

NANOČÁSTICE STŘÍBRA – PŘÍPRAVA, VLASTNOSTI A APLIKACE

Libor KVÍTEK ^a, Robert PRUCEK ^a, Aleš PANÁČEK ^a, Jana SOUKUPOVÁ ^a

^a UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální chemie, Tř. 17. listopadu 12, 77146 Olomouc, Česká republika, libor.kvitek@upol.cz

Abstrakt

Nanočástice stříbra nacházejí díky svým unikátním optickým, katalytickým a biologickým vlastnostem široké využití nejen ve výzkumných laboratořích, ale i v běžné lidské praxi. Jejich příprava je nejčastěji založena na redukci rozpustné stříbrné soli vhodným redukčním činidlem. V případě modifikované Tollensovy reakce je amoniakální komplex stříbra redukován redukujícím cukrem. Mimo pro tuto reakci typickou glukosu lze využít další cukry - fruktosu, galaktosu, laktosu či maltosu. Přítomnost komplexotvorného činidla umožňuje společně s výběrem redukujícího cukru a hodnotou pH řídit velikost vznikajících nanočástic stříbra od 25 až po asi 75 nm. V aplikační oblasti byly připravené nanočástice testovány jak z hlediska jejich biologické aktivity, tak i z hlediska jejich katalytické aktivity. V oblasti biologické aktivity vykazují tyto nanočástice vysokou antibakteriální aktivitu při výrazně nižší cytotoxicitě, než jakou vykazuje iontové stříbro. V oblasti katalýzy se připravené nanočástice osvědčily zejména při katalytické redukci organických barviv a nitroslouchenin, tedy látek, které vykazují vysoký stupeň toxicity pro životní prostředí. Pro praktické aplikace není ovšem primárně připravená vodná disperze nanočástic stříbra příliš vhodná díky své agregační nestabilitě zejména při přidávku elektrolytů. Z tohoto hlediska byla proto dále studována možnost modifikace těchto nanočástic povrchově aktivními látkami a polymery. Z testovaných látek vysokou schopnost stabilizace nanočástic stříbra proti agregaci vykázal zejména anionický tenzid SDS, z polymerů pak přírodní polymery jako želatina či kasein. Při vhodných koncentracích těchto modifikátorů navíc docházelo ke zvýšení jejich biologické aktivity díky vyšší schopnosti odolávat agregaci během vlastních biologických testů.

1. ÚVOD

Současné období intenzivního rozvoje v oblasti nanotechnologií dává nový život materiálům, které lidstvo neuvědoměle využívá již po staletí – materiálům, které daly vzniknout významné oblasti fyzikální chemie – koloidní chemii. V této oblasti hrály vždy důležitou roli i koloidy kovů, např. při barvení keramiky a skla, kde obzvláště významnou roli hrál koloid zlata. Michael Faraday výzkumem tohoto koloidu na počátku 2. poloviny 19. století zahájil éru koloidní chemie [1], jejíž rozvoj na počátku 20. století přinesl mimo jiné masové rozšíření fotografie [2], či naději v boji s mikroorganismy za pomoci koloidu stříbra. Poslední čtvrtina 20. století přinesla mimo jiné i obnovení zájmu o koloidy kovů, či v užším slova smyslu nanočástic kovů, jako příklad může sloužit objev stříbrným povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS) [3], který inicioval rychlý rozvoj nové, vysoce citlivé spektroskopické metody, umožňující studium i jediné molekuly naadsorbované na stříbrné nanočástici [4]. Nelze nezmínit ani obnovený zájem o baktericidní účinky nanočástic stříbra v době, kdy rostoucí rezistence bakterií vůči antibiotikům přináší závažný problém pro medicínskou praxi budoucnosti [5].

Ve všech vyvíjených nanotechnologických aplikacích hraje významnou roli velikost resp. velikostní distribuce používaných nanočástic, dále jejich morfologie, stabilita, stav povrchu z hlediska fyzikálního (např. elektrický náboj) i chemického (modifikace povrchu). Cílená příprava nanočástic stříbra požadovaných vlastností však zdaleka není vyřešeným úkolem současného materiálového výzkumu, čemuž odpovídá i rostoucí počet

