



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PRODUKCE NANOČÁSTIC STŘÍBRA BAKTERIEMI

BIOLOGICAL SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Martina Kubínová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

BRNO 2016

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1020/2015
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Martina Kubínová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.**
Akademický rok: 2015/16

Název bakalářské práce:

Produkce nanočástic stříbra bakteriemi

Zadání bakalářské práce zadání:

1. Vyhledání a kritické zpracování dostupné literatury.
2. Provedení experimentů zaměřených na produkci nanočástic stříbra vybraným mikroorganismem.
3. Zpracování získaných experimentálních výsledků.
4. Vyhodnocení experimentů formou diskuse.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Martina Kubínová
student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Nanočástice stříbra a jejich potencionální využití jakož i budoucí vliv na životní prostředí je stále objektem studií. Metodika syntézy nanočástic stříbra je poměrně dobře prostudována a studium se nyní zabývá spíše ekonomičtějšími způsoby syntézy pomocí materiálů, které jsou šetrné k životnímu prostředí a nejsou toxické. Všechny tyto výhody má biochemické produkce nanočástic. Tato práce byla zaměřena především na produkci nanočástic bakteriemi mléčného kvašení a jejich antibakteriální aktivitu. Experimentální část byla zaměřena na izolaci amplifikaci DNA izolované z bakterie *Lactobacillus gasseri* K7, u které byla potvrzena schopnost tvorby nanočástic. DNA byla izolována v kvalitě vhodné pro PCR, což bylo potvrzeno její amplifikací s primery specifickými pro doménu *Bacteria* a primery specifickými pro druh *Lactobacillus gasseri*.

ABSTRACT

Silver nanoparticles and its potencial use and influence on the environment is still object of research. Methodics of synthesis of silver nanoparticles is already well investigated and study deals with more economical ways of syntesis by metireals, which are environmentally friendly and nontoxic. Biochemical production of nanoparticles has both advantages. This study focused on the production of nanoparticles by lactic acid bacteria and antibacterial activity. Experimental part of the study focused on amplification DNA isolated from *Lactobacillus gasseri* K7, which has efficiency to form silver nanoparticles. DNA was isolated in PCR, it was confirmed using primers specific for domena *Bacteria* and species *Lactobacillus gasseri*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nanočástice stříbra, bakterie mléčného kvašení, morfologie nanočástic, identifikace, příprava, metoda PCR.

KEYWORDS

Silver nanoparticles, lactic acid bacteria, mofphology of nanoparticles, identification, production, PCR method.

KUBÍNOVÁ, M. *Produkce nanočástic stříbra bakteriemi* . Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 39 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych velice poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc. za odborný dohled, vedení, konzultace, vstřícnost a především čas, který této práci věnoval. Ráda bych také poděkovala svým blízkým za jejich podporu.

OBSAH

1.	ÚVOD	7
2.	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Nanotechnologie	8
2.1.1	Disperzní systém nanočástic stříbra	8
2.1.2	Povrchový plasmon	9
2.1.3	Morfologie nanočástic	9
2.2	Metody chemické syntézy	11
2.2.1	Fotochemická příprava nanočástic	11
2.2.1.1	Chitosan	11
2.2.1.2	Ketylové radikály a α -aminoalkylové radikály	12
2.2.2	Příprava nanočástic redukcí	12
2.2.2.1	Hydrazin hydrát (HH) a formaldehyd-sulfoxylát sodný (FSS)	12
2.2.2.2	Hydrazin hydrát a hydroxid sodný	13
2.2.3	Příprava nanočástic stříbra biologickými postupy	14
2.2.3.1	Houby	14
2.2.3.2	Bakterie	15
2.2.3.3	Rod Lactobacillus	16
2.3	Antimikrobiální aktivita	17
2.3.1	Mechanismus	17
2.3.1.1	Stříbro (Ag^0)	17
2.3.1.2	Stříbrné ionty (Ag^+)	18
2.3.1.3	Povrch nanočástice	18
2.3.2	Toxicita	18
3.	CÍL PRÁCE	21
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1	Materiál	22
4.1.1	Chemikálie	22
4.1.2	Mikroorganismy a DNA	23
4.1.3	Média a roztoky	23
4.1.3.1	Kultivační média	23
4.1.3.2	Roztoky pro agarovou gelovou elektroforézu	23
4.2	Pomůcky a přístroje	23

4.3	Metody	24
4.3.1	Křížový roztěr buněk	24
4.3.2	Příprava DNA pro amplifikaci ředěním DNA <i>Lactobacillus gasseri</i> K7	24
4.3.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	24
4.3.3.1	PCR pro doménu Bacteria	24
4.3.3.2	Druhově specifická PCR	26
4.3.4	Agarózová gelové elektroforéza produktů PCR	27
5.	VÝSLEDKY	28
5.1	Křížový roztěr bakteriální kultury	28
5.2	Amplifikace DNA metodou PCR	28
5.2.1	Amplifikace DNA metodou PCR s primery specifickými pro doménu <i>Bacteria</i>	28
5.2.2	Amplifikace DNA s primery specifickými pro druh <i>Lactobacillus gasseri</i>	30
5.3	Diskuse	32
6.	ZÁVĚR	33
7.	SEZNAM ZKRATEK	34
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	35

1. ÚVOD

Nanočástice vzhledem k jejich optickým a elektronickým vlastnostem jsou intenzivně studovány již řadu let. Nanočástice nacházejí uplatnění v odvětví optiky, optoelektroniky, katalýze, výrobě a chemickém či biochemickém snímání. Nanočástice jsou vysoce aktivními heterogenními katalyzátory vzhledem ke svým unikátním elektrickým vlastnostem a velkému specifickému povrchu. Katalýza kovy hraje klíčovou roli v širokém spektru odvětví chemického průmyslu. Cílem je vývoj vysoce účinných katalyzátorů, které budou umožňovat vyšší efektivitu a selektivitu reakcí. Významná je i antibakteriální aktivita nanočástic některých kovů a s tím spojené biomedicínské aplikace.

Bakterie rezistentní vůči antibiotikům a geny pro rezistenci vůči antibiotikům jsou v posledních letech vážným problémem v celosvětovém měřítku. Diskutovanou možnou náhradou jsou nanočástice stříbra, které mají antibakteriální účinky a také schopnost inaktivace genů pro rezistenci¹. Zájem o nanotechnologie se také projevuje v odvětví textilního průmyslu. Hedvábí vykazuje biokompatibilitu, pevnost a skvělou flexibilitu při pokrytí nanočásticemi stříbra a nachází využití v medicíně pro rychlejší hojení ran a přípravu umělých tkání². Nanočásticemi stříbra mohou být pokryty nejrůznější materiály, jako jsou obaly nejrůznějších potravin, sýrů, zelenin a ovoce³.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nanotechnologie

Nanotechnologie se zaměřuje na jevy, techniky, zařízení a struktury, jejichž rozměry odpovídají úrovni nanometrů, tedy na molekulární úrovni. Takto zavedený pojem je však příliš široký, protože celý hmotný svět je složen z atomů a molekul, jejichž stavy a ději se již dlouhodobě zabývá řada oborů, jako jsou fyzika, chemie, biologie a další. Pojem nanotechnologie tedy musí znamenat více než pouze obsah částí zmíněných vědních disciplín. Za nanotechnologie lze označit jen takové materiály, systémy, jejich aplikace nebo způsoby výroby, které splňují následující podmínky:

- mají alespoň jeden rozměr nebo svoji vnitřní strukturu v intervalu velikostí 1 – 100 nm,
- využívají fyzikálních nebo chemických vlastností na úrovni atomů a molekul, mají neobvyklé charakteristiky v porovnání se stejným materiálem nebo systémem, který nemá nanorozměry,
- mohou být kombinovány tak, aby vytvářely větší struktury.

Na nanotechnologie je možné přihlížet ze dvou úhlů pohledu. První fyzikální nebo inženýrský přístup k nanotechnologiím od větších struktur k menším je označován názvem top-down. Druhý chemický přístup označovaný jako bottom-up se zakládá na vytváření větších a složitějších struktur z menších prekurzorů⁴.

2.1.1 Disperzní systém nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra tvoří v roztoku disperzní systém, tedy soustavu obsahující disperzní podíl, rozptýlené v disperzním prostředí rozpouštědla ve vzájemné termodynamické rovnováze. Základní fyzikální vlastnosti těchto systémů jsou závislé především na disperzitě a tvaru částic, které se nemění a jsou agregátně stálé. Stabilita systému je závislá na fázové a agregátní stabilitě. Nežádoucím jevem je sedimentace nanočástic, která roste s poloměrem a hustotou nanočástic. Kinetická nestabilita je příčinou tepelného pohybu, gradientu osmotického tlaku, fluktuace, difuze, gradientu chemického potenciálu, rotačního pohybu, gradientu koncentrace, gradientu rychlosti pohybu a podobně⁵.

Disperzní systém nanočástic stříbra je vysvětlen DLVO teorií. Tato teorie se opírá o vytvoření rovnováhy mezi elektrostatickou repulzí a van der Waalsovými interakcemi, která brání aglomeraci. Částice v disperzních systémech tvoří elektrické dvojvrstvy, jejichž shodné náboje se odpuzují (tato síla je nepřímo úměrná druhé mocnině vzdálenosti částic) a tvoří tak energetickou bariéru, která určuje stabilitu systému. Van der Waalsovy síly jsou výsledkem vzájemného přitažlivého působení molekul a při dostatečné kinetické energii srážení. Pro stabilitu disperzního systému je nutné řešení sterické a elektrické stabilizace indikované zeta-potenciálem⁶.

2.1.2 Povrchový plasmon

Nanočástice ve své koloidní disperzi rozptylují světlo a také ho absorbují. Poloha maxima absorpce je závislá jak na chemickém složení a velikosti částic, tak i na jejich morfologii a rovněž na jejich agregaci. Teorii popisující rozptyl a současnou absorpci světla částicí sférického tvaru vypracoval Mie⁷. V případě kovových nanočástic tento jev ovlivňuje koherentní oscilace elektronů indukovaná interakcí s elektromagnetickým polem světelné vlny. Tyto oscilace produkují šíření vln tzv. povrchového plasmonu (SPB), který je na rozdíl od situace na rozhraní rovinného povrchu lokalizován na povrchu nanočástice (lokalizovaný povrchový plasmon). Vlnová délka, při níž je světlo absorbováno za vzniku plasmonových oscilací, se označuje absorpční pás povrchového plasmonu.

