

VŠB – Technická univerzita Ostrava

Univerzitní studijní programy

Aplikace biosyntetizovaných nanočástic a nanokompozitů

Application of biosynthesized nanoparticles and
nanocomposite materials

Student:

Marta Natšínová

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Gabriela Kratošová, Ph.D.

Ostrava 18.5.2012

Zadání bakalářské práce

Student: **Marta Natšínová**

Studijní program: B3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie

Téma: **Aplikace biosyntetizovaných nanočástic a nanokompozitů**
Application of biosynthesized nanoparticles and nanocomposite materials

Zásady pro vypracování:

V současné době se stále více v syntéze nanočástic a nanomateriálů využívají biotechnologické metody přípravy právě pro výhody, s jakými je jejich nenáročná příprava spojena – běžné laboratorní tlaky a teploty, použití netoxických chemikálií, vysoká stabilita nanočástic v koloidním roztoku, možnost další manipulace a úpravy např. magnetickými ferrofluidy, atd. Bakalářská práce se zaměří na biologicky připravené nanočástice a nanokompozity z titulu dalšího využití jejich vlastností a aplikačního potenciálu. Obsah práce by měl být následující:

- 1) Provést důkladnou rešerši dostupné a současné literatury, která popisuje možné aplikace biosyntetizovaných nanočástic nebo kompozitů obsahujících tyto nanočástice.
- 2) Definovat hlavní možné aplikační oblasti nanočástic a nanomateriálů připravených biotechnologickými postupy.
- 3) Seznámit se zásadami aseptické práce v biotechnologické laboratoři.
- 4) Navrhnout, popsat a realizovat jednoduchý laboratorní experiment přípravy a aplikace biosyntetizovaného nanomateriálu.

Recently, biotechnological approaches of nanomaterials and nanoparticles synthesis gained significant interest especially due to use of mild experimental conditions. With successive methodological improvement, biological synthesis might acquire some extra advantages such as higher productivity, higher stability of nanoparticles and lower cost. This bachelor thesis should be focused on biologically prepared nanoparticles and nanocomposites with regard to further exploitation of their properties and their application potential. To fulfil the work goals it is necessary to:

- 1) Perform a detail study of accessible and current literature that describes possible applications of biosynthesized nanoparticles and/or nanocomposites.
- 2) Define the main area of application of nanoparticles and nanocomposites prepared by using biomass.
- 3) Acquaint with fundamentals of an aseptic work in the biotechnological laboratory.
- 4) Make a proposal of a preliminary laboratory experiment of preparation and application of biosynthesized nanomaterials, realise the experiment and evaluate results.

Seznam doporučené odborné literatury:

1. Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation, Edmund Bauerlein a Jeremy Pickett-Heaps, Wiley-VCH; Minimal Library Markings edition, 1. Vyd., 2009
2. Biomimetics: Biologically Inspired Technologies, CRC Press; 1. Vyd., 2005, ISBN-10: 0849331633
3. Biomimetalization: From Nature to Application, Astrid Sigel, Helmut Sigel, Roland K. O. Sigel Wiley-VCH; 4. Vyd., 2010, ISBN: 9780470035252
4. Schröfel, A., Kratošová, G.: Biosynthesis of metallic nanoparticles and their application. In: Intracellular Drug Delivery: Fundamentals and Applications (Ed: Aleš Prokop), Springer Verlag 2001. ISBN 978-94-007-1247-8, e-ISBN 978-94-007-1248-5.

5. Aktuální odborné články a review ze zahraničních impaktovaných časopisů

Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

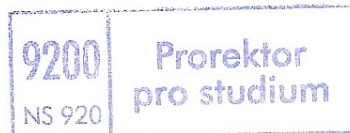
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Gabriela Kratošová, Ph.D.**

Datum zadání: 02.10.2011

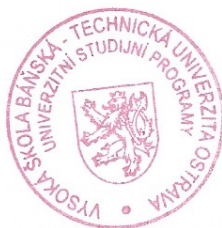
Datum odevzdání: 18.05.2012



prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry



prof. Ing. Petr Noskvič, CSc.
prorektor pro studium



Místopřísežné prohlášení

Místopřísežně prohlašuji, že jsem celou bakalářskou práci vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě...*14.5.2012*.....

Marta Nabinová
.....

Podpis

Prohlášení o využití výsledků práce

Prohlašuji že,

- jsem byla seznámena s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a § 60 – školní dílo.
- beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen „VŠB-TUO“) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§ 35 odst. 3).
- souhlasím s tím, že bakalářská práce bude v elektronické podobě uložena v Ústřední knihovně VŠB-TUO k nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o kvalifikační práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO.
- bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.
- bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1988 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě... 14.5.2012

Marta Natšínová
.....

Podpis

Jméno a příjmení autora práce:

Marta Natšínová

Adresa trvalého pobytu autora práce:

Čáslavská 9/1825, Český Těšín

PSČ: 737 07

Anotace:

Bakalářská práce se zabývá aplikacemi nanočástic a nanokompozitů připravených biotechnologickými postupy. Biosyntetizované nanomateriály jsou využívány v mnoha oblastech od medicíny, přes katalytické aplikace po využití v elektronice. Náplní této bakalářské práce je výroba a testování nanokompozitu připraveného biosyntézou. Jako výchozí komponenty byly vyžity kultura rozsivek *Diademsis gallica* a roztok soli zlata o koncentraci 1mM. Takto připravený nanokompozit byl charakterizován pomocí mikroskopických technik, upraven kalcinací a následně aplikován při katalýze N₂O. Po katalýze byla struktura nanokompozitu studována pomocí transmisního elektronového mikroskopu

Klíčová slova: biosyntéza, nanočástice, nanokompozity, aplikace, katalýza

NATŠINOVÁ, M. *Aplikace biosyntetizovaných nanočástic a nanokompozitů*. Ostrava 2012. Bakalářská práce. VŠB – Technická univerzita Ostrava, Univerzitní studijní programy. Vedoucí práce: Ing. Kratošová Gabriela, Ph.D.

Annotation:

This bachelor thesis studies the applications of nanoparticles and nanocomposite materials prepared by biotechnological processes. Recently, biosynthesized nanomaterials have been used in many areas ranging from medicinal and catalytic applications to use in electronic. The thesis focused on the biosynthetic preparation of nanocomposite material and its testing in catalysis. As a starting component diatom culture of *Diademsis gallica* and gold salt solution with a concentration of 1 mM were used. Prepared nanocomposite material was characterized by microscopy techniques, calcinated and was subsequently applied for N₂O catalysis. The nanocomposite material was studied by means of transmission electron microscopy after the catalysis.

Key words: biosynthesis, nanoparticles, nanocomposite materials, applications, catalysis

NATŠINOVÁ, M. *Application of biosynthesized nanoparticles and nanocomposite material*. Ostrava 2012. VŠB – Technical University of Ostrava, University Study Programmes. Thesis supervisor: Ing. Kratošová Gabriela, Ph.D.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména vedoucí práce paní Ing. Gabriele Kratošové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, cenné rady a čas věnovaný konzultacím.

Poděkování bych dále věnovala panu Ing. Ivo Vávrovi, CSc. za spolupráci při charakterizaci kompozitu metodou transmisní elektronové mikroskopie. Rovněž děkuji paní Ing. Kateřině Karáskové, Ph.D. za odbornou konzultaci a panu Mgr. et BcA. Adamu Schröflovi za ochotu a cenné připomínky.

Zvláštní poděkování patří všem, kteří mi při zpracování bakalářské práce poskytli vhodné zázemí plné podpory.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Biosyntézy nanočástic kovů	9
2.1	Faktory ovlivňující vlastnosti nanočástic	12
3	Aplikace biosyntetizovaných nanočástic a nanokompozitů	14
3.1	Aplikace v medicíně	14
3.1.1	Cílená lokalizace léčiv	14
3.1.2	Antimikrobiální vlastnosti a vývoj nových antibiotik	15
3.1.3	Modifikace textilií	18
3.2	Katalytické aplikace	19
3.2.1	Dehalogenace	20
3.2.2	Katalytické odbourávání nitroaromátů	20
3.2.3	„Biopalivové“ články	21
3.3	Elektrochemické aplikace – biosenzory	22
4	Experimentální část	24
4.1	Taxonomie a stručná charakteristika rozsivek	24
4.1.1	Výběr druhu rozsivek pro biosyntézu nanočástic	25
4.2	Kultivace kultury	26
4.2.1	Kultivační médium	26
4.2.2	Proces kultivace	27
4.3	Příprava bionanokompozitu, jeho charakterizace a použití	27
4.3.1	Aplikace v katalýze – degradace N ₂ O	28
5	Výsledky a diskuse	30
5.1	Biosyntéza nanočástic zlata s využitím rozsivek <i>Diademsis gallica</i>	30
5.2	Katalytická aktivita bionanokompozitu	32
6	Závěr	36
7	Literatura	37

1 Úvod

V současné době již existuje několik postupů přípravy nanočástic. Mezi nejznámější patří postupy chemické a fyzikální. Další metodou, která představuje ekologičtější a finančně méně náročnou alternativu, je příprava kovových nanočástic nebo nanokompozitů biologickou cestou - hovoříme o tzv. biosyntézách.

Vznik biosyntetických postupů rozvíjejících se v posledním desetiletí byl podmíněn mj. vzrůstajícími požadavky na vytvořené nanomateriály. Chemické a fyzikální postupy nejsou postačující a nekryjí veškeré nároky. Často je jejich realizace finančně a ekologicky náročná (náročné přístrojové vybavení a užívání množství toxických látek). Vědci našli inspiraci v přírodě a začali zkoumat syntézy založené na biologických procesech. Prvotní myšlenkou bylo vyzkoušet tvorbu nanočástic na základě známé schopnosti některých organismů akumulovat a sorbovat kovy. Nakonec byla výsledkem řada metod, s jejichž pomocí lze poměrně snadno syntetizovat nanočástice kovů i metalických sloučenin. Stinnou stránkou těchto metod však zůstává zcela neobjasněný mechanismus vzniku nanočástic.

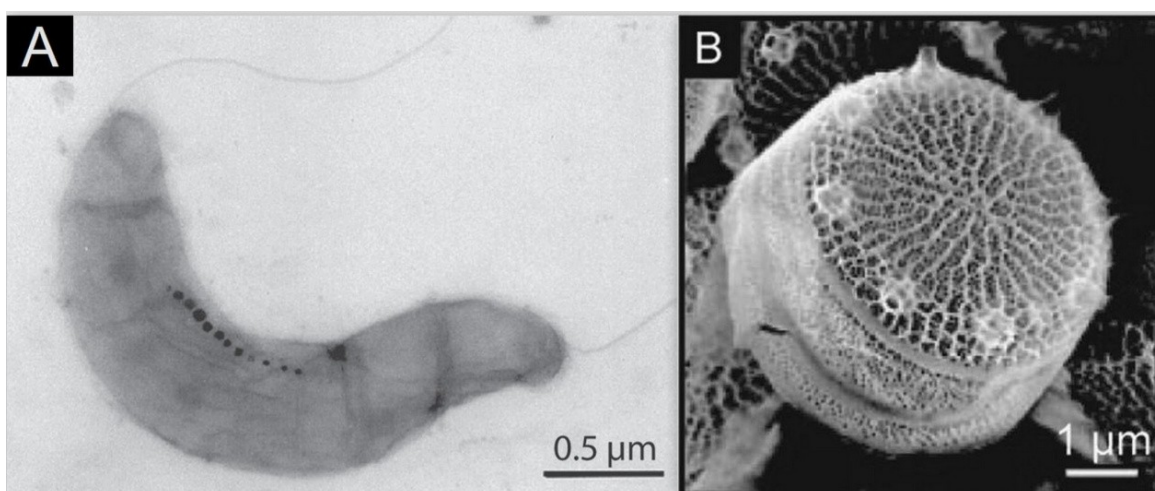
V posledních pěti letech došlo k velkému nárůstu využití biosyntéz k přípravě nanočástic a nanokompozitů. Díky unikátním vlastnostem takto vytvořených materiálů, úměrným tempem vzrostlo také jejich zavádění do různých průmyslových odvětví a oblastí lidské činnosti.

Cílem této bakalářské práce je zhodnocení aplikačního potenciálu nanočástic a nanokompozitů vyrobených pomocí biomasy se zaměřením na materiály obsahující nanočástice kovů a jejich sloučenin. Součástí práce je zároveň rešerše, jejímž cílem je shrnout a zhodnotit dosavadní výsledky dané problematiky. Na základě této rešerše je v praktické části práce navržen a realizován pilotní experiment testování vlastností kovových nanočástic syntetizovaných biomasou vybranou vzhledem ke konkrétní aplikaci.