publikací na toto téma. Ze dvou obecných postupů přípravy nanočástic kovů - tedy dispergačních a kondenzačních metod převládají při přípravě nanočástic stříbra v současné praxi metody kondenzační. Ty jsou v převážné většině založeny na chemické redukci rozpustné sloučeniny stříbra za vzniku zárodků nové pevné fáze, které po dosažení kritické velikosti mohou dále růst za vzniku stabilních nanočástic stříbra. Současný intenzivní rozvoj tzv. "wet" (roztokových) metod přípravy nanočástic stříbra souvisí s již zmíněným objevem SERS v 70. letech 20. stol. odkud pochází i dva dnes již klasické postupy přípravy nanočástic stříbra. Postup podle Creightona, Blatchforda a Albrechta vychází z redukce roztoku AgNO_3 silným redukčním činidlem (NaBH_4) ve vodném prostředí [6]. Touto metodou lze připravit několik měsíců stabilní disperzi stříbra s velmi malými částicemi (5 - 20 nm), čemuž odpovídá i poloha absorpčního maxima („surface plasmon“) o hodnotě přibližně 400 nm. Stříbrné nanočástice připravené borohydridovou redukcí nejsou ovšem vždy vhodné pro následné aplikace, zejména díky borátovému aniontu adsorbovanému na jejich povrchu. To ukazuje případ SERS studia cytochromu P-450, který na borohydridovém solu podléhá denaturaci [7]. V takových případech se osvědčuje druhý z klasických redukčních postupů podle Lee a Meisela, používajícím mírnější redukční činidlo - citrátový anion, který zároveň stabilizuje vznikající nanočástice stříbra [8]. V tomto případě vznikají výrazně větší a polydisperznější nanočástice stříbra než u borohydridové redukce. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 30 až 120 nm, absorpční maximum pak leží okolo 420 nm a rovněž stabilita disperze těchto citrátových nanočástic je menší než v případě borohydridové redukce. Ovšem NaBH_4 nebo citrát sodný nejsou jediné používané redukční látky při přípravě nanočástic stříbra. Využit lze rovněž redukčních účinků vodíku [8, 9], peroxidu vodíku [10], hydroxylaminu [11], hydrazinu [9, 12, 13], formaldehydu a jeho derivátů [13-15], kyseliny askorbové [9, 16, 17], EDTA [18, 19], hydrogenvinanu draselného [20] i jednoduchých cukrů [9, 13]. Z tohoto hlediska i z hlediska této práce jsou pak zajímavé výsledky dosažené při přípravě nanočástic stříbra metodou vycházející z historického Tollensova postupu přípravy stříbrného zrcátka - tedy redukce amoniakálního komplexního kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ redukujícími cukry, např. glukózou [21]. Tato metoda nabízí možnost řízené přípravy nanočástic stříbra v jediném reakčním kroku díky vazbě Ag^+ iontu do komplexního iontu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. Změnou koncentrace ligandu lze pak ovlivňovat velikost vznikajících částic Ag v rozmezí 25 až 400 nm [22]. Cílem tohoto příspěvku je rozbor této metody přípravy nanočástic stříbra z hlediska mechanismu jejich vzniku a rovněž tak rozbor problému stabilizace vodné disperze nanočástic stříbra se zřetelem na zlepšení vlastností takto stabilizované disperze v běžných aplikacích, zejména pak v oblasti antibakteriální aktivity vůči běžným bakteriálním patogenům.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

Příprava nanočástic stříbra probíhala v amoniakálním prostředí za použití redukujících cukrů, analogicky podle reakce historicky známé jako Tollensova reakce, resp. reakce přípravy stříbrného zrcátka [23]. V úloze redukční látky byla použita řada redukujících cukrů, z nichž byli vybráni nejběžnější zástupci: z monosacharidů glukóza a fruktóza z disacharidů maltóza a laktóza. V úloze modifikátorů připravených nanočástic stříbra pak byly použity povrchově aktivní látky (PAL) a polymerní ve vodě rozpustné látky. Ze skupiny PAL byl použit dodecyl sulfonát sodný (SDS, anionický tenzid) a dále Tween80 (oxyethylenát acylsorbitanu, neionický tenzid). Ze skupiny polymerních látek to byl polyethylenglykol (PEG) o různé průměrné molekulové hmotnosti v rozmezí 1.500 až 35.000 a dále polyvinylpyrrolidon (PVP) opět s různými hodnotami průměrné relativní molekulové hmotnosti v rozmezí 10.000 až 360.000.

