeň disperzity. Systémy, ve kterých se vyskytují nejmenší částice ($d < 10^{-9}$ m) označujeme jako analytické disperze (pravé roztoky nízkomolekulárních látek), u koloidních disperzí se velikost částic pohybuje v rozmezí od 1 do 500 nanometrů (pravé roztoky látek vysokomolekulárních i nano či mikrodisperze dalších látek) a s velkými částicemi ($d > 10^{-6}$ m) se můžeme setkat u hrubých disperzí (makroheterogenní soustavy). O soustavě monodisperzní hovoříme tehdy, mají-li všechny částice soustavy stejnou velikost. V případě, že se nám v disperzním fázeu nacházejí částice o různé velikosti, jedná se o soustavu polydisperzní [1, 2, 3].

3 KOLOIDNĚ DISPERZNÍ SYSTÉMY

Koloidně disperzní systémy jsou dvoufázové a vícefázové soustavy, ve kterých je jedna fáze velmi jemně rozptýlena ve fázi druhé tak, že tvoří mikroskopické až submikroskopické objekty. Tyto soustavy vykazují unikátní fyzikálně chemické vlastnosti zapříčiněné malou velikostí částic a velkou plochou fázového rozhraní mezi disperzní fází a prostředím, se kterými se u makroskopických fází výrazněji nesetkáme [4, 1].

3.1 KLASIFIKACE KOLOIDNÍCH SOUSTAV

Díky velké rozmanitosti můžeme stejně jako disperzní soustavy dělit i soustavy koloidní. Ty lze obecně rozdělit do 8 skupin, jak je patrné z tab. 1:

Disperzní prostředí	Disperzní fáze	Označení koloidní disperze
Plynné	Plynný	Koloid netvoří
	Kapalný	Aerosoly
	Pevný	Aerosoly
Kapalné	Plynný	Pěny
	kapalný	Emulze
	Pevný	Lyosoly
Pevné	Plynný	Tuhé pěny
	Pevný	Tuhé emulze
	Pevný	Tuhé soly

Tabulka 1: Klasifikace skupenského stavu disperzní fáze a disperzního prostředí

Koloidně disperzní soustavy spadající pod lyosoly (tvořené kapalným prostředím a pevnou disperzní fází) můžeme dále klasifikovat do tří skupin. Soustavy lyofobní nazývané též jako koloidní disperze jsou heterogenní systémy tvořené převážně anorganickými látkami, mající ostře vymezené fázové rozhraní. Je pro ně typická nestálost a samovolné zanikání. Lyofobní soustavu označujeme jako hydrofobní pokud je disperzní prostředí tvořené vodou. V případě však, že je tvořeno organickou kapalinou, jedná se o organosoly. Do druhé skupiny zapadají soustavy lyofilní, kdy se jedná o homogenní soustavy, v nichž je fázové rozhraní rozprostřeno do všech rozměrů. Tyto systémy jsou tvořeny pravými roztoky molekul, jež jsou stálé a mohou vznikat samovolným rozpuštěním. Třetí skupinu tvoří tzv. asociativní koloidní soustavy vznikající spojováním molekul povrchově aktivních látek za vzniku útvarů koloidní velikosti nazývané micely. Gely jsou zvláštním případem koloidních soustav, v nichž jsou spojeny disperzní částice do trojrozměrné sítě prostupující disperzním prostředím [1, 5, 3].

3.2 KINETICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV

3.2.1 BROWNŮV POHYB

Brownův pohyb nese jméno po anglickém botanikovi Robertu Brownovi, který jako první pozoroval zdánlivě náhodné pohyby koloidních částic. Své pozorování započal sledováním zrnka pylu, jež bylo suspendované ve vodě. Následně totéž zkusil i s různými organickými a anorganickými látkami, aby vyloučil, že pohyb zrn není spojen s projevem života pylu a došel tak k závěru, že chaotický pohyb částic je pozorován vždy při dostatečném rozmělnění látky [6, 7].

Brownův pohyb je zapříčiněn tepelným pohybem molekul disperzního prostředí, které nahodile narážejí do koloidních částic a způsobují tak pohyb těchto částic. Tento pohyb, který je pozorovatelný v mikroskopu a ultramikroskopu, roste se zmenšujícími se rozměry částic a také s teplotou. Budeme-li mít částice o větším průměru než 4 μm, tepelný pohyb již nebude pozorovatelný [4, 5, 1].

3.2.2 DIFÚZE V KOLOIDNÍCH SOUSTAVÁCH

Za pomoci difúze dochází v soustavách s koncentračním gradientem (rozdíl koncentrací) k samovolnému vyrovnávání koncentrací zapříčiněné translačním pohybem částic. Čím budeme mít poloměr částice větší, tím nám bude rychlost difúze klesat. Aby se dosáhlo vyrovnání koncentrace v celém systému, směr difúze nastává vždy ve směru koncentračního gradientu – tedy z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí s nižší koncentrací. Za pomoci Fickova zákona můžeme popsat pohyb hmoty ve směru difúze:

$$\frac{dn}{dt} = -SD \frac{dc}{dx}$$

Kde dn/dt je látkové množství difundující látky v čase, S je plocha kolmá na směr difúze, D je difúzní koeficient [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$] a nakonec dc/dx je koncentrační gradient [1, 3].

Je třeba zmíniti jeden ze základních vztahů koloidní chemie – Einsteinovu rovnici, z níž plyne, že se stoupající teplotou hodnota difuzního koeficientu stoupá a se vzrůstající viskozitou prostředí a rostoucím poloměrem částic naopak klesá [1, 3].

3.2.3 OSMÓZA

Osmóza je jev, který si lze představit jako tok rozpouštědla ze zředěnějšího do koncentrovanějšího roztoku. Tento děj může nastat pouze za předpokladu, že budeme mít dva různě koncentrované systémy oddělené polopropustnou (semipermeabilní) membránou, přes kterou mohou pronikat pouze molekuly disperzního prostředí (rozpouštědla), částice dispergované nemohou projít jejími póry. Na obou stranách membrány dochází ke snaze o vyrovnání chemických potenciálů rozpouštědla, což je i hnací silou celého děje. Přetlak, který způsobí zastavení průchodu rozpouštědla membránou na straně koncentrovanějšího systému, označujeme jako osmotický tlak π . Vztah označovaný jako van't Hoffova rovnice nám popisuje závislost osmotického tlaku na koncentraci a teplotě:

$$\pi = cRT$$

kde c označuje molární koncentraci [mol/m^3], T termodynamickou teplotu a R je univerzální plynová konstanta. Když nahradíme molární koncentraci počtem částic v v objemové jednotce, získáme vztah vyjadřující velikost osmotického tlaku v koloidních soustavách:

$$\pi = v \frac{RT}{N_A}$$

Jelikož osmotický tlak silně závisí na velikosti částic, využívají se osmotická měření jak ke zjišťování velikosti dispergovaných částic, tak k určování molární hmotnosti makromolekulárních látek [1, 5].

3.2.4 SEDIMENTACE

V případě, že na disperzní systémy působí silové pole (např. gravitační nebo odstředivé), dochází k sedimentaci – pohyb ve směru působení síly. V gravitačním poli Země částice o hustotě větší než je disperzní prostředí, klesají prakticky všechny ke dnu, v opačném případě plavou na povrchu. Obecně lze říct, že v gravitačním poli pohyb částic závisí jak na hmotnosti, tvaru a hustotě, tak také na vlastnostech prostředí, v němž se částice pohybují [1, 5, 2].

V průběhu sedimentace dochází k rovnovážnému uspořádání částic, kde největší částice se budou držet u dna a nejmenší částice, které jsou sedimentačně stálé, vlivem Brownova pohybu zůstanou rovnoměrně rozptýleny v celém objemu koloidního systému. Abychom urychlily proces ustavování sedimentační rovnováhy, používá se odstředivé silové pole ultracentrifugy, jehož síla je řádově až 10^6 krát větší oproti zemské gravitaci [1, 5, 4].

3.3 OPTICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV

Optické vlastnosti koloidních soustav patří k významným zvláštnostem. Bude-li dopadat světelný paprsek na koloidní systém, současně bude docházet jak k pravé absorpci, tak k rozptylu světla na částicích systému. To, který z jevů bude převládat, rozhoduje charakter koloidní soustavy, zejména pak velikost přítomných částic [1].

3.3.1 ABSORPCE SVĚTLA

Absorpce záření je doprovázena pohlcováním energie elektromagnetického záření, při němž dochází ke zvýšení vnitřní energie molekul systému. Tento jev se vyjadřuje za pomoci Lambert-Beerova zákona:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon cd$$

Lambert-Beerův zákon

V němž I látkou prošlá intenzita záření, I_0 je na látku dopadající intenzita světla, ε je absorpční koeficient, c koncentrace a d šířka kyvety, kterou záření prochází. Jelikož u koloidních soustav absorpce záření závisí na velikosti částic, dochází ke zkomplikování Lambert-Beerova zákona. Tato závislost je pozorovatelná převážně u elektricky vodivých koloidních částic například u koloidní disperze Ag [1].

3.3.2 ROZPTYL SVĚTLA

Koloidní soustavy mají tu schopnost, že mohou rozptylovat určitý podíl procházejícího záření všemi směry bez změny vlnové délky, přičemž nedochází při pohlcování kvanta světelné energie ke změně energetických stavů systému. Tento jev je pozorovatelný pouze u systémů s různými indexy lomu disperzních částic a disperzního prostředí. Intenzita rozptýleného světla je u koloidních disperzí obsahující částice s rozměry shodnými či menšími než vlnová délka světla, nižší, proto jsou v procházejícím světle v tenkých vrstvách čiré. Teprve až v tlustších vrstvách jeví jemný zákal [1, 3].

Budeme-li koloidním roztokem pozorovat průchod úzkého svazku paprsků, uvidíme, že paprsek procházející přes tento roztok, se rozšiřuje do kužele, jehož vrchol je v místě, kde paprsek vchází do nehomogenního prostředí a dále se rozšiřuje ve směru procházejícího paprsku. Tento jev označujeme jako Tyndallův jev, který byl pojmenován po Tyndallově, jenž poprvé kvalitativně pozoroval rozptyl světla. Vlivem rozptylu nám bude klesat intenzita primárního záření a to ve směru postupu paprsků. Zákonem podobným jako Lambert-Beerův můžeme pak popsat kvantitativní podíl rozptylu záření na zeslabení intenzity dopadajícího záření a to ve směru pozorování:

$$\frac{-\log I}{I_0} = \tau d$$

Kde turbidita, označovaná jako τ , je mírou úhrnné energie, která se rozptýlí na všechny strany od paprsku procházejícího vrstvou suspenze o jednotkové tloušťce a je výrazně závislá jak na stupni disperzity, vlnové délce záření, tak i na optických vlastnostech koloidní soustavy [1, 8].

V roce 1871 Rayleigh vytvořil teoretický popis rozptylu světla na koloidních částicích, která je ovšem platná pouze pro dostatečně malé částice ($d = \lambda/20$) kulovitěho tvaru, které jsou od sebe dostatečně vzdáleny a nevykazují vlastní absorpci světla. Vztah vyjadřující intenzitu rozptýleného světla pak vypadá:

$$\left(\frac{I}{I_0}\right)_v = \frac{16 \pi^4}{r^2 \lambda^4} \cdot \left(\frac{-\alpha}{4\pi\epsilon_0}\right)^2$$

Kde ϵ_0 nám značí permitivitu vakua, r je vzdálenost od detektoru a α označuje polarizabilitu částice [1].

Jako další významná vlastnost koloidních roztoků je tzv. dynamický rozptyl světla, kdy dochází ke kolísání intenzity rozptýleného záření v čase okolo průměrné hodnoty vlivem difúzního pohybu částic. Z časového průběhu kolísání intenzity rozptýleného světla, můžeme změřit rychlost pohybu částice prostředím, z čehož můžeme určit rozměr částice, která rozptyluje záření. V dnešní době existuje celá řada přístrojů pro zjišťování velikostní distribuce koloidních částic, která je založena na principu dynamického rozptylu. Jako příklad si můžeme uvést například ultramikroskop, který se používá k nepřímému sledování koloidních částic [1].

3.4 ELEKTRICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV

U koloidních systémů, které jsou tvořeny tuhou disperzní fází a kapalným disperzním prostředím, se můžeme setkat se znatelnými elektrickými vlastnostmi, které jsou způsobeny přítomností elektrického náboje. Vzniklý elektrický náboj nerozhoduje pouze o chování nabitých částic v elektrickém poli, ale také ovlivňuje stabilitu koloidních roztoků [8, 9, 1, 7].

3.4.1 ELEKTROKINETICKÉ JEVY

Jako elektrokinetické jevy označujeme jevy, které nastávají při pohybu fáze s elektrickou dvojvrstvou vůči roztoku v důsledku rozdělení elektrické dvojvrstvy a vzniku elektrokinetického potenciálu. Mezi tyto jevy řadíme elektroforézu, sedimentační potenciál, potenciál proudění a také elektroosmózu [10].

Na začátek je tedy třeba si vysvětlit, co je elektrická dvojvrstva. Jak již bylo zmíněno, elektrokinetické jevy jsou zapříčiněny existencí elektrického náboje na fázovém rozhraní mezi disperzním prostředím a fází. Tento náboj vzniká buď ionizací funkčních skupin povrchových molekul, nebo absorpcí iontů nacházejících se v disperzním prostředí. Díky tomuto náboji dochází k vytvoření elektrického pole, jehož vlivem dochází k uspořádání opačných nábojů v těsné blízkosti zmíněného rozhraní za vzniku útvaru skládajícího se ze

dvou vrstev s opačně nabitými ionty, nazývané též jako elektrická dvojvrstva. Elektrické potenciály „ φ “ jsou rozdílné mezi nabitým povrchem a objemovou fází disperzního prostředí. Znaménko potenciálu na povrchu částice „ φ_0 “ a znaménko povrchového náboje jsou stejné [1].