2 Biosyntézy nanočástic kovů

Způsob přípravy nanočástic má hlavní vliv na jejich vlastnosti. Aplikační potenciál nanočástic a nanokompozitů je tedy nepřímo ovlivněn přípravou nanočástic. Nezbytnou součástí práce je základní popis biosyntéz nanočástic, který objasňuje samotný vznik a následně charakteristické vlastnosti získaných materiálů.

Takzvané „zelené“ syntézy (biosyntézy) či biologické metody přípravy nanočástic využívající mikroorganismy, houby, části vyšších rostlin nebo častěji jejich extrakty nabízejí bezpečnou a ekologicky šetrnou alternativu k chemickým a fyzikálním metodám. Například některé mikroorganismy jsou vhodné pro přípravu kovových nanočástic, protože mají schopnost adaptovat se na různá extrémní životní prostředí (extrémní teploty, tlak, pH, vysokou koncentraci kovů, zvýšenou salinitu, aj) [1]. Již delší dobu se mikroorganismy využívají pro odstranění toxických kovů z odpadních vod tzv. biosorpci [2, 3, 4], ale samotné syntézy nanočástic s využitím mikroorganismů se začaly studovat poměrně nedávno. Příkladem jednobuněčných organismů, které záměrně intracelulárně produkují magnetické nanočástice, mohou buď být magnetotaktické bakterie, anebo rozsivky syntetizující křemičité nano- a mikrostruktury, jež jsou stavebním základem jejich schránek [3, 4, 5, 6] (viz obr. 1).



Obr. 1: Snímky z elektronového mikroskopu: A – Magnetotaktická bakterie *Magnetospirillum gryphiswaldense* se syntetizovanými krystaly magnetitu spojenými do řetězce, tzv. magnetosomu; B – Struktura křemičité schránky rozsivky *Thalassiosira pseudonana* [6]

Při biosyntéze nanočástic se využívá schopnost vhodně vybraného mikroorganismu zachytit cílový iont kovu z roztoku a následně jej zredukovat. Ionty jsou zachyceny pomocí elektrostatické interakce. Ta se uskutečňuje mezi kladně nabitými ionty a záporně nabitými skupinami na povrchu organismu (např. karboxylovými skupinami). Redukce iontů se mohou účastnit enzymy (např. reduktázy) nebo funkční skupiny v buňkách a na jejich povrchu (hydroxyly, aminy, apod.). Podle místa, kde dochází k formování nanočástic lze biosyntézu rozdělit na intracelulární a extracelulární. Při intracelulární syntéze ionty do buňky difundují nebo dojde k jejich přepravě při výměně živin [7].

Živé buňky jsou složité komplexní systémy tvořené tisíci biomolekulami. Tyto molekuly zajišťují v buňce rozmanité funkce a jsou součástí transportních řetězců, zajišťujících růst a reprodukci organismu. Ve svých strukturách mají různé funkční skupiny, které se mohou účastnit redukce kovů. Je velmi obtížné určit specifické místo nebo děj přímo zodpovědný za syntézu nebo redukcí nanočástic, většinou se v literatuře může vyskytovat více hypotéz ohledně možného mechanismu v souvislosti s biomasou využitou pro syntézu nanočástic [8, 9].

Po biosyntéze je výsledným materiálem obvykle směs buněk (buněčných zbytků), metabolitů a nanočástic. Jak bylo uvedeno, jedná se o komplexní a složitý systém, který je navíc doprovázen přítomností tisíců metabolických produktů a různých biomolekul. Oddělit nanočástice od pozůstatků buněk lze například v ultrazvukové lázni nebo s použitím tenzidů. Prostředí matrice a obal z proteinů však na druhé straně významně přispívá ke stabilitě nanočástic, takže není nutné do systému přidávat za účelem stabilizace už žádný další surfaktant (což je většinou nutné u chemických postupů) [8]. Stabilní nanočástice neagregují, z čehož plynou výhody pro jejich uplatňování v praxi. Ne vždy je nutné nanočástice z biomasy separovat. Vzniklé bionanokompozity se převážně užívají jako katalyzátory [8, 10].

Dosud bylo zjištěno, že mnoho mikroorganismů zahrnujících bakterie, aktinomycety a kvasinky je schopno intracelulární nebo extracelulární syntézy kovových nanočástic a jejich sloučenin [4, 7]. Pro syntézu se rovněž využívají houby, rostliny či extrakty z rostlin [7, 11]. Intracelulární a extracelulární produkce nanočástic jsou tedy schopny jak jednobuněčné tak mnohobuněčné organismy [4, 5] (viz tabulka 1).

Tabulka 1: Biosyntézy nanočástic různými druhy mikroorganismů [12]

Organismus	Nanočástice	Velikost [nm]	Biosyntéza	Tvar
Bakterie				
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Au	5 – 25	Intracelulární	Oktaedrické
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Pd a Se	-	Intracelulární	-
<i>Klebsiella aerogenes</i>	CdS	20–200	Intracelulární	-
<i>Lactobacillus</i> sp.	Ag-Au slitiny	100 – 300	Intracelulární	-
<i>Lactobacillus</i> sp.	Ti	40 – 60	Intracelulární	Kulovité
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	ZnS	cca 8	Intracelulární	Kulovité
Aktinomycety				
<i>Rhodococcus</i> sp.	Au	5 – 15	Intracelulární	Kulovité
<i>Thermomonospora</i> sp.	Au	8	Extracelulární	Kulovité
Kvasinky				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sb ₂ O ₃	2 – 10	-	Kulovité
<i>Torulopsis</i> sp.	PbS	-	Intracelulární	-
Houby				
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fe ₃ O ₄	20 – 50	Extracelulární	-
<i>F. oxysporum</i>	Ag	5 – 15	Extracelulární	Kulovité, trojúhelníkové
<i>F. oxysporum</i>	Au	20 – 40	Extracelulární	Kulovité, trojúhelníkové
<i>F. oxysporum</i>	CdS	5 – 20	Extracelulární	Hexagonální
<i>F. oxysporum</i>	Pt	10 – 100	Intra- a extracelulární	Hexa- a pentagonální, čtvercové, obdélníkové
Řasy				
<i>Chlorella vulgaris</i>	Au	-	Intracelulární	-
<i>Spirulina platensis</i>	Ag	7 – 16	Extracelulární	Kulovité
Rostliny				
<i>Aloe vera</i> (aloe pravá) extrakt z listů	Au	-	Extracelulární	Kulovité, trojúhelníkové
<i>Azadirachta indica</i> (zederach indický)	Au, Ag a Ag-Au slitiny	5 – 35, 50 – 100	Extracelulární	Kulovité, hexagonální, trojúhelníkové
<i>Medicago sativa</i> (vojtěška)	Oxidy železa	2 – 10	Intracelulární	-

Objasnění biochemických cest vedoucích k redukcí iontů kovu vlivem různých druhů mikrobů je nezbytností pro vytvoření optimálního postupu mikrobiálních syntéz nanočástic [2, 13]. V současnosti jsou navíc biologické metody v syntéze nanočástic omezeny na kovy, některé sulfidy kovů a několik málo oxidů. Rozšířením postupů, které by umožnily reprodukovatelné syntézy nanokrystalů dalších oxidů (TiO_2 , ZrO_2 , atd.), nitridů, karbidů, atd., by mohly biosyntézy, jako metody přípravy nanomateriálů, více konkurovat ostatním metodám [13].

2.1 Faktory ovlivňující vlastnosti nanočástic

Veškeré aplikace nanočástic se odvíjí a striktně závisí na velikosti, tvaru a složení nanočástic. Například elektrooptické a fyzikálně-chemické vlastnosti jsou v nanoměřítku silně ovlivněny velikostí částic. Je také známo, že se zmenšující se velikostí částic roste velikost jejich měrného povrchu, což má za následek vysokou reaktivitu. Na druhé straně, tvar nanočástic zase přispívá k modulaci elektrických vlastností. Dalším důležitým charakteristickým rysem je distribuce jejich velikosti. Právě rozmanitost postupů biosyntézy nanočástic různých tvarů a velikostí rozšířila mj. možnost volby vlastností, které mohou mít syntetizované nanočástice [11]. Pro optimalizaci procesů biosyntézy byl studován přímý vliv faktorů, mezi které patří pH, koncentrace a stáří biomasy, typ prekursoru kovu (rozpustná sůl kovu, jehož nanočástice chceme připravit) a jeho koncentrace, teplota, čas reakce (doba expozice buněk v roztoku iontů), ozáření a míchání [3, 7]. Změnou a řízením těchto faktorů mohou být ovlivněny charakteristické vlastnosti jak intracelulárně, tak extracelulárně syntetizovaných nanočástic [2].

Každý druh mikroorganismu se schopností bioredukce může vytvořit částice stejného složení, které budou mít rozdílnou velikost a tvar. Biosyntéza nanočástic je tedy druhově specifická. Byl srovnán vliv tří druhů mikroorganismů (aktinomycety, kvasinky a bakterie) na některé charakteristické vlastnosti biosyntetizovaných nanočástic. Experimenty využívajícími aktinomycety a kvasinky bylo dosaženo lepší kontroly distribuce velikosti částic než u bakterií. Velikost částic byla snáze ovlivnitelná v případě syntézy s využitím kvasinek. Výše zmíněné výsledky dokazují, že typ používaného mikroorganismu je významným parametrem pro ovládání velikosti a distribuce částic [7]. Na tyto dvě charakteristické vlastnosti nanočástic má navíc vliv prostředí růstu mikrobů (především složky růstového média) a kultivační podmínky [3, 4].

Zkoumáním vlivu pH při syntéze bylo převážně zjištěno, že velikost částic roste s rostoucím pH systému [3]. S vyšší koncentrací kovových iontů většinou vzroste velikost částic a výskyt nanočástic, které nejsou monodisperzní. Teplota přímo působí na aktivitu mikroorganismů a pohyblivost iontů. Při vyšší teplotě dochází k nárůstu reakční rychlosti. Výzkumy dokázaly, že reakčním časem biosyntézy může být ovládána velikost částic a jejich distribuce [3, 7]. Rovněž ozáření má vliv na modifikaci vlastností materiálu. Například mikrovlnné záření může v některých případech ovlivňovat velikost a distribuci velikosti nanočástic. Dalším faktorem je míchání během procesu syntézy. Procesy biosyntéz doplněné o míchání reakční zóny často vedly k prudkému vzrůstu velikosti nanočástic [7].

Pro biosyntézu nanočástic je také důležité v jaké růstové fázi se aplikovaná biomasa nachází. Důsledkem aplikace buněk v různých růstových fázích mohou být syntetizované nanočástice s různou kvantitou i kvalitou. Experimentálně bylo zjištěno, že buňky v exponenciální fázi růstu syntetizovaly mnohem menší množství nanočástic, než buňky v rané exponenciální fázi [7].

3 Aplikace biosyntetizovaných nanočástic a nanokompozitů

Nanočástice mají díky výjimečným vlastnostem široký aplikační potenciál. Biosyntetizované nanočástice a nanomateriály se začaly využívat zejména kvůli jejich relativně snadné a rychlé přípravě, přičemž jejich využití striktně závisí na jejich velikosti, tvaru a složení [11]. Protože se v posledních pěti letech vědci intenzivně zabývají danou problematikou, je pochopitelný ohromný nárůst potenciálních a praktických využití biosyntetizovaných nanočástic a nanokompozitů. Rozdělení do jednotlivých skupin vzniklo podle nejčastěji zmiňovaných aplikací a účelu použití biosyntetizovaných nanočástic a nanomateriálů.

3.1 Aplikace v medicíně

V lékařství se biosyntetizované nanočástice využívají při cíleném doručení léků, léčbě rakoviny, genové terapii, analýze DNA, v antibakteriálních přípravcích, biosenzorech a při magnetické rezonanci (dále jen MRI, z angl. „magnetic resonance imaging“) [14]. Zřejmou nevýhodu biosyntetizovaných nanočástic představuje potřeba vyčistit vzorek a oddělit nanočástice od biomasy případně buněčných zbytků. V lékařských aplikacích je obzvláště důležitá čistota materiálu, musí se proto zamezit obsahu potenciálních patogenů a jedů, které by mohly materiál znečistit [8]. Navzdory těmto omezením existuje řada potenciálních aplikací biosyntetizovaných nanočástic a nanomateriálů v medicíně.