Se zmenšováním částice se začínají uplatňovat kvantová omezení, a proto kovový charakter nanočástice přechází na nevodivý. Rozdíl jednotlivých hladin povolených pro elektrony není tak velký, aby došlo tímto způsobem k ovlivnění optických vlastností nanočástic kvantově chemickými mechanismy. Závislost resonance povrchového plasmonu na velikosti kovové nanočástice souvisí se závislostí dielektrické konstanty kovu na velikosti nanočástice, kde se na určení dielektrické konstanty podílejí vnitřní d-elektrony a volné vodivostní elektrony. Vodivé elektrony se mohou srážet s fotony a vzájemně interagovat. V malých částicích má také velký vliv rozptyl na rozhraní fází povrchu nanočástice s disperzním prostředím. Při studiu větších částic (25 – 30 nm) dochází k zakřivení vyšších řádů prostorového rozložení náboje vodivostních elektronů, což způsobuje významný posun resonance povrchového plasmonu s růstem nanočástice⁸.

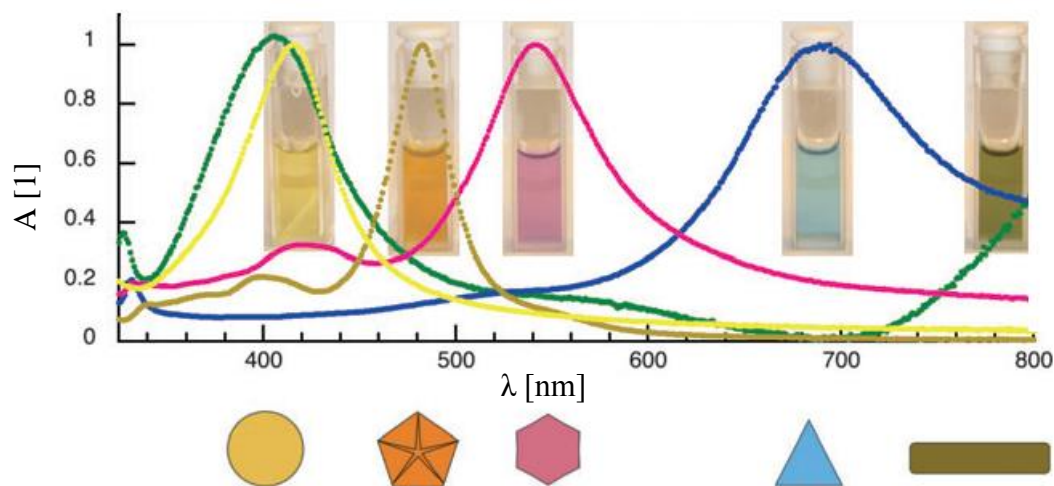
2.1.3 Morfologie nanočástic

Kovové nanočástice je možné rozlišit podle charakteristické absorpce (zlato, stříbro, měď). Díky tomuto jevu je možné dosáhnout změny morfologie, chemických reakcí, supramolekulárních interakcí, elektronovou vodivost, děrovou vodivost, singletový stav, tripletový stav a Ramanova jevu. Nanočástice tvoří specificky zbarvené koloidní disperze. Typické SPB spektrum koloidní vodné disperze sférických nanočástic stříbra má maximum při 420 nm⁹.

Velikost a tvar vysoce ovlivňují fyzikální, optické vlastnosti a chemickou reaktivitu nanočástic. Zatímco převážně symetrické, sférické částice vykazují jediný absorpční pík při studiu absorpce elektromagnetického vlnění v oblasti viditelného spektra, anizotropní nanočástice jako například krychle, kvádr, trojboký hranol apod. vykazují více absorpčních maxim. Tato změna je způsobena polarizací hran ve struktuře, kde se hromadí potenciál a vzniká gradient. Syntéza krystalů z hlediska tvaru nanočástic je řízena především termodynamickými (teplota, redoxní potenciál) a kinetickými (koncentrace reaktantů, reakční rychlost, rozpustnost, difuze) parametry. Při koloidní syntéze určuje tvar nanočástic krok nukleace.

Prvním krokem při chemické syntéze nanočástic je vznik krystalizačních jader v roztoku stříbrných iontů, což může být vyvoláno různými postupy, o kterých bude podrobněji pojednáno v kapitole 2.2. Téměř okamžitě dojde k redukci stříbrných iontů, avšak další fáze růstu částic probíhá déle. Z hlediska energetické bilance je nárůst větších krystalů výhodnější, jelikož se při růstu částic snižuje jejich povrchová energie a částice se tak stabilizují¹⁰.

Po ozáření nanočástic elektromagnetickým zářením o různé vlnové délce vznikaly krystaly o různé velikosti a tvaru (Obrázek 1). Pro syntézu nanočástic byl použit dusičnan stříbrný, jako redukční činidlo citrát či tetrahydridoboritan sodný a jako stabilizační činidlo polyvinylpyrrolidin. Stříbrný ion reagoval s citrátem za vzniku krystalizačních jader o velikosti $3,3 \pm 0,4$ nm. Pro změnu morfologie nanočástic bylo použito ozáření LED zdrojem a bylo ji možné indikovat UV-VIS spektrofotometricky či primárně vizuálně. Po ozáření LED zdrojem o vlnové délce 405 nm byla detegována spektrální změna absorpčního maxima vzorku z 395 nm na 416 nm. Tato změna velikosti byla téměř okamžitě zaznamenána plasmonovou absorpcí se zvýšením ozáření a excitací. Po vystavení LED ozáření o vlnové délce 455 nm byla zaznamenána další spektrální změna absorpce vzorku na hodnotu 480 nm, která tak indikovala vznik nanočástic ve tvaru dvanáctistěnu s úzkou polydisperzitou. Ozáření vlnovou délkou 627 nm vedlo ke změně absorpčního maxima vzorku a vzniku nanočástic ve tvaru destiček. Po excitaci vzorku zářením o vlnové délce 720 nm byly získány nanočástice ve tvaru tyčinek s absorpčním maximem v oblasti 800 nm.. Při tvorbě krystalů má velký vliv přítomnost kyslíku O_2 ¹¹.



Obrázek 1: Absorbance různých morfologických forem nanočástic stříbra při UV-VIS spektrofotometri¹¹.

2.2 Metody chemické syntézy

Přípravu nanočástice stříbra (AgNP) je možné vést několika způsoby. První z nich může být redukce kovových ionů příslušným redukčním činidlem (boran, citrát, askorbová kyselina, hydroxilamin apod.). Další možností je fotochemická reakce, při které proběhne fotochemicky iniciovaná redukce kovových iontů a dojde k tvorbě radikálů, které donují kovové ionty elektrony a reakce je tak zahájena elektromagnetickým zářením o určité vlnové délce¹². Dále je možné nanočástice stříbra syntetizovat biochemicky, o čemž bude pojednáno v kapitole 2.2.3.

2.2.1 Fotochemická příprava nanočástic

2.2.1.1 Chitosan

Chitosan je lineární polysacharid, jehož struktura je tvořena D-glukosaminovými jednotkami, má schopnost vázat těžké kovy a právě díky této vlastnosti je používán při přípravě nanočástic kovů. Nevýhodou je velká molekulová hmotnost chitosanu, a proto i nestabilita nanočástic v neutrálnějším a bazickém prostředí. V popsaném experimentu byly připraveny nanočástice o struktuře $[(\text{GlcN})_x - \text{AgNPs}]$, kde x je rovno 1 – 6, pomocí γ radiace. Připravené nanočástice měly velikost 5 – 15 nm. Nanočástice vykazovaly již při pokojové teplotě vysokou stabilitu až několik měsíců především v roztoku chloridu sodného. Pouze při vyšší koncentraci NO_3^- či H_2PO_4^- aniontů vykazovaly nanočástice nestabilitu, která byla prokázána pomocí absorpce SPB posuvem absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám.

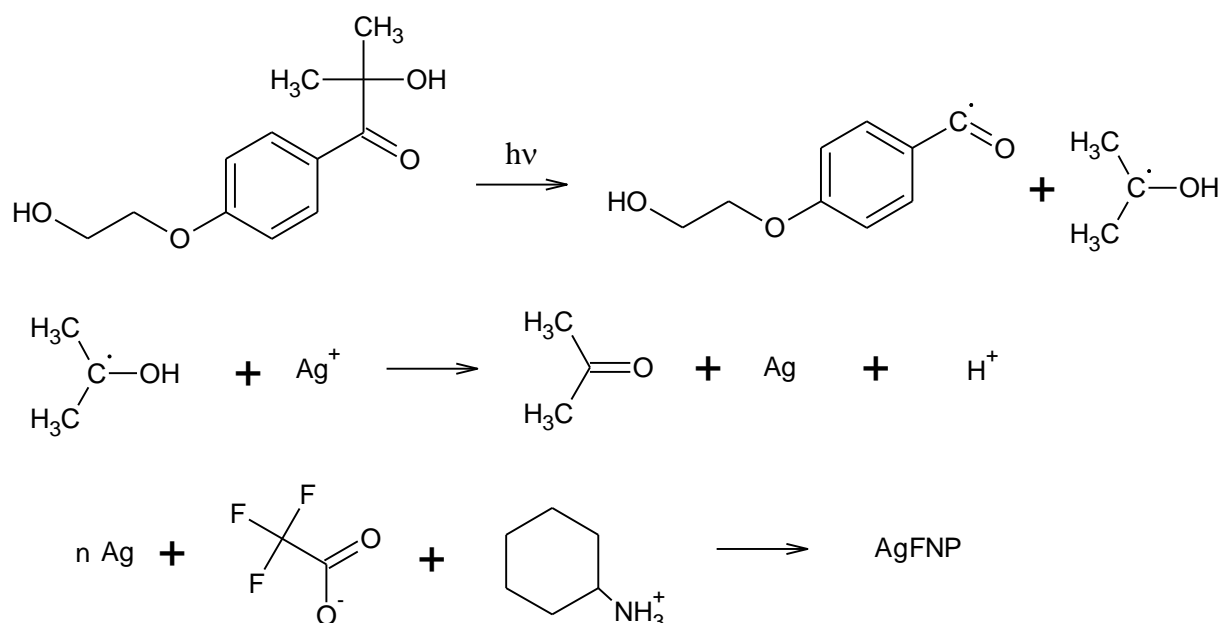
Chitosan nese pozitivní náboj a při vystavení záporným iontům způsobí shlukování nanočástic. Při praktickém experimentu byl chitosan rozpuštěn v kyselině octové (pH = 3) a následně sloučeno s dusičnanem stříbrným v poměru 1:2. Deaerace systému byla zabezpečena probubláváním čistým dusíkem. Reakce proběhla při různých koncentracích dusičnanu stříbrného a z výzkumu vyplynulo, že velikost částic je ovlivněna jeho koncentrací. Vyšší koncentrace zabezpečuje větší částice (16nm částice byly připraveny při koncentraci 10^{-3} M AgNO_3 a částice 5 nm byly detegovány při koncentraci $1,2 \cdot 10^{-4}$ M AgNO_3), dalším faktorem je doba vystavení záření.