2.2 Příprava nanočástic stříbra

Použitá metoda přípravy nanočástic stříbra je založena na redukci roztoku stříbrné soli v komplexujícím prostředí, umožňujícím řídit průběh redukce a tím i parametry vznikajících nanočástic jak výběrem redukčního činidla, tak i výběrem vhodného ligandu a jeho koncentrace v reakčním systému. V realizovaných experimentech byla studována redukce stříbrné soli v amoniakálním prostředí, kde vzniká komplexní kation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ ($\text{pK}_{\text{dis}} = 7,03$) redukovatelný i tak slabými redukčními látkami jako jsou redukující cukry. Protože redox potenciál použitých redukčních činidel závisí na pH (redukce probíhá v alkalické oblasti, obvykle při pH vyšším než 10), byla úpravou jeho hodnoty řízena rychlost celé reakce (z důvodu dosažení reakční doby kratší než 5 min). Jako hlavní řídicí parametr z hlediska přípravy stříbrných nanočástic byla zvolena koncentrace komplexotvorného činidla, která se v realizovaných experimentech pohybovala v rozmezí koncentrací 0,005 až 0,2 mol·dm⁻³. Výsledná velikost vznikajících nanočástic stříbra se dá rovněž do jisté míry ovlivnit počáteční koncentrací stříbrné soli v roztoku. Protože tato koncentrace ale rovněž významně určuje celkovou reakční rychlost, byla standardně používána koncentrace 10⁻³ mol·dm⁻³ Ag⁺ v reakčním systému. Z důvodu zjednodušení kinetických studií byla koncentrace redukčního činidla udržována ve vysokém přebytku oproti koncentraci stříbrné soli, konkrétně na hodnotě 10⁻² mol·dm⁻³. V případě realizace povrchové modifikace nanočástic stříbra za účelem modifikace jejich povrchového náboje resp. zvýšení jejich agregační stability byly do systému přidávány vybrané ionické i neionické tenzidy (SDS, Tween) a rovněž vybrané polymerní látky (PEG, PVP), využívané běžně v praxi za účelem stabilizace koloidních disperzí. Studium přípravy nanočástic stříbra redukcí komplexní sloučeniny stříbra vybraným redukčním činidlem probíhalo v upraveném titračním nástavci ze spektrofotometru Specol v kyvetě o objemu 30 ml za míchání elmg. míchadlem. Reakce probíhala za laboratorní teploty bez temperování, tedy při teplotě 23±2 °C. Její průběh byl sledován na základě rostoucí turbidity vznikající disperze nanočástic stříbra za pomoci jednoduchého kolorimetrického uspořádání, využívajícího jako detektor fotočlánek příslušného titračního nástavce a jako zdroj světla vysoce svítivou LED diodu emitující záření o vlnové délce 660 nm a intenzitě 1500 mcd.

2.3 Charakterizace nanočástic stříbra

Měření velikosti vznikajících nanočástic stříbra ve vodné disperzi včetně jejich polydisperzity bylo prováděno na přístroji Zetasizer Zeta Plus (fy Brookhaven), využívající metodu dynamického rozptylu světla (DLS). Veškeré hodnoty průměrné velikosti částic a s ní spojené doplňující údaje jsou tak v této práci primárně uváděny jako výsledky tohoto měření. V některých případech jsou uváděny výsledky průměrných velikostí částic získaných manuálně z TEM snímků, v těchto místech je vždy přímo uvedeno, že se jedná o hodnotu získanou tímto způsobem. Přístroj Zeta Plus byl rovněž použit pro měření zeta potenciálu připravených nanočástic stříbra. V tomto případě je měřená veličina vyhodnocována na základě měření elektroforetické pohyblivosti nanočástic, určené opět prostřednictvím DLS. Kontrolní měření velikosti částic bylo prováděno za využití snímků z transmisní elektronové mikroskopie (TEM), pořízených jak za pomoci el. mikroskopu Jeol JEM 2010. Další verifikace nanočásticového charakteru připravených nanočástic stříbra byla prováděna metodou UV/VIS spektroskopie na spektrofotometru Specol S600, Analytic Jena AG. Tato metoda byla využita rovněž při sledování rychlosti agregace disperzí nanočástic stříbra v případě provádění stabilizačních studií na základě modifikace nanočástic stříbra tenzidy a polymery. Kontrolní stanovení obsahu stříbra ve vzorcích připravených disperzí pak bylo realizováno metodou AAS na přístroji Avanta Σ, fy GBC.