3.1.1 Cílená lokalizace léčiv

Přesné a bezpečné doručování léků na cílové místo, řízené uvolňování a dosažení maximálního léčebného účinku představují hlavní výzvu v navrhování a vývoji nového systému dopravy léčiv. Nanosystémy pro cílenou dopravu léčiv mohou díky malému rozměru obejít hematoencefalickou bariéru¹ a pevné epiteliální spojení kůže, které obvykle omezují nebo znemožňují doručení léků k požadovanému cíli [1, 14]. Také díky velkému měrnému povrchu vůči objemu vykazují nanonosiči lepší farmakokinetiku² a biodistribuci terapeutických látek, a tím minimalizují toxicitu vznikající při akumulaci v cílovém místě. Mají schopnost zlepšit rozpustnost hydrofobních sloučenin a zvyšují stabilitu různých terapeutických látek, jako peptidů a oligonukleotidů [14].

¹ Hematoencefalická bariéra je fyziologická bariéra, která u obratlovců odděluje vnitřní prostředí mozku od cévního systému.

² Farmakokinetika zahrnuje přeměnu farmak v organismu (štěpení, vylučování, aj.)

Magnetické nanočástice Fe_3O_4 (magnetitu) a Fe_2O_3 (maghemitu) jsou známé svou biokompatibilitou. Byly aktivně studovány v cílené léčbě rakoviny, třídění a manipulaci kmenových buněk, doručování léčiv, genové terapii, DNA analýze a MRI. Léčení rakoviny přehřátím neboli tzv. magnetickou hypertermií zahrnuje magnetické řízení nanočástic v těle, přímo do míst výskytu rakovinné tkáně. Lokální přehřívání specifických míst je umožněno aplikací vnějšího magnetického pole. Vědci sledovali toxicitu magnetosomů³ extrahovaných z *Magnetospirillum gryphiswaldense* k fibroblastům⁴ myši a zjistili, že čištěné a sterilizované magnetosomy nevykazovaly při zkouškách „in vitro“ toxicitu [14]. Magnetosomy mají tedy potenciál k tomu, aby byly využívány pro přepravu léčiv a genů při léčbě nádorů.

Vhodným nanonosičem pro dopravu různých terapeutických látek mohou být také nanočástice zlata, které jsou schopny přepravovat jednak malé molekuly léku, jednak také velké biomolekuly, jako bílkoviny, DNA, či RNA. Výhodou nanočástic zlata je jejich biokompatibilita, velký měrný povrch a stabilita. Tyto vlastnosti jsou vhodnou kombinací pro potenciální využití nanozlata jako přepravce léků a genů [3, 10, 14].

Očekává se, že doručování léků zprostředkované nanočásticemi by mohlo výrazně snížit dávkování protirakovinných i jiných léků a zlepšit přesnost lokalizace. V porovnání se současnými léčebnými postupy by tímto způsobem mohla být zvýšena účinnost a snížena toxicita léčby. Předpokládá se rostoucí množství aplikací založených na nanotechnologiích v oblasti terapie a diagnostiky. Nanotechnologie mohou hrát rozhodující roli také v oblasti studie „individualizovaných léčiv“. Specificky mířená terapie nemusí být účinná pro všechny pacienty, znemožňuje to různorodost rakovinných onemocnění a jejich vyvíjející se odolnost proti lékům [14].

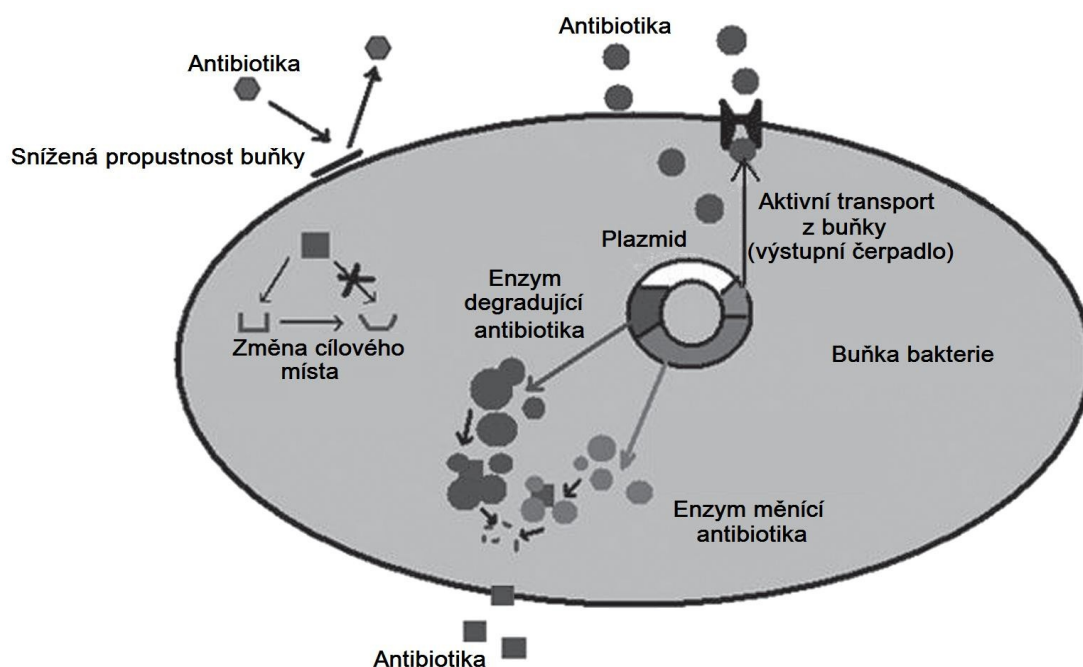
3.1.2 Antimikrobiální vlastnosti a vývoj nových antibiotik

V souvislosti s množstvím infekčních onemocnění způsobených různými patogenními mikroorganismy a narůstajícím množstvím rezistentních kmenů vůči současným antibiotikům (viz obr. 2) vzrůstá také potřeba najít nové antimikrobiální prostředky. Různé typy nanomateriálů, jako měď, zinek, titan, zlato a stříbro, vykazují aktivitu proti bakteriím, virům a houbám [8, 9]. Široké spektrum antimikrobiálních vlastností nanomateriálů vede k jejich testování v procesech čištění (léků, vody a vzduchu), při

³Magnetosom je označení pro organelu tvořenou z krystalu magnetitu (maghemitu) obaleného membránou, která slouží k orientaci v magnetických polích Země.

⁴Fibroblast představuje základní buňku vazivové tkáně.

výrobě potravin, kosmetiky, šatstva a čtených výrobků do domácnosti [8]. Díky nejlepší účinnosti se jako antimikrobiální látka nejčastěji využívá nanostříbro [9]. Jako antimikrobiální činidlo se užívají také ionty stříbra. Jejich nevýhodou je však tvorba komplexů a fakt, že účinek iontů stříbra je pouze krátkodobý [15]. Alternativou iontů stříbra se stalo právě nanostříbro. Přehled antimikrobiálních vlastností nanostříbra a jeho použití je uvedeno v tabulce 2.



Obr. 2: Mechanismy rezistence bakterií proti bakteriostatikům [16]

Nanočástice stříbra jsou široce využívány jako nová terapeutická látka v oblasti antibakteriální, antifungální a protivirotické ochrany. U těchto částic byl rovněž ověřen protizánětlivý účinek. Zjistilo se, že stříbrné nanočástice syntetizované v přítomnosti bakterií *Bacillus licheniformis* mají antiangiogenní⁵ potenciál [14]. Jiné stříbrné nanočástice byly biosyntetizovány pomocí houby *Trichoderma viride*. Ionty stříbra vystavené filtrátu *T. viride* byly redukovány a byl získán koloidní roztok s extrémně stabilními nanočásticemi stříbra o velikosti 5 – 40 nm. V kombinaci s různými antibiotiky byl následně testován jejich antimikrobiální účinek proti gram pozitivním (dále jen G+) a gram negativním (dále jen G-) bakteriím. Antibakteriální aktivita ampicilinu, kanamycinu, erytromycinu a chloramfenikolu proti testovaným kmenům bakterií byla v přítomnosti Ag nanočástic zvýšena. Nejvyšší nárůst antibakteriálního účinku byl zaznamenán u ampicilinu. Výsledky ukázaly, že antibiotika kombinovaná s nanočásticemi

⁵Antiangiogenní látky zabraňují vývoji cévního zásobení tumorů. Následkem je omezení růstu tumoru či zničení v důsledku nedostatku živin a kyslíku.

stříbra mají lepší antimikrobiální efekt [17]. Tato skutečnost poskytuje cenný náhled do vývoje nových antimikrobiálních činidel.

Tabulka 2: Antimikrobiální vlastnosti a aplikace biosyntetizovaného nanostříbra [8]

Organismus použitý pro přípravu nanostříbra	Antimikrobiální vlastnosti a aplikace
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aktivita proti G+ a G- bakteriím
<i>Penicilium</i> sp.	Aktivita proti G+ a G- bakteriím
<i>Pleurotus sajor caju</i>	Aktivita proti G+ a G- bakteriím
<i>Bipolaris nodulosa</i>	Aktivita proti G+ a G- bakteriím
<i>Streptomyces</i> sp.	Aktivita proti G+ a G- bakteriím
<i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>viridis</i>	Aktivita proti <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Trichoderma viride</i>	Aktivita proti VRSA ⁶
<i>T. viride</i>	Uchovávání ovoce a zeleniny
<i>Aspergillus clavatus</i>	Aktivita proti MRSA ⁷ a MRSE ⁸
<i>Garcinia mangostana</i> – extrakt z listů	Aktivita proti <i>E. coli</i>
<i>Candida albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. fluorescens</i>	Aktivita proti <i>E. coli</i>
<i>Phoma glomerata</i>	Součinnost s antibiotiky
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Účinnost v kombinaci s antibiotiky
<i>T. viridae</i>	Účinnost v kombinaci s antibiotiky
<i>Fusarium acuminatum</i>	Aktivita proti G+ a G- bakteriím
Různé druhy řas	Aktivita proti G+ a G- bakteriím
<i>Acalypha indica</i> – extrakt z listů	Aktivita proti <i>E. coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	Bavlněné tkaniny impregnované Ag nanočásticemi
<i>Fusarium solani</i>	Bavlněné tkaniny impregnované Ag nanočásticemi
<i>Azadirachta indica</i> – extrakt z listů	Baktericidní efekt v bavlněném oblečení proti <i>E. coli</i>
<i>Cinnamon zeylanicum</i> – kůra	Aktivita proti <i>E. coli</i> , BL-21
<i>Curcuma longa</i> – hlíza a extrakt z hlízy	Fixace na bavlněném oblečení
<i>Eucalyptus citriodora</i> , <i>Ficus bengalensis</i>	Antibakteriální aktivita proti <i>E. coli</i> , přichycení Ag nanočástic na bavlněných tkaninách
<i>Amylomyces rouxii</i>	Antifungální a antibakteriální aktivita
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Antifungální a antibakteriální aktivita
<i>Aspergillus niger</i>	Antifungální a antibakteriální aktivita
<i>Aspergillus clavatus</i>	Antifungální a antibakteriální aktivita
<i>Solanum torvum</i>	Antifungální a antibakteriální aktivita

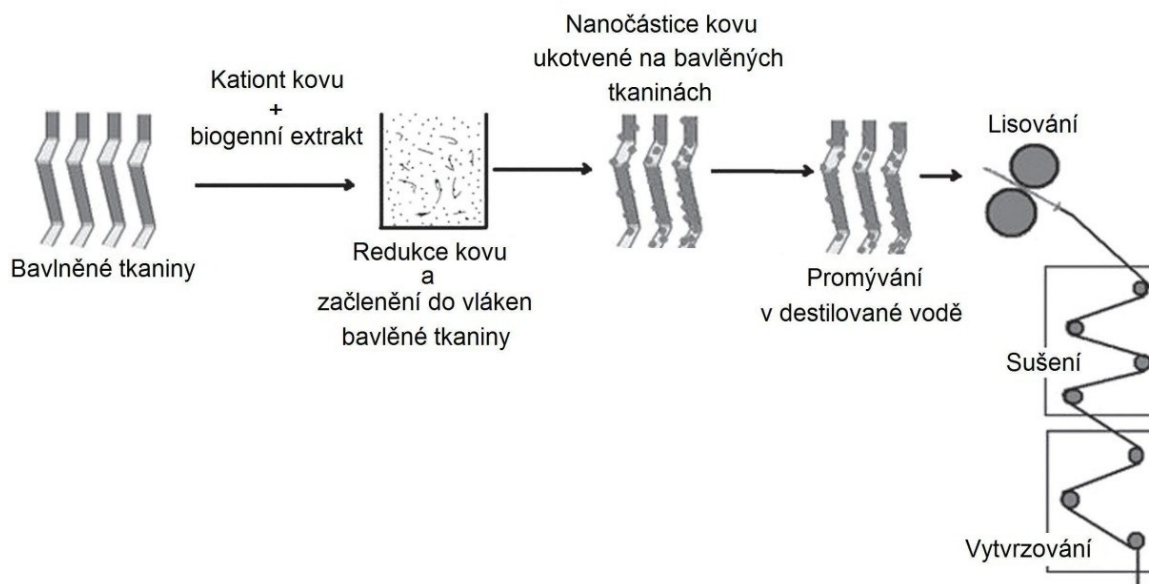
⁶ VRSA (z angl. „vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*”) – vancomycinu odolný *S. aureus*