Produkce nanočástic byla iniciována zářením, které způsobilo rozpad molekul vody a vyrazení elektronu, který redukoval stříbrný kation na stříbrné částice. Hydroxylový radikál při napadení oligochitosanu formoval radikály chitosanu, které působily také jako redukční činidla pro vznik stříbrných částic. Stříbrné částice se primárně shlukovaly v dimery, které se mohly kombinovat i mezi sebou a tvořily tak tetramery a větší aglomeráty. Disperze organicky chráněných nanočástic obvykle závisí na pH roztoku a iontové síle. Pomocí měření zeta potenciálu bylo zjištěno, že stabilita nanočástic je srovnatelná s částicemi stabilizovanými citrátem, hodnoty při pH 11 jsou -55 mV a pH optimum bylo zjištěno 1,8 – 6,6. Při vyšších hodnotách pH byl zaznamenán pokles absorpčního maxima, roztok s nanočásticemi změnil barvu ze žluté k oranžové až červené, došlo k agregaci nanočástic¹³.

2.2.1.2 Ketylové radikály a α -aminoalkylové radikály

Pro vznik ketylových radikálů, které jsou dobrými redukčními činidly, může být použita sloučenina 1-[4-(2-hydroxyethoxy)fenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propan-1-on (CAS 106797-53-9). Při syntéze byl zaznamenán vysoký výtěžek radikálů a krátký poločas rozpadu tripletu molekuly zmenšil pravděpodobnost excitace jiných sloučenin v roztoku a zamezil kalení cizími radikály (Obrázek 2). Praktická syntéza byla provedena v roztoku toluenu, který zabezpečil dostatečnou stabilitu za probublávání dusíku po dobu 30 minut.

Rozpouštědlo z UVA oblasti záření neabsorbuje, a proto je ideálním solventem pro tuto fotochemickou reakci. Spektrální změny byly pozorovány po ozáření křemenné kyvety s 2mM trifluorooctanem stříbrným a cyklohexylaminem. Absorpční maximum se posunulo k hodnotě 447 – 449 nm vlnové délky. Amino-sloučenina zabezpečila stabilitu nanočástice a bylo zjištěno, že není nutné použití cyklohexylaminu, dobře fungují i další aminosloučeniny¹⁴.

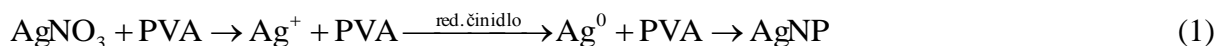


Obrázek 2: Reakční schéma.

2.2.2 Příprava nanočástic redukcí

2.2.2.1 Hydrazin hydrát (HH) a formaldehyd-sulfoxylát sodný (FSS)

Nanočástice stříbra lze připravit pomocí hydrazin hydrátu (HH) a formaldehyd-sulfoxylátu sodného (FSS, $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{Na}$) použitými jako redukční činidla ve vodném roztoku polyvinylalkoholu v přítomnosti dusičnanu stříbrného jako zdroje stříbrných iontů. Základní schéma reakce je znázorněno následující reakcí (1).



V experimentu byl polyvinylalkohol rozpuštěn v deionizované vodě současně s roztokem dusičnanu stříbrného v poměru 1:10 a promíchány. Roztok byl pročištěn probubláváním inertního dusíku. Rozpuštěné redukční činidlo (jedno ze zmíněných) bylo převedeno do prvního roztoku pomocí stříkačky v poměru ekvimolárním. Roztok se začal zabarvovat do žluta, což značilo syntézu nanočástic. Celý postup byl proveden v inertní atmosféře, při pokojové teplotě s následným měřením absorpčních spekter vzorku. V druhé části experimentu byl vytvořen film nanočástic na podložním sklíčku, na které byl nanesen roztok se všemi komponenty a odpařován v elektrické sušárně při teplotě 100 °C.

Polyvinylalkohol je dobrý stabilizátor malých kovových částic¹⁵. Při porovnání redukčních činidel bylo zjištěno, že FSS je mnohem lepší činidlo z hlediska uchování nanočástic. Z hlediska kvality vzniklých částic bylo zjištěno, že FSS měl nižší tendenci stříbra k aglomeraci. Při měření absorbance při užití FSS v roztoku se absorpční maximum drželo na hodnotě 418 nm, při proměření filmu nanočástic se absorpční maximum rozložilo na další píky o různých vlnových délkách. V případě HH byl pík v obou případech filmu i roztoku rozložen na řadu píků o různých vlnových délkách.

Metodou FTIR bylo zjištěno, že mezi obalem polyvinylalkoholu a stříbrným jádrem vznikají chemické vazby především párováním hydroxilových skupin s jádrem částice. Tato skutečnost byla dokázána poklesem výšky píku při 1 420 cm⁻¹ u nanočástic ve srovnání se samotným polyvinylalkoholem. Metodou transmisní elektronové mikroskopie TEM bylo zjištěno, že částice syntetizované pomocí FSS byly větší (asi 50 nm) a bez tendence k aglomeraci, zatímco částice syntetizované pomocí HH byly menší (asi 20 nm) a postupně se shlukovaly ve větší částice. Pomocí termogravimetrické analýzy TGA bylo zjištěno, že se nanočástice rozkládají při teplotě 330 – 430 °C. Bylo možné konstatovat, že HH je pro syntézu nanočástic využitelných v elektronických technologiích pro výsledné fyzikální vlastnosti méně vhodný než FSS, při jehož použití bylo možné syntetizovat monodisperzní nanočástice, které neaglomerovaly a byly stabilnější¹⁶.

2.2.2.2 *Hydrazin hydrát a hydroxid sodný*

Stabilní nanočástice stříbra byly připraveny redukcí dusičnanu stříbrného pomocí hydrazin hydrátu a hydroxidu sodného s následnou stabilizací pomocí citronanu sodného. Syntéza proběhla podle následující reakce (2) známé stechiometrie.



První krok procesu byla adsorpce hydrazin hydrátu na povrch nanočástice stříbra za vzniku intermediátu $[\text{N}_2\text{H}_4\text{Ag}_s^0]$. Tento komplex následně interagoval se dvěma stříbrnými ionty a dvěma hydroxylovými ionty za vzniku intermediátu $[\text{N}_2\text{H}_2\text{Ag}_s^0]$ a dvou atomů stříbra. Komplex $[\text{N}_2\text{H}_2\text{Ag}_s^0]$ interagoval se dvěma stříbrnými ionty a dvěma hydroxylovými ionty za vzniku dvou molekul stříbra. Molekuly stříbra byly stabilizovány citronanem sodným¹⁷.

2.2.3 Příprava nanočástic stříbra biologickými postupy

2.2.3.1 Houby

Cladosporium cladosporioides

Pro extracelulární syntézu nanočástic stříbra byla použita houba *Cladosporium cladosporioides*¹⁸ získaná ze sbírky Gulbarga University v Indii. 10 ml supernatanu biomasy bylo sloučeno se 100 ml roztoku obsahujícím 0,01 ml stříbrných iontů a reakce probíhala na třepače při teplotě 27 °C po dobu 3 dny při neustálé periodické kontrole absorbance UV-VIS spektrofotometrickou metodou při vlnové délce 415 nm. Vlnkost koloidních částic byla stanovena rentgenovou difrakcí na 35 nm. Výsledek byl potvrzen snímkem elektronovým transmisním mikroskopem, pomocí kterého byly zjištěny částice v rozmezí velikostí 10 – 100 nm, přičemž asi 32 % tvořily částice o velikosti 20 nm.

Pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) byly zaznamenány dva píky náležící hodnotám 1 640 cm⁻¹ a 1 540 cm⁻¹, které odpovídaly vibracím aminoskupin a karbonylů. Touto metodou byl potvrzen předpoklad o stabilizaci nanočástic stříbra proteiny ve vodném médiu, které tak zabraňují jejich aglomeraci. Produkty metabolismu hub, mezi které patří organické kyseliny, proteiny, polysacharidy, interagují s nanočásticemi, stabilizují je a díky tomu hrají velkou roli v utváření krystalů nanočástice.

Penicillium oxalicum

K buněčnému filtrátu druhu houby *Penicillium oxalicum*¹⁹ byl přidán dusičnan stříbrný za stálého míchání. Reakční směs byla vystavena záření xenonové lampy při udržování stálé teploty 25 °C. Optimálním pH bylo zvoleno pH 8, kdy byla zjištěna nejvyšší katalytická aktivita enzymu. Při pH 8 se tvořily nanočástice v rozsahu 1 – 14 nm s nejvyšším zastoupením nanočástic o velikosti 6 nm. Při pH 12 byly detegovány nanočástice v rozsahu 1 – 12 nm s nejvyšším zastoupením nanočástic o velikosti 4 nm. Tento postup kombinoval fotochemickou a biochemickou metodu syntézy nanočástic.

Phaenerochaete chrysosporium

Nanočástice stříbra byly syntetizovány druhem hub *Phaenerochaete chrysosporium*²⁰. Povrchový plasmon nanočástic měl maximum 470 nm a další maximum bylo zjištěno při vyšších vlnových délkách ve viditelné části spektra. Tato hodnota vypovídala o tvaru a velikosti nanočástic, která se pohybovala v rozmezí 50 – 200 nm a tvar nanočástic nebyl uniformní. Nanočástice byly tvořeny extracelulárně, obalovaly mycelium, nanočástice zde byly stabilizovány štěpením karboxylů, peptidických vazeb proteinů a hydroxylů sacharidů na povrchu mycelia.