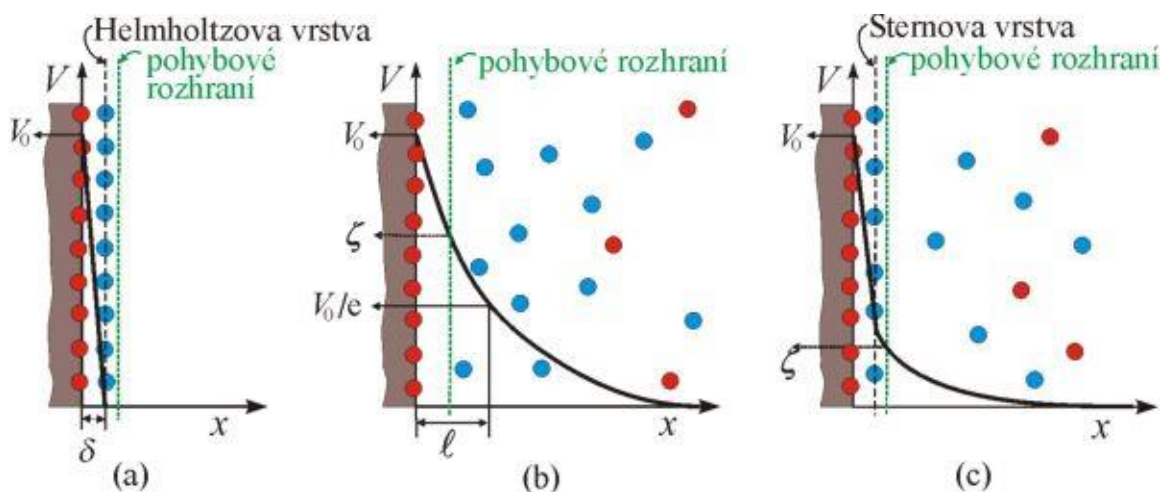
Podle teorie Helmholtze si můžeme elektrickou dvojvrstvu představit jako deskový kondenzátor, který je tvořen dvěma deskami, z nichž jedna je přímo spojena s povrchem tuhé látky a druhá deska, která nese opačně nabitý iont, je v kapalině, ve velmi malé vzdálenosti od desky první. Stejně jako potenciál deskového kondenzátoru i potenciál v dvojvrstvě klesá velmi strmě. Z hlediska koloidní chemie toto schéma uspořádání elektrické dvojvrstvy neodpovídá skutečnosti, neboť neobjasňuje řadu skutečností týkající se elektrokinetických jevů [9, 1].

Teorie elektrické dvojvrstvy s difúzní vrstvou protiiontů, jenž byla navržena Gouyem a nezávisle také Chapmanem byla významným pokrokem a do značné míry tak odstranila nedostatky Helmholtzovy teorie. Podle této teorie ionty nacházející se na povrchu částice nemohou vázat ekvivalentní množství protiiontů v protivrstvě, neboť vlivem difúze se pohybují a jsou tak rozptylovány v kapalně fázi v určité vzdálenosti od rozhraní. Pouze určitý počet protiiontů je poután k první vrstvě iontů, která určuje povrchový náboj na koloidní částici a nazývá se jako vnitřní (kompaktní) vrstva. V tzv. vnější (difúzní) vrstvě dochází k soustředění zbývajících částí opačně nabitých iontů. Gouyho-Chapmanova teorie má bohužel spoustu nedostatků. Tato teorie ionty považuje za bodové náboje, které se mohou přiblížit libovolně blízko k první vrstvě, a nepočítá tedy se skutečnými rozměry iontů. Dalším nedostatkem je neschopnost vysvětlit změnu znaménka elektrokinetického potenciálu, po přidání elektrolytu s vícevázaným iontem nesoucí opačný náboj, než má disperzní fáze do systému. Také tuto teorie nelze použít na vysoce koncentrované systémy, kde selhává a nakonec nedokáže vysvětlit rozdílné působení různých iontů stejné valence na elektrickou dvojvrstvu.

Sternova teorie struktury elektrické dvojvrstvy byla navržena roku 1924 Sternem, kdy model elektrické dvojvrstvy do značné míry překonává obtíže spojené s Helmholtzovou a Gouyho-Chapmanovu teorií, tedy již jsou v ní zahrnuty jak rozměry iontů, tak i specifické neelektrické interakce iontů s povrchem tuhé fáze. Podle Sterna jsou za pomoci elektrostatických a adsorpčních sil k vnitřní vrstvě iontů přitahovány ionty opačného znaménka. Tzv. Sternova vrstva, ve které dochází přirozeně k prudkému poklesu elektrického potenciálu, je k povrchu těsně přiléhající vrstva protiiontů, která je tvořená převážně adsorpčními silami vázané ionty a spolu s ionty, které jsou vázané na povrchu částice

vytváření již zmíněnou kompaktní vnitřní vrstvy. Součástí difúzní vrstvy jsou protiionty nacházející se ve větší vzdálenosti od částic, které jsou přitahovány elektrostatickými silami. Kompaktní vrstva iontů s částicí se bude pohybovat v případě, že částice s elektrickou dvojvrstvou se bude pohybovat vůči nepohyblivému disperznímu prostředí, zatímco difúzní vrstva se s částicí nepohybuje. Jako pohybové rozhraní pak nazýváme rozhraní, které nám odděluje pohyblivou a nepohyblivou část elektrické dvojvrstvy. Rozdíl potenciálů na pohybovém rozhraní, ustavující se při relativním pohybu tuhé fáze s elektrickou dvojvrstvou vůči roztoku nazýváme jako elektrokinetický potenciál neboli ζ -potenciál, který je příčinou vzniku elektrokinetických jevů. O tom, jaké bude mít ζ -potenciál znaménko, rozhoduje specifická adsorpce iontů a o jeho velikosti bude rozhodovat převážně iontová síla roztoku, ale také absorbované ionty. Po přidavku elektrolytu do systému budou přecházet opačně nabití ionty z difúzní části elektrické dvojvrstvy blíž k vnitřní části této dvojvrstvy, což povede ke zmenšení difúzní části, a to následně povede ke snížení hodnoty potenciálu ζ a tím zároveň ke ztrátě stability koloidních částic. Naopak při ředění systému se nám bude difúzní vrstva rozšiřovat a ζ -potenciál bude vzrůstat [9, 1, 11].

Všechny modely elektrických dvojvrstev jsou znázorněny na obrázku č. 2:



Obr.2: Modely elektrické dvojvrstvy [12]

a) Helmholtzův model b) Gouyho-Chapmanův model c) Sternův model

Jak již bylo zmíněno, mezi elektrokinetické jevy patří elektroforéza, elektroosmóza, sedimentační potenciál a potenciál proudění. Tyto jevy se dají rozdělit do dvou skupin, kdy v prvním případě je v klidu pevná fáze a pohybuje se fáze kapalná, v případě druhém je tomu naopak [2].

Do první skupiny spadají elektroosmóza a potenciál proudění. Potenciál proudění, nazývaný též jako průtokový proud, je inverzním jevem k elektroosmóze, při kterém dochází ke vzniku elektrického proudu a průtoku potenciálů při protlačování roztoku elektrolytu porézním materiálem. Jevem obráceným k elektroforéze, je elektroosmóza, kdy dochází k transportu kapaliny, který je vyvolaný vnějším napětím působícím na kapilárním systému. Pro bližší představu, si lze představit, že v případě vložení stejnosměrného potenciálního rozdílu na konce kapilární trubice naplněné kapalinou vytvářející elektrickou dvojvrstvu s vlastním potenciálem na kapilární stěně, za vhodných podmínek se pak uvede celý kapilární sloupec kapaliny do pohybu. Tento pohyb může být kompenzován protitlakem, který označujeme jako elektroosmotický [2, 1, 4].

Do skupiny druhé patří elektroforéza a sedimentační potenciál. Elektroforéza je nejnázornějším elektrokinetickým jevem a z hlediska praktického využití také nejvýznamnějším. Představme si, že bychom pomocí dvou inertních elektrod zavedli do kapalného disperzního systému stejnosměrné elektrické pole. Pod vlivem tohoto vnějšího elektrického pole se budou částice disperzní fáze, které mají nenulový povrchový náboj pohybovat v závislosti na znaménku náboje a to buď ke kladné či záporné elektrodě. Jednoduše lze říct, že elektroforéza je pohyb koloidních částic v elektrickém poli. Dalším jevem, který je jevem inverzním k elektroforéze, je sedimentační potenciál. Tento potenciál vzniká v silovém poli v disperzním prostředí při sedimentaci částic [4, 9, 2].

Všechny elektrokinetické jevy jsou citlivé na přítomnost elektrolytu v disperzním prostředí, kdy velký obsah elektrolytů může vést ke snížení intenzity projevů a to jak rychlosti elektroforézy a elektroosmózy, tak také velikosti průtokového a sedimentačního proudu a potenciálu. Dále může přidavek elektrolytů zapříčinit změnu znaménka vznikajících potenciálů nebo směru pohybu fází [4, 7].

3.5 STABILITA KOLOIDNÍCH SOUSTAV

Stabilitou koloidních soustav rozumíme jejich schopnost bránit se průběhu dějů, které mají za následek změnu jejich struktury, stupně disperzity, nebo změnu rozdělení částic podle rozměrů. Stabilitu je možno rozdělit na dva typy a to na kinetickou stabilitu, kdy se jedná o stálost, s jakou systém dokáže zachovat rozdělení koncentrace částic v gravitačním poli a

stabilitu agregátní, kdy se jedná o stálost, s jakou systém dokáže zachovat svůj stupeň disperzity. Koloidní disperze mohou být buď úplně nestabilní, kdy doba jejich existence je v řádech sekund až zlomků sekund, nebo se můžeme setkat se systémy prakticky stálými, kdy se změny soustavy projevují až po velmi dlouhé době [5].

Koloidní soustava má přebytek povrchové energie díky velkému povrchu částic disperzní fáze, a to převážně tehdy, jsou-li interakce slabé mezi molekulami disperzní fáze a disperzního prostředí. Taková soustava pak existuje ve stavu se zvýšenou energií nazývanou jako tzv. metastabilní stav. Překoná-li koloidní soustava určitou energetickou bariéru, může se dostat do stavu s nižší povrchovou energií. Jako aktivační energii pak označujeme energii potřebnou pro překonání již zmíněné energetické bariéry. Obecně lze tedy říct, že pro stabilitu koloidní soustavy musíme vytvořit dostatečnou energetickou bariéru, která nám bude zabraňovat ve spojování částic a tím poklesu povrchové energie [1].

Mezi částicemi disperzní fáze koloidní soustavy se uplatňují přitažlivé a odpudivé mezimolekulární síly. V případě, že dochází ke spojování částic koloidní soustavy vlivem silných přitažlivých sil, kdy již není možné je převést zpět do koloidní formy, nastává děj označovaný jako koagulace. Vzniklý útvar nazýváme jako koagulát. V případě, kdy převažují odpudivé mezimolekulové síly důsledkem dostatečné vzdálenosti částic, koloidní soustava je stabilní. Velikost přitažlivých a odpudivých sil nám bude klesat v případě dalšího nárůstu vzdálenosti částic. V tomto případě může docházet k tzv. flokulaci, při které vznikají útvary, flokuláty, ve kterých jsou částice poutány velmi slabými silami, kdy je možné je zpětně od sebe oddělit a převést je do koloidní formy. Souhrnně tyto jevy označujeme jako agregace a útvary, které vznikly agregací pak jako agregáty [1].

3.5.1 STÉRICKÁ STABILIZACE

Koloidní disperze je možné stabilizovat dvěma způsoby – elektrostatickou a stérickou. Za stérickou stabilizaci považujeme stabilizaci koloidních lyofobních částic za pomoci lyofilních koloidů, jako například želatina, polymery či povrchově aktivní látky, které vytvářejí na povrchu částic dostatečně silnou adsorpční vrstvu, která brání jejich agregaci. Tato stabilizace může být účinná pouze v případě, že povrch částice je zcela pokryt dostatečně silnou vrstvou pevně vázané stabilizující látky a v případě vhodně zvolené koncentrace této látky (za určitých podmínek mohou mít jinak tyto látky opačný účinek) [1, 5].

3.5.2 ELEKTROSTATICKÁ STABILIZACE

Způsob jakým lze dále zabránit agregaci v systémech je stabilizace elektrickou dvojrůstvou. Takovou stabilizaci označujeme jako elektrostatickou. Vlivem elektrostatických odpudivých sil, jenž převažují nad přitažlivými mezimolekulovými interakcemi, se elektricky nabitě částice odpuzují a brání tak jejich agregaci. Po přidání elektrolytu však může dojít k silné komprimaci elektrické dvojrůstvy, ba dokonce lze zcela zrušit povrchový náboj, což vede k destabilizaci koloidní soustavy [1].

Derjagin a Landau nezávisle pak i holandští vědci Verweya Overbeek vypracovali teorii koagulace elektrolyty, po nichž je pojmenována jako teorie DLVO. Za pomoci této teorie se fyzikálně popisuje koagulace koloidních částic způsobená elektrolyty, přičemž bere v úvahu jak přitažlivé mezimolekulové interakce, tak i odpudivé elektrostatické síly povrchově nabitých koloidních částic. Následkem přidavku elektrolytu do koloidního systému, dochází ke stlačení elektrické dvojrůstvy a tak ke snižování velikosti ζ -potenciálu – tím se sniží intenzita odpudivých sil mezi částicemi a částice se tak mohou k sobě více přiblížit a následně spojovat. Aby ale došlo k agregaci, je zapotřebí, aby byl překročen tzv. koagulační práh – γ [mol/dm³], tedy koncentrace přidávaného elektrolytu musí být dostatečná, aby překonala energetickou bariéru elektrické dvojrůstvy [1, 9].

3.6 METODY PŘÍPRAVY KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ

Koloidní systémy zaujímají podle velikosti částic disperzní fáze polohu mezi pravými roztoky a makroskopickými heterogenními soustavami. Můžeme je tak připravit dvěma způsoby. První způsob označujeme jako kondenzační metodu, při které vzniká koloidní systém spojováním molekul analytických disperzí. Další metodu nazýváme jako dispergační, při které jsou hrubě disperzní soustavy rozptýlovány za vzniku menších částic [5, 1].