⁷ MRSA (z angl. „methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”) – methicilinu odolný *S. aureus*

⁸ MRSE (z angl. „methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*”) – methicilinu odolný *S. epidermidis*

3.1.3 Modifikace textilií

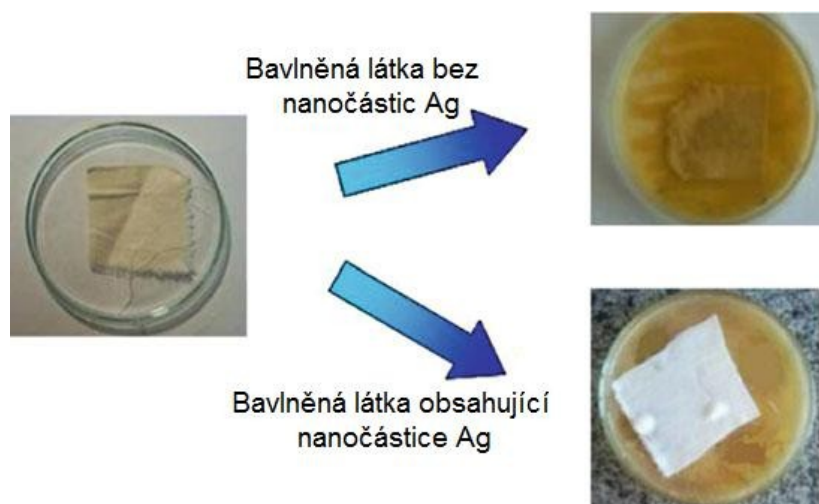
Dalším použitím biosyntetizovaných nanočástic je jejich fixace na vláknech různých druhů textilií. Pro tyto aplikace bývají nejčastěji využívány nanočástice stříbra. Modifikované textilie mohou dále sloužit při dezinfekci či sterilizaci [8, 9, 14]. Schéma kotvení nanočástic je znázorněno na obr. 3.



Obr. 3: Kotvení kovových nanočástic do bavlněné tkaniny [16]

Durán a kol. popsali ukotvení nanočástic stříbra s antimikrobiálním efektem do bavlněných tkanin. Ag nanočástice byly získány extracelulární syntézou s *Fusarium oxysporum*. Po ukotvení nanočástic v bavlněných tkaninách byl testován jejich antibakteriální účinek proti patogenu *Staphylococcus aureus*. Výsledky potvrdily prakticky 100% antibakteriální účinnost proti testované patogenní bakterii (viz obr. 4). Po několika vypráních se nicméně z tkaniny nanočástice uvolnily do výluhu. Z tohoto výluhu byly nanočástice stříbra sorbovány na biomasu bakterií *Chromobacterium violaceum* [18].

Podobné experimenty prováděli El-Rafie a kol. S použitím houby *Fusarium solani* připravili nanočástice stříbra a následně je kotvili do bavlněných tkanin. Vybělené bavlněné tkaniny byly v lázni impregnovány koloidním stříbrem a lisovány. Účinnost proti patogenním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *E. coli* se však po 20 promytích snížila zhruba na 50%. Pokles účinnosti byl kompenzován začleněním komerčně dostupného pojiva během procesu impregnace, kdy po 20 promytích materiál stále vykazoval uspokojivé baktericidní účinky proti bakteriím *Staphylococcus aureus* (94%) a *E. coli* (85%) [19].



Obr. 4: Testování antibakteriální aktivity bavlněné látky modifikované nanočásticemi stříbra proti *Staphylococcus aureus* [9]

Dále byly na bavlněné látce fixovány nanočástice stříbra syntetizované extraktem z listů zederachu indického (*Azadirachta indica*). S využitím diskového difúzního testu byl zkoumán jejich dezinfekční účinek proti *E. coli*. Výsledky potvrdili antibakteriální účinnost proti testovanému patogenu [8].

V práci autorů Durána N. a Marcata P. D. je citováno několik studií, kdy byly do textilií kotveny nanočástice stříbra připravené převážně chemickými postupy. V těchto případech se většina nanočástic uvolnila po prvním vyprání [9]. Z výše uvedených faktů tedy vyplývá, že využívání „bionanočástic“ pro modifikaci látek má slibnou budoucnost.

3.2 Katalytické aplikace

Za poslední desetiletí byl zaznamenán exponenciální nárůst využívání nanokatalyzátorů na úkor běžných katalyzátorů. Materiály běžně užívané jako katalyzátory mají v nanoměřítku vyšší katalytickou aktivitu (např. Pd, Pt, Au) [8, 20]. Zvýšení je zapříčiněno velkým měrným povrchem a vysoce aktivními atomy na povrchu nanočástic. Poměr povrchu k objemu částice totiž exponenciálně roste se snižující se velikostí částic. Současná příprava komerčně dostupných nanokatalyzátorů se mnohdy neobejde bez toxických a drahých chemických činidel. Navíc se musí získané nanočástice stabilizovat, aby nedocházelo k agregaci a jejich uvolňování do životního prostředí. Z těchto důvodů jsou slibnou alternativou právě biotechnologické postupy přípravy katalyzátorů. Tyto postupy vedou ke vzniku stabilních, vysoce aktivních bionanokatalyzátorů, které je navíc možno recyklovat a použít opětovně [20].

3.2.1 Dehalogenace

Biosyntetizované nanočástice palladia jsou první velkou skupinou vykazující katalytickou aktivitu. Bioorganické nanokatalyzátory byly získány např. redukcí iontů kovu Pd s využitím tří různých druhů bakterie rodu *Desulfovibrio*. Ačkoli je pro vznik nanočástic palladia s těmito organismy nezbytná přítomnost dalšího redukčního činidla (např. H₂, mravenčan), proces redukce je striktně ovlivněn právě přítomností bakterií. Redukce v nepřítomnosti buněk bakterií nevede ke vzniku nanočástic Pd. Během redukčního procesu dochází k sorpci nanočástic palladia na povrchu buněk a vzniká tak kompozitní materiál, který lze dále použít např. pro redukční dehalogenaci chlorofenolu, polychlorovaných bifenyľů, trichlorethenu, polybromovaných bifenyľetherů nebo kontrastních činidel obsahujících jód [8, 20].

Za přítomnosti dalších redukčních činidel (např. H₂, mravenčan, laktát, pyruvát a ethanol) se pro přípravu „bioPd“ katalyzátorů často využívá také bakterie *Shewanella oneidensis* [20, 21]. Získaný bionanokompozit s nanočásticemi palladia byl použit pro dechlorinaci polychlorovaných bifenyľů obsažených v odpadních kalech [21]. Další studie *S. Oneidensis* ukázaly rozdíly mezi katalytickou aktivitou nanokrystalů Pd formovaných na živé nebo neživé biomase. Relativně velké a hustě rozložené krystaly palladia na neživé biomase prokázaly vysokou katalytickou aktivitu při degradaci hydrofobních molekul polychlorovaných bifenyľů. Zatímco menší a více dispergované nanokrystaly na živém bakteriálním nosiči byly katalyticky aktivní při degradaci chloristanu [8].

3.2.2 Katalytické odbourávání nitroaromátů

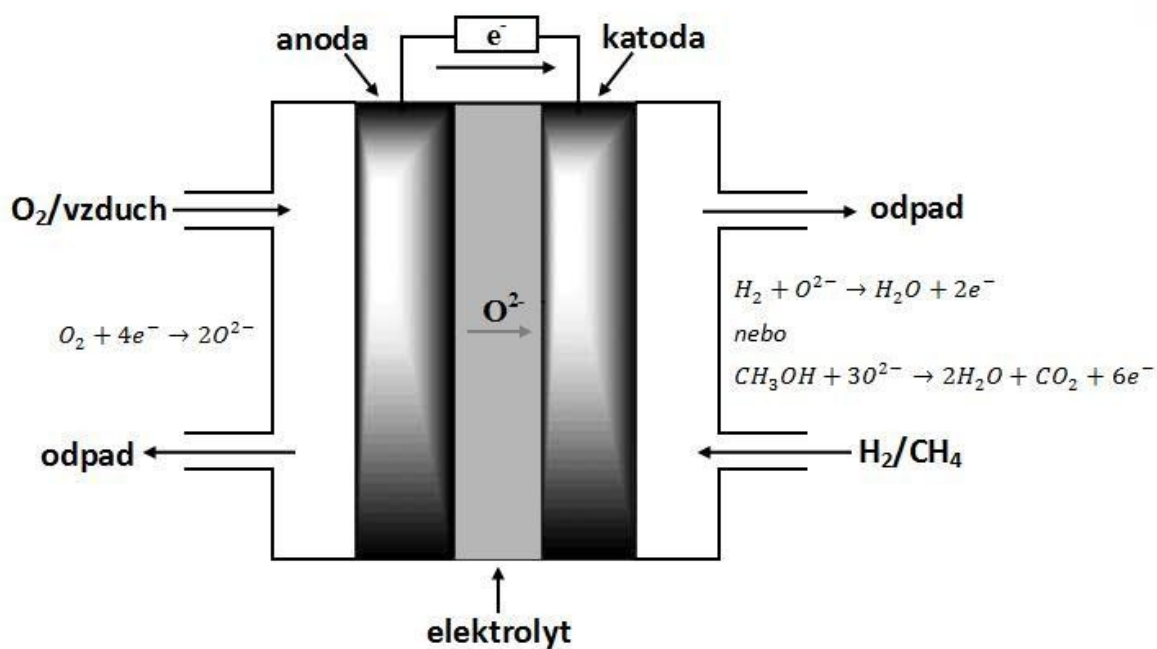
Nitroaromatické sloučeniny jsou běžnými polutanty životního prostředí. Přítomnost těchto toxických látek v půdě a vodě je výsledkem nedokonalého spalování fosilních paliv a používání nitroaromátů jako výchozího produktu pro syntézu výbušnin, pesticidů, herbicidů, barviv, léků, atd. Nekontrolované používání těchto chemikálií v minulosti mělo za následek rozsáhlou kontaminaci životního prostředí. Použití biosyntetizovaných nanočástic ušlechtilých kovů schopných katalyzovat degradaci právě nitroaromátů by mohlo přispět k vyřešení tohoto aktuálního problému [8].

Sharma a kol. využili pro redukcii iontů zlata luštěninu *Sesbania drummondii*. V pletivech rostliny se syntetizovaly stabilní nanočástice Au. Nanočástice akumulované na biomase *S. drummondii* prokázaly katalytickou aktivitu při redukcii 4-nitrofenolu za vzniku 4-aminofenolu [22].

Pozoruhodný je rozsáhlý výzkum využívající 21 tradičních čínských rostlin a bylin. Po rozřídění do čtyř kategorií zahrnujících listy, květy, plody a traviny byla sledována účinnost v produkování Au nanočástic. Produkce byla obvykle zaznamenána po 30 minutách inkubace s vodným HAuCl_4 . Takto vytvořené nanočástice rovněž vykazovaly vysokou katalytickou aktivitu při odbourávání 4-nitrofenolu [8].