2.2.3.2 Bakterie

Bacillus subtilis

Nanočástice stříbra byly připraveny pomocí mikroorganismu *Bacillus subtilis* a rostliny *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (barvínek růžový)²¹. Spektrofotometricky byla zjištěna různá morfologie syntetizovaných nanočástic použitých substrátů. U vzorku s bakteriálním supernatanem byl zjištěn jediný pík s maximem 440 nm. U vzorku z listového extraktu byl zjištěn pík s maximem 390 nm. Tento jev byl potvrzen při analýze pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu a rentgenovou difraktoметриí. Ve vzorku s bakteriálním supernatanem byly dokázány rovinné částice, destičky a částice, které vykazovaly nestabilitu a snahu aglomerovat ve větší částice. Ve druhém vzorku byly zjištěny vysoce stabilní nanočástice o velikosti 45 – 70 nm.

Klebsiella pneumonia

Pro syntézu nanočástic byl použit gram-negativní druh bakterie *Klebsiella pneumonia*²². Směs supernatanu a stříbrných iontů (10^{-3} M roztok) byla uložena na dobu 20 minut na temném místě při vystavení viditelnému záření, které bylo generováno halogenovou lampou (75 W). Redukce stříbrných iontů byla monitorována spektrofotometricky. Bylo naměřeno absorpční maximum 418 nm. Nejvyšší absorpce byla zaznamenána po vystavení záření halogenové výbojky o optické hustotě $1\ 000\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (nejvyšší zkoumaná hodnota optické hustoty). Získané nanočástice byly dále studovány metodou transmisní elektronové mikroskopie a bylo zjištěno, že jejich průměrná velikost v analytu činila 40 nm.

V této práci byl také popsán vliv míchání po ozáření reakční směsi světlem o nejvyšší optické hustotě. V první části probíhalo míchání reakční směsi po celou dobu 20 minut a byly připraveny nanočástice s absorpčním maximem 412 nm a velikosti přibližně 40 nm. Zatímco ve druhé části probíhalo míchání pouze při srážení AgCl a při samotné reakci míchání neprobíhalo. Velikost částic se snížila na 1 – 6 nm a průměrná velikost nanočástice byla asi 3 nm. Nastala rovněž změna spektra ve viditelné oblasti. Absorpční maximum se posunulo na hodnotu 410 nm a rostlo na intenzitě po hodnotu 480 nm vlnové délky. Na mechanismu syntézy nanostruktur se podílel enzym nitroreduktáza NfsA.

Pseudomona putida

Bakteriální druh *Pseudomona putida*²³ byl kultivován na Luria Bertani agaru. Extracelulární tvorba nanočástic byla indikována s maximem 420 nm. Bylo zjištěno, že biochemická tvorba nanočástic byla možná pouze při koncentraci 1 mM dusičnanu stříbrného, vyšší koncentrace inhibovali růst buněk. Byla měřena aktivita enzymu nitrátoreduktáza a bylo zjištěno, že aktivita enzymu v čase 20 minut od počátku reakce byla 0,958 U/ml/min. Následně byl zaznamenán pokles v aktivitě enzymu, což bylo způsobeno spotřebováním substrátu. Koncentrace vzniklých nanočástic byla 0,330 mg/l a průměrná velikost činila 70 nm. Optimalizované podmínky pro reakci byly pH 6, teplota 37,5 °C a inkubační doba 48 hodin.

Staphylococcus aureus

Pro přípravu nanočástic byl vybrán bakteriální druh *Staphylococcus aureus*²⁴. Supernatan byl přidán k dusičnanu stříbrnému. Reakce probíhala za světla po dobu 72 hodin a byla monitorována spektrofotometricky (420 nm). Nanočástice se začaly tvořit během několika minut a jejich tvorba probíhala extracelulárně. Byly syntetizovány nanočástice stříbra o velikosti 160 – 180 nm.

2.2.3.3 Rod *Lactobacillus*

Probiotické druhy bakterií mléčného kvašení jsou adaptabilní, rychle rostoucí, rychle se rozmnožující, produkující různé enzymy a jsou nepatogenní. Díky těmto svým vlastnostem jsou dobrými kandidáty k produkci nanočástic jak v laboratorním měřítku, tak i v průmyslu. Bakteriální buňky zástupců tohoto rodu mají schopnost tvorby nanočástic stříbra, zlata²⁵ i titanu²⁶.

Lactobacillus casei subsp. casei

K produkci nanočástic byly použity buňky *Lactobacillus casei subsp. casei*²⁷. Čas nezbytný pro adaptaci mikroorganismu na reakční podmínky byl asi 15 hodin, poté nastala enzymatická reakce s tvorbou nanočástic a jejich aglomerací. V této studii bylo také zjištěno, že centrifugace a filtrace vzorků s nanočásticemi měla negativní vliv na udržení koloidního roztoku nanočástic a vznikla větší tendence nanočástic aglomerovat ve větší částice a tvořit pouhým okem viditelné částice za současného zániku povrchového plasmonu. Bylo také zjištěno, že přítomný dusičnan stříbrný v reakční směsi funguje jako induktor transkripce genu pro příslušný redukční enzym. Pro správnou produkci enzymů i růst bakterie bylo třeba optimalizovat pH, přičemž kyselejší pH bylo výhodnější.

Pro enzymatickou reakci byly nezbytné některé koenzymy, a jelikož jsou koenzymy poměrně drahé, bylo výhodné použít při biochemické syntéze celé buňky, které zabezpečily recyklaci koenzymů. Pro recyklaci koenzymů byl nezbytný elektronový donor, který umožňuje neustálý průběh enzymatické reakce, proto obsahovala reakční směs glukózu. V opačném případě nastává vyčerpání koenzymů po 12 hodinách reakce.

Při vyšší koncentraci stříbrných iontů byl zjištěn neenzymatický mechanismus reakce. Grampozitivní bakterie mají buněčnou stěnu, která obsahuje silnou vrstvu peptidoglykanů, kyselinu teichoovou, lipoteichoovou kyselinu, proteiny a polysacharidy. *L. casei* má na svém povrchu mnoho záporně nabitých skupin, kde může probíhat biosorpce. Mléčné bakterie jsou schopny produkce exopolysacharidů, které fungují při protekci buněk proti toxickým sloučeninám, jako jsou kovové ionty. Exopolysacharidy mohou vytvořit dodatečná místa pro biosorpci stříbrných iontů. Buňky *L. casei* jsou schopny detoxikovat a redukovat velké množství stříbrných iontů na kovové stříbro. Experimentálně bylo ověřeno, že při zvýšení koncentrace biomasy dojde i ke zvýšení koncentrace vzniklých nanočástic.

Metodou analýzy TEM bylo zjištěno, že nanočástice jsou lokalizovány uvnitř bakteriálních buněk i volně ve směsi. Nanočástice byly převážně kulovitěho tvaru v rozmezí velikostí 25 – 100 nm a byly vysoce stabilní. Při pozorování syntézy nanočástic, bylo zjištěno, že bakteriální buňky nejprve vychytávaly stříbrné ionty ze směsi a následně je redukovaly enzymem z cytoplasmy.

2.3 Antimikrobiální aktivita

Stříbrné nanočástice vykazují desinfekční vlastnosti. Působí vysoce aktivně proti široké škále mikroorganismů a parazitů v nízkých dávkách. Při použitých dávkách nanočástice stříbra vykazují velice nízkou toxicitu pro člověka a jsou relativně levné a dostupné. Podle nejnovějších studií v antimikrobiální aktivitě nanočástic stříbra hraje hlavní roli oxidace kovových nanočástic.

2.3.1 Mechanismus

Při studiu antimikrobiální aktivity nanočástic stříbra je nutné studovat interakci částic s bakteriální buňkou a pochody, které vedou k bakteriální smrti. Výsledky se odvíjejí od typu nanočástic, studovaného organismu, tvaru, velikosti, koncentraci, médiu, přítomnosti světla, kyslíku atd. U částic s vysokou antimikrobiální aktivitou je potom třeba sledovat jejich chemické a fyzikální modifikace, agregaci nanočástic, rozpustnosti, oxidačně-redukční reakce, absorpci a desorpci iontů, molekul či polymerů, interakci s ostatními nanočásticemi a povrchu nanočástic. Následně je třeba studovat jejich chování v životním prostředí.

2.3.1.1 Stříbro (Ag^0)

Při kontaktu nanočástic stříbra s bakteriální kulturou mají nanočástice tendenci akumulovat na bakteriální membráně a vytvářet agregáty. Tento proces vede ke snížení integrity bakteriální membrány a následně její perforaci a buněčné smrti. Při studiu mechanismu tohoto procesu bylo zjištěno, že je závislý především na velikosti částic. Různě velké částice mají jiný mechanismus působení na buněčnou membránu. Malé částice jsou aktivnější, mají větší povrch, a proto působí rychleji při oxidaci na stříbrné ionty.

V některých studiích byl pozorován vysoký podíl reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňkách, které interagovaly s nanočásticemi stříbra. Při vystavení buňky vysoké koncentraci ROS vzrůstal oxidační stres buňky, který vedl k inaktivaci buňky. Nanočástice fungují jako katalyzátory při produkci ROS, které vznikají taktéž přirozeně při aerobní respiraci. Přirozená produkce ROS je však mnohem nižší než produkce způsobená nanočásticemi stříbra.

2.3.1.2 *Stříbrné ionty (Ag⁺)*

Stříbrné ionty mohou být z roztoku uvolněny v přítomnosti solí, zeolitů, ionomerů iontovou výměnou či rozpuštěním. Stříbrné ionty fungují jako oxidační činidlo za vzniku Ag⁰ nanočástic. Iontové stříbro má vysokou afinitu k organickým aminům, fosfátům, thiolům, (selenolům), se kterými tvoří téměř kovalentní vazbu. Mezi některými thioley může stříbro tvořit můstek za tvorby řetězců, což může vést k nevratné agregaci. Může dojít k inaktivaci biologických systémů za nevratného vzniku aduktů. Některé molekuly, jako například DNA, peptidy, kofaktory, byly identifikovány jako cíle stříbrných iontů a jsou hlavním důvodem buněčné smrti.

Zvýšení koncentrace ROS v buňce při vystavení stříbrným iontům je způsobeno narušením regulace oxidačního stresu, interakcí stříbrných iontů s reduktázami (glutathion peroxidáza obsahuje selenocystein) či vyplavením intracelulárního glutathionu, který funguje jako kofaktor. Klíčovým krokem antibakteriální aktivity nanočástic stříbra je rozpouštěcí mechanismus oxidace. Nanočástice jsou stabilní vůči oxidaci vodou, při rozpouštění je nutná role oxidovačla, tím je ve většině studií atmosférický kyslík, který je rozpuštěn ve vodě. Nanočástice stříbra fungují jako rezervoáry stříbrných iontů, které mají majoritní podíl na antibakteriální aktivitě.