3.6.1 METODY DISPERGAČNÍ

V případě dispergačních metod vycházíme z tuhé fáze, hrubých suspenzí nebo sraženin, které převedeme vhodným způsobem na disperzní stupeň odpovídající koloidnímu roztoku. Koloidní soustavy jsou tak připravovány mechanickým nebo vibračním rozmělněním částic hrubě disperzního podílu. Na přípravu koloidních soustav touto metodou je nutno vynaložit práci, jejíž část se v soustavě uloží jako Gibbova energie fázového rozhraní. Koloidní částice lze tak připravit mletím, za pomoci tzv. kulových mlýnů. Další možností je použití ultrazvuku, který je možné použít převážně u málo pevných látek. Dále mezi

dispergační metody můžeme zařadit přípravy s využitím elektrického proudu, kdy vlivem elektrického oblouku mezi elektrodami dochází k odtrhování částic z elektrod. Tato metoda je ale spojením jak dispergačních tak kondenzačních metod, neboť současně dochází i k odpařování materiálu z povrchu elektrod a tak k následné kondenzaci. Nejnovější metodou spadající pod kondenzační metody je tzv. laserová ablace, kdy dochází k tvorbě koloidní soustavy důsledkem působení laserového paprsku s velmi vysokou energií na povrch pevné fáze[5, 1, 8].

3.6.2 METODY KONDENZAČNÍ

Při kondenzačních metodách se koloidní soustavy připravují z analytických roztoků, kdy molekulárně či iontově dispergovaná fáze se za vhodné změny podmínek převede na nerozpustnou sloučeninu, která vytváří sol shlukováním se na částičky koloidní velikosti. Toho lze dosáhnout buď fyzikálními metodami či chemickými reakcemi [1, 8].

Na změně rozpustnosti látek jsou založeny postupy s využitím fyzikálních metod. Kondenzaci látky za vzniku koloidních částic lze vyvolat změnou rozpouštědla, ve kterém se daná látka hůře rozpouští. Jako další fyzikální postup přípravy lze zařadit ochlazování par kovů nebo uhlíku na vhodné podložce [1].

U chemických metod se využívá vhodné chemické reakce, kdy se z původně rozpustné látky stane látka nerozpustná v daném prostředí. Tyto metody umožňují přípravu většího počtu koloidních systémů o různém chemickém složení, proto jsou podstatně využívanější [1].

4 KOLOIDNÍ STŘÍBRO

Stříbrné koloidní částice o velikosti jednotek až stovek nanometrů díky svým unikátním biologickým, optickým a katalytickým vlastnostem patří k nejvíce studovaným. Svoji pozornost získávají nejen ve výzkumných laboratořích, ale i v běžné praxi, kdy se používají například při výrobě ponožek, obuvi, polštářů, zubních past nebo jako nátěry ledniček a vysavačů. Dále své uplatnění nacházejí také v medicíně k impregnaci gázy nebo k vytvoření antibakteriálního povlaku na lékařských pomůckách a další [16, 48, 13].

4.1 METODY PŘÍPRAVY KOLOIDNÍCH ČÁSTIC STŘÍBRA

Jak bylo již popsáno výše, koloidní soustavy můžeme připravit buď dispergací nebo kondenzací, případně za přítomnosti látky, která zastaví jejich růst a stabilizuje vzniklé částice. V přípravě koloidního stříbra převládají převážně metody kondenzační, a obzvláště pak tzv. roztokové (wet) metody, které jsou založené na chemické redukci rozpuštěné sloučeniny stříbra [14, 3].

Redukce patří tedy mezi časté způsoby přípravy nanočástic stříbra, při kterých se používá různých organických a anorganických činidel, ze kterých můžeme zmínit například redukující cukry (Tollensova metoda), tetrahydridoboritan sodný nebo citrát sodný.

Metoda Leeho a Meisela, nazývaná též jako citrátová a Creightonova metoda zvaná též jako borohydridová, patří mezi metody neznámější. Borohydridová metoda přípravy stříbra je založena na redukci dusičnanu stříbrného silným redukčním činidlem – tetrahydridoboritanem sodným ve vodném prostředí. Dochází ke vzniku nanočástic o velikosti 5-20 nm, kdy vzniklá disperze je stabilní i několik měsíců. V případě použití citrátového aniontu (citrát sodný) jako redukčního činidla, hovoříme o citrátové metodě podle Leeho a Meisela. Vznikající částice stříbra jsou zároveň stabilizovány citrátem sodným. U této metody probíhá redukce za varu a vznikající částice se pohybují v rozmezí od 30 do 120 nm [14, 15].

U další metody se jako redukční činidlo používá redukující cukr, který redukuje amoniakální komplex stříbra. Tuto metodu nazýváme jako modifikovanou Tollensovu metodu. Jako redukující cukry v této metodě, je možné použít jak disacharidy (maltosa, laktosa), tak i monosacharidy (glukosa, galaktosa, fruktosa). Vzniklé nanočástice jejichž velikost, kterou lze řídit výběrem redukujícího cukru, teplotou, úpravou pH a koncentrací amoniaku (komplexotvorné činidlo), se pohybuje v rozmezí od 25 do 75 nm mající dobré katalytické a antibakteriální účinky. Jelikož vzniklá disperze lehce podléhá agregaci, je třeba

ji stabilizovat. Ke stabilizaci koloidních disperzí se nejčastěji používají ionické a neionické tensidy (SDS, Tween), želatina nebo vybrané polymerní látky (PVP, PEG) [16].

Mimo těchto redukčních činidel lze k přípravě nanočástic stříbra použít například vodík, hydrazin, formaldehyd a jeho deriváty, EDTA, jednoduché cukry i peroxid vodíku [14].

4.2 BIOLOGICKÉ ÚČINKY NANOČÁSTIC STŘÍBRA

Velmi významnou vlastností nanočástic stříbra je jejich výrazná biologická aktivita. Již od dob Starého Egypta se stříbro využívalo převážně pro své antibakteriální účinky, které se využívaly převážně k léčbě infekcí. Flemingův objev penicilinu v první polovině 20. století ale vedl k ústupu využívání stříbra do pozadí a došlo k velkému rozmachu ve výzkumu antibiotik. V dnešní době klasická antibiotika nejsou již tak účinná a mnohé bakteriální kmeny si vytvořili vůči nim rezistenci. To je důvod proč se opět navrácí zájem k výzkumu stříbra a to převážně v koloidní formě, u něhož bylo dokázáno, že účinně inhibuje růst bakterií a nedochází k vytvoření rezistence [14, 17].

Největší obavy vyvolávala toxicita stříbra, která se projevovala změnou barvy pokožky. Takové onemocnění se označuje jako Argyrie a zahrnuje ukládání stříbrných zrníček v kůži, sliznicích a převážně ve vnitřních orgánech. Tyto obavy ale byly následně vyvráceny hlubším zkoumáním antibakteriálních účinků nanočástic stříbra, při kterých se zjistilo, že v nízkých koncentracích není pro lidské buňky téměř toxické [14].

Jelikož mechanismus antibakteriálního účinku nanočástic stříbra nebyl doposud úplně vysvětlen, bylo navrženo několik možností. První z nich je interakce nanočástic se sírou a fosforem v molekulách enzymů a proteinů po průniku přes buněčnou membránu bakterií, jenž způsobí buněčnou smrt, zapříčiněnou negativním ovlivněním buněčného dýchání a transportu iontů přes membrány bakterie. Druhou je oxidační stres v důsledku vzniku reaktivních forem kyslíku vytvořených na povrchu nanočástic. Posledním známým mechanismem je destabilizace vnější membrány bakterií nanočásticemi a následné snížení hladiny adenosintrifosfátu, který představuje hlavní zdroj energie pro buňku [13, 17, 18].

Bylo zjištěno, že antibakteriální aktivita nanočástic stříbra úzce souvisí s jejich velikostí, stabilitou a také tvarem. V případě velikosti platí, že čím menší budeme mít nanočástici, a tím pádem větší povrch částice, tím více bude vykazovat antibakteriální efekt. Tyto antibakteriální účinky nanočástic stříbra, které byly připraveny modifikovanou Tollensovou metodou za použití různých redukujících cukrů byly studovány vůči rezistentním

druhům běžných bakterií pomocí stanovení minimální inhibiční koncentrace – MIC, kdy se dokázalo, že opravdu vyšší antibakteriální aktivitu vykazují menší částice již při koncentraci stříbra pod 2 µg/ml. Další studium antibakteriální aktivity nanočástic stříbra v závislosti na velikosti provedl Sotiriou a Pratsinis na gram-negativní bakterii *Escherichii coli*, kdy na nanostrukturní částice oxidu křemičitého bylo navázáno nanostříbro, přičemž bylo zjištěno, že nanočástice menší než 10 nm uvolňují vysoké koncentrace stříbrných iontů a antibakteriální aktivita je jimi ovládána. Mají-li nanočástice větší rozměr, koncentrace uvolněných iontů je nižší a vliv na antibakteriální aktivitu mají již jen částice samotné [20, 21, 22, 23].

Za pomoci gram-negativní bakterie *Escherichia Coli* byl zjišťován vliv tvaru na antibakteriální aktivitu nanočástic stříbra, kdy snímky z elektronového mikroskopu poukázaly na značné změny buněčných membrán stříbrem ovlivněných bakterií. Nanočástice kulovitého a tyčinkovitého tvaru spolu s iontovým stříbrem, nevykazovali tak silné biocidní účinky jako stříbrné nanočástice trojúhelníkového tvaru [22].

Některými studiemi byla prokázána i antifungální aktivita nanočástic stříbra, připravených modifikovanou Tollensovou metodou, prostřednictvím stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), minimální fungicidní koncentrace (MFC) a časové závislosti inhibice růstu kvasinek. Zároveň byla stanovena cytotoxicita těchto částic proti lidským fibroblastům. Tato aktivita byla prokázána proti patogenní plísni *Candida spp.* (kvasinky), která je původcem plísňových infekcí vedoucí k otravě krve. Nanočástice stříbra měly již při koncentraci 0,21 mg/L Ag prokazatelný inhibiční účinek na testovaný vzorek kvasinek. V případě stabilizace nanočástic stříbra dodecylsulfátem sodným se dosáhlo nejnižší inhibiční koncentrace 0,05 mg/L Ag na testované kultuře *Candida albicans* II. Získané hodnoty MIC nanočástic stříbra byly srovnatelné a u stabilizovaných nanočástic dokonce nižší než MIC běžných antimykotik [24].

Další studie se zabývala zkoumáním antibakteriálních vlastností stříbra v kombinaci s antibiotiky, kdy se dosáhlo zvýšené účinnosti antibiotik (Kanamycin, Ampicillin, Erythromycin, Chloramphenicol). Pro *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus* a *Micrococcus lutes* byli získané hodnoty minimální inhibiční koncentrace MIC nanočástic stříbra 30, 35, 80 a 65 µg/ml [25].

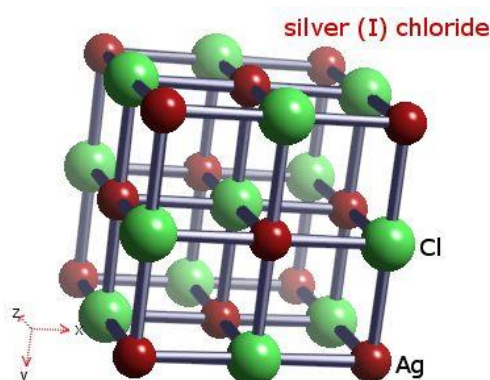
4.3 HALOGENIDY

Halogenidy jsou binární sloučeniny halogenů s méně elektronegativními prvky. Lze je rozdělit do tří skupin podle charakteru vazby, který závisí na elektronegativitě prvku na

halogenidy iontové, molekulové a polymerní. Nás budou zajímat pouze halogenidy iontové, které vznikají při slučování halogenů s některými kovy o malé elektronegativitě. Kationty kovů a anionty halogenů X^- tvoří jejich strukturu. Pod iontové halogenidy spadají halogenidy alkalických kovů a kovů alkalických zemin a také halogenidy některých přechodných kovů. Jsou to krystalické, pevné a křehké látky, které se vyznačují vysokými teplotami tání a v roztaveném stavu vedou elektrický proud. V případě, že je rozpustíme ve vodě, budou se chovat jako silné elektrolyty [26, 27].

4.3.1 CHLORID STŘÍBRNÝ

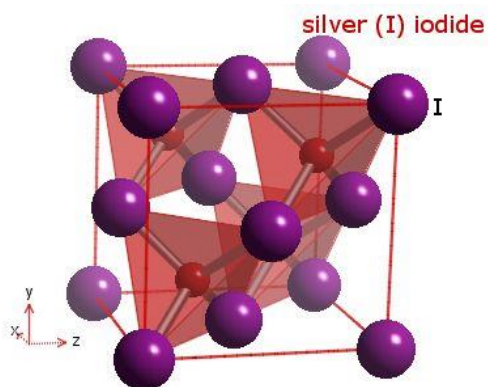
Chlorid stříbrný je bílá práškovitá látka, prakticky nerozpustná ve vodě. Lze ji ale rozpustit ve vodném roztoku amoniaku za vzniku diammin-stříbrného komplexu $[Ag(NH_3)_2]^+$. Vyznačuje se teplotou tání 455°C a varu $1\,550^\circ\text{C}$ [28, 29].



Obr. 3: Struktura chloridu stříbrného [28]

4.3.2 JODID STŘÍBRNÝ

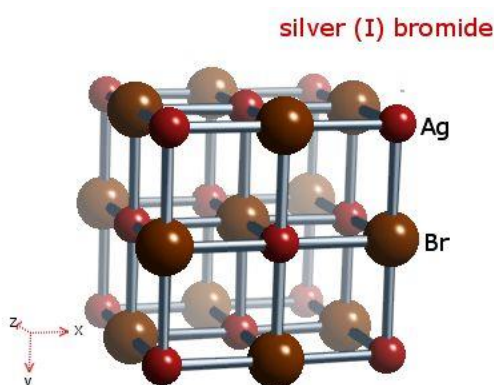
Jodid stříbrný je žlutá pevná látka s teplotou tání 554°C a varu $1\,506^\circ\text{C}$, prakticky nerozpustná ve vodě a velmi špatně rozpustná v koncentrovaném roztoku amoniaku. Své využití nachází ve fotografii a v medicíně jako antiseptikum [29, 30].



Obr. 4: Struktura jodidu stříbrného [30]

4.3.3 BROMID STŘÍBRNÝ

Bromid draselný je žlutá krystalická látka, vyznačující se teplotou tání 432 °C a varu 1 303 °C. Opět je prakticky nerozpustná ve vodě, ale v roztoku amoniaku ano. Své uplatnění nachází převážně ve fotografickém průmyslu [29, 31].