3.2.3 „Biopalivové“ články

V posledních letech neustále narůstá potřeba nalézt alternativní zdroj energie. Takovým zdrojem mohou být palivové články, které na základě elektrochemických procesů přemění vnitřní energii paliva (např. H_2 , metanol) na elektrickou energii (viz obr. 5) [23, 24]. Palivové články se skládají ze dvou elektrod, které působí výlučně jako katalyzátory a jsou odděleny elektrolytem (např. tenká polymerní membrána). Na zápornou elektrodu (anodu) se přivádí palivo, které je zde zoxidováno a na kladné elektrodě (katodě) dochází k redukci okysličovadla (např. O_2 , vzduch). Elektrony uvolněné z paliva se přesouvají vnějším obvodem ke katodě, a tak vzniká elektrický proud. Elektrolyt působí jako elektronový izolátor a současně jako vysoce efektivní vodič vodíkových kationtů. V oblasti technologie palivových článků bylo rovněž zkoumáno využití mikroorganismů se schopností enzymatické redukce a sorpce palladia, platiny a jiných drahých kovů pro přípravu „biopalivového“ článku [8].



Obr. 5: Schéma palivového článku a reakce probíhající na katodě a anodě [25]

S využitím bakterie *Desulfovibrio desulfuricans* a dalšího redukčního činidla ve formě H_2 proběhla redukce iontů Pt a Pd. Nanočástice platiny a palladia akumulované bakterií byly ukotveny na kopírovací papír a testovány jako anoda v palivovém článku s polymerní membránou. Výroba elektrické energie s využitím „biopalivových“ článků byla srovnána s komerčně dostupnými palivovými články. V případě „bioPt“ bylo dosaženo účinnosti 100% a u „bioPd“ pak 81% [23].

Jako anodový katalyzátor v palivovém článku s polymerní membránou byla testována také suchá biomasa bakterie *Shewanella oneidensis* se sorbovanými nanočásticemi palladia. Ve srovnání s komerčně dostupným katalyzátorem výsledky prokázaly maximální účinnost výroby elektřiny využitím palivového článku s „bioPd“ anodovým katalyzátorem [8].

3.3 Elektrochemické aplikace – biosenzory

Biosenzory se obecně skládají z bioreceptorů (citlivý prvek biologického původu) a elektrochemických převodníků, přičemž se nejčastěji využívají fyzikálně-chemické převodníky. Pro sestavení elektrochemického měřicího systému jsou zapotřebí nejméně dvě elektrody – pracovní (měřící) a referenční (srovnávací). Podle aplikace a konstrukce biosenzoru může být tento dvouelektrodový systém doplněn o elektrodu pomocnou. Elektrody modifikované biosyntetizovanými nanočásticemi mohou mít v závislosti na jejich unikátních vlastnostech vyšší citlivost a širší detekční limit [3, 9].

Zheng a kol. použili pro elektrochemickou detekci vanilínu kvasinkami syntetizované nanočástice slitiny zlata a stříbra. Biosenzor pracoval na principu skelné uhlíkové elektrody modifikované nanočásticemi slitiny Au-Ag. Takto upravený biosenzor vykazoval cca 5x vyšší citlivost na vanilín. Výsledky potvrdily možné využití modifikovaného biosenzoru při detekci vanilínu ve vzorcích bobu vanilky a aromatizovaného vanilkového čaje. Na základě těchto experimentů lze navrhnout nové systémy detekce a monitorování obsahu vanilínu [14].

Poněkud kuriózní je příklad biosyntézy nanočástic zlata využívající blány z vaječných skořápek. Od bílku a žloutku byla oddělena skořápka vajíčka. Ta byla následně promyta v demineralizované vodě a nechala se volně vysušit. Ze skořápky byla sejmuta blána, ke které se přidal roztok $HAuCl_4$. Experimentální výsledky potvrdily ukotvení nanočástic zlata na bláně z vaječné skořápky. Biosyntetizovaný nanokompozit byl použit pro fixaci

glukózooxidázy na skelné uhlíkové elektrodě za účelem detekce glukózy v roztoku. Enzymatická aktivita glukózooxidázy byla za přítomnosti vysoce vodivých nanočástic zlata zvýšena. Zkonstruovaný biosenzor byl úspěšně aplikován při detekci hladiny glukózy v glukózových injekcích [26].

Polovodičové nanočástice selenu byly připraveny syntézou pomocí bakterie *Bacillus subtilis*. Vznikly tak sférické nanočástice o velikosti 40 – 500 nm. Při pokojové teplotě však mohou být za jeden den přeměněny na jednodimenzionální trojúhelníkové struktury. Oba dva druhy Se nanomateriálů (sférické, 1D-trojúhelníkové) s dobrou adhesivní schopností a biokompatibilitou byly využity jako materiál pro výrobu biosenzoru pro detekci H_2O_2 . Tvar nanočástic selenu neměl významný vliv na funkčnost biosenzoru. Výsledky prokázaly, že skelné uhlíkové elektrody s nanočásticemi selenu mohou být slibným nástrojem pro aplikace v klinické, průmyslové a environmentální analýze při detekci H_2O_2 v potravinách a léčivech [27].

4 Experimentální část

Jak již bylo zmíněno, pro biosyntézu nanočástic se využívá celá škála organismů. Za velmi zajímavé jsou považovány mikroorganismy ze skupiny hnědých řas – rozsivky. Při jejich podrobnějším zkoumání byla totiž odhalena jejich unikátnost, která je dána optickými, mechanickými a strukturními vlastnostmi jejich křemičitých schránek. Na základě těchto poznatků zavedli Gordon a kol. v roce 2005 nový pojem „Diatoms nanotechnology“ – nanotechnologie rozsivek. Z unikátních vlastností rozsivek plyne jejich využití v mnoha oblastech, např. ve fotonice a optice, při detekci biomolekul, doručování léčiv [28, 29]. Kromě těchto využití se rozsivky jeví jako slibný mikroorganismus také pro biosyntézu nanočástic kovů.

Z kapitoly 3.2 vyplývá nárůst využívání nanočástic ušlechtilých kovů v katalýze. Středem zájmu se stávají také nanočástice zlata, které vykazují velmi slibné katalytické vlastnosti ve srovnání s makroskopickými částicemi zlata. Katalyzátory obsahující zlaté nanočástice se podle dostupných zdrojů využívají také při degradaci NO_x [30, 31].

Na základě výše uvedených zjištění a poznatků byly tedy provedeny vstupní experimenty biosyntézy nanočástic zlata s vybraným kmenem rozsivek. Byl připraven kompozitní materiál s obsahem zlatých nanočástic a otestována jeho katalytická aktivita při odbourávání oxidu dusného.

4.1 Taxonomie a stručná charakteristika rozsivek

Rosivky jsou jednobuněčné fotosyntetizující mikroorganismy patřící do skupiny hnědých řas. Převážně obývají vodní ekosystémy, ale osidlují také celou řadu suchozemských biotopů. Jejich součástí je dvoudílná křemičitá schránka zvaná frustula, jejíž stavební materiál je většinou nanostrukturovaná amorfni polymerní kyselina křemičitá [32]. Křemík, na němž jsou rozsivky životně závislé, přijímají aktivně z prostředí. Při jeho nedostatku tyto mikroorganismy nemohou růst a množit se, následkem toho hynou [33].

Frustulu tvoří dvě části nazývané valvy spojené dohromady křemičitými kroužky [32]. Valvy do sebe zapadají jako dno a víko krabičky. Jemně strukturovaný povrch frustuly je charakteristický pro každý druh. Během procesu dělení rozsivek získá každá z dceřiných buněk jednu valvu a druhou dotvoří ještě před úplným osamostatněním. Valva dotvářená dceřinou buňkou je vždy menší než ta, kterou získala. Po mnoha děleních se tedy schránka

radikálně zmenší. Poklesne-li velikost pod určitou mez, dochází k zániku buňky nebo k přechodu na pohlavní způsob rozmnožování, při němž se obnoví optimální velikost schránky. Schránky odumřelých rozsivek tvoří horninu zvanou diatomit [33].

Taxonomický strom rozsivek [34]:

Nadříše: *Eukaryota*

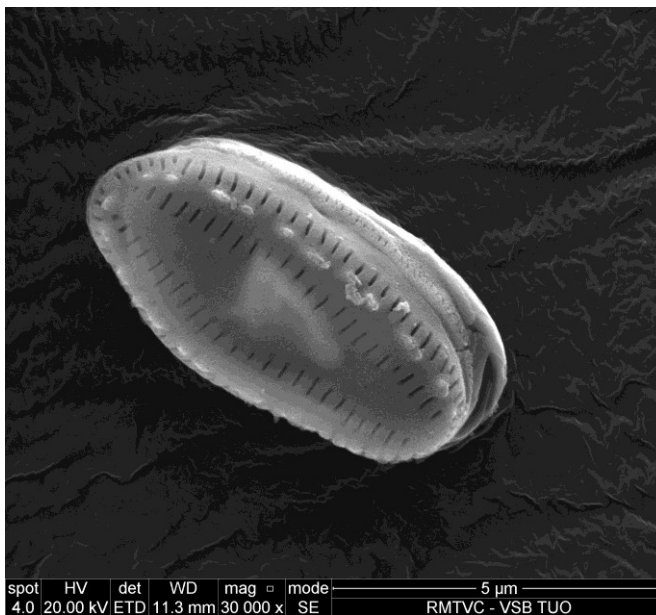
Říše: *Chromalveolata*

Kmen: *Heterokontophyta*

Třída: *Bacillariophyceae*

4.1.1 Výběr druhu rozsivek pro biosyntézu nanočástic

Z důvodů dostupnosti (výskyt na území ČR) a snadné kultivace byl vybrán druh rozsivek *Diadesmis gallica* (viz obr. 6). Jako prekurzor ušlechtilého kovu byl použit roztok kyseliny tetrachlorozlatité (HAuCl_4) o koncentraci 1mM.



Obr. 6: Křemičitá schránka rozsivky *Diadesmis gallica*, snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu QUANTA FEG 450

Náročnost kultivace přímo závisí na velikosti a struktuře schránek daného druhu rozsivek. Je zřejmé, že rozsivky větších rozměrů anebo se složitěji strukturovanou schránkou mají větší nároky na kultivační prostředí, dostatek živin (především křemíku) a čas pro růst. Tvar a struktura rozsivek *Diadesmis gallica* nejsou příliš složité, jejich

průměrná délka se pohybuje kolem 5 μm . Z uvedeného vyplývá, že kultivace tohoto druhu v laboratorních podmínkách by neměla být příliš náročná.

4.2 Kultivace kultury

Kultivace kultury je označení pro umělé množení bakterií za účelem získání čisté kultury. Optimální růstové podmínky a vhodně vybrané kultivační médium zaručí prostředí vhodné pro růst a množení biomasy. Jelikož jsou kultury mikroorganismů náchylné na kontaminaci, musí být veškerá manipulace s nimi prováděna za aseptických podmínek.

4.2.1 Kultivační médium

Pro kultivaci rozsivek bylo využito médium WC (zkratka z Wright's Chu č.10), jehož složky jsou uvedeny v tabulce 3 [35]. Vyvážené poměry jednotlivých složek média zajišťují dostatečný přísun živin potřebných pro růst pěstované kultury rozsivek *Diademsis gallica*.

Tabulka 3: Seznam chemikálií pro přípravu kultivačního média WC

Číslo	Chemikálie	Koncentrace [g·l ⁻¹]
Zásobní roztoky média		
1	CaCl ₂ ·2H ₂ O	36,800
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	37,000
3	NaHCO ₃	12,600
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	5,700
5	NaNO ₃	42,500
6	Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	21,200
7	Na ₃ EDTA	4,360
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,150
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,010
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,022
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,010
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,180
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,006
	H ₃ BO ₃	1,000
	Další složky média	
8	Thiamin	0,1000
	Biotin	0,0005
	Cyanokobalamin	0,0005
9	Pufr (TRIS)	0,1150

Do 1 litru destilované vody byl vždy přidán 1 ml zásobního roztoku v pořadí 1 – 5 a 7. K této směsi bylo přisypáno 0,115 g suchého práškového pufru (složka číslo 9). Sterilizace média probíhala 20 minut v autoklávu značky Tuttnauer 3850 EL při teplotě 121°C. Po autoklávování a vychlazení byly sterilně doplněny vitamíny (složka číslo 8) a zásobní roztok číslo 6. Vodní sklo (zásobní roztok č. 6) je nezbytnou součástí média zajišťující optimální růst křemičitých schránek rozsivek.

4.2.2 *Proces kultivace*

Zásobní kultura rozsivek (*Diademsis gallica* CCALA 766-DG) byla poskytnuta ze Sbírký buněčných kultur Centra algologie v Třeboni, Biologické centrum AV ČR, Institut hydrobiologie v České republice.