2.3.1.3 *Povrch nanočástice*

Na antimikrobiální aktivitu nanočástic stříbra se podílí také jejich povrch. Bakteriální membrána je záporně nabitá, a pokud je povrch nanočástic taktéž záporně nabit, může dojít k výměně ligandů mezi nanočásticí a buněčnou membránou. Afinita nanočástic k povrchu buňky závisí na gama-potenciálu nanočástice a na složení buněčné membrány a extracelulárních polymerech a může tak dojít i k fyzické interakci. Při synergickém působení nanočástice s povrchem buňky dochází ke zvýšení antibakteriálního efektu^{28,29}.

2.3.2 Toxicita

Escherichia coli

Nanočástice byly připraveny pomocí dusičnanu stříbrného a citronanu sodného, jejich velikost se pohybovala v rozsahu 20 – 70 nm. Jako pozitivní kontrola byly požitý nanočástice s PVP obalem o velikosti 20 nm a jako negativní kontrola deionizovaná voda. Na malé kolečko filtračního papíru byly naneseny vzorky nanočástic o různé koncentraci a následně byly inkubovány s bakteriálními buňkami na Petriho miskách. Nanočástice o koncentracích 10 – 100 ppm vytvořily na Petriho miskách zónu bez buněk v rozsahu 0,4 – 1,42 cm. Bylo také zjištěno, že při vystavení reakce atmosféře byl výsledek antibakteriální aktivity viditelně zvýšen.

Pro analýzu charakteristických znaků apoptózy byly buňky potřísněny Annexinem V-FITC a propidium jodidem. Po inkubaci buněk s nanočásticemi stříbra byly buňky inkubovány 20 minut v Annexinu V vazebném pufru (5 μl/ml Annexin V-FITC) a 1 μl/ml propidium

jodidu. Buňky byly analyzovány pomocí průtokového cytometru. Pomocí této techniky je možné oddělit apoptické, nekrotické a živé buňky. Po 2 hodinách vystavení buněk stříbrným iontům bylo zjištěno, že došlo k nárůstu koncentrace apoptických buněk o 21 %, při pozitivní kontrole o 27 %.

Pro indikaci poruch membrány byly buňky inkubovány v disperzi stříbra, buňky byly po centrifugaci přidány k 1 ml hovězího sérového albuminu. Bylo přidáno 5 µg [DiBAC₄(3)] (CAS 70363-83-6) a cytometrická analýza byla provedena pomocí cytometru FACSCalibur. Fluorescence indikující poruchy membrány vzrostla po vystavení stříbru o téměř 90 %, při pozitivní kontrole o 99 %. Aktivace kaspáz byla analyzována pomocí průtokového cytometru. Genová exprese kaspáz byla zjištěna u 37 % buněk po vystavení nanočástic, pozitivní kontrola 48 %.

Detekce znaků pozdní apoptózy a aktivace mechanismů opravy DNA byla provedena pomocí deoxynukleotidové transferázy dUTP. Buňky po inkubaci s nanočásticemi stříbra byly nejprve promyty Krebsovým pufrém a následně permeabilizovány permeabilizačním roztokem 2 minuty v ledu a znovu promyty. DNA fragmenty byly analyzovány FITC-dUTP. Buňky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem a fluorescence byla měřena pomocí průtokového cytometru. Byl detegován nárůst fluorescence o 62 % po vystavení nanočástic stříbra.

Proces apoptózy bakteriálních buněk *E. coli* byl zapříčiněn nadměrnou produkcí ROS, která přetěžuje antioxidační systémy a zvýšení koncentrace peroxidu vodíku, peroxidových iontů, oxidu dusnatého a hydroxylových radikálů, které mají vliv na brzký počátek apoptózy. Příčina počátku apoptózové kaskády je také destrukce buněk, nárůst volných vápenatých iontů a depolarizace buněčné membrány. Následně je vyvolána exprese genů pro tvorbu proteinů se stejnou funkcí, jako mají kaspázy (cysteinproteázy) u eukaryot a expresi další genů, které inhibují expresi bakteriálních genů pro opravu buňky³⁰.

Klebsiella pneumoniae

Gram-negativní bakterie *Klebsiella pneumoniae*³¹ byla kultivována při teplotě 37 °C na Mueller-Hinton agaru a byla vybrána koncentrace 10⁶ buněk/ml. Nanočástice stříbra byly připraveny pomocí listového extraktu rostliny *Typha angustifolia* a dusičnanu stříbrného, jejich průměrná velikost činila 8 nm. Minimální inhibiční koncentrace nanočástic stříbra pro potlačení životaschopnosti kolonií činila 1,4 µg/ml.

Tato studie byla také zaměřena na efekt antibiotik společně s nanočásticemi stříbra (gentamicin 10 µg/ml, cefotaxime 30 µg/ml, meropenem 10 µg/ml). Minimální inhibiční koncentrace pro vzorky s antibiotiky činila: 1 µg/ml pro gentamicin, 0,5 µg/ml pro cefotaxime a 0,4 µg/ml nanočástic stříbra pro meropenem. Produkce ROS bakteriemi při současném vystavení antibiotik a nanočástic znatelně vzrostlo. Nanočástice stříbra stejně jako antibiotika zvyšují produkci ROS tak, že zvyšují permeabilitu bakteriální membrány.

Pseudomonas aeruginosa

Nanočástice stříbra byly připraveny o velikosti 6,7 nm s maximem povrchového plazmonu 412 nm. Kompletní inhibice růstu buněk byla indikována při koncentraci nanočástic 50 µg/ml, v přítomnosti dusičnanu stříbrného byla tato koncentrace 10 µg/ml při vystavení suspenzi buněk. Při zkoumání bakteriálního biofilmu, který je chráněn metabolity buněk, bílkovinami, polysacharidy apod. bylo zjištěno, že koncentrace 100 µg/ml nanočástic stříbra snížila koncentraci buněk přibližně na 8 % původní koncentrace. Pro docílení stejného výsledku antibakteriální aktivity bylo třeba expozice koncentrace 8 µg/ml dusičnanu stříbrného. A bylo zjištěno, že pro zničení kombinace biofilmu i volných buněk bylo zapotřebí 250 µg/ml nanočástic stříbra.

Následně bylo zkoumáno, zda-li jsou buňky po vystavení nanočásticím pouze neschopny metabolismu a růstu nebo došlo k buněčné smrti. Počet buněk, které tvořily kolonie, silně klesl po působení nanočástic i stříbrných iontů. Z dalších analýz bylo možné říci, že buňky nepodlehly lyzi, nedošlo k perforaci membrán a množství rRNA v buňkách se nezměnilo. Pouze koncentrace ATP v buňkách klesla na 75 % původní hodnoty. Tato studie prokázala, že u bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa*³² nedošlo po působení nanočástic a iontů stříbra k buněčné smrti.

3. CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat přehled literatury o produkci nanočástic stříbra.

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo pomocí PCR ověřit amplifikace DNA izolované z buněk *Lactobacillus gasseri* K7.

Součástí práce bylo:

- kultivace buněk *Lactobacillus gasseri* K7,
- izolace DNA z buněk kmene *Lactobacillus gasseri* K7,
- amplifikace izolované DNA s použitím specifických parametrů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Standard DNA (100 bp žebříček, který obsahuje fragmenty DNA o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-HCl (Tris-hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid) (Amresco, Solon, USA)
- Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) (Amresco, Solon, USA)
- Nanášecí pufr Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- další běžné chemikálie byly z komerční sítě v kvalitě p.a.

Komponenty pro PCR

- voda pro PCR (Top-Bio, Praha, ČR)
- 10×PCR Blue Buffer (obsahuje 750 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 1 % Tween 20, 25 mM MgCl₂) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Směs dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery F_eub, R_eub a GASS I, GASS II (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)

Sekvence obou primerů jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 3 a Tabulka 6).

- Taq DNA polymeráza 1.1 (1 U/μl) (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA izolované z buněk *Lactobacillus gasseri* K7

Média

- MRS (Mann, Rogosa, Sharpe) medium (Oxoid, Hampshire, Velká Británie)

4.1.2 Mikroorganismy a DNA

Mikroorganismus *Lactobacillus gasseri* K7 byl získán od doc. RNDr. A. Španové, CSc. (VUT v Brně, Fakulta chemická).

Uvedený mikroorganismus byl zvolen na základě skutečnosti, že produkoval částice nanostříbra³³.

4.1.3 Média a roztoky

Roztoky a metody byly převzaty ze skript³⁴.

4.1.3.1 Kultivační média

- MRS agar

MRS médium bylo připraveno podle návodu výrobce a pH upraveno na hodnotu 6,5. Bylo přidáno 15 g/l agaru. Půda byla sterilizována v autoklávu při 121°C na dobu 15 minut.

4.1.3.2 Roztoky pro agarovou gelovou elektroforézu

- 0,5 × TBE pufr

54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněno destilovanou vodou do 1000 ml.

Před použitím byl TBE pufr 10krát ředěný.

- Barvicí lázeň

100 µl roztoku ethidiumbromidu (5 mg/ml) bylo přidáno k 500 ml destilované vody.

- Nanášecí pufr Yellow load (6×koncentrovaný, obsahuje barvivo orange G), (Top-Bio, Praha, ČR)

4.2 Pomůcky a přístroje

- Mikrovlnná trouba SMW 2320 (SENCOR, ČR)
- Thermocycler PTC – 200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Transilluminator TVR-3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy – Cast, model B1 (Owl Scientific, USA)

- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Běžné laboratorní sklo, umělohmotný materiál a laboratorní pomůcky

4.3 Metody

V této kapitole jsou popsány postupy metod experimentů, které byly v této práci provedeny.

4.3.1 Křížový roztěr buněk

- Bylo připraveno pevné MRS médium v Petriho miskách pro kultivaci mikroorganismů.
- V očkovacím boxu bylo sterilně očkovací kličkou přeneseno určité množství bakteriální kultury na pevné médium a následně roztíráním docíleno co nejnižší koncentrace mikroorganismů (křížový roztěr).
- Kultivace probíhala 48 hodin při teplotě 37 °C v termostatu.