2.4 Antibakteriální aktivita

Antibakteriální aktivita modifikovaných a nemodifikovaných nanočástic stříbra byla testována za využití standardní mikrodiluční metody, jejíž pomocí se určuje tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibakteriální látky. Testování bylo prováděno na mikrotitračních destičkách postupem, kdy byla testovaná disperze nanočástic stříbra naředěna v rámci geometrické řady 2x až 128x přídatkem 100 μL Mueller-Hintonova kultivačního média inokulovaného testovaným bakteriálním kmenem o koncentraci 10^5 to 10^6 CFU·ml⁻¹. Hodnota MIC byla odečítána po 24 hod inkubace při 37 °C jako minimální koncentrace testované látky, která inhibovala růst bakterií v testu. Stejným způsobem bylo vždy provedeno kontrolní testování obdobně koncentrovaného vzorku iontového stříbra a v případě, že byly použity, byly testovány i samotné roztoky modifikátorů. Ve vybraných případech byla tato stanovení doplněna stanovením minimální baktericidní koncentrace (MBC), což je minimální koncentrace látky, která ničí bakterie přítomné ve vzorku. Jako standardy byly použity dále uvedené bakteriální kmeny ze sbírky MU Brno (Czech Collection of Microorganisms, Czech Republic): *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Dále byly k testování použity i bakteriální kmeny izolované z klinického materiálu Fakultní nemocnice Olomouc: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, methicillin-resistentní *Staphylococcus epidermidis*, methicillin-resistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistentní *Enterococcus faecium* (VRE) a ESBL-positivní *Klebsiella pneumoniae*. Testování antibakteriální aktivity bylo prováděno na specializovaném pracovišti Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci pod vedením Prof. M. Koláře.

2.5 Testování environmentální toxicity

V rámci primárního testování biologické aktivity připravených nanočástic stříbra bylo mimo testování antibakteriální aktivity provedeno i testování environmentální toxicity těchto nanočástic na běžně k tomuto účelu užívaném mikroorganismu *Paramecium caudatum* (*Trepka velká*). K testování byla použita laboratorní kultura mikroorganismu získaná z MU Brno. Vlastní toxicita nanočástic stříbra byla určována na základě stanovení hodnoty LT₅₀, tedy doby, za kterou při dané koncentraci nanočástic stříbra zahyne právě polovina studovaného mikroorganismu. Ke kultuře mikroorganismu *Paramecium caudatum* (koncentrace 200-300 jedinců na 1 ml) v množství 1 až 5 ml v testovací zkumavce bylo přidáno adekvátní množství koncentrované disperze nanočástic stříbra (o koncentraci 200 mg Ag/l). Po promíchání obsahu zkumavky bylo 200 μl vzorku přeneseno na mikroskopické podložní sklíčko opatřené mřížkou o velikosti 1 x 1 cm a mikroorganismy byly sledovány v optickém mikroskopu při 40x zvětšení.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Získané výsledky závislosti velikosti připravených částic stříbra (měřených DLS) na koncentraci amoniaku v reakčním systému v první fázi experimentů naznačily možný široký rozsah dosažitelných velikostí částic stříbra od cca 20 nm až po stovky nm (viz Tab. 1). Nanočásticový charakter připravených částic stříbra redukcí stříbrné soli redukujícími cukry v amoniakálním prostředí, stejně jako jejich agregaci při vyšších hodnotách pH prokázala i UV/Vis spektra. V případě samostatně dispergovaných nanočástic stříbra se v těchto spektrech objevuje charakteristická intenzivní absorpce světla okolo vlnové délky 400-420 nm, která uděluje disperzi těchto nanočástic intenzivní oranžové zbarvení. Tato intenzivní absorpce je důkazem existence povrchového plasmonu, který je spojen právě s rozměrem kovových nanočástic pod 100 nm

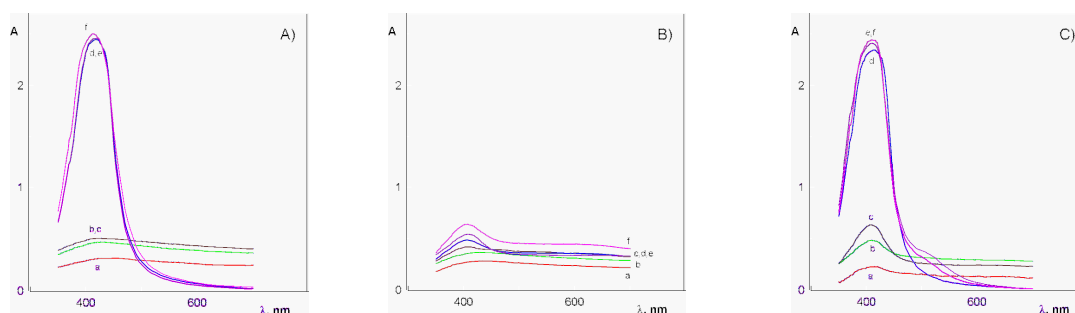
(Obr. 1). Aplikační možnosti této metody zvyšuje dlouhodobá stabilita disperze připravených nanočástic, která se pohybuje v oblasti měsíců, což je mimo jiné důsledek vysoké hodnoty zeta potenciálu těchto nanočástic okolo hodnoty -25 mV [22].