Rozsivky byly kultivovány ve sterilních Erlenmayerových baňkách o objemu 1 litr. Ze zásobní kultury byl odpipetován 1 ml do sterilní Erlenmayerovy baňky a bylo přidáno cca 400 ml kultivačního média. Rozsivky byly rozočkovány do 30 Erlenmayerových baněk, aby bylo v závěru získáno dostatečné množství biomasy pro biosyntézu nanočástic.

Biomasa byla inkubována při teplotě 21°C v růstové komoře (Binder KBW-240) v režimu 16 h/8 h světlo/tma (5 x 36 W/m² Osram Lumilux Cool Daylight fluorescenční lampa), což simuluje optimální podmínky pro růst kmene v jeho přirozeném prostředí. Kultura dospěla do stacionární růstové fáze zhruba za čtyři týdny. Po této době byla biomasa využita k experimentu biosyntézy nanočástic zlata.

4.3 Příprava bionanokompozitu, jeho charakterizace a použití

Kompozit s obsahem nanočástic zlata byl připraven smícháním kultury *Diademsis gallica* s roztokem kyseliny tetrachlorozlatité o koncentraci zlata 1 mM v poměru 1:1. Biosyntéza nanočástic zlata probíhala za laboratorních podmínek.

Rozsivky s přídavkem H₂AuCl₄ a rovněž kontrolní zásobní kultura byly zdokumentovány optickým mikroskopem (Olympus CX31). Syntetizované zlaté nanočástice ukotvené na biomase byly zkoumány transmisním elektronovým mikroskopem (Jeol 1200 EX TEM, JEOL Ltd., Tokio, Japonsko) na pracovišti Elektrotechnického ústavu SAV.

4.3.1 Aplikace v katalýze – degradace N_2O

Vstupní experimenty testování katalytické aktivity kompozitu byly realizovány na pracovišti katedry fyzikální chemie a teorie technologických pochodů VŠB-TUO.

Zdrojem oxidu dusného jsou některé chemické výroby a spalovací procesy, 65% však vzniká přirozenými procesy v přírodě. N_2O patří mezi skleníkové plyny, jeho vzrůstající koncentrace v atmosféře má za následek poškozování ozonové vrstvy [36, 37].

V případě katalytické degradace N_2O vyžaduje vzorek vzhledem k použité metodice, průběhu katalytického procesu a konstrukci reaktoru ještě několik úprav (kalcinace, příprava frakce určitého rozměru). Během měření rozkladu N_2O musí být vzorek stabilní. Nestabilní složky, které by se rozložily během reakce, se odstraňují kalcinací. Vzniklý bionanokompozit byl vykalcinován na vzduchu při teplotě 450°C po dobu 4 hodin. Pod tlakem 25 MPa se z materiálu vytvořila tableta a následně došlo k jejímu rozdrčení. Prášek byl vysítován na výslednou frakci 0,16 – 0,315 mm, která byla použita pro testování rozkladu N_2O .

Experimentální aparatura se skládá z nerezového trubkového průtočného reaktoru o vnitřním průměru 5 mm s integrálním ložem katalyzátoru. Aby došlo k vyrovnání toku reakční směsi je katalyzátor umístěn mezi inertní materiál, kterým bylo v tomto případě sklo. Přehled frakcí použitého inertního materiálu a katalyzátoru je uveden v tabulce 4. Vrstvení materiálu odpovídá pořadí v tabulce. Vně reaktoru je spirálovité vinutí, které slouží k předehřívání plynu (viz obr. 7). Reaktor je uložen v kelímkové peci s programovatelným regulátorem teploty.

Tabulka 4: Rozměry a množství frakcí skla pro plnění reaktoru

Frakce	Rozměry [mm]	Množství
Skleněné kuličky	2	18 ks
Skleněná drť	0,8 – 1	0,35 g
Skleněná drť	0,315 - 0,8	0,15 g
Skleněná drť	0,250 - 0,315	0,15 g
Skleněné kuličky	0,18 - 0,250	0,1 g
Katalyzátor	0,16 - 0,315	0,15 g
Skleněné kuličky	0,18 - 0,250	0,3 g



Obr. 7: Trubkový reaktor se spirálou k předehřívání vstupujícího plynu

Měření probíhalo při atmosférickém tlaku a teplotách v rozmezí 300 – 450°C (měřilo se v ustáleném teplotním stavu, konkrétně při teplotách 450°C, 420°C, 390°C, 360°C, 330°C, 300°C). Celkový průtok plynu reaktorem byl 150 ml/min. Výchozí navážka kompozitu byla 0,15 g.

Vstupní a výstupní koncentrace N_2O byly analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru RGA 200 (Prevac, Polsko). Aktivita katalyzátoru byla zjišťována na základě výpočtu konverze (X_A) podle vztahu (1).

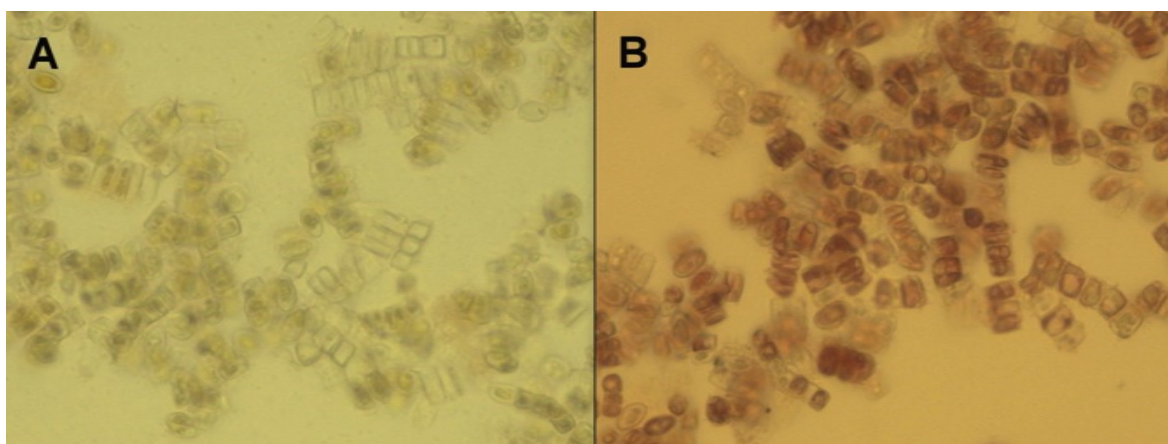
$$X_A = \frac{C_{A0} - C_A}{C_{A0}}, \quad (1)$$

kde C_{A0} je koncentrace N_2O na vstupu do reaktoru a C_A je koncentrace N_2O na výstupu z reaktoru.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Biosyntéza nanočástic zlata s využitím rozsivek *Diademsis gallica*

Již po dvou hodinách po přidání HAuCl_4 ke kultuře rozsivek začala biomasa měnit barvu do purpurova, což indikuje vznik zlatých nanočástic. Po 24 hodinách měla směs sytě červenou až fialovou barvu. Změna zbarvení je patrná na snímcích z optického mikroskopu (viz obr. 8). Z barevné změny biomasy a prakticky čirého zbarvení roztoku nad usazenou biomasou je možné usuzovat, že nanočástice se kumulují především na biomase nebo v její těsné blízkosti, kde jsou stabilizovány a jen jejich minimální část přechází do roztoku.

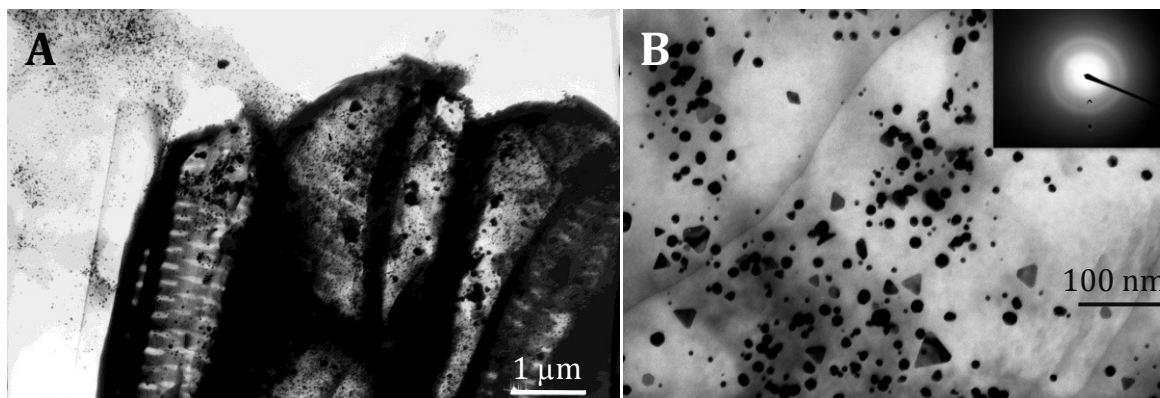


Obr. 8: Snímky pořízené světelným mikroskopem Olympus CX31, zvětšeno 400X; A – čistá kultura rozsivek; B – rozsivky se syntetizovanými nanočásticemi zlata

Na obrázku 8A je viditelné zelenožlutého zbarvení čisté kultury rozsivek *Diademsis gallica*. Snímek 8B představuje biomasu po 24 hodinové inkubaci s přidavkem HAuCl_4 . Je patrné, že během bioredukce došlo k fixaci nanočástic zlata (červené zbarvení) na živou substanci buněk. Během procesu většina buněk zanikla, následkem bylo vylití buněčného obsahu rozsivek do roztoku. Vzniklé nanočástice byly imobilizované na křemičitých schránkách. Výsledky prokazují, že biomasa hnědých řas *Diademsis gallica* je schopna biosyntézy nanočástic zlata z vodného roztoku soli.

Obr. 9A zachycuje frustuly rozsivek s asociovanými nanočásticemi zlata. Na snímku 9B je dobře viditelný detail tvaru biosyntetizovaných nanočástic zlata. Nanočástice jsou převážně sférické, ale místy se vyskytují i krystaly trojúhelníkového tvaru. Pomocí elektronové difrakce (SAED, z angl. „selected area electron diffraction“) byl

vyhodnocen charakter krystalické struktury, který korespondoval s kubickým zlatem (Obr. 9B – výřez).



Obr. 9: Snímky buněčných zbytků *Diadesmis gallica* se syntetizovanými nanočásticemi zlata z transmisního elektronového mikroskopu

Vyreduované nanočástice zlata na biomase rozsivek jsou dlouhodobě stabilní a nedochází k jejich agregaci. Nanočástice jsou jednak kotveny na porézní struktuře frustul a jednak jsou stabilizovány obalem tvořeným sekretovanými buněčnými metabolity. Díky stabilizaci a imobilizaci na silikátové matici si nanočástice zachovávají své vlastnosti i po vysušení. Připravený kompozit má dlouhou životnost, je možné ho skladovat jak ve formě suspenze, tak po vysušení jako prášek (viz obr. 10), případně zmražený. Důležitou roli v životnosti materiálu hraje i fakt, že silikátová matrice tvořená křemičitými schránkami rozsivek vydrží miliony let (fosilie rozsivek se těží ve formě horniny diatomitu).

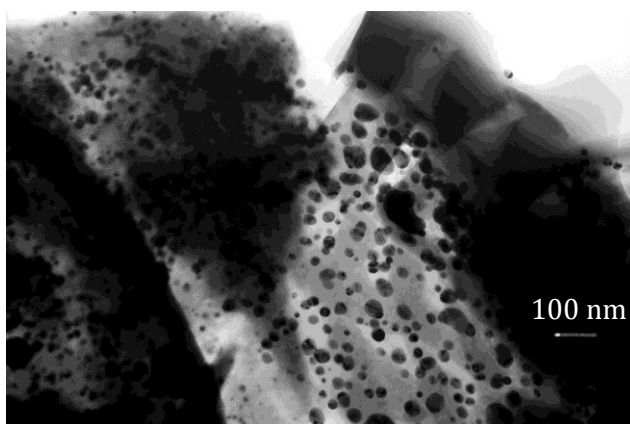


Obr. 10: Vysušený biosyntetizovaný kompozit obsahující nanočástice zlata

5.2 Katalytická aktivita bionanokompozitu

Připravený bionanokompozit obsahující nanočástice zlata imobilizované na schránkách rozsivek byl testován jako katalyzátor při degradaci N_2O (viz tabulka 5).

Na obr. 11 je patrné, že se vzniklý bionanokompozit po kalcinaci podstatně nezměnil. Nanočástice jsou stále asociovány na křemičitých schránkách.