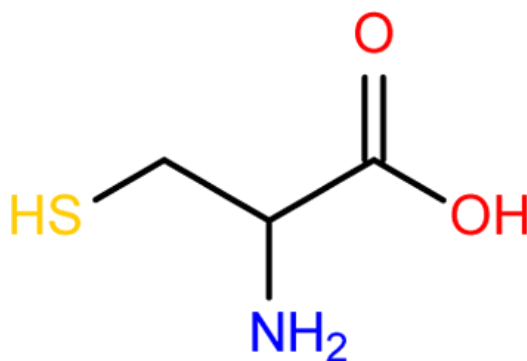
Obr. 5: Struktura bromidu stříbrného [31]

4.4 AMINOKYSELINY

Aminokyseliny jsou stavebními jednotkami bílkovin, mající dvě charakteristické skupiny: aminoskupinu -NH_2 a karboxylovou skupinu -COOH . V bílkovinách se objevuje pravidelně dvacet různých aminokyselin, které se od sebe liší vedlejším řetězcem R. Můžeme je pak rozdělit do čtyř skupin. Do první skupiny spadají aminokyseliny s nepolárním zbytkem R, tedy s uhlovodíkovým postranním řetězcem, druhá skupina zahrnuje aminokyseliny s neionizovanými, avšak polárně působícími skupinami (tj. -OH , -SH , -CO.NH_2 a některými heterocykly) v postranním řetězci. Ve třetí skupině kyselé aminokyseliny obsahují ve zbytku R druhou karboxylovou skupinu („aminodikarboxylové kyseliny“) a poslední skupina basických aminokyselin obsahuje navíc další basickou skupinu [32, 33].

4.4.1 CYSTEIN

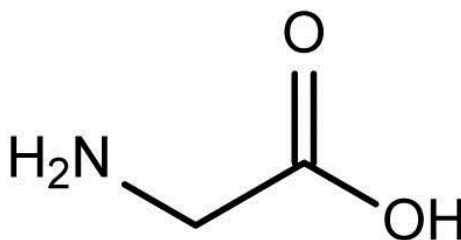
Cystein (α -amino- β -merkaptopropionová kyselina) patří do skupiny aminokyselin obsahující neionizované, avšak polárně působící skupiny v postranním řetězci. Obsahuje tedy poměrně reaktivní –SH (thiolovou) skupinu, která se snadno oxiduje za vzniku disulfidové vazby [32, 34].



Obr. 6: Struktura cysteinu [35]

4.4.2 GLYCIN

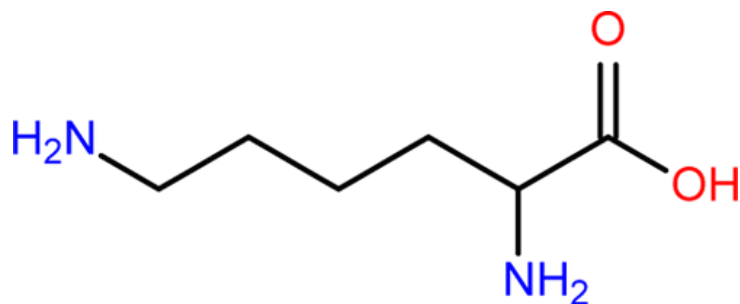
Glycin (kyselina aminooctová) spadá pod aminokyseliny obsahující nepolární zbytek R, tedy uhlovodíkový postranní řetězec. Jedná se o nejjednodušší, neesenciální aminokyselinu bez asymetrického uhlíku [32, 36].



Obr. 7: Struktura glycinu [37]

4.4.3 LYSIN

Lysin (kyselina α,ϵ -diaminokapronová) je bazická aminokyselina, obsahující v postranním řetězci primární aminoskupinu, která dodává basický charakter [38].



Obr. 8: Struktura lysinu [39]

4.4.4 VLIV AMINOKYSELIN A HALOGENIDŮ NA NANOČÁSTICE STŘÍBRA

Již mnoho studií zkoumalo ovlivňování koloidního stříbra halogenidy popřípadě aminokyselinami. Zong-Ming Xiu, JieMa a Pedro J.J.Alvarezdošli na to, že toxicitu stříbrných iontů lze eliminovat ekvivalentním cysteinem a sulfidem, ale také ekvivalentní koncentrace chloridu dokáže zredukovat toxicitu Ag^+ iontů bez překročení součinu rozpustnosti [40].

P. X. Zhang, Y. Fang, W. N. Wang, D. H. Ni a S. Y. Fu pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) přímo zjišťovali vliv KCl na koloid stříbra. Bylo zjištěno, že došlo ke zvětšení velikosti částic a povrch krystalových částic stříbra byl obalen „příkrývkou“. Dále, nanočástice mají tendenci agregovat a vytvářet řetězce [41].

Další studie zkoumala vliv chloridových iontů na transformaci tvaru stříbrných nanočástic. K pozorování vývoje transformace nanodestiček byli použity metody UV/VIS spektroskopie a TEM. Bylo zjištěno, že Cl^- může „ořezat“ rohy a postranní strany nanohranolu a vznikne tak diskovitý tvar nanočástic. Efekt chloridu, který má „ořezávací“ účinky je způsoben rozdílem energie na povrchu každé ze stěn nanočástice. Tloušťka nanodisku vzrůstala při procesu „ořezávání“, díky změně pozice shluků nanočástic v rovinách [42].

Bromidový nebo jodidový iont může mít také vliv na redukční přípravu koloidních částic stříbra, založenou na redukci stříbrné soli glukózou v prostředí vodného roztoku amoniaku. Získané experimentální výsledky ukazují, že stříbrné částice vznikají přímou redukcí částic sraženiny příslušného stříbrného halogenidu, přičemž významný vliv přítomnosti amoniaku v systému byl pozorován pouze u bromidových iontů. Připravené koloidní částice stříbra mají velikost řádově okolo 100 nm, ovšem v mnoha případech jeví silnou tendenci k aglomeraci [43].

Doposud se žádná studie nezabývala vlivem aminokyselin a halogenidů na biologickou aktivitu nanočástic stříbra, ale z dosud zjištěných informací, kdy víme, že dochází

vlivem těchto látek ke změně velikosti a tvaru nanočástice stříbra, lze předpokládat, že dochází i k ovlivnění biologické aktivity.

4.5 APLIKACE NANOČÁSTIC STŘÍBRA

V dnešní době nacházejí nanočástice stříbra velké uplatnění převážně díky jejich jedinečným fyzikálně chemickým vlastnostem, kdy mezi nejvýznamnější patří převážně optické a elektrické vlastnosti spolu s antimikrobiální a katalytickou aktivitou. Proto se dnes můžeme setkat se širokou škálou výrobků od ponožek, zubních kartáčků, lékařských pomůcek, mycích prostředků až po elektroniku, které obsahují nanočástice stříbra [44].

Díky schopnosti koloidního stříbra ničit houby, plísňe a parazity a zároveň napomáhat k regeneraci buněk se využívá v lékařství při léčbě některých kožních chorob, jako jsou opary, ekzémy a vyrážky. Dále se schopnosti zastavit množení a růst bakterií využívá k čištění vody. Antibakteriální aktivity nanočástic stříbra se také využívá při výrobě různých medicínských materiálů, kdy se vytvářejí antibakteriální povlaky na lékařských pomůckách nebo se impregnují obvazové materiály a gázy. Dále se do budoucnosti počítá s využitím nanočástic stříbra při výrobě cévních náhrad [45, 46, 14].

Ramanova spektroskopie je populární analytická metoda, která se používá pro různé chemické analýzy. Tato metoda je však omezena nižším detekčním limitem. SERS (povrchově zesílená Ramanova spektroskopie) je metoda umožňující použití Ramanovy spektrometrie v rozsahu nízkých koncentrací analytu a dokonce i při detekci jediné molekuly. Neelasticky rozptýlené záření, nazývané Ramanův rozptyl můžeme zesílit převážně právě použitím stříbrných nanomateriálů. Na povrchu stříbrných nanomateriálů dochází k rezonanci lokalizovaných povrchových plasmonů, způsobené dopadem viditelného záření a vzniká tak silné elektromagnetické pole. Analyt emitující Ramanovo rozptýlené záření, který se nachází v dosahu tohoto elektromagnetického pole, zvýší svůj indukovaný dipól o několik řádů a tím i intenzitu jím emitovaného rozptýleného záření [47].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 MATERIÁL A METODY

5.1 CHEMIKÁLIE

Pro přípravu koloidního stříbra byly použity následující chemikálie: dusičnan stříbrný (p.a., Fagron), hydroxid sodný mikropely (p. a., Lach-Ner), amoniak (vodný roztok, 28-30%, Sigma-Aldrich), D(+)-maltosa monohydrát (Sigma-Aldrich). K ředění roztoků a doplňování objemu soustavy bylo použito destilované vody.

Pro experimenty sledující ovlivňování antibakteriální aktivity způsobené uvolňováním volných stříbrných iontů byly použity aminokyseliny cystein, glycin a lysin. Z halogenidů pak jodid, bromid a chlorid draselný.

K vytvoření kalibrační křivky byly použity zásobní roztoky chloridu, jodidu, bromidu draselného, thiokyanatanu draselného a dusičnanu stříbrného.

Jako referentní roztok při měření elektromotorického napětí potenciometricky byl použit dusičnan stříbrný o koncentraci 0,001 M.

Při měření elektromotorického napětí potenciometricky byl do solného můstku použit nasycený roztok dusičnanu draselného.

K zabránění koagulace nanočástic stříbra byla použita 3% želatina (p.a., Penta).

K testování antibakteriální aktivity byl použit kultivační bujon Mueller-Hinton (MH bujon), obsahujícím hovězí extrakt a kaseinový hydrolyzát.

5.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Za pomoci přístroje 90 plus Particle Size Analyser (Brook haven Instruments Corporation) byla měřena metodou dynamického rozptylu světla velikost připravených nanočástic stříbra.

S použitím spektrofotometru Specord S 600 (Analytik Jena, Germany), pracující v jednopaprskovém uspořádání, byly zaznamenávány absorpční spektra koloidních roztoků.

K získávání hodnot rovnovážného napětí roztoků byl použit potenciometr PHM210 (MeterLab).

5.3 PRACOVNÍ POSTUPY

5.3.1 PŘÍPRAVA KOLOIDNÍHO STŘÍBRA

Koloidní disperze nanočástic stříbra byla připravena modifikovanou Tollensovou metodou, při které dochází k redukci diamin-stříbrného komplexu maltosou v alkalickém prostředí.

K přípravě 250 ml koloidní disperze o koncentraci stříbra 108 mg/l byly nejprve připraveny odměrné roztoky v dostatečném množství, z nichž se pak odměřily následující objemy:

- 50 ml $5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ dusičnanu stříbrného
- 12,5 ml 0,1 mol/dm³ amoniaku
- 127,5 ml destilované vody
- 10 ml 0,24 mol/dm³ hydroxidu sodného
- 50 ml $5 \cdot 10^{-2}$ mol/dm³ maltosy.

Redukce probíhající za stálého míchání trvala 5 minut. Následně se připravený koloid odlil do kyvety, přičemž byla změřena jeho velikost částic a k získání absorpčního spektra byl tento roztok ještě desetkrát naředěn destilovanou vodou v kyvetě.

5.3.2 PŘÍPRAVA A MĚŘENÍ VZORKŮ PRO VYTVOŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY

Kalibrační křivka byla vytvořena na základě známé rozpustnosti sloučenin AgCl, AgBr, AgSCN a AgI. Halogenidy stříbra a thiokyanatan stříbrný byly připraveny smícháním 10^{-3} mol/L roztoku příslušného aniontu s 10^{-5} mol/L roztoku AgNO₃. Do kalibrační křivky byly rovněž zahrnuty roztoky dusičnanu stříbrného o koncentraci 10^{-4} a 10^{-5} mol/L. Tato řada zásobních roztoků byla proměřena potenciometricky, kdy se odpipetovalo do kádinky 15 ml zásobního roztoku, do kterého se přidalo 150 µl dusičnanu stříbrného o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l a jako referentní roztok se použil dusičnan stříbrný o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Oba roztoky byly propojeny solným můstkem naplněným nasyceným roztokem dusičnanu draselného. Ze získaných hodnot EMN v závislosti na rovnovážné koncentraci Ag⁺ iontů vypočítané ze součinu rozpustnosti příslušné málo rozpustné sloučeniny použité v kalibraci, byla sestavena kalibrační křivka.

5.3.3 VLIV VYBRANÝCH ANIONTŮ NA KONCENTRACI IONTOVÉHO STŘÍBRA UVOLŇOVANÉHO Z KOLOIDNÍCH ČÁSTIC Ag

Ke sledování koncentrace Ag^+ iontů uvolňovaných nanočásticemi stříbra byla sestavena řada vzorků zahrnující cystein, glycin a lysin o koncentracích v koloidu 0,01 M, 0,001 M, 0,0001 M, 0,00005 M a 0,00001 M. Dále pak jodid, bromid a chlorid draselný o stejných koncentracích jako uvedené aminokyseliny. Měření se provádělo potenciometricky s použitím dvou stříbrných elektrod, kdy se vždy do kádinky odpipetovalo dané množství koloidu a aminokyseliny (popř. halogenidu) na celkový objem 15 ml. Stejně jako u měření kalibrační křivky se jako referentní roztok použil dusičnan stříbrný o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M, kterého se do kádinky odpipetovalo 15 ml. Oba roztoky byly opět spojeny solným můstkem, naplněným nasyceným roztokem dusičnanu draselného.