Tab. 1: Závislost velikosti částic stříbra na koncentraci amoniaku v reakčním systému.

Table 1: The dependence of silver nanoparticle sizes on ammonia concentration in the reaction system.

redukující cukr	koncentrace amoniaku [mol·dm ⁻³]						
	0,005	0,01	0,02	0,035	0,05	0,1	0,2
	d / h.w.*	d / h.w.*	d / h.w.*	d / h.w.*	d / h.w.*	d / h.w.*	d / h.w.*
glukóza	44/13	52/18	52/20	304/140	318/138	394/165	453/246
fruktóza	149/37	158/52	182/71	250/93	303/127	363/153	395/187
maltóza	25/8	30/9	32/10	290/95	286/99	213/75	262/91
laktóza	35/11	41/12	41/13	286/96	282/106	168/59	186/63

* d značí průměrnou hodnotu velikosti stříbrné částice v nm určené z DLS a h.w. značí pološířku distribuční křivky rozdělení velikosti těchto částic v disperzi rovněž určené z DLS

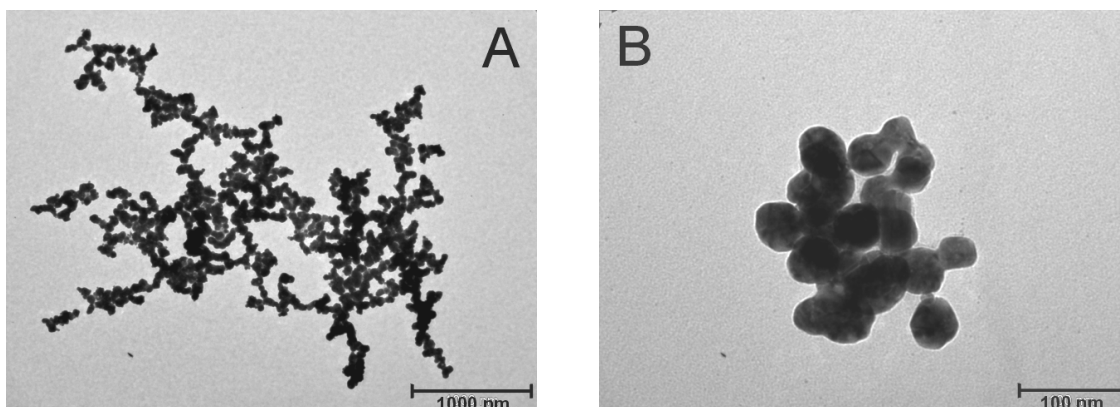


Obr. 1: UV/Vis spektra nanočástic stříbra připravených redukcí Ag⁺ glukózou (A), fruktózou (B) a maltózou (C). Koncentrace amoniaku byla a) 0,2; b) 0,1; c) 0,05; d) 0,02; e) 0,01 a f) 0,005 mol·dm⁻³.

Fig. 1: UV/Vis spectra of silver nanoparticles reduced using glucose (A), fructose (B), and maltose (C). Ammonia conc. was a) 0.2; b) 0.1; c) 0.05; d) 0.02; e) 0.01, f) 0.005 mol·dm⁻³.

Ovšem ani tato metoda neposkytuje zcela optimální výsledky z hlediska možnosti řízení velikosti připravovaných částic stříbra. Závislost velikosti připravených částic stříbra na koncentraci amoniaku vykazuje velmi strmý nárůst velikosti až na hodnoty několika stovek nm v okolí koncentrace amoniaku přibližně 0,03 mol·dm⁻³. Prudký nárůst velikosti částic stříbra v reakčním systému při vzrůstu koncentrace amoniaku na hodnotu 0,035 mol·dm⁻³ a vyšší se stal objektem dalšího studia reakčního mechanismu příslušného redukčního děje. Jako modelový redukující cukr pro toto studium byla vybrána glukóza a s ní bylo provedeno podrobné zmapování vlivu jak koncentrace amoniaku, tak i dalších reakčních proměnných na změnu velikosti vyredukovaných částic stříbra. V rámci tohoto podrobného rozboru vlivu jednotlivých reakčních podmínek na výsledné částice stříbra se jako další významný faktor projevila hodnota pH