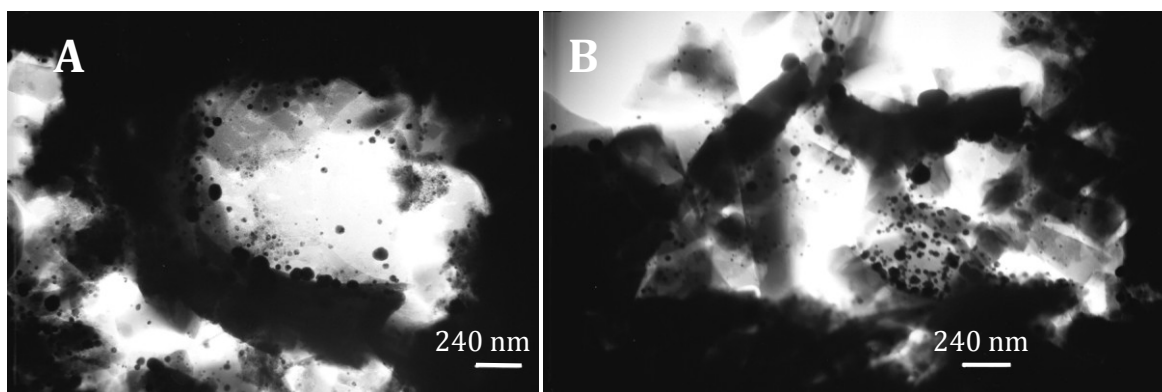
Obr. 11: Bionanokompozit obsahující nanočástic zlata kotvené na schránkách *Diadesmis gallica* po procesu kalcinace, snímek z transmisního elektronového mikroskopu

Tabulka 5: Výsledky katalýzy: závislost konverze N_2O na teplotě

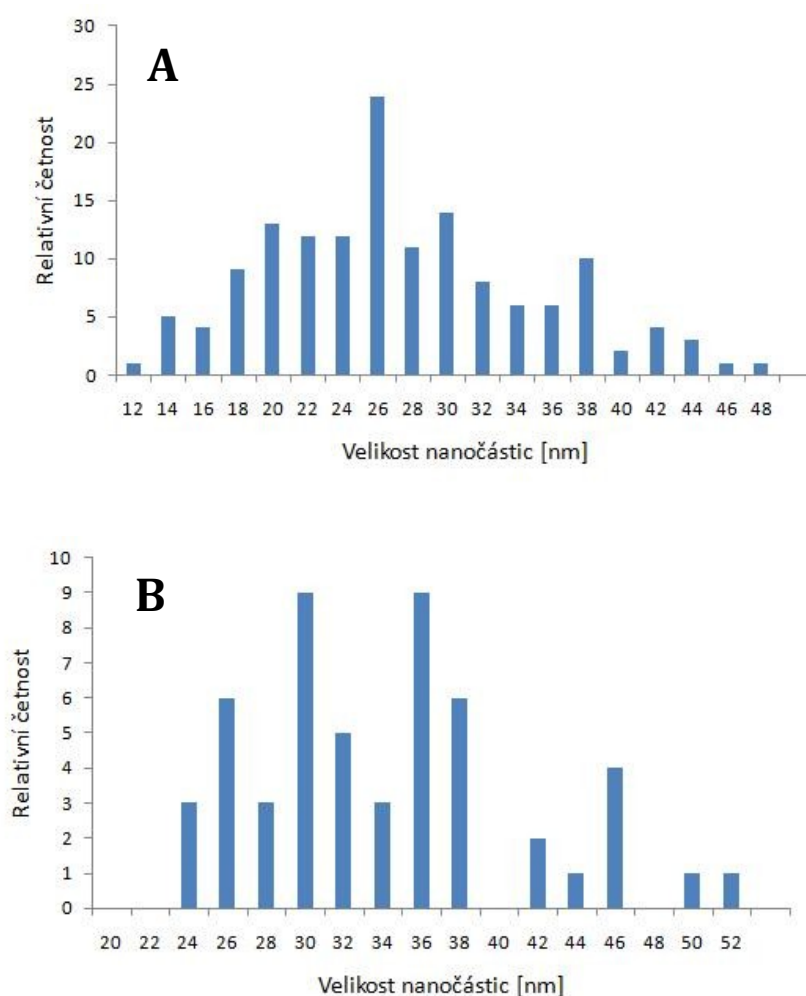
Teplota [°C]	Konverze N_2O [%]
450	4,0
420	3,6
390	0

Výsledky katalýzy při teplotě 450°C prokázaly přeměnu 4% N_2O . Při poklesu teploty o 60°C již nebyl katalyzátor aktivní vůbec.

Pozitivním výsledkem tohoto experimentu je skutečnost, že se vlastnosti bionanokompozitu zachovávají i po jeho vystavení působení vysokých teplot. Po testování katalytické aktivity zůstala barva práškového bionanokompozitu s obsahem zlata fialová, což dokazuje stálou přítomnost nanočástic. Skutečnost, že se nanočástice kovu v bionanokompozitu zachovaly i po katalýze, je zřejmá také ze snímků z transmisního elektronového mikroskopu (viz obr. 12). Jedinou změnou, která byla u materiálu zaznamenána je mírná agregace zlatých nanočástic.



Obr. 12: Bionanokompozit na bázi křemičitých schránek rozsivek a zlata po katalýze, snímky z transmisního elektronového mikroskopu



Obr. 13: Histogramy distribuce velikostí zlatých nanočástic; A – v kompozitu po kalcinaci (odpovídá obr. 11); B - v kompozitu po katalýze (odpovídá obr. 12)

Nanočástice biosyntetizované pomocí *Diademsis gallica* měly průměrnou velikost 22 nm [32]. Z histogramu (viz obr. 13A) je patrné, že po kalcinaci průměrná velikost částic vzrostla na 26 nm. Po katalýze oxidu dusného byla výsledná velikost částic zhruba

30 - 36 nm, což odpovídá výše zmiňované agregaci. Histogramy distribuce velikostí byly vytvořeny v programu JMicroVision ze snímků z transmisního elektronového mikroskopu (obr. 11 a 12, v případě obr. 12 se využila sumace hodnot z obou snímků).

Oxid dusný je možno odstranit termickým rozkladem, ten však vyžaduje vysoké teploty. Jako energeticky i finančně výhodnější se jeví provádět tuto reakci v přítomnosti vhodného katalyzátoru [36]. Při rozkladu N_2O dochází ke vzniku přirozených složek kyslíku a dusíku (viz rovnice 2).



Do současnosti bylo při katalytickém rozkladu N_2O studováno několik druhů katalyzátorů. Šlo především o kovy nanesené na různých nosičích, oxidy, směsné oxidy a zeolity. Složky, které se běžně vyskytují v odpadních plynech (především kyslík, vodní pára a další (NO_x , SO_2 , CO_2)), negativně ovlivňují vlastnosti katalyzátorů. Snahou zůstává vyvinout stabilní katalyzátor, který těmto vlivům odolá. Výzkum je zaměřen na vývoj katalyzátorů aktivních za nízkých teplot, jež budou odolné vůči inhibici kyslíkem a vodní parou [8, 20, 21, 36].

V případě katalyzátorů na bázi kovů se využívá skupina platinových kovů (Ru, Pd, Pt, Ir, Rh), které jsou nanesené na různých nosičích [8, 36, 38]. Při využití čistého práškového katalyzátoru je během reakce aktivní relativně malá část na povrchu vrstvy. Právě z těchto důvodů se většina katalyzátorů kotví na katalyticky neaktivní porézní nosič (např. TiO_2 , SiO_2). Platinové kovy jsou málo odolné vůči inhibici kyslíkem, což ovlivňuje mechanismus redukce N_2O . Proto se platinové kovy kombinují např. s nanočásticemi zlata, které mohou usnadnit adsorpci a desorpci kyslíku a zvýšit tak katalytickou aktivitu směsného katalyzátoru (slitiny Au-Pd) [38].

U připraveného bionanokompozitu, jehož příprava je popisována v této bakalářské práci, jsou nanočástice zlata vázány na křemičitých frustulách rozsivek. Předpokládalo se, že křemičité schrány rozsivek nahradí komerčně dostupný porézní nosič. Frustuly rozsivek tvoří velmi porézní materiál, který je vzhledem ke svému velkému povrchu využíván v průmyslových aplikacích.

Výsledky experimentálního ověření katalytické účinnosti bionanokompozitu prokázalo relativně nízkou účinnost tohoto materiálu pro katalytický rozklad oxidu dusného. Tento fakt může být způsoben změnami ve struktuře bionanokompozitu v průběhu kalcinace

(agregace nanočástic), nedostatečným celkovým obsahem nanočástic ve vzorku, či nízkou účinností nanozlata na katalýzu tohoto typu reakce.

Experiment také prokázal očekávaný pokles účinnosti se snižující se teplotou. Katalytickou aktivitu by podle výsledků teoreticky bylo možné zvýšit zvýšením teploty. Tyto reakční podmínky jsou však energeticky náročné a pro praktické využití se tak jako vhodnější jeví katalyzátory, které jsou schopné rozkládat N_2O již za nízkých teplot [36].

Publikace [39, 40, 41] uvádí, že nanočástice zlata jsou vysoce aktivní do velikosti 10 nm. Nanočástice vzniklé bioredukcí měly velikost 20 nm. Je možné, že úpravou velikosti nanočástic by se mohla jejich katalytická aktivita zvýšit. Velikost bioredukovaných nanočástic lze ovlivnit změnou podmínek procesu jejich přípravy.

Bionanokompozit připravený redukcí $HAuCl_4$ pomocí rozsivek *Diademsis gallica* byl již dříve využit při degradaci 4-nitrofenolu [42]. Vzorek je tedy katalyticky aktivní, v současné podobě však není vhodný pro účely rozkladu N_2O . Perspektivní by do budoucna mohla být kombinace získaného kompozitního materiálu s jinými katalyzátory, které jsou pro degradaci sice účinné, ale příliš drahé – např. Pt.

6 Závěr

V první části práce byla provedena rešerše současné literatury a zhodnocení aplikačního potenciálu nanočástic a nanokompozitů připravených biotechnologickými postupy. Separace nanočástic z biomasy je náročná a jeví se jako nevýhodná, protože čisté nanočástice mají sklon agregovat. Jak se však ukazuje i v praxi, pro mnoho aplikací není třeba nanočástice izolovat. Nejčastější aplikace biosyntetizovaných nanočástic a nanokompozitů byly rozděleny do tří hlavních skupin – aplikace v medicíně, katalýze a elektrochemii.

Experimentální část byla zaměřena na přípravu kompozitního materiálu s nanočásticemi zlata a jeho aplikaci v katalýze. Prvním krokem byla příprava samotného nanokompozitu bioredukcí roztoku kyseliny tetrachlorozlatité pomocí rozsivek druhu *Diademsis gallica*. Výsledky prokázaly, že biosyntéza vedla k vytvoření bionanokompozitního materiálu tvořeného nanočásticemi zlata asociovanými s křemičitými schránkami. Výhodou tohoto postupu je provedení redukce, stabilizace a imobilizace nanočástic kovu v jednom kroku a to za pokojové teploty, fyziologického pH a bez většího množství toxických činidel. Připravený bionanokompozit je vysoce stabilní, lze ho uchovávat jak ve formě suspenze, tak ve formě prášku, beze změn jeho vlastností.

Bionanokompozit vykazoval při rozkladu N_2O velice nízkou aktivitu, a to i při vyšších teplotách. Výsledky vedou k pozitivnímu zjištění, že se vlastnosti bionanokompozitu po působení vysokých teplot podstatně nezměnily, což vede k možnosti jeho využití při reakcích vyžadující právě vysoké teploty. Připravený biokompozit tak má velký potenciál pro další úpravy či katalýzu jiných reakcí. Jednou z možností optimalizace bionanokompozitu může být úprava velikosti biosyntetizovaných nanočástic, nebo kombinace s jinými katalyticky aktivními prvky (Pt, Pd). Nanočásticové katalyzátory mohou výrazně přispět k rozvoji katalýzy nejen zvýšením její efektivity, ale i nacházením nových katalyzátorů k reakcím, ve kterých byly klasické katalyzátory neúčinné. Proto je důležité dále zkoumat a zkoušet potenciál těchto nových katalyzátorů.