4.3.2 Příprava DNA pro amplifikaci ředěním DNA *Lactobacillus gasseri* K7

- Ze základního roztoku bakteriální DNA *Lactobacillus gasseri* K7 o koncentraci 492 ng/μl byly připraveny vzorky s bakteriální DNA o koncentraci 49,2; 4,92 a 0,492 ng/μl. K ředění byla použita voda pro PCR.
- Eppendorfovy zkumavky s různými koncentracemi bakteriální DNA byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě –21 °C.

4.3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Byla provedena amplifikace DNA *Lactobacillus gasseri* K7 metodou PCR pro doménu *Bacteria* a následně druhově specifická, metody se lišily především v použitých primerech a průběhu procesu amplifikace DNA.

4.3.3.1 PCR pro doménu *Bacteria*

- Všechny komponenty PCR byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány.
- Bylo připraveno 24 μl směsi pro PCR s 1 μl DNA izolované z bakteriální kultury v 200 μl Eppendorfových zkumavkách. Směsi byly namíchány v množství a pořadí

uvedeném v Tabulka 1. Byla připravena negativní kontrola s 1 μ l vody pro PCR a pozitivní kontrola s DNA matricí (10 ng/ μ l) bakteriálního kmene *Lactobacillus gasseri* K7.

- Vzorke obsahující komponenty pro PCR byly po promíchání umístěny do termocyklu, kde proces amplifikace probíhal ve 30 cyklech (Tabulka 2).
- Vzorke s amplifikovanou DNA byly uchovávány v mrazícím boxu při teplotě $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 1: Složení směsi pro PCR.

Pořadí	Komponenta	Objem [μ l]
1.	Voda pro PCR	19,0
2.	Reakční pufr	2,5
3.	Směs dNTP	0,5
4.	Primer F_eub	0,5
5.	Primer R_eub	0,5
6.	Taq DNA-polymeráza	1,0
7.	Vzorek DNA	1,0

Tabulka 2: Podmínky PCR.

Krok	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas [min]
První denaturace DNA	94	5
Poslední syntéza řetězce DNA	72	5
Denaturace DNA	94	0,5
Hybridizace primerů	55	0,5
Syntéza řetězce DNA	72	1

Tabulka 3: Primery pro druhově specifickou PCR³⁵.

Primery	Sekvence (5' – 3')	Produkt PCR (bp)
F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466
R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

4.3.3.2 Druhově specifická PCR

- Všechny komponenty PCR byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány.
- Bylo připraveno 144 μl mastermix pro PCR, ze kterých bylo pipetováno 24 μl a přidán 1 μl DNA izolované z bakteriální kultury v 200 μl Eppendorfových zkumavkách. Směsi byly namíchány v zadaném množství a pořadí (Tabulka 4 a Tabulka 6). Byla připravena negativní kontrola s 1 μl vody pro PCR a pozitivní kontrola s DNA matricí (10 $\text{ng}/\mu\text{l}$) bakteriálního kmene *Lactobacillus gasseri* K7.
- Byly připraveny 3 vzorky DNA o různé koncentraci: 49,2 $\text{ng}/\mu\text{l}$; 4,92 $\text{ng}/\mu\text{l}$; 0,492 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Tyto vzorky byly připraveny ředěním zásobního roztoku (492 $\text{ng}/\mu\text{l}$). Byly smíseny 2 μl roztoku DNA s 18 μl vody pro PCR. Tento postup byl proveden třikrát pro dosažení konečné koncentrace.
- Vzorky obsahující komponenty pro PCR byly po promíchání umístěny do termocykleru, kde proces amplifikace probíhal ve 30 cyklech (Tabulka 5).
- Vzorky s amplifikovanou DNA byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 4: Složení mastermix pro PCR.

Pořadí	Komponenta	Objem [μl]
1.	Voda pro PCR	144
2.	Reakční pufr	15
3.	Směs dNTP	3
4.	Primer UNIV	3
5.	Primer GASS	3
6.	Taq DNA-polymeráza	6

Tabulka 5: Podmínky PCR.

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]
První denaturace DNA	94	5
Poslední syntéza řetězce DNA	72	10
Denaturace DNA	94	1
Hybridizace primerů	58	1
Syntéza řetězce DNA	72	2
Poslední krok	10	bez omezení

Tabulka 6: Primery pro druhově specifickou PCR³⁶.

Primery	Sekvence (5' – 3')	Produkt PCR (bp)
GASS I	GAGTGCGAGAGCACTAAAG	574
GASS II	CTATTTCAAGTTGAGTTTCTCT	

4.3.4 Agarózová gelové elektroforéza produktů PCR

- Do Erlenmeyerovy baňky byl připraven 1,2 % agarózový gel z 0,84 g agarózy a 70 ml 0,5 × TBE pufru. Směs byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě a po vychladnutí asi na 60 °C nalita do vaničky s následným vložením hřebínku, kde byla asi 30 minut ponechána ke ztuhnutí.
- K produktům PCR bylo napipetováno 5 µl nanášecího pufru Yellow load.
- Po ztuhnutí byl vyjmut hřebínek a do vzniklých otvůrků v pevném gelu bylo naneseno 30 µl amplifikonů. Přibližně uprostřed gelu byl do nanášecího otvůrku nanesen také DNA standard v objemu 5 µl.
- Vanička s gelem byla vložena do elektroforetické vany a převrstvena 0,5 × TBE pufrům do výšky asi 2 – 3 mm nad gel. Bylo použito asi 600 ml 0,5 × TBE pufru.
- Elektroforéza probíhala při napětí 80 V přibližně 2 hodiny. Elektroforéza byla ukončena, jakmile barvička doputovala do 2/3 délky agarózového gelu.
- Po skončení elektroforézy byl gel barven v roztoku ethidium bomidu asi 30 minut. Následně byl gel opláchnut v destilované vodě a umístěn na transilluminátor a pozorován v UV světle při vlnové délce $\lambda = 305$ nm.
- Nakonec byla provedena fotografická dokumentace gelu.

5. VÝSLEDKY

5.1 Křížový roztěr bakteriální kultury

Byl proveden křížový roztěr bakteriální kultury *Lactobacillus gasseri* K7 dle postupu uvedeném v kapitole 4.3.1. Růst kolonií byl fotograficky dokumentován (Obrázek 3). Narostlé kolonie byly hladké, okrouhlé, bíle zbarvené.



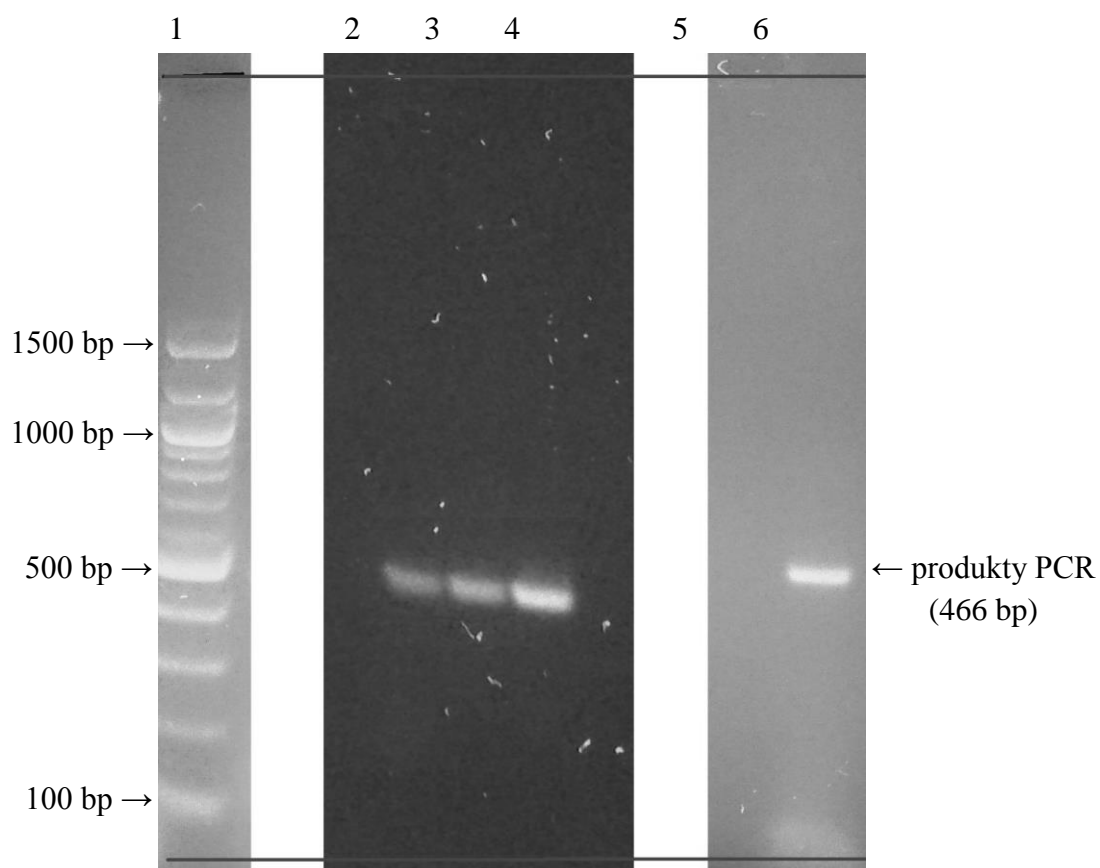
Obrázek 3: Růst kolonií na MRS agaru po křížovém roztěru bakteriální kultury *Lactobacillus gasseri* K7.

Po křížovém roztěru narostly jednotlivé bakteriální kolonie čisté mikrobiální kultury *Lactobacillus gasseri* K7.

5.2 Amplifikace DNA metodou PCR

5.2.1 Amplifikace DNA metodou PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*

Byly připraveny směsi pro PCR a provedena PCR dle postupů uvedených v kapitole 4.3.3.1. Vzorky byly připraveny ředěním základního roztoku bakteriální DNA *Lactobacillus gasseri* K7 o koncentraci 492 ng/μl podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.3.1. Byla provedena agarózová gelová elektroforéza produktů PCR amplifikovaných z DNA, byly fotograficky dokumentovány (Obrázek 4). Byly detegovány produkty PCR rozdílné intenzity.