reakčního systému. Bylo zjištěno, že při konstantní koncentraci amoniaku v reakčním systému dochází k prudkému nárůstu velikosti vyredukovaných částic stříbra přibližně okolo hodnoty pH 12,5. Následná elektronmikroskopická studie částic stříbra vznikajících v této soustavě za různých podmínek koncentrace amoniaku a pH prokázala existenci agregátů primárních nanočástic stříbra v disperzi vznikající za těchto podmínek (viz Obr. 2). Takto byla potvrzena hypotéza o nárůstu velikosti částic stříbra při vysokých hodnotách pH vlivem agregace primárních nanočástic stříbra díky zvýšené koncentraci jednomocného kationtu Na^+ . Ten je do reakčního systému dodáván v podobě NaOH, jímž byla řízena hodnota pH. Zde se tak ukázala univerzální platnost mechanismu rychlé koagulace vyvolané přidávkem elektrolytů, popsané teorií DLVO jako tzv. neutralizační mechanismus koagulace - neutralizace povrchového náboje koloidních částic vlivem zvýšené koncentrace elektrolytu.



Obr. 1: TEM snímky nanočástic stříbra vzniklých v amoniakálním systému při vysoké hodnotě pH=12,7.

Fig.1: TEM micrographs of the silver nanoparticles prepared in ammoniacal system at high pH=12.7.

Praktické aplikace nanočástic stříbra vyžadují použití systémů se stabilními částicovými parametry bez ohledu na prostředí, ve kterém jsou tyto částice aplikovány. Přes dobrou stabilitu připravených disperzí nanočástic stříbra není tato disperze stabilní za všech podmínek. Velká změna pH, přebytek elektrolytů či některých organických látek (tzv. polyelektrolytů) vedou k destabilizaci disperze a následné koagulaci stříbrných nanočástic. Tomuto procesu se v praxi brání povrchovou modifikací nanočástic, obvykle látkami, které jsou schopny po adsorpci zvyšovat povrchový náboj částic – ionické tenzidy, či mohou po adsorpci na povrchu zvyšovat energetickou bariéru proti spojování částic díky sterické repulzi – neionické tenzidy a polymery. Pro studium agregační stability připravených nanočástic stříbra byl použit kationický polyelektrolyt poly(diallyldimethylammonium) chlorid (PDDA), který velmi účinně destabilizuje výchozí disperzi nanočástic stříbra již při velmi nízkých koncentracích v roztoku (10^{-5} % (w/w) roztok). To umožnilo provést tuto stabilizační studii za podmínek jen minimálních koncentračních změn původní disperze. Již při přidávku 10 μl 0,01% roztoku PDDA do 1 ml disperze (konc. PDDA 10^{-4} %, objemová změna disperze 1%) docházelo k dvojnásobnému nárůstu průměrné velikosti částic v disperzi a desetinásobné množství roztoku PDDA tuto disperzi již totálně destabilizuje za vzniku mikrometrových agregátů velmi rychle sedimentujících z původní disperze. Zjištěná kritická koagulační koncentrace (CCC) u nemodifikované disperze nanočástic stříbra pak měla hodnotu $2,4 \cdot 10^{-5}$ % (w/w) PDDA. Následně byly stejným způsobem testovány i disperze nanočástic stříbra modifikované vybranými tenzidy a polymery o výsledné koncentraci modifikátorů v disperzi 1% (w/w). Pro toto testování byly použity následující látky – anionický tenzid SDS, neionický tenzid Tween 80 a

z polymerů pak byly použity PEG a PVP o různých molekulových hmotnostech. Z hlediska stabilizačního účinku proti agregaci vyvolané přidavkem PDDA do vodné disperze nanočástic stříbra se jako optimální stabilizátor ukázal SDS, který zásadně zvyšuje zeta potenciál nanočástic stříbra až na hodnotu okolo -50 mV. Ani maximální použitý přídavek roztoku PDDA (výsledná koncentrace cca $8 \cdot 10^{-3}$ %) nezpůsobil v tomto případě ani minimální agregaci studované disperze nanočástic stříbra. Použitý neionický tenzid Tween 80 již tak optimální stabilizaci nevykazoval, i když velmi významně oproti nemodifikované disperzi zpomalil tvorbu agregátů. Modifikace disperze nanočástic stříbra polymery polyethylenglykolového typu (PEG) nevedla ke zvýšení agregátní stability, stejně jako u polymerů typu PVP s nízkou molekulovou hmotností. Pouze u polymeru PVP360 byly prokázány stabilizující účinky s neionickým tenzidem Tween.