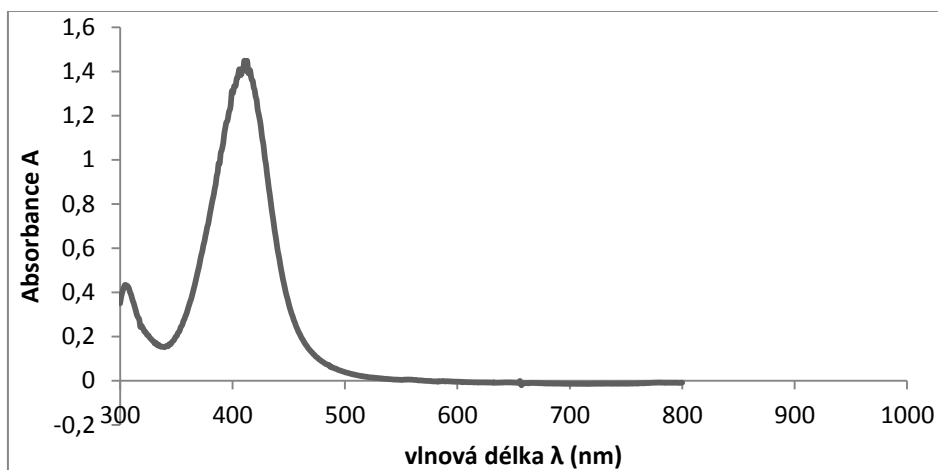
5.3.4 TESTOVÁNÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY

Dále bylo u vybraných vzorků prováděno testování antibakteriální aktivity standardní diluční metodou v Mueller-Hintonově bujonu, pomocí níž se stanovuje minimální inhibiční koncentrace, při které dochází k viditelnému potlačení růstu bakterie. Pro testování antibakteriální aktivity byly použity bakteriální kmeny *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermis* 1, *Staphylococcus epidermis* 2, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium* (VRE) a *Klebsiella pneumoniae* (ESBL). Ředění a kultivace vzorků byly prováděny na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE NANOČÁSTIC STŘÍBRA

Průměrná hodnota velikosti nanočástic stříbra (získaná metodou DLS), které byly připraveny modifikovanou Tollensovou metodou, jenž spočívá v redukci diamin-stříbrného komplexu maltosou, se pohybovala kolem 27 nm. Za pomoci UV/VIS spektrometru bylo získáno absorpční spektrum, které ukazuje, že absorpční maximum této disperze nastává při vlnové délce 408nm.



Obr. 9: UV/VIS spektrum vodné disperze koloidního stříbra připraveného modifikovanou Tollensovou metodou

6.2 KALIBRAČNÍ KŘIVKA

Získané hodnoty EMN byly vyneseny v závislosti na rovnovážné koncentraci iontového stříbra, která byla stanovena výpočtem ze známého součinu rozpustnosti použitých halogenidů stříbra (AgCl, AgBr, AgI) a thiokyanatanu stříbrného. V tabulce 2 jsou uvedeny vypočítané koncentrace iontového stříbra pro příslušné sloučeniny a jim odpovídající hodnoty EMN včetně roztoků AgNO₃ s koncentrací 10⁻⁴ a 10⁻⁵ mol/L. Za pomoci logaritmické spojnice trendu kalibrační křivky byly vypočítány koncentrace (rozpustnost) volných stříbrných iontů ve vzorcích koloidního stříbra.

Rovnovážná koncentrace Ag⁺ (AgX ⇌ Ag⁺ + X⁻) byla spočítána ze součinu rozpustnosti podle rovnice 1.

$$K_s = [Ag] \cdot (X^-) \cdot f_-^+$$

kde f je aktivitní koeficient spočítaný dle rovnice 2.

$$-\log f = 0,509 \cdot z^+ \cdot z^- \cdot \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}},$$

kde I je iontová síla, určena dle rovnice 3.

$$I = 0,5 \cdot \sum c_i \cdot z_i^2.$$

Výpočet koncentrace Ag^+ pro vytvoření kalibrační křivky:

Tabulka 2:

	K_s	Koncentrace Ag^+ [mol/l]	EMN [mV]
AgNO_3	-	$1 \cdot 10^{-4}$ mol/l	-63
AgNO_3	-	$1 \cdot 10^{-5}$ mol/l	-116
AgCl	$1,78 \cdot 10^{-10}$	$1,78 \cdot 10^{-7}$	-242
AgSCN	$1,07 \cdot 10^{-12}$	$1,15 \cdot 10^{-9}$	-311
AgBr	$4,89 \cdot 10^{-13}$	$5,26 \cdot 10^{-10}$	-364
AgI	$8,3 \cdot 10^{-17}$	$8,93 \cdot 10^{-14}$	-570

Vzorový výpočet koncentrace Ag^+ pro AgCl :



$$K_s = \text{Ag}^+ \cdot \text{Cl}^- \quad f = 1,000585887$$

$$[\text{Ag}] = \frac{K_s}{[\text{Cl}^-]} \cdot f^z$$

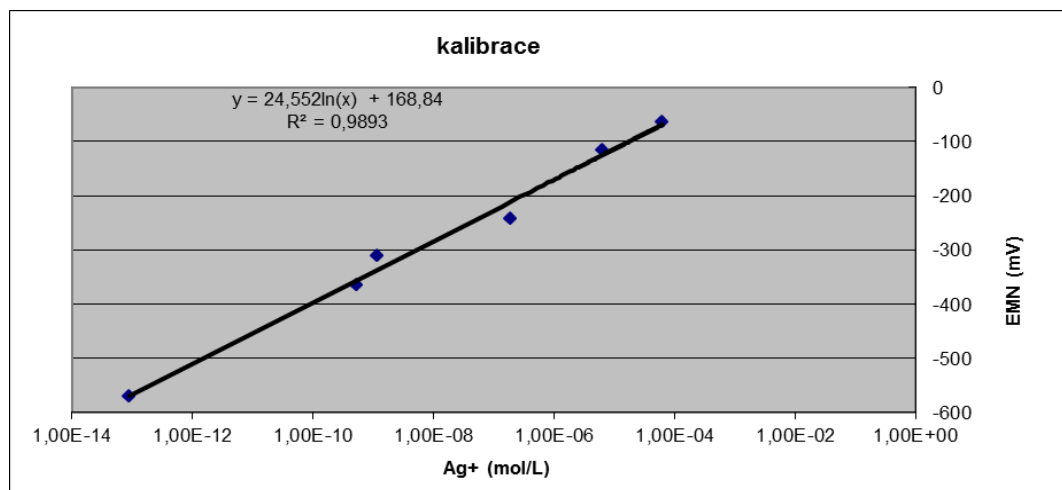
$$[\text{Ag}] = \frac{1,78 \cdot 10^{-10}}{1 \cdot 10^{-3}} \cdot 1,000585887^2$$

$$[\text{Ag}] = 1,782086 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$$

$$I = 0,5 \cdot \sum c_i \cdot z_i^2$$

$$I = 0,5 \cdot [c_{\text{Ag}} \cdot z^2 + c_{\text{Cl}} \cdot z^2]$$

$$I = 0,000505$$



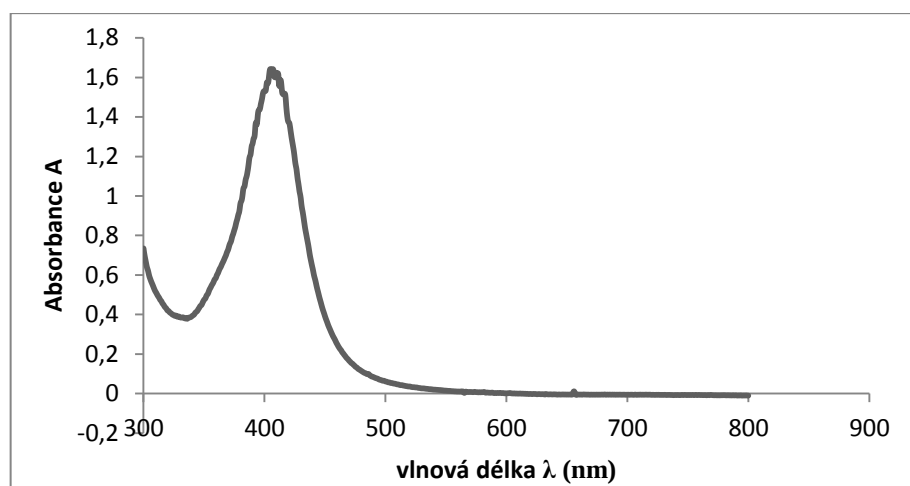
Obr. 10: Kalibrační křivka

6.3 VLIV GLYCINU NA KOLOIDNÍ STŘÍBRO

Po přidavku glycinu ke koloidnímu stříbru nedošlo k žádné změně barvy, tudíž lze předpokládat, že nedochází vlivem glycinu ke koagulaci nanočástic stříbra, ale pouze k vyvázání volných stříbrných iontů. V tabulce 3 můžeme vidět sérii vzorků, naměřenou hodnotu elektromotorického napětí a jejich vypočítanou koncentraci Ag^+ iontů. Měření bylo prováděno třikrát, kdy se hodnoty nakonec zprůměrovaly. Jak je patrné z tabulky 3, u všech vzorků koloidního stříbra s různými koncentracemi glycinu zůstala koncentrace Ag^+ iontů téměř totožná s koncentrací Ag^+ iontů čistého koloidu.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí a koncentrace volných stříbrných iontů u roztoků koloidního stříbra s různými koncentracemi glycinu

roztok	EMN (mV)	Směrodatná odchylka EMN	Koncentrace Ag^+ iontů (mol/L)
Čistý koloid	-173	0,816	$8,90 \cdot 10^{-7}$
0,00001M glycin v koloidu	-189	12,247	$4,64 \cdot 10^{-7}$
0,00005M glycin v koloidu	-191	3,266	$4,27 \cdot 10^{-7}$
0,0001M glycin v koloidu	-189	4,899	$4,64 \cdot 10^{-7}$
0,001M glycin v koloidu	-188	9,798	$4,74 \cdot 10^{-7}$
0,01M glycin v koloidu	-169	9,798	$1,05 \cdot 10^{-7}$



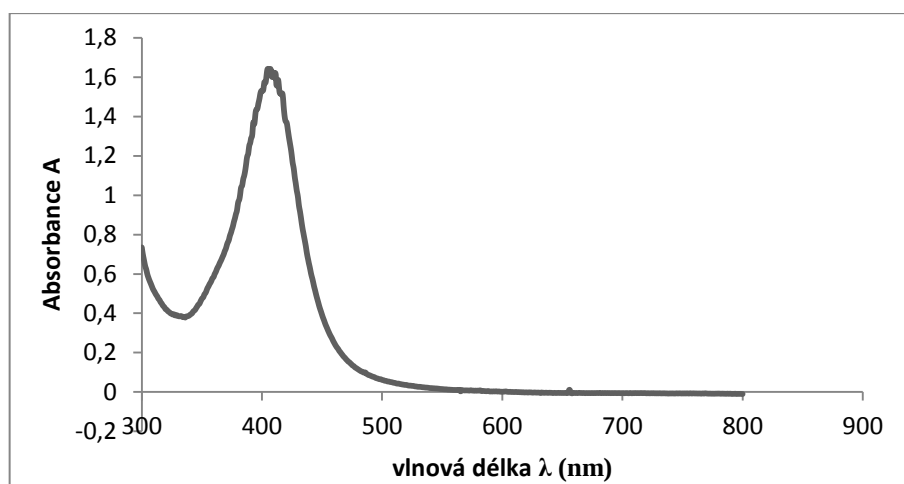
Obr. 11: UV/VIS spektrum vzorku 0,01M glycinu v koloidním stříbře

6.4 VLIV LYSINU NA KOLOIDNÍ STŘÍBRO

Lysin se choval podobně jako glycin, kdy opět nedošlo ke změně barvy s koloidem stříbra a zároveň nedošlo ani k tak výrazným změnám koncentrace Ag^+ . Lysin vyvazoval volné stříbrné ionty více (pokles až o 2 řády v porovnání s čistým koloidem) než glycin, což může být způsobeno tím, že lysin na rozdíl od glycinu, který obsahuje pouze jeden atom dusíku v molekule aminokyseliny, obsahuje tyto atomy dva.

Tabulka 4: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí a koncentrace volných stříbrných iontů u vzorků koloidního stříbra s různými koncentracemi lysinu

roztok	EMN (mV)	Směrodatná odchylka EMN	Koncentrace Ag^+ iontů (mol/L)
Čistý koloid	-175	0,816	$8,20 \cdot 10^{-7}$
0,00001M lysin v koloidu	-199	5,715	$3,08 \cdot 10^{-7}$
0,00005M lysin v koloidu	-198	1,633	$3,21 \cdot 10^{-7}$
0,0001M lysin v koloidu	-212	8,731	$1,82 \cdot 10^{-7}$
0,001M lysin v koloidu	-238	3,300	$6,29 \cdot 10^{-8}$
0,01M lysin v koloidu	-307	6,342	$3,78 \cdot 10^{-9}$



Obr. 12: UV/VIS spektrum 0,01M lysinu v koloidním stříbře

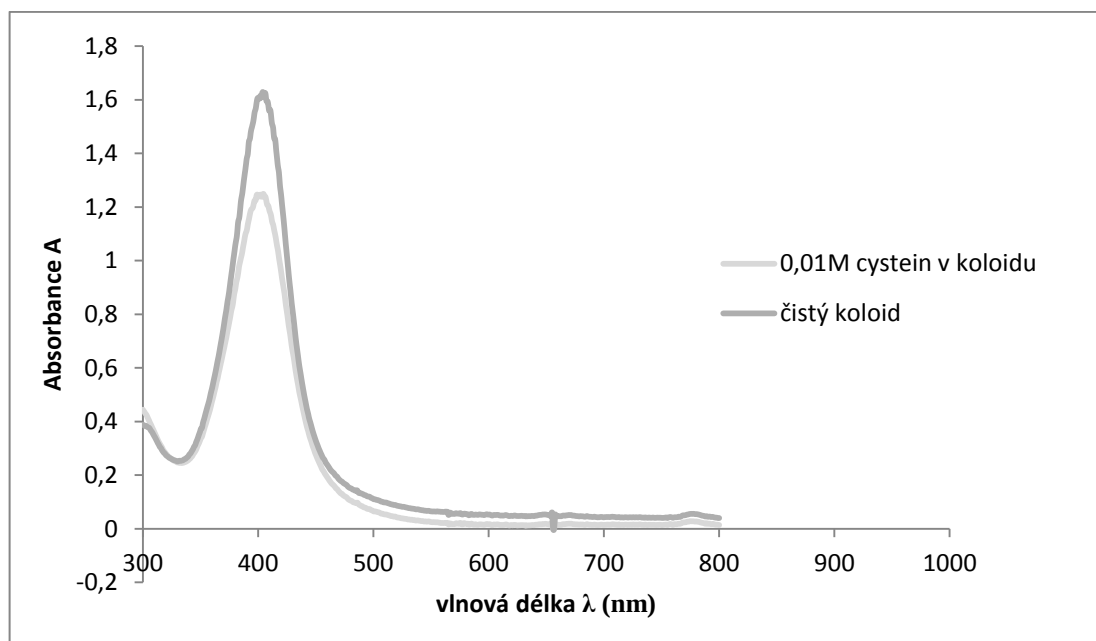
6.5 VLIV CYSTEINU NA KOLOIDNÍ STŘÍBRO

Po přidavku cysteinu ke koloidnímu stříbru nedošlo k žádné změně barvy, tudíž lze předpokládat, že nedochází vlivem cysteinu ke koagulaci nanočástic stříbra, ale pouze k vyvázání volných stříbrných iontů. Z charakteru UV-Vis spekter je patrné, že přítomnost cysteinu nijak neovlivňuje velikost částic stříbra v disperzi. Povrchový plasmon je lokalizován stále při vlnové délce 408 nm jako v případě čistého koloidu. Tabulka 5 obsahuje sérii vzorků o různé koncentraci cysteinu v koloidním stříbře a jejich vypočítanou koncentraci Ag^+ iontů. Z tabulky je patrné, že cystein poměrně silně ovlivňuje koncentraci Ag^+ iontů, kdy u vzorku obsahujícího nejkoncentrovanější cystein v koloidním stříbře klesla hodnota koncentrace Ag^+ iontů o 9 řádů v porovnání se systémem neovlivněným přidavkem cysteinu. Tato výrazná změna je pravděpodobně způsobena tím, že Ag^+ se váže na atom síry a dusíku, který cystein obsahuje. Málo výrazné změny koncentrace volného iontového stříbra u glycinu a lysinu mohou být způsobeny právě absencí atomu síry.