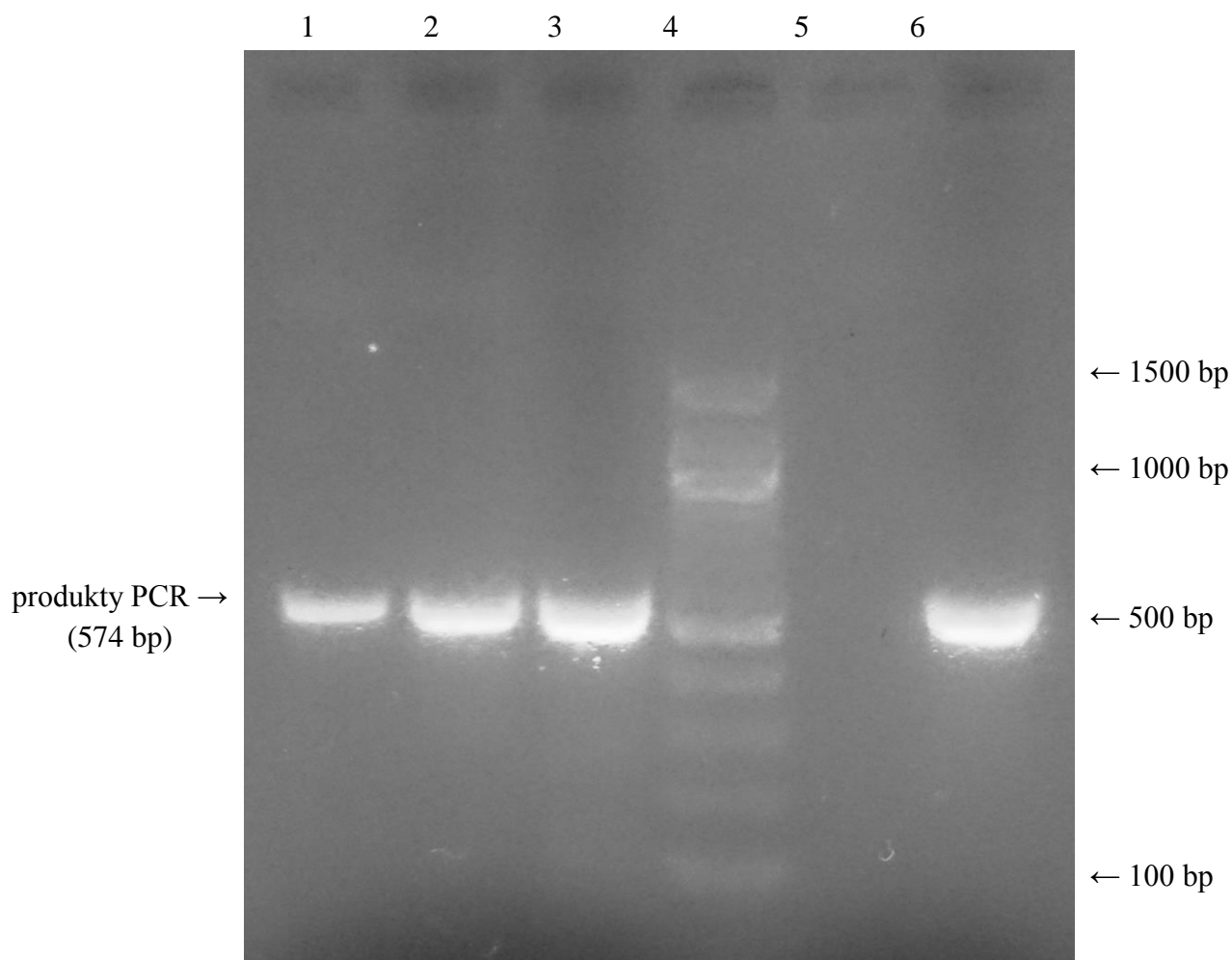


Číslo běhu	DNA	Množství DNA [ng/μl]	Detekce produktů PCR
1	standard DNA		
2	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	0,492	+
3	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	4,920	++
4	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	49,200	+++
5	negativní kontrola		-
6	pozitivní kontrola	10,000	+++

Obrázek 4: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (466 bp), amplifikováno bylo různé množství DNA *Lactobacillus gasseri* K7, intenzita produktů PCR: velmi silná +++, silná ++, slabá +, nedetekován -.

5.2.2 Amplifikace DNA s primery specifickými pro druh *Lactobacillus gasseri*

Byl připraven mastermix (Tabulka 4) pro PCR a provedena PCR dle postupů uvedených v kapitole 4.3.3.2. Do PCR směsí bylo použito různé množství DNA (49,2 ng/μl; 4,92 ng/μl; 0,492 ng/μl). Tyto vzorky byly získány ředěním základního roztoku bakteriální DNA *Lactobacillus gasseri* K7 o koncentraci 492 ng/μl podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.2. Byla provedena agarózová gelová elektroforéza produktů PCR amplifikovaných z DNA, výsledky byly fotograficky zaznamenány (Obrázek 5). Byly detegovány produkty PCR rozdílné intenzity.



Číslo běhu	DNA	Množství DNA [ng/μl]	Detekce produktů PCR
1	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	0,492	+
2	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	4,920	++
3	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	49,200	+++
4	standard DNA		
5	negativní kontrola		-
6	pozitivní kontrola	10,000	+++

Obrázek 5: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (574 bp), amplifikováno bylo různé množství DNA *Lactobacillus gasseri* K7, intenzita produktů PCR: velmi silná +++, silná ++, slabá +, nedetegován -.

5.3 Diskuse

Byl proveden křížový roztěr mikrobiální kultury *Lactobacillus gasseri* K7. Narostly jednotlivé bakteriální kolonie čisté mikrobiální kultury. Bakteriální kultura *Lactobacillus gasseri* K7 byla následně použita pro amplifikaci DNA.

Produkty PCR pro doménu *Bacteria* byly detegovány v závislosti na jejich koncentraci před amplifikací (Obrázek 4). Výsledky tohoto gelu je možné brát za aprávné, protože v negativní kontrole, ve které byla pouze voda pro PCR, nebyl na gelu detegován produkt PCR (5. běh). Proto lze konstatovat, že použité komponenty pro přípravu PCR směsí nebyly kontaminovány bakteriální DNA. Pozitivní kontrola (6. běh), provedená se vzorkem standardu bakteriální DNA *Lactobacillus gasseri* K7, byla velice zřetelně detegována na gelu. Proto lze konstatovat, že použité komponenty pro PCR byly dobré kvality. Nejkoncentrovanější vzorek DNA vykazoval nejvyšší intenzitu amplikonu na gelu (4. běh), naopak nejzředěnější vzorek DNA vykazoval nejnižší intenzitu amplikonu (2. běh).

Produkty specifické PCR byly také detegovány s různou intenzitou v závislosti na jejich počáteční koncentraci (Obrázek 5). Byla také provedena pozitivní a negativní kontrola stejným způsobem jako u výše popsané metody. Produkty PCR u negativní kontroly nebyly detegovány (5. běh), zatímco u pozitivní kontroly (6. běh) byl amplikon dobře detegován. Na tomto gelu byl nejkoncentrovanější vzorek DNA (3. běh) také nejlépe detegován, nejzředěnější vzorek DNA (1. běh) byl detegován o minimální intenzitě.

6. ZÁVĚR

V první části bakalářské práce byly teoreticky zpracovány poznatky týkající se syntézy nanočástic stříbra, byla provedena schematizace procesů syntézy a byly kriticky hodnoceny výhody i nevýhody procesů. Teoretická část práce byla také zaměřena na antibakteriální aktivitu nanočástic stříbra, bylo pojednáno o používaných metodách indikace mechanismu působení antibakteriální aktivity a šíře působení nanočástic stříbra na různé mikroorganismy také v závislosti na typu jejich syntézy. V neposlední řadě bylo také pojednáno o vlastnostech nanočástic, na které bylo navázáno jejich možným použitím.

Pro syntézu nanočástic jsou vybírány materiály, které nezatěžují životní prostředí, nejsou toxické a ani příliš drahé, proto je velice výhodná biochemická produkce nanočástic. Extrakt biomasy či celé bakteriální kultury nejsou příliš drahé a je možné vybrat nenáročné mikroorganismy, které zabezpečí dobrou aglomeraci, požadovaný tvar i velikost nanočástic pro další účely. Mechanismy biochemické produkce nanočástic jsou prozatím objektem zkoumání, základem je však enzymatická reakce, které se účastní enzym nitrátoreduktáza, substrátem je stříbrná sůl, pro průběh reakce je nutná glukóza pro recyklaci kofaktorů enzymatické reakce.

Nynější výzkumy jsou zaměřeny na objev mechanismu a popis vlivu nanočástic stříbra na životní prostředí v globálním měřítku při použití do produktů každodenní potřeby a jejich vliv na tkáň eukaryotních organismů jako i člověka, stejně tak je výzkum zaměřen na jejich potenciální použití a vývoj nanotechnologií.

Druhá část bakalářské práce byla zaměřena na praktickou identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus*. Vybraným zástupcem byl *Lactobacillus gasseri* K7. Pomocí primerů F_eub a R_eub, specifických pro doménu *Bacteria*, byly získány amplikony o velikosti 466 bp. Pomocí druhově specifických primerů byly získány amplikony o velikosti 574 bp. Byla tak potvrzena správnost druhového zařazení použitého mikroorganismu, který bude použit v dalších experimentech s cílem optimalizovat produkci nanočástic stříbra. Pomocí těchto metod je možné získat amplifikovanou matici DNA daného mikroorganismu ze vzorku o nepatrném množství.