7 Literatura

- [1] GADE, Aniket, Avinash INGLE, Chris WHITELEY a Mahendra RAI. Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications. *Biotechnology Letters*. 2010, roč. 32, č. 5, 593 – 600. ISSN 0141-5492. DOI: 10.1007/s10529-009-0197-9.
- [2] MOHANPURIA, Prashant, Nisha K. RANA a Sudesh Kumar YADAV. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research*. 2008, roč. 10, č. 3, 507 – 517. ISSN 1388-0764. DOI: 10.1007/s11051-007-9275-x.
- [3] KANNAN, N. a S. SUBBALAXMI. Biogenesis of nanoparticles – a current perspective. *Reviews on Advanced Materials Science* [online]. 2011, roč. 27, č. 2, 99 – 114 [cit. 2012-04-02]. ISSN 1606-5131. Dostupné z: http://www.ipme.ru/e-journals/RAMS/no_22711/kannan.pdf
- [4] SASTRY, Murali, Absar AHMAD, M. Islam KHAN a Rajiv KUMAR. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current Science* [online]. 2003, roč. 85, č. 2 [cit. 2012-04-14]. ISSN 0011-3891. Dostupné z: http://repository.ias.ac.in/47133/1/92_pub.pdf
- [5] GAJBHIYE, Monali, Jayendra KESHARWANI, Avinash INGLE, Aniket GADE a Mahendra RAI. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*. 2009, roč. 5, č. 4, 382 – 386. ISSN 1549 – 9634. DOI: 10.1016/j.nano.2009.06.005.
- [6] CROOKES-GOODSON, Wendy J., Joseph M. SLOCIK a Rajesh R. NAIK. Bio-directed synthesis and assembly of nanomaterials. *Chemical Society Reviews*. 2008, roč. 37, č. 11, 2403 – 2412. ISSN 0306-0012. DOI: 10.1039/b702825n.
- [7] ZHANG, Xiaolei, Song YAN, R. D. TYAGI a R. Y. SURAMPALLI. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*. 2011, roč. 82, č. 4, 489 – 494. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.023.
- [8] SCHRÖFEL, Adam a Gabriela KRATOŠOVÁ. Biosynthesis of metallic nanoparticles. In *Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications*. Aleš Prokop. Verlag: Springer, 2001. ISBN 9789400712478.

- [9] MARCATO, Priscyla D. a Nelson DURÁN. Biogenic silver nanoparticles: Application in medicines and textiles and their health implications. *Metal Nanoparticles in Microbiology*. Verlag: Springer, 2011, 249 – 267. ISBN 9783642183119.
- [10] SADOWSKI, Zygmunt. Biosynthesis and application of silver and gold. [online]. 257 – 276 [cit. 2012-04-28]. Dostupné z: http://cdn.intechopen.com/pdfs/9725/InTech-Biosynthesis_and_application_of_silver_and_gold_nanoparticles.pdf
- [11] KUMAR, Vineet a Sudesh Kumar YADAV. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [online]. 2009, roč. 84, č. 2, 151 – 157 [cit. 2012-03-21]. ISSN 0268-2575. DOI: 10.1002/jctb.2023. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.2023/pdf>
- [12] KORBKANDI, Hassan, Siavash IRAVANI a Sajjad ABBASI. Production of nanoparticles using organisms. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2009, roč. 29, č. 4. ISSN 0738-8551. DOI: 10.3109/07388550903062462.
- [13] MANDAL, Deendayal, Mark E. BOLANDER, Debabrata MUKHOPADHYAY, Gobinda SARKAR a Priyabrata MUKHERJEE. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, roč. 69, č. 5, 485 – 492. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-005-0179-3.
- [14] LI, Xiangqian, Huizhong XU, Zhe-Sheng CHEN a Guofang CHEN. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2011 [cit. 2012-04-02]. ISSN 1687 – 4110. DOI: 10.1155/2011/270974. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2011/270974/>
- [15] VENKATARAMAN, Deepak, Kalimuthu KALISHWARALAL, Sureshbabu Ram Kumar PANDIAN a Sangiliyandi GURUNATHAN. An insight into the bacterial biogenesis of silver nanoparticles, industrial production and scale-up. *Metal Nanoparticles in Microbiology*. Verlag: Springer, 2011, 17 – 35. ISBN 9783642183119.

- [16] THIRUMURUGAN, G. a M. D. DHANARAJU. Novel biogenic metal nanoparticles for pharmaceutical applications. *Advanced Science Letters*. 2011, roč. 4, č. 2, 339 – 348. ISSN 1936-6612. DOI: 10.1166/asl.2011.1246.
- [17] FAYAZ, Amanulla Mohammed, Kulandaivelu BALAJI, Morukattu GIRILAL, Ruchi YADAV, Pudupalayam Thangavelu KALAICHELVAN, Ramasamy VENKETESAN. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: A study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine - Nanotechnology Biology and Medicine*. 2010, roč. 6, č. 1, 103 – 109. ISSN 1549-9634. DOI: 10.1016/j.nano.2009.04.006.
- [18] DURÁN, Nelson, Priscyla D. MARCATO, Gabriel I. H. DE SOUZA, Oswaldo L. ALVES a Elisa ESPOSITO. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2007, č. 2, [cit. 2012-05-05]. ISSN 1550-7033. Dostupné z:
<http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/asp/15507033/v3n2/s13.pdf?expires=1336323306&id=68651564&titleid=11665&acname=Guest+User&checksum=F21222683477674A8F65EC64425A09F8>
- [19] EL-RAFIE, A. A. MOHAMED, Th. I. SHAHEEN a A. HEBEISH. Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers*. 2010, roč. 80, č. 3, 779 – 782. ISSN 0144-8617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.12.028.
- [20] DE CORTE, Simon, Tom HENNEBEL, Bart DE GUSSEME, Willy VERSTRAETE a Nico BOON. Bio-palladium: from metal recovery to catalytic applications. *Microbial Biotechnology* [online]. 2012, roč. 5, č. 1, 5 – 17 [cit. 2012-05-02]. ISSN 1751-7907. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00265.x. Dostupné z:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-7915.2011.00265.x/pdf>
- [21] DE WINDT, W., P. AELTERMAN a W. VERSTRAETE. Bioreductive deposition of palladium(0) nanoparticles on *Shewanella oneidensis* with catalytic activity towards reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. *Environmental Microbiology*. 2005, roč. 7, č. 3, 314 – 325. ISSN 1462-2912. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2004.00696.x.

- [22] SHARMA, Nilesh C., Shivendra V. SAHI, Sudip NATH, Jason G. PARSONS, Jorge L. GARDEA-TORRESDEY a Tarasankar PAL. Synthesis of plant-mediated gold nanoparticles and catalytic role of biomatrix-embedded nanomaterials. *Environmental Science and Technology*. 2007, roč. 41, č. 14, 5137 – 5142. ISSN 0013-936X. DOI: 10.1021/es062929a.
- [23] YONG, P., M. PATERSON-BEEDLE, I. P. MIKHEENKO a L. E. MACASKIE. From bio-mineralisation to fuelcells: Biomanufacture of Pt and Pd nanocrystals for fuel cell electrode catalyst. *Biotechnology Letters*. 2007, roč. 29, č. 4, 539 – 544. ISSN 0141-5492. DOI: 10.1007/s10529-006-9283-4.
- [24] DOLEŽEL, Ivo. *Palivové články - princip, konstrukce, vlastnosti a využití* [online]. 1999 [cit. 2012-05-02], 12 s. Dostupné z: <http://www.powerwiki.cz/attach/APE/palivo.doc>
- [25] XU, Ke, David T PIERCE, Aize LI a Julia Xiaojun ZHAO. Nanocatalysts in direct metanol fuel cell applications. *Synthesis and Reactivity in Inorganic Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*. 2008, roč. 38, č. 4, 394 – 399. ISSN 1553-3174. DOI: 10.1080/15533170802132295.
- [26] ZHENG, Baozhan, Lei QIAN, Hongyan YUAN, Dan XIAO, Xiupei YANG, Man Chin PAAU a Martin M. F. CHOI. Preparation of gold nanoparticles on eggshell membrane and their biosensing application. *Talanta*. 2010, roč. 82, č. 1, 177 – 183. ISSN 0039-9140. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.04.014.
- [27] WANG, Tingting, Liangbao YANG, Buchang ZHANG a Jinhuai LIU. Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H₂O₂ biosensor. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2010, roč. 80, č. 1, 94 – 102. ISSN 0927-7765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.05.041.
- [28] GORDON, Richard, Frithjof STERRENBURG a Ken H. SANDHAGE. A special issue on diatom Nanotechnology. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2005, roč. 5, č. 1. ISSN 1533-4880. DOI: 10.1166/jnn.2005.017.
- [29] GORDON, Richard, Dusan LOSIC, Mary Ann TIFFANY, Stephen S. NAGY a Frithjof A. S. STERRENBURG. The Glass Menagerie: Diatoms for novel applications in nanotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2009, roč. 27, č. 2, 116 – 127. ISSN 0167-7799. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.11.003.

- [30] CHOUDHARY, T. V. a GOODMAN. Oxidation catalysis by supported gold nano-clusters. *Topics in Catalysis* [online]. 2002, roč. 21, 1 – 3, 25 – 34. ISSN 1022-5528. DOI: 10.1023/A:1020595713329.
- [31] Nanotechnológia: Inovácie pre svet zajtrajška. In: SCHULENBURG, Mathias. [online]. Európska komisia, GR pre výskum, 2007 [cit. 2012-05-07]. ISBN 92-79-00886-2. Dostupné z: http://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/nano-brochure/nanotechnology_bat_sk.pdf
- [32] SCHRÖFEL, Adam, Gabriela KRATOŠOVÁ, Markéta BOHUNICKÁ, Edmund DOBROČKA a Ivo VÁVRA. Biosynthesis of gold nanoparticles using diatoms – silica-gold and EPS-gold bionanocomposite formation. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2011, roč. 13, č. 8, 3207 – 3216 [cit. 2012-05-09]. ISSN 1388-0764. DOI: 10.1007/s11051-011-0221-6. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/content/5853w3287931250v/fulltext.pdf>
- [33] ZNACHOR, Petr. Rozsivky – podivuhodné řasy v krabici. In: *Živa* [online]. 2008, [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/2008-1/rozsivky-podivuhodne-rasy-v-krabicce.html>
- [34] Diatomeae (rozsivky). *BioLib* [online]. © 1999-2011 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id58356/>
- [35] GUILLARD R. R. L., C. J. LORENZEN (1972) Yellow-green algae with chlorophyllide C. *J. Phycol* 8: 10–14.
- [36] OBALOVÁ, Lucie, Bohumil BERNAUER. Katalytický rozklad oxidu dusného. *Chemické Listy*. 2003, 255 – 259.
- [37] OBALOVÁ, Lucie, Kateřina PACULTOVÁ. Problematika emisí N₂O ve výrobě HNO₃. *Chemické Listy*, 2008, 487 – 492.
- [38] WEI, X., X. F. YANG, A. Q. WANG, L. LI, X. Y. LIU, T. ZHANG, C. Y. MOU a J. LI. Bimetallic Au-Pd alloy catalysts for N₂O decomposition: Effects of surface structures on catalytic activity. *Journal of Physical Chemistry C*. 2012, roč. 116, č. 10, s. 6222 – 6232. ISSN 1932-7447. DOI: 10.1021/jp210555s.
- [39] LIM, Dong-Chan, Chan-Cuk HWANG, Gerd GANTEFÖR a Young Dok KIM. Model catalysts of supported Au nanoparticles and mass-selected clusters. *Physical*

Chemistry Chemical Physics. 2010, roč. 12, č. 6, s. 15172-15180. ISSN 1463-9076.
DOI: 10.1039/c0cp00467g.

- [40] CHENG, Wu-Hsun, Kao-Ching WU, Man-Yin LO a Chiou-Hwang LEE. Recent advances in nano precious metal catalyst research at Union Chemical Laboratories, ITRI. *Catalysis Today* . 2004, roč. 97, 2 – 3, s. 145 – 151. ISSN 0920-5861. DOI: 10.1016/j.cattod.2004.03.065.
- [41] CHANG, Li-Hsin, Yi-Lin YEH a Yu-Wen CHEN. Preferential oxidation of CO in hydrogen stream over nano-gold catalysts prepared by photodeposition method. *International Journal of Hydrogen Energy* . 2008, roč. 33, č. 7, s. 1965-1974. ISSN 0360-3199. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.01.014.
- [42] SCHRÖFEL, Adam. *Biosynthesis of metallic nanoparticles and their applications*. Ostrava, 2012. Disertační práce. VŠB - Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Prof. RNDr. Čapková Pavla, DrSc.