Tabulka 5: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí a koncentrace volných stříbrných iontů u roztoků koloidního stříbra s různými koncentracemi cysteinu.

roztok	EMN (mV)	Směrodatná odchylka EMN	koncentrace Ag^+ iontů (mol/L)
Čistý koloid	-177	4,898	$7,56 \cdot 10^{-7}$
0,00001 M cystein v koloidu	-393	3,461	$1,14 \cdot 10^{-10}$
0,00005 M cystein v koloidu	-556	5,866	$1,48 \cdot 10^{-13}$

0,0001 M cystein v koloidu	-617	9,405	$1,23 \cdot 10^{-14}$
0,001 M cystein v koloidu	-675	13,330	$1,16 \cdot 10^{-15}$
0,01 M cystein v koloidu	-725	10,704	$1,51 \cdot 10^{-16}$



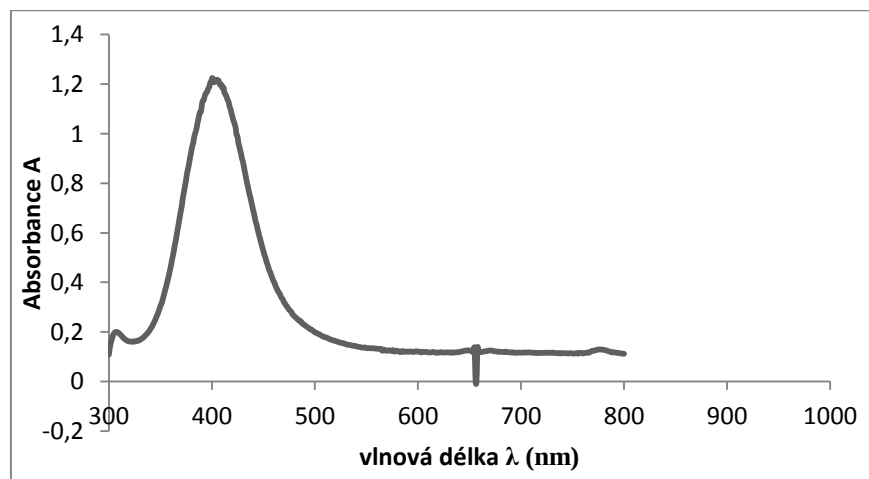
Obr. 13: UV/VIS spektra vzorků 0,01M cysteinu v koloidu a čistého koloidu (10krát naředěný)

6.6 VLIV JODIDOVÉHO IONTU NA KOLOIDNÍ STŘÍBRO

Stejným způsobem jako u aminokyselin, se provádělo měření u halogenidů. Toto měření bylo prováděno jednou. Při smíchání jodidu draselného s koloidem stříbra nedošlo k žádné barevné změně, tudíž opět lze předpokládat, že nedocházelo ke koagulaci nanočástic, ale pouze k ovlivnění koncentrace Ag^+ iontů. Z tabulky 6 je patrné, že jodid velmi silně ovlivňuje koncentraci volných stříbrných iontů již při nejnižší koncentraci, což je dáno tím, že jodid stříbrný je velmi málo rozpustná sloučenina ($K_s = 8,3 \cdot 10^{-17}$).

Tabulka 6: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí a koncentrace volných stříbrných iontů u vzorků koloidního stříbra s různými koncentracemi jodidu draselného

Roztok	EMN (mV)	Koncentrace Ag^+ iontů (mol/L)
Čistý koloid	-170	$1,01 \cdot 10^{-6}$
0,00001M jodid v koloidu	-589	$3,86 \cdot 10^{-14}$
0,00005M jodid v koloidu	-563	$1,11 \cdot 10^{-13}$
0,0001M jodid v koloidu	-622	$1,01 \cdot 10^{-14}$
0,001M jodid v koloidu	-686	$7,40 \cdot 10^{-16}$
0,01M jodid v koloidu	-734	$1,05 \cdot 10^{-16}$



Obr. 14: UV/VIS spektrum roztoku 0,01M jodidu draselného v koloidním stříbře

6.7 VLIV BROMIDOVÉHO IONTU NA KOLOIDNÍ STŘÍBRO

Opět při smíchání bromidu draselného s koloidním stříbrem nedocházelo ke změně barvy a disperze zůstala stále medově hnědá. Z tabulky 7 je patrné, že nedochází k tak velkému ovlivnění koncentrace volných stříbrných iontů jako u jodidu, nicméně byl zaznamenán pokles až 5 řádů v porovnání se systémem neovlivněným přidavkem bromidových iontů.

UV/VIS spektrum roztoku 0,01M bromidu draselného v koloidním stříbře bylo obdobné jako u roztoku 0,01M jodidu draselného v koloidním stříbře, z tohoto spektra lze usoudit, že bromid draselný nevyvolává agregaci koloidního stříbra.

Tabulka 7: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí a koncentrace volných stříbrných iontů u roztoků koloidního stříbra s různými koncentracemi bromidu draselného

Roztok	EMN (mV)	Koncentrace Ag^+ iontů (mol/L)
Čistý koloid	-172	$9,27 \cdot 10^{-7}$
0,00001M bromid v koloidu	-379	$2,01 \cdot 10^{-10}$
0,00005M bromid v koloidu	-390	$1,28 \cdot 10^{-10}$
0,0001M bromid v koloidu	-398	$9,27 \cdot 10^{-11}$
0,001M bromid v koloidu	-442	$1,54 \cdot 10^{-11}$
0,01M bromid v koloidu	-473	$4,36 \cdot 10^{-12}$

6.8 VLIV CHLORIDOVÉHO IONTU NA KOLOIDNÍ STŘÍBRO

Roztok koloidního stříbra s chloridem draselným opět nevykazoval změnu barvy. U chloridu draselného došlo k nejnižšímu ovlivnění koncentrace volných stříbrných iontů v rámci halogenidů (pokles o 4 řády u všech vzorků koloidního stříbra s přidavkem chloridu draselného oproti čistému koloidnímu stříbru).

UV/VIS spektrum roztoku 0,01M chloridu draselného v koloidním stříbře bylo obdobné jako u roztoku 0,01M jodidu draselného v koloidním stříbře, z tohoto spektra lze usoudit, že chlorid draselný neovlivňuje stabilitu koloidu stříbra.

Tabulka 8: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí a koncentrace volných stříbrných iontů u vzorků koloidního stříbra s různými koncentracemi chloridu draselného

Roztok	EMN (mV)	Koncentrace Ag^+ iontů (mol/L)
Čistý koloid	-178	$7,26 \cdot 10^{-7}$
0,00001M chlorid v koloidu	-402	$7,87 \cdot 10^{-11}$
0,00005M chlorid v koloidu	-404	$7,26 \cdot 10^{-11}$
0,0001M chlorid v koloidu	-407	$6,42 \cdot 10^{-11}$
0,001M chlorid v koloidu	-408	$6,17 \cdot 10^{-11}$
0,01M chlorid v koloidu	-416	$4,45 \cdot 10^{-11}$

6.9 VLIV PŘÍTOMNOSTI AMINOKYSELIN A HALOGENIDŮ NA ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITU KOLOIDNÍCH ČÁSTIC STŘÍBRA

U některých vzorků bylo kromě měření elektromotorického napětí a tím zjišťování koncentrace volných stříbrných iontů, také prováděno testování antibakteriální aktivity koloidů stříbra s přidavkem aminokyselin či halogenidů s vybranou koncentrací na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Testování se provádělo standardní diluční metodou v Mueller-Hintonově bujonu, pomocí níž se stanovuje minimální inhibiční koncentrace (MIC).

První testování antibakteriální aktivity se provádělo u všech vzorků obsahující nejvyšší koncentraci aminokyseliny či halogenidu v koloidu stříbra. V tabulce 9 jsou shrnuty naměřené hodnoty elektromotorického napětí a tomu odpovídající koncentrace volných stříbrných iontů.

Tabulka 9: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí a koncentrace volných stříbrných iontů u vybraných vzorků

Roztok	EMN (mV)	Koncentrace Ag^+ iontů (mol/L)
Čistý koloid	-185	$5,46 \cdot 10^{-7}$
0,01M jodid v koloidu	-734	$1,05 \cdot 10^{-16}$
0,01M bromid v koloidu	-473	$4,36 \cdot 10^{-12}$
0,01M chlorid v koloidu	-416	$4,45 \cdot 10^{-11}$
0,01M cystein v koloidu	-725	$1,51 \cdot 10^{-16}$
0,01M glycin v koloidu	-169	$1,05 \cdot 10^{-7}$
0,01M lysin v koloidu	-307	$3,78 \cdot 10^{-9}$
Ag^+ 0,001M	-3	$9,09 \cdot 10^{-4}$

Tabulka 10: Minimální inhibiční koncentrace vybraných vzorků. U vzorků označených symbolem „-“ nebyla inhibice růstu prokázána

	MIC (mg/L) Mal.kolo id čistý	MIC (mg/L) Ag koloid+0 ,01M jodid	MIC (mg/L) Ag koloid+0 ,01M bromid	MIC (mg/L) Ag koloid+0 ,01M chlorid	MIC (mg/L) Ag koloid+0 ,01M cystein	MIC (mg/L) Ag koloid+0 ,01M glycin	MIC (mg/L) Ag koloid+0 ,01M lysin	MIC (mg/L) Ag+ 0,001M
Enterococcus faecalis CCM 4224	54	-	45,563	45,563	-	45,563	45,563	3,375
Staphylococcus aureus CCM 3953	27	-	22,781	22,781	-	22,781	22,781	3,375
Escherichia coli CCM 3954	6,75	-	22,781	5,695	-	5,695	5,695	6,75
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955	6,75	-	11,391	5,695	-	5,695	5,695	1,6875
Pseudomonas aeruginosa	1,688	-	5,695	2,848	-	2,848	5,695	1,6875
Staphylococcus epidermidis 1	13,5	-	11,391	11,391	-	11,391	11,391	1,6875
Staphylococcus epidermidis 2	6,75	-	11,391	2,848	-	5,695	5,695	1,6875
Staphylococcus aureus (MRSA)	27	-	45,563	45,563	-	22,781	22,781	1,6875

Enterococcus faecium (VRE)	54	-	45,563	45,563	-	45,563	22,781	3,375
Klebsiella pneumoniae (ESBL)	6,75	-	22,781	5,695	-	45,563	45,563	3,375

Z Tabulky 10, která zahrnuje minimální inhibiční koncentrace vybraných vzorků je patrné, že u vzorků 0,01M cysteinu v koloidu stříbra a 0,01M jodidu draselného v koloidu stříbra nebyla prokázána inhibice růstu u všech bakteriálních kmenů a dochází k vyrušení antibakteriální aktivity nanočástic stříbra.

U vzorku 0,01M bromidu draselného v koloidu stříbra je z hodnot MIC pro různé bakteriální kmeny patrné, že ve většině případů došlo ke snížení antimikrobní aktivity koloidu stříbra (u 7 z 10 bakteriálních kmenů), nicméně nedošlo k úplnému vymizení antibakteriální aktivity jako v případě jodidu, ale pouze k dvou až čtyřnásobnému nárůstu minimálních inhibičních koncentrací.

Ze zjištěných hodnot MIC pro různé bakteriální kmeny u vzorku 0,01M chloridu draselného v koloidu stříbra je patrné, že ve většině případů KCl neovlivňuje aktivitu nanočástic stříbra tak výrazně jako např. jodid draselný a hodnoty MIC jsou totožné s těmi pro čistý koloid stříbra s výjimkou bakterie *Staphylococcus epidermis* 2, kde inhibuje růst při větším zředění (2,848 mg/L) než čistý koloid stříbra (6,75 mg/L).

U vzorků 0,01M glycinu a 0,01M lysinu v koloidu stříbra bylo z hodnot MIC zjištěno, že nedochází ve většině případů k diametrálním změnám od čistého koloidu stříbra. Z toho můžeme usoudit, že tyto dvě aminokyseliny téměř vůbec neovlivňují antibakteriální aktivitu koloidního stříbra.

Roztok 0,001M AgNO₃ ze všech testovaných vzorků inhiboval růst bakterií při největším zředění.