7. SEZNAM ZKRATEK

AgNP	stříbrné nanočástice
FSS	formaldehyd-sulfoxylát sodný
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
HH	hydrazin hydrát
NfsA	nitroreduktáza
PCR	polymerázová řetězová reakce
ROS	reaktivní formy kyslíku
SPB	povrchový plasmon
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TGA	termogravimetrická analýza

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ SHARMA, Virender K., Natalie JOHNSON, Leslie CIZMAS, Thomas J. MCDONALD, Hyunook KIM a V. SIMON. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere*. 2016, **150**, 702-714. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.12.084. ISSN 00456535. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653515305385>
- ² MENG, Mei, Huawei HE, Jing XIAO, Ping ZHAO, Jiale XIE a Zhisong LU. Controllable in situ synthesis of silver nanoparticles on multilayered film-coated silk fibers for antibacterial application. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016, **461**, 369-375. DOI: 10.1016/j.jcis.2015.09.038. ISSN 00219797. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979715302095>
- ³ NGUYEN VAN LONG, N., Catherine JOLY, Philippe DANTIGNY, Ping ZHAO, Jiale XIE a Zhisong LU. Active packaging with antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, **220**, 73-90. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.001. ISSN 01681605. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160516300022>
- ⁴ UVOD DO NANOTECHNOLOGIE HOŠEK 2010 ISBN: 978-80-01-04555-8
- ⁵ POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0331-2.
- ⁶ *Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes* [online]. In: . [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: <http://www.zeta-meter.com/5min.pdf>
- ⁷ MIE, Gustav. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*. 1908, **330**(3), 377-445. DOI: 10.1002/andp.19083300302. ISSN 00033804. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/andp.19083300302>
- ⁸ KVÍTEK, Libor. *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra*. Olomouc, 2008. Habilitační práce. Universita Palackého v Olomouci.
- ⁹ SCAIANO, Juan C., José C. NETTO-FERREIRA, Emilio ALARCON, Paul BILLONE, Carlos J. Bueno ALEJO, Charles-Oneil L. CRITES, Matthew DECAN, Chiara FASCIANI, María GONZÁLEZ-BÉJAR, et al. Tuning plasmon transitions and their applications in organic photochemistry. *Pure and Applied Chemistry*. 2011, 83(4): -. DOI: 10.1351/PAC-CON-11-01-09. ISSN 1365-3075. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2011.83.issue-4/pac-con-11-01-09/pac-con-11-01-09.xml>
- ¹⁰ TAO, Andrea R., Susan HABAS a Peidong YANG. Shape Control of Colloidal Metal Nanocrystals. *Small*. 2008, **4**(3), 310-325. DOI: 10.1002/sml.200701295. ISSN 16136810. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sml.200701295>

- ¹¹ STAMPLECOSKIE, Kevin G. a Juan C. SCAIANO. Light Emitting Diode Irradiation Can Control the Morphology and Optical Properties of Silver Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2010, **132**(6), 1825-1827. DOI: 10.1021/ja910010b. ISSN 0002-7863. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja910010b>
- ¹² STAMPLECOSKIE, Kevin G. a Juan C. SCAIANO. Silver as an Example of the Applications of Photochemistry to the Synthesis and Uses of Nanomaterials†,‡. *Photochemistry and Photobiology*. 2012, **88**(4), 762-768. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01103.x. ISSN 00318655. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.2012.01103.x>
- ¹³ LONG, Dewu, Guozhong WU, Shimou CHEN, Andriy HORECHYY, Yuriy MEDVEDEVKIKH a Rong YIN. Preparation of oligochitosan stabilized silver nanoparticles by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*. 2007, **76**(7), 1126-1131. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2006.11.001. ISSN 0969806x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969806X06005470>
- ¹⁴ MARETTI, Luca, Paul S. BILLONE, Yun LIU a Juan C. SCAIANO. Facile Photochemical Synthesis and Characterization of Highly Fluorescent Silver Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2009, **131**(39): 13972-13980. DOI: 10.1021/ja900201k. ISSN 0002-7863. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja900201k> transitions and their applications in organic photochemistry. *Pure and Applied Chemistry*. 2011, **83**(4): -. DOI: 10.1351/PAC-CON-11-01-09. ISSN 1365-3075. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2011.83.issue-4/pac-con-11-01-09/pac-con-11-01-09.xml>
- ¹⁵ PAENG, Dongwoo, Daeho LEE, Costas P. GRIGOROPOULOS, S. DASH, A. K. TYAGI, M. S. R. N. KIRAN a U. RAMAMURTY. Characteristic time scales of coalescence of silver nanocomposite and nanoparticle films induced by continuous wave laser irradiation: “Nanomechanical and optical properties of highly a-axis oriented AlN films” [Appl. Phys. Lett. 101, 254102 (2012)]. *Applied Physics Letters*. 2014, **105**(7), 073110-. DOI: 10.1063/1.4893465. ISSN 0003-6951. Dostupné také z: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/apl/105/7/10.1063/1.4893465>
- ¹⁶ KHANNA, P.K., Narendra SINGH, Shobhit CHARAN, V.V.V.S. SUBBARAO, R. GOKHALE a U.P. MULIK. Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method. *Materials Chemistry and Physics*. 2005, **93**(1): 117-121. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2005.02.029. ISSN 02540584. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058405001550>
- ¹⁷ KYTSYA, Andriy, Liliya BAZYLYAK, Yuriy HRYNDA, Andriy HORECHYY, Yuriy MEDVEDEVKIKH a Rong YIN. The Kinetic Rate Law for the Autocatalytic Growth of Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles. *International Journal of Chemical Kinetics*. 2015, **47**(6), 351-360. DOI: 10.1002/kin.20913. ISSN 05388066. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/kin.20913>

- ¹⁸ BALAJI, D.S., S. BASAVARAJA, R. DESHPANDE, D. Bedre MAHESH, B.K. PRABHAKAR a A. VENKATARAMAN. Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009, **68**(1), 88-92. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.09.022. ISSN 09277765. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776508003494>
- ¹⁹ DU, Liangwei, Qiuhong XU, Meiyong HUANG, Liang XIAN a Jia-Xun FENG. Synthesis of small silver nanoparticles under light radiation by fungus *Penicillium oxalicum* and its application for the catalytic reduction of methylene blue. *Materials Chemistry and Physics*. 2015, **160**(1), 40-47. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2015.04.003. ISSN 02540584. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058415300109>
- ²⁰ VIGNESHWARAN, Nandanathangam, Arati A. KATHE, P.V. VARADARAJAN, Rajan P. NACHANE a R.H. BALASUBRAMANYA. Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phaenerochaete chrysosporium*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006, **53**(1), 55-59. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.07.014. ISSN 09277765. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776506002293>
- ²¹ KANNAN, N., K.S. MUKUNTHAN, S. BALAJI, R.P. NACHANE, K.M. PARALIKAR, R.H. BALASUBRAMANYA a Jorge L. GARDEA-TORRESDEY. A comparative study of morphology, reactivity and stability of synthesized silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* and *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, **86**(2), 378-383. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.04.024. ISSN 09277765. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776511002311>
- ²² MOKHTARI, Narges, Shahram DANESHPAJOUH, Seyedali SEYEDBAGHERI, et al. *Biological synthesis of very small silver nanoparticles by culture supernatant of Klebsiella pneumonia: The effects of visible-light irradiation and the liquid mixing process*. DOI: 10.1016/j.materresbull.2008.11.021. ISBN 10.1016/j.materresbull.2008.11.021. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025540808004145>
- ²³ THAMILSELVI, V. a K. V. RADHA. SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES FROM PSEUDOMONAS PUTIDA NCIM 2650 IN SILVER NITRATE SUPPLEMENTED GROWTH MEDIUM AND OPTIMIZATION USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. *DIGEST JOURNAL OF NANOMATERIALS AND BIOSTRUCTURES*. 2013, **8**(3), 1101-1111. ISSN 1842-3582. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963409000501>
- ²⁴ NANDA, Anima a M. SARAVANAN. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2009, **5**(4), 452-456. DOI: 10.1016/j.nano.2009.01.012. ISSN 15499634. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963409000501>

- ²⁵ NAIR, Binoj a T. PRADEEP. Coalescence of Nanoclusters and Formation of Submicron Crystallites Assisted by Lactobacillus Strains. *Crystal Growth*. 2002, **2**(4), 293-298. DOI: 10.1021/cg0255164. ISSN 1528-7483. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cg0255164>
- ²⁶ PRASAD, K., Anal K. JHA a A. R. KULKARNI. Lactobacillus assisted synthesis of titanium nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*. 2007-5-31, **2**(5), 248-250. DOI: 10.1007/s11671-007-9060-x. ISSN 1931-7573. Dostupné také z: <http://www.nanoscalereslett.com/content/2/5/248>
- ²⁷ KORBEKANDI, Hassan, Siavash IRAVANI a Sajjad ABBASI. Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using Lactobacillus casei subsp. casei. *Journal of Chemical Technology*. 2012, **87**(7), 932-937. DOI: 10.1002/jctb.3702. ISSN 02682575. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.3702>
- ²⁸ LE OUAY, Benjamin, Francesco STELLACCI, A. M. SCHRAND, L. K. BRAYDICH-STOLLE, K. L. HESS, R. L. JONES a J. J. SCHLAGER. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today*. 2015, **10**(3), 339-354. DOI: 10.1016/j.nantod.2015.04.002. ISSN 17480132. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748013215000493>
- ²⁹ CARLSON, C., S. M. HUSSAIN, A. M. SCHRAND, L. K. BRAYDICH-STOLLE, K. L. HESS, R. L. JONES a J. J. SCHLAGER. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008, **112**(43), 13608-13619. DOI: 10.1021/jp712087m. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp712087m>
- ³⁰ SHEEHY, K., A. CASEY, A. MURPHY a G. CHAMBERS. Antimicrobial properties of nano-silver: A cautionary approach to ionic interference. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015, 443, 56-64. DOI: 10.1016/j.jcis.2014.11.074. ISSN 00219797. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979714009424>
- ³¹ GURUNATHAN, Sangiliyandi. Biologically synthesized silver nanoparticles enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2015, **29**, 217-226. DOI: 10.1016/j.jiec.2015.04.005. ISSN 1226086x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1226086X15001264>
- ³² KÖNIGS, Alexa M., Hans-Curt FLEMMING a Jost WINGENDER. Nanosilver induces a non-culturable but metabolically active state in Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Microbiology*. 2015, **06**, -. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00395. ISSN 1664-302x. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00395/abstract>
- ³³ SÁSKOVÁ, D. *Identifikace a charakterizace vybraných vlastností některých kmenů bakterií mléčného kvašení*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 90 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc..

³⁴ ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.

³⁵ HAARMAN, M., J. KNOL, A. TILSALA-TIMISJARVI, S. RODTONG, D. M. LOACH, K. MUNRO a T. ALATOSSAVA. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, **72**(4), 2359-2365. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>

³⁶ WALTER, J., G. W. TANNOCK, A. TILSALA-TIMISJARVI, S. RODTONG, D. M. LOACH, K. MUNRO a T. ALATOSSAVA. Detection and Identification of Gastrointestinal Lactobacillus Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, **66**(1), 297-303. DOI: 10.1128/AEM.66.1.297-303.2000. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.66.1.297-303.2000>