Primární testování biologické aktivity připravených nanočástic stříbra proběhlo standardní mikrodiluční metodou při níž jako standardní vzorek byl použit roztok dusičnanu stříbrného, tedy iontová forma stříbra, která je obecně považována za nejúčinnější (ale rovněž tak nejtoxičtější) formu stříbra. Výsledky této studie shrnuje následující tabulka 2.

Tab. 2: Přehled stanovených antibakteriálních aktivit (MIC) nanočástic stříbra.

Table 2: The review of determined antibacterial activity of the prepared silver nanoparticles.

Testovaný kmen	MIC (mg /dm ³ Ag)			
	glukóza	laktóza	maltóza	Ag ⁺
<i>Enterococcus faecalis</i>	---	54.0	13.5	6.75
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.75	6.75	6.75	6.75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27.0	13.5	6.75	0.84
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13.5	6.75	1.69	0.84
<i>Enterococcus faecium</i>	---	54.0	13.5	3.38
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	27.0	54.0	6.75	3.38

Následně byla provedena studie vlivu stabilizátorů na antibakteriální aktivitu modifikovaných nanočástic stříbra a skutečně ty látky, které se projevily jako dobré stabilizátory (zejména anionický tenzid SDS a neionický tenzid Tween 80 a z polymerních látek pak PVP360) pozitivně ovlivnily jejich antibakteriální aktivitu (viz Tab. 3). V této tabulce jsou tučně zvýrazněny případy, kdy modifikace zvyšuje antibakteriální aktivitu nanočástic stříbra. Z četnosti výskytu takto označených hodnot je zřejmé, že SDS nejen že se osvědčil jako výborný stabilizátor vodných disperzí nanočástic stříbra, ale rovněž pozitivně ovlivnil antibakteriální aktivitu těchto nanočástic ve více než polovině případů. Nutno poznamenat, že i další dva testované modifikátory – neionický tenzid Tween 80 a polymer PVP360 pozitivně ovlivnily antibakteriální aktivitu nanočástic stříbra, i když tak významný vliv jako u SDS nebyl pozorován. Přesto je zde dobré poznamenat netriviální fakt, že povrchová modifikace nanočástic stříbra nevedla ke zhoršení jejich antibakteriální aktivity, ačkoliv pravděpodobný mechanismus interakce nanočástic stříbra s bakteriemi souvisí s nutností přímého kontaktu povrchu částice a bakteriální stěny.

Tab. 3: Výsledky testování antibakteriální aktivity nanočástic stříbra modifikovaných tenzidy a polymery.

Table 3: The results of the antibacterial activity silver nanoparticles modified by tensides and polymers.

testované bakteriální kmeny	MIC = minimální inhibiční koncentrace (mg/dm ³ Ag)				
	Ag ⁺	nemodifikované nanočástice	modifikované nanočástice		
			SDS	Tween 80	PVP 360
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,69	6,75	3,38	6,75	6,75
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,69	3,38	1,69	3,38	3,38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,84	3,38	1,69	3,38	1,69
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,84	1,69	0,84	1,69	1,69
<i>Enterococcus faecium</i>	1,69	6,75	3,38	3,38	3,38
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,69	6,75	6,75	3,38	6,75

V rámci další fáze testování biologické aktivity nanočástic stříbra byla provedena studie jejich ekotoxicity vůči jednoduchým mikroorganismům. Tato studie měla potvrdit předpoklad, že toxicita s rostoucí složitostí organismu v případě stříbra klesá. Prvok *Trepka velká* (*Paramecium caudatum*) použitý v této studii je díky své velikosti dobře viditelný již při nevelkém zvětšení pod mikroskopem a proto je velmi snadné využít jej jako indikátor toxických účinků různých látek, včetně kovů [24]. Výsledky testování ekotoxicity pro obě formy stříbra ukazují na významný rozdíl v toxicitě iontového stříbra a nanočástic stříbra. V případě nanočástic stříbra se akutní toxicita ztrácí v okolí hodnoty jejich koncentrace přibližně 25 mg/dm³, kdy prvoci přežívají v médiu minimálně 7 dní. Zato iontové stříbro zabíjí trepky prakticky okamžitě ještě při koncentracích nižších než 1 mg/dm³. Jako jednoznačný údaj o toxicitě nanočástic stříbra vůči testovanému mikroorganismu byla určena navíc hodnota LC50 pro 1 hod expozici, ta se pohybuje okolo 39 mg/dm³ Ag. I když není zcela přesné srovnávat tuto hodnotu s hodnotami MIC dosaženými pro bakteriální kmeny v rámci testování antibakteriální aktivity nanočástic stříbra, lze ale s jistou rezervou konstatovat, že toxicita nanočástic stříbra je vůči testovanému jednobuněčnému eukaryotickému organismu minimálně o řád nižší než vůči bakteriím (prokaryotický organismus). Potvrzuje se tak obecně přijímaný fakt, že toxicita stříbra a jeho sloučenin rychle klesá s rostoucí složitostí organismu. Přes tento závěr je však třeba, aby využití nanočástic stříbra v praxi bylo činěno s rozvahou, protože zde určené limity toxicity mohou být v přírodním prostředí (díky znečištění jinými polutanty) podstatně sníženy, což by mohlo vést k porušení rovnováhy na té nejelementárnější úrovni přírody, tedy na úrovni nejjednodušších živých organismů.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla finančně podpořena projekty MŠMT ČR MSM6198959218, 1M6198959201 a MSM6198959223.