Z těchto dosažených výsledků lze usoudit, že úplné či částečné potlačení antimikrobní aktivity koloidních částic stříbra s přidavkem cysteinu, jodidových resp. bromidových iontů je dáno snížením koncentrace volného iontového stříbra, jak bylo potvrzeno měřením EMN. Jelikož z prvního měření bylo zjištěno, že k největším změnám koncentrace volného iontového stříbra dochází právě vlivem cysteinu a jodidu, byl cystein vybrán k dalšímu testování, kdy byly vybrány vzorky obsahující nejvyšší a nejnižší koncentraci cysteinu

v koloidu. Z kapacitních důvodů nebyla podrobněji zkoumána antibakteriální aktivita koloidu stříbra s přidavkem jodidových iontů s různou koncentrací.

Tabulka 11: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí a koncentrace volných stříbrných iontů u vybraných vzorků koloidního stříbra s cysteinem

Vzorek	EMN (mV)	Koncentrace Ag ⁺ iontů (mol/L)
Čistý koloid	-188	$4,83 \cdot 10^{-7}$
0,01M cystein v koloidu	-725	$1,51 \cdot 10^{-16}$
0,00001M cystein v koloidu	-393	$1,14 \cdot 10^{-10}$
Ag ⁺ 0,001M + 0,01M cystein	-580	$5,57 \cdot 10^{-14}$

Tabulka 12: Minimální inhibiční koncentrace vybraných vzorků. U vzorků označených symbolem „-“ nebyla inhibice růstu prokázána

	MIC (mg/L) Maltosový Koloid stříbra	MIC (mg/L) Ag koloid + cystein 0,01M	MIC (mg/L) Ag koloid + cystein 0,00001M	MIC (mg/L) Ag ⁺ 0,001M + cystein 0,01M
Enterococcus faecalis CCM 4224	27	-	25,059	-
Staphylococcus aureus CCM 3952	27	-	25,059	-
Escherichia coli CCM 3954	27	-	25,059	-
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955	6,75	-	12,530	-
Pseudomonas aeruginosa	13,5	-	6,265	-
Staphylococcus epidermis 1	13,5	-	12,530	-

Staphylococcus epidermis 2	6,75	-	6,265	-
Straphylococcus aureus (MRSA)	27	-	25,059	-
Enterococcusfaecium (VRE)	27	-	25,059	-
Klebsiellapneumoniae (ESBL)	54	-	25,059	-

Z tabulky 12, která ukazuje minimální inhibiční koncentrace vybraných vzorků na různé bakteriální kmeny je patrné, že po přidání cysteinu o koncentraci 0,01M v koloidu stříbra nebo v roztoku AgNO₃ mající koncentraci 0,001M nebyla ani u jedné bakterie inhibice růstu prokázána, tedy dochází k úplnému vymizení antibakteriální aktivity u těchto roztoků.

U vzorku 0,00001M cysteinu v koloidním stříbře je patrné, že nízká koncentrace cysteinu nevyvazuje tak markantně volné iontové stříbro a i při větším zředění koloidní stříbro inhibuje růst všech vybraných bakterií stejně jako čistý koloid bez cysteinu. Nejlépe pak inhiboval růst bakterií *Staphylococcus aureus* (MRSA), kde je zjištěná hodnota MIC 6,265 mg/L a *Pseudomonasaeruginosa*, kde je zjištěná hodnota MIC stejná jako u předešlé a inhibuje růst bakterie dokonce při větším zředění než čistý koloid s MIC 13,5 mg/L.

Ze získaných dat bylo zjištěno, že antibakteriální aktivitu nejvíce ovlivňuje cystein a jodid draselný, proto je nutné posoudit, jaká je rozpustnost koloidu stříbra přímo v kultivačním bujónu. Protože je kultivační bujon rovněž směsí proteinů a aminokyselin, tak lze očekávat, že bude rovněž snižovat koncentraci volného iontového stříbra. Proto byla provedena série měření rozpustnosti koloidního stříbra v přítomnosti cysteinu nebo jodidu po smíchání v kultivačním bujónu v poměru 1:1, což odpovídá prvnímu ředění při testování antimikrobiální aktivity. Rovněž byl proměřen kontrolní vzorek koloidu stříbra naředěného vodou ve stejném poměru 1:1.

Tabulka 13: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí a koncentrace volných stříbrných iontů u vybraných vzorků

Vzorek	EMN (mV)		Koncentrace Ag^+ iontů (mol/L)	
	S H_2O 1:1	S bujonem 1:1	S H_2O 1:1	S bujonem 1:1
Čistý koloid	-189	-389	$4,64 \cdot 10^{-7}$	$1,34 \cdot 10^{-10}$
0,01M jodid v koloidu	-730	-669	$1,23 \cdot 10^{-16}$	$1,48 \cdot 10^{-15}$
0,01M cystein v koloidu	-726	-769	$1,45 \cdot 10^{-16}$	$2,51 \cdot 10^{-17}$

Jak už bylo uvedeno výše, po přidání jodidu draselného a cysteinu o koncentraci 0,01M do koloidu stříbra, došlo k výraznému poklesu koncentrace volného iontového stříbra řádově 10^{-16} mol/L. Díky tomuto tak výraznému poklesu koncentrace už po smíchání koloidu stříbra s obsahem cysteinu a jodidu draselného s kultivačním bujonem k dalšímu výraznému poklesu koncentrace iontového stříbra v koloidu nedocházelo (tabulka 13). K výraznému poklesu koncentrace stříbrných iontů došlo pouze v případě smíchání čistého koloidu (bez přídavku cysteinu či jodidu) s kultivačním bujonem, kdy koncentrace Ag^+ iontů klesla z $4,64 \cdot 10^{-7}$ na $1,34 \cdot 10^{-10}$ mol/L. Z těchto dosažených hodnot lze usoudit, že kultivační bujon nesnižuje koncentraci Ag^+ iontů v případě koloidů s obsahem cysteinu a jodidu draselného a antimikrobní aktivita je tedy zcela potlačena na základě snížení koncentrace Ag^+ iontů přídavkem pouze cysteinu a jodidu. Avšak v průběhu těchto experimentů byla vyzorována v případě smíchání 0,01 M cysteinu v koloidu s kultivačním bujonem okamžitá změna barvy koloidu stříbra z medově hnědé na tmavě šedou. Tato změna barvy svědčí o tom, že dochází k agregaci nanočástic stříbra s přídavkem cysteinu po smíchání s kultivačním bujonem. Z toho vyplývá, že předchozí data týkající se antimikrobní aktivity, resp. snížení až vytracení antimikrobní aktivity v případě cysteinu může být způsobeno agregací nanostříbra po smíchání s bujonem, nikoli pouze snížením koncentrace volného stříbra. Pro posouzení vlivu pouze cysteinu na antimikrobní aktivitu koloidu stříbra a vyloučení vlivu agregace na snížení antibakteriální aktivity bylo potřeba koloid stabilizovat proti agregaci, v tomto případě byl použit roztok želatiny s konečnou koncentrací v koloidu 1%.

V tabulce 14 je zaznamenáno postupné měření elektromotorického napětí a koncentrace volných stříbrných iontů disperze koloidu stříbra stabilizovaného želatinou, následně po přidání 0,01 M cysteinu a nakonec po smíchání s bujonem v poměru 1:1.

Tabulka 14: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí a koncentrace volných stříbrných iontů u vzorku koloidu se želatinou, po následném přidání cysteinu a nakonec po přidání bujonu

Vzorek	EMN (mV)	Koncentrace Ag^+ iontů (mol/L)
Čistý koloid	-185	$5,46 \cdot 10^{-7}$
Koloid + 1% želatina	-515	$7,87 \cdot 10^{-13}$
Kol.+ 1% želatina + cystein	-817	$3,55 \cdot 10^{-18}$
Kol.+ 1%želatina+ 0,01M cystein+bujon	-742	$7,55 \cdot 10^{-17}$

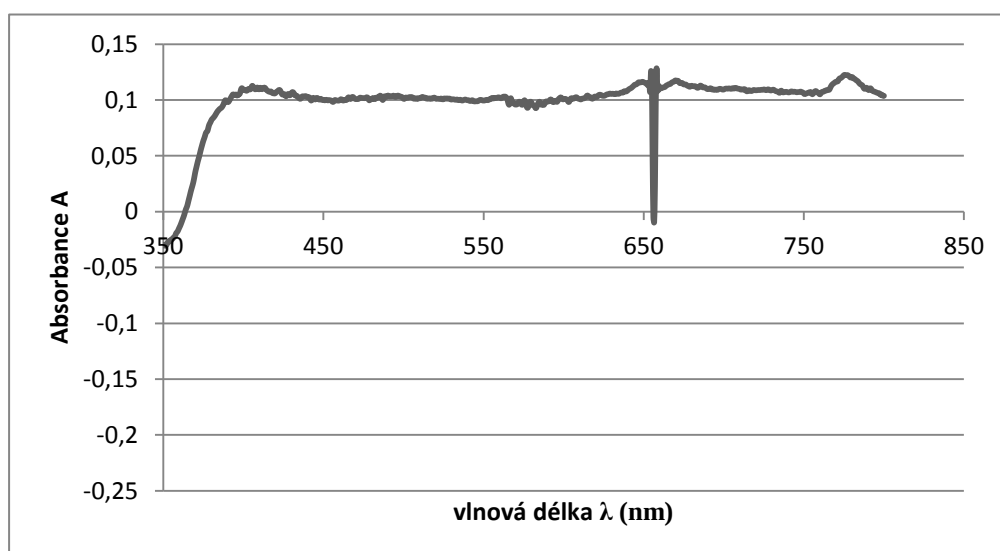
Takto stabilizovaný koloid s obsahem 0,01 M cysteinu byl podroben testu antimikrobní aktivity a jak je patrné z tabulky 15, opět nebyla prokázána antimikrobní aktivita koloidního stříbra s obsahem cysteinu a stabilizovaného želatinou. Z toho lze tedy usuzovat, že při zachování agregátní stability koloidních částic stříbra díky stabilizaci želatinou je jediným důvodem potlačení antibakteriální aktivity koloidu stříbra snížení koncentrace Ag^+ iontů vlivem přídavku cysteinu. Nicméně dalším pozorováním tohoto vzorku v průběhu 24 hodin bylo zjištěno, že i takto stabilizovaný koloid nezůstává v koloidní formě, jelikož po této době došlo u vzorků koloidu stabilizovaného želatinou a s obsahem 0,01M cysteinu smíchaného s kultivačním bujonem k diametrální změně barvy, kdy disperze z medově hnědé barvy přešla na disperzi obsahující bílou sraženinu se zlatavým nádechem. Tzn., že disperze již neobsahovala původní koloidní částice stříbra a nelze tak posoudit jejich antimikrobní účinek.

Tabulka 15: Minimální inhibiční koncentrace vybraných vzorků. U vzorků označených symbolem „-“ nebyla inhibice růstu prokázána

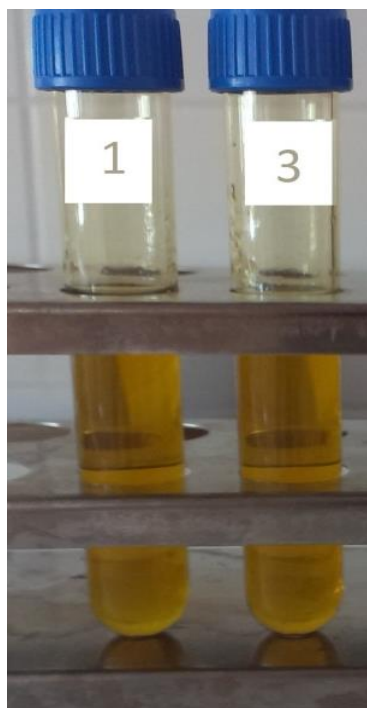
	MIC (mg/L) Čistý koloid	MIC (mg/L) Koloid + 1% želatina	MIC (mg/L) Koloid + 0,01M cystein	MIC (mg/L) Koloid + 1% želatina + 0,01M cystein
Enterococcus faecalis CCM 4224	-	-	-	-

Staphylococcus aureus CCM 3953	54	10,125	-	-
Pseudomonasaeruginosa CCM 3955	54	10,125	-	-
Escherichia coli CCM 3954	54	10,125	-	-

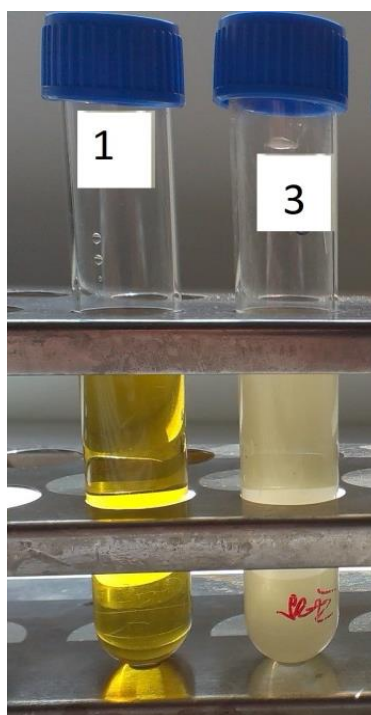
Na základě provedených experimentů tak nebylo možné jednoznačně prokázat snížení antibakteriální aktivity nanočástic stříbra na základě snižující se koncentrace volného iontového stříbra, jelikož koloid stříbra s přidavkem cysteinu stabilizovaný želatinou ve směsi s kultivačním bujonem v poměru 1:1 nebyl stabilní. Vzhledem k tomu, že se vytratilo žluté zabarvení typické pro koloidní částice stříbra a objevilo se zabarvení bílé se zlatavým nádechem, lze předpokládat, že v daném systému vzniká zcela nová málo rozpustná sloučenina stříbra a aminokyseliny či bílkoviny.



Obr. 15: UV/VIS spektrum vzorku 0,01M cysteinu v koloidu po 24 hodinách



Obr. 17: zkumavky se vzorky. 1 - čistý koloid stabilizovaný želatinou, 3 - koloid stříbra stabilizovaný želatinou s obsahem 0,01M cysteinu ihned po přípravě



Obr. 18: zkumavky se vzorky. 1 - čistý koloid stabilizovaný želatinou, 3 - koloid stříbra stabilizovaný želatinou s obsahem 0,01M cysteinu 24 hod po přípravě

7 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na zkoumání antibakteriální aktivity nanočástic stříbra v závislosti na koncentraci iontového stříbra uvolňovaného z nanočástic a její možné ovlivňování přidavkem vybraných aminokyselin a halogenidů ke koloidu stříbra.

Pro testování byl použit koloid stříbra připravený modifikovaným Tollensovým procesem, kdy se jako redukční látka použila maltosa. Vzniklé nanočástice stříbra měly průměrnou velikost okolo 27 nm.

Ke sledování ovlivňování koncentrace volných stříbrných iontů uvolněných nanočásticemi stříbra bylo z aminokyselin použito cystein, glycin a lysin a z halogenidů chlorid draselný, jodid draselný a bromid draselný. Koncentrace volného stříbra byla stanovena potenciometricky metodou kalibrační křivky. Antibakteriální aktivita byla testována standardní diluční metodou, pomocí níž se stanovovali minimální inhibiční koncentrace MIC.

Naměřené hodnoty elektromotorického napětí, které byly následně přepočítané na koncentrace volných stříbrných iontů ve vzorcích, prokázaly, že po přidání cysteinu ke koloidnímu stříbru dochází k silnému ovlivnění koncentrace volných stříbrných iontů (cystein vyvazuje volné stříbrné ionty), kdy původní čistý koloid stříbra měl koncentraci volných stříbrných iontů okolo $7,56 \cdot 10^{-7}$ mol/L a vzorek obsahující nejkoncentrovanější 0,01M cystein v koloidu stříbra měl koncentraci Ag^+ iontů přibližně $1,51 \cdot 10^{-16}$ mol/L. Vzorek obsahující nejnižší koncentraci cysteinu (0,00001M) v koloidním stříbre dosahoval koncentrace Ag^+ iontů okolo $1,14 \cdot 10^{-10}$ mol/L. Podobně jako cystein se choval i jodid draselný, kdy z koncentrace Ag^+ iontů $1,01 \cdot 10^{-6}$ mol/L u čistého koloidu, klesla na $1,05 \cdot 10^{-16}$ mol/L po přidání nejkoncentrovanějšího KI (0,01M) a po přidání nejméně koncentrovaného KI (0,00001M) byla hodnota koncentrace volných stříbrných iontů okolo $3,86 \cdot 10^{-14}$ mol/L. Po přidání bromidu draselného a chloridu draselného ke koloidu stříbra došlo také k ovlivnění koncentrace Ag^+ iontů, ale ne tak k velkému jako u cysteinu a jodidu draselného. Koncentrace Ag^+ iontů čistého koloidu se pohybovala okolo $9,27 \cdot 10^{-7}$ mol/L, vzorek obsahující 0,01M KBr v koloidu stříbra měl hodnotu koncentrace Ag^+ iontů okolo $4,36 \cdot 10^{-12}$ mol/L a vzorek s 0,01M KCl v koloidu stříbra $4,45 \cdot 10^{-11}$ mol/L. K nejmenšímu ovlivnění koncentrace volných stříbrných iontů nanočástic stříbra došlo po přidání glycinu a lysinu, kdy koncentrace Ag^+ iontů čistého koloidu vzrostla na $1,05 \cdot 10^{-7}$ mol/L po přidání glycinu (0,01M v koloidu stříbra) a u lysinu 0,01M v koloidu stříbra) klesla na $3,78 \cdot 10^{-9}$ mol/L z $8,20 \cdot 10^{-7}$ mol/L. Jelikož se při každém měření vzorků hodnota koncentrace volných stříbrných iontů trochu měnila, jsou výsledné hodnoty pouze přibližné.

Při stanovení MIC bylo zjištěno, že u vzorků 0,01M cysteinu v koloidním stříbře, 0,01M jodidu draselného v koloidním stříbře, u obou těchto vzorků navíc obsahující 1% želatinu a u 0,01M cysteinu v 0,001M AgNO₃ inhibice růstu nebyla prokázána. Vlivem cysteinu a jodidu draselného tedy dochází k úplnému vyrušení antibakteriální aktivity koloidního stříbra. U ostatních vzorků obsahující různé koncentrace chloridu draselného, bromidu draselného, lysinu a glycinu v koloidním stříbře snížení antibakteriální aktivity nebylo prokázáno.

Jelikož bylo zjištěno, že antibakteriální aktivitu nejvíce ovlivňuje cystein a jodid draselný, bylo nutné posoudit, jaká je rozpustnost koloidu stříbra přímo v kultivačním bujónu, protože je rovněž směsí proteinů a aminokyselin. V případě, že se k 0,01M cysteinu v koloidu přidal kultivační bujon, změnila se barva z medově hnědé na tmavě šedou. Tato barevná změna byla způsobena agregací nanočástic stříbra díky níž došlo k vyrušení antibakteriální aktivity. Aby se zabránilo agregaci, byla použita 1% želatina. Takto stabilizovaný koloid s obsahem 0,01 M cysteinu byl podroben testu antimikrobní aktivity, kdy opět nebyla prokázána antimikrobní aktivita koloidního stříbra stabilizovaného želatinou s obsahem cysteinu. Z toho lze tedy usuzovat, že při zachování agregátní stability koloidních částic stříbra díky stabilizaci želatinou je jediným důvodem potlačení antibakteriální aktivity koloidu stříbra snížení koncentrace Ag⁺ iontů vlivem přídavku cysteinu. Nicméně v průběhu 24 hodin došlo u takto stabilizovaného vzorku 0,01 M cysteinu v koloidním stříbře smíchaného s kultivačním bujonem k diametrální změně barvy, kdy z medově hnědé přešla na bílou sraženinu se zlatavým nádechem, z čehož lze předpokládat, že v daném systému vzniká zcela nová málo rozpustná sloučenina stříbra a aminokyseliny či bílkoviny.

Na základě provedených experimentů nelze jednoznačně prokázat snížení antibakteriální aktivity koloidního stříbra na základě snižující se koncentrace volného iontového stříbra, jelikož koloid stříbra s přídavkem cysteinu stabilizovaný želatinou smíchaný s kultivačním bujonem 1:1 nebyl stabilní.

8 SUMMARY

Recently much attention is paid to the silver nanoparticles, mainly due to their strong antibacterial activity. This important property of silver nanoparticles is usable in many fields. Therefore we asked question, whether it is possible to affect the antibacterial activity of silver colloid, by using various amino acids and halides.

In this work the silver nanoparticles with an average size of 27 nm was prepared by modified Tollen's process, which leads to reduction of $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ by D-maltose in the presence of sodium hydroxide. One of the mechanisms how silver nanoparticles show its antibacterial activity is release of free silver ions. Amino acids cysteine, glycine and lysine were selected for monitoring its influential effect to free silver ions. Potassium iodide, bromide and chloride with different concentrations in the silver colloid were selected as a halides. Antibacterial activity of samples was tested at the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Palacky University in Olomouc by standard dilution method by which it was determined the minimum inhibitory concentration. It was chosen 10 bacterial strains for these antibacterial activity tests.

The results show that usage of these amino acids and halides can affect the antibacterial activity of silver nanoparticles. MIC values shown, that most unbind effect to free silver ions, released by silver nanoparticles, had 0,01M cysteine and 0,01M potassium iodide, which completely cancel antibacterial activity. Least influence to the concentration of free silver ions occurred after addition of glycine and lysine.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) KVÍTEK, Libor; PANÁČEK, Aleš. *Základy koloidní chemie*, Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007.
- 2) KOMERS, Karel. *Základy koloidní chemie*, Pardubice: Univerzita Pardubice, 1996.
- 3) NOVÁK, Josef a kol. *Fyzikální chemie – bakalářský a magisterský kurz*, Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2008.
- 4) FISCHER, Oldřich a kol. *Fyzikální chemie (termodynamika, elektrochemie, kinetika, koloidní soustavy)*, Praha: Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1983.
- 5) BARTOVSKÁ, Lidmila; ŠIŠKOVÁ, Marie. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*, Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2010.
- 6) EVERETT, D. H. *Basic principles of colloid science*, Royal society of chemistry, 1992.
- 7) ŠČUKIN, E. D.; PERCOV, A. V.; AMELINOVÁ, E. A. *Koloidní chemie*, Praha: Academia, 1990.
- 8) BRDIČKA, Rudolf; DVOŘÁK, Jiří. *Základy fyzikální chemie*, Praha: Academia, 1997.
- 9) VOJUCKIJ, Sergej S. *Kurs koloidní chemie*, Praha: SNTL – nakladatelství technické literatury, 1984
- 10) *Elektrokinetické jevy*. VSCHT.cz [cit. 4. 7. 2013] Dostupné na:
<http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/elektrokineticke_jevy.html>
- 11) *Elektrokinetický potenciál*. VSCHT.cz [cit. 4. 7. 2013] Dostupné na:
<http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/elektrokineticky_potencial.html>

- 12) *Elektrokinetické dvojvrstvy*. VSCHT.cz [cit. 4. 7. 2013] Dostupné na:
<http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/modely_elektricke_dvojvrstvy.html>
- 13) BUZEA, C.; BLADINO, I.; ROBBIE, K. *Biointerphases*, 2007, 2, MR 17 – MR172
- 14) KVÍTEK, L. *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra: Habilitační práce*, Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2008.
- 15) LEE, P. C.; MEISEL, D. J. *Phys. Chem.*, 1982. 86, 3391–3395.
- 16) KVÍTEK, L.; PRUCEK, R.; PANÁČEK, A.; SOUKUPOVÁ J. Nanočástice stříbra – příprava, vlastnosti, aplikace. Rožnov pod Radhoštěm: NANOCON 2009, 2009.
- 17) PANÁČEK, A. et al. *J PhysChem B*. 2006, 110, 16248-16253.
- 18) LEVARD, C. et al. *Environmental Science and Technology*. 2012, 46, 6900-6914.
- 19) PANÁČEK, A. et al. *Biomaterials*. 2009, 30, 6333-6340.
- 20) SOTIRIU, G. A.; PRATSINIS, S. E.; *Environmental Science and Technology*. 2010, 44, 5649-5654
- 21) SHRIVASTAVA, S. et. al. Characterization of enhanced antibacteriae effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2007, 18, 1-9
- 22) PAL, S. et. al. Does the antibacterial aktivty of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of gram – negative bacterium Escherichia coli. *Environ. Microb.* 73, 1712-1720
- 23) KITTLER, S. et. al. Synthesis of PVP – coated silver nanoparticles and their biological aktivty towards human mesenchymal stem cells. *Materialwiss Werkst.* 2009, 40, 258-264
- 24) PANÁČEK, A. et. al. Antifungal aktivty o silver nanoparticles against Candida spp. *Biomaterials*. 2009, 30, 6333- 6340
- 25) FAYAZ, A. M. et. al. *Nanomedicine*. 2010, NBM 6, 103-109

- 26) LEŠKO, J.; TRŽIL, J.; ŠTARHA, R. *Anorganická chemie*. Ostrava: Vysoká škola báňská – technická univerzita, 2011
- 27) KAŠPÁREK, F.; PASTOREK, R.; ŠINDELÁŘ, Z.; BŘEZINA F. *Anorganická chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011
- 28) *Silver compounds: silver chloride*, Webelements.com [cit. 7. 7. 2013], Dostupné na:
<http://www.webelements.com/compounds/silver/silver_chloride.html>
- 29) VOHLÍDAL, Jiří; ŠTULÍK, Karel; JULÁK, Alois. *Chemické a analytické tabulky*. Praha: Grada Publishing, 1999
- 30) *Silver compounds: silver iodide*, Webelements.com [cit. 7. 7. 2013], Dostupné na:
<http://www.webelements.com/compounds/silver/silver_iodide.html>
- 31) *Silver compounds: silver bromide*, Webelements.com [cit. 7. 7. 2013], Dostupné na:
<http://www.webelements.com/compounds/silver/silver_bromide.html>
- 32) KARLSON, P. *Základy biochemie*, Praha: Academia, 1981
- 33) JONES, J. *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford University Press: New York, 1992
- 34) *Cystein*. VSCHT.cz [cit. 8. 7. 2013] Dostupné na:
<http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/cystein.html>
- 35) About.com [cit. 8. 7. 2013] Dostupné na:
<http://chemistry.about.com/od/imagesclipartstructures/ig/Amino-Acid-Structures/Cysteine.htm>
- 36) *Glycin*. VSCHT.cz [cit. 8. 7. 2013] Dostupné na:
<http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/glycin.html>
- 37) About.com [cit. 8. 7. 2013] Dostupné na:
<<http://chemistry.about.com/od/imagesclipartstructures/ig/Amino-Acid-Structures/Glycine.htm>>

- 38) *Lysin*. VSCHT.cz [cit. 8. 7. 2013] Dostupné na:
<http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/lysin.html>
- 39) About.com [cit. 8. 7. 2013] Dostupné na:
<<http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---L/Lysine.htm>>
- 40) XIU, Zong-Ming; MA, Jie; ALVAREZ, Pedro JJ. Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environmental science & technology*, 2011, 45.20: 9003-9008.
- 41) ZHANG, P. X., et al. Influence of addition of potassium chloride to silver colloids. *Journal of Raman spectroscopy*, 1990, 21.2: 127-131.
- 42) AN, Jing, et al. Sculpturing effect of chloride ions in shape transformation from triangular to discal silver nanoplates. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2008, 112.39: 15176-15182.
- 43) KVÍTEK, Libor, et al. Influence of Halide Anion on Preparation of Silver Colloid Particles. *CHEMICA* 45, 2006, 35.
- 44) PRUCEK, Robert; KVÍTEK, Libor; HRBÁČ, Jan. Silver colloids-Methods of preparation and utilization. *CHEMICA* 43, 2004, 59.
- 45) ZÍTKA, Ondřej, et al. NANOTECHNOLOGIE PRO EFEKTIVNĚJŠÍ CÉVNÍ NÁHRADY. *Chem. Listy*, 2013, 107, 24-29.
- 46) GUZMÁN, M.G.; DILLE, J.; GODET, S. *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, 2009, 2:3, 104–111.
- 47) PŘIKRYL, Jan, et al. Využití nanočástic ve fluorescenční mikroskopii a ramanově spektrometrii. *SVOBODOVÁ, Ivona, Marcela LIŠKOVÁ, Karel KLEPÁRNÍK, František FORET, Věra HEZINOVÁ and Denisa MADĚRÁNKOVÁ. NANOCON*, 2009.

- 48) JEFFERSON, Warren. Colloidal Silver Today: The All Natural, Wide-Spectrum Germ Killer. Book Publishing Company, 2003.