LITERATURA

- [1] Everett, D.H. and e. al., in *Basic Principles of Colloid Science*. 1988, Royal Society of Chemistry: London. p. 11-15.
- [2] James, T.H. and e. al., in *The Theory of the Photographic Process*. 1977, MacMillan Publishing Co.: New York.

- [3] Fleischmann, M. and e. al., *Chemical Physics Letters*, 1974. **26**: p. 163.
- [4] Nie, S.M. and S.R. Emery, *Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering*. *Science*, 1997. **275**(5303): p. 1102-1106.
- [5] Lambert, P.A., *Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005. **57**(10): p. 1471-1485.
- [6] Creighton, J.A., C.G. Blatchford, and e. al., *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, 1979. **75**: p. 790-798.
- [7] Rospendowski, B.N., K. Kelly, and e. al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991. **113**: p. 1217-1225.
- [8] Lee, P.C. and D. Meisel, *Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols*. *Journal of Physical Chemistry*, 1982. **86**(17): p. 3391-3395.
- [9] Esumi, K., et al., *Preparation of Colloidal Silver Using Various Reductants in the Presence of Copolymers of Vinyl Alcohol-N-Vinyl Pyrrolidone*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1992. **44**(6): p. 1003-1007.
- [10] Li, Y.S., J.C. Cheng, and L.B. Coons, *A silver solution for surface-enhanced Raman scattering*. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1999. **55**(6): p. 1197-1207.
- [11] Leopold, N. and B. Lendl, *A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2003. **107**(24): p. 5723-5727.
- [12] Nickel, U., et al., *A silver colloid produced by reduction with hydrazine as support for highly sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy*. *Langmuir*, 2000. **16**(23): p. 9087-9091.
- [13] Nersisyan, H.H., J.H. Lee, and e. al., *Materials Research Bulletin*, 2003. **38**: p. 949-956.
- [14] Khanna, P.K., V.V.V.S. Subbarao, and e. al., *Materials Letters*, 2003. **57**: p. 2242-2245.
- [15] Chou, K.S. and Y.S. Lai, *Effect of polyvinyl pyrrolidone molecular weights on the formation of nanosized silver colloids*. *Materials Chemistry and Physics*, 2004. **83**(1): p. 82-88.
- [16] Sondi, I., D.V. Goia, and E. Matijevic, *Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003. **260**(1): p. 75-81.
- [17] Velikov, K.P., G.E. Zegers, and A. van Blaaderen, *Synthesis and characterization of large colloidal silver particles*. *Langmuir*, 2003. **19**(4): p. 1384-1389.
- [18] Keating, C.D., K.K. Kovaleski, and M.J. Natan, *Heightened electromagnetic fields between metal nanoparticles: Surface enhanced Raman scattering from metal-cytochrome c-metal sandwiches*. *Journal of Physical Chemistry B*, 1998. **102**(47): p. 9414-9425.
- [19] Bright, R.M., M.D. Musick, and e. al., *Langmuir*, 1998. **14**: p. 5695-5701.
- [20] Tan, Y.W., et al., *Preparation of gold, platinum, palladium and silver nanoparticles by the reduction of their salts with a weak reductant-potassium bitartrate*. *Journal of Materials Chemistry*, 2003. **13**(5): p. 1069-1075.
- [21] Yin, Y.D., et al., *Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process*. *Journal of Materials Chemistry*, 2002. **12**(3): p. 522-527.
- [22] Kvitek, L., et al., *The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis*. *Journal of Materials Chemistry*, 2005. **15**(10): p. 1099-1105.
- [23] Greenwood, N.N. and A. Earnshaw, *Chemie prvků*. 1993, Informatorium: Praha. p. 1469.
- [24] Madoni, P., *Environmental Pollution*, 2000. **109**(1): p. 53-59.