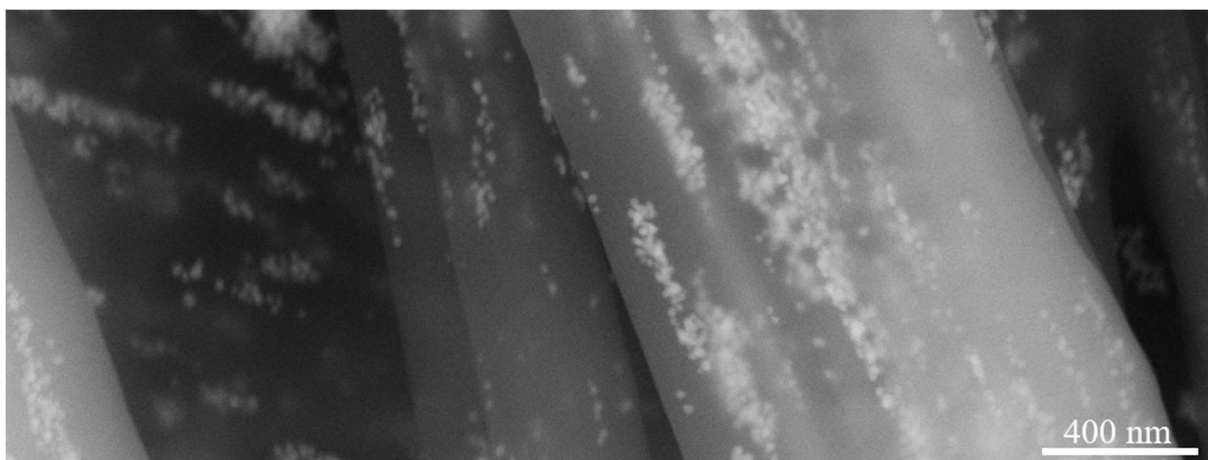


Technická univerzita v Košiciach
Fakulta materiálov, metalurgie a recyklácie

doc. Ing. Oksana Velgosová, PhD.

Nanomateriály II

Návody na cvičenia II



Košice, 2023

Autor:

doc. Ing. Oksana Velgosová, PhD.

Technická univerzita v Košiciach, Fakulta materiálov, metalurgie a recyklácie,
Ústav materiálov a inžinierstva kvality

Recenzent:

RNDr. Anna Mražíková, PhD.

Za odbornú, obsahovú a jazykovú úpravu textov zodpovedá autor.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani jeho časť nemožno reprodukovat' bez súhlasu majiteľa
práv:

© Technická univerzita v Košiciach, Fakulta materiálov, metalurgia a recyklácie

© doc. Ing. Oksana Velgosová, PhD.

Názov: Nanomateriály II

Podnázov: Návodý na cvičenia II

Vydavateľ: Technická univerzita v Košiciach

Druh publikácie: skriptá

Rok: 2023

Vydanie: prvé

Náklad: 50 ks

Rozsah: 79 strán

ISBN: 978-80-553-4341-9

Obsah

Úvod.....	7
Zoznam použitých značiek a symbolov	9
Cvičenie č. 1	11
1 Príprava prírodných extraktov na redukciu iónov kovov	11
1.1 Rastlinné extrakty	12
1.1.1 Kultivácia biomasy.....	14
1.1.1.1 Spôsoby kultivácie.....	14
1.1.1.2 Rastová krivka	15
1.1.1.3 Kultivačné médiá.....	15
1.1.2 Možnosti stanovenia počtu buniek.....	17
1.2 Praktické cvičenie	18
1.2.1 Úlohy a experiment	18
1.3 Kontrolné otázky.....	20
Literatúra	20
Cvičenie č. 2.....	22
2 Biologická syntéza nanočastíc Ag	22
2.1 Teoretický úvod.....	22
2.1.1 Mechanochemická syntéza.....	22
2.1.2 Roztoková chémia	23
2.2 Syntéza nanočastíc	24
2.3 Praktické cvičenie	25
2.3.1 Úlohy a experiment	25
2.4 Kontrolné otázky.....	27
Literatúra	27
Cvičenie č. 3.....	29
3 Kompozitné materiály a ich výroba	29
3.1 Kompozitné materiály	29
3.1.1 Matrica a sekundárna fáza.....	30
3.1.2 Výroba kompozitných materiálov	30
3.2 Polymérne kompozity dopované kovovými nanočasticami.....	31
3.2.1 In situ metóda prípravy polymérnych nanokompozitov	32
3.2.2 Ex situ metóda prípravy polymérnych nanokompozitov	32
3.3 Elektrostatické zvlákňovanie	32
3.4 Praktické cvičenie	34
3.4.1 Úlohy a experiment	34
3.5 Kontrolné otázky.....	35
Literatúra	35
Cvičenie č. 4.....	36
4 Povrchová úprava povlakovaním	36
4.1 Dip coating.....	36
4.2 Spin coating	38
4.3 Striekanie	39
4.4 Praktické cvičenie	40
4.4.1 Úlohy a experiment	40

4.5 Kontrolné otázky	41
Literatúra.....	41
Cvičenie č. 5	42
5 Vstup látok do buniek a mechanizmy toxicity	42
5.1 Vstup látok do buniek	43
5.2 Mechanizmy toxicity nanočastíc striebra	46
5.2.1 Narušenie funkčnosti bunkových membrán	47
5.2.2 Tvorba ROS	47
5.2.3 Poruchy replikácie DNA.....	49
5.3 Praktické cvičenie.....	49
5.4 Kontrolné otázky	50
Literatúra.....	50
Cvičenie č. 6	51
6 Toxikológia, toxicita, ekotoxikológia a ekotoxicita.....	51
6.1 Ekotoxikológia	52
6.1.1 Legislatíva.....	53
6.1.2 Testy toxicity	55
6.1.2.1 Testy akútnej toxicity	56
6.1.2.2 Semichronické testy	56
6.1.2.3 Chronické testy	57
6.2 Kontrolné otázky	57
Literatúra.....	57
Cvičenie č. 7	59
7 Test na zelených riasach a na vyšších rastlinách	59
7.1 Test toxicity na vyšších rastlinách.....	59
7.1.1 Charakteristika organizmov	59
7.1.2 Krátkodobé testy klíčivosti na semenách <i>Sinapis alba</i>	60
7.1.2.1 Test inhibície rastu koreňa horčice bielej	60
7.1.2.2 Test klíčivosti semien <i>Sinapis alba</i>	62
7.2 Test toxicity na zelených riasach.....	62
7.2.1 Charakteristika organizmov	62
7.2.2 Diskový difúzny test	63
7.2.3 Test inhibície rastu rias vo výluhu.....	65
7.3 Praktické cvičenie.....	66
7.3.1 Testy toxicity na vyššej rastline.....	67
7.3.1.1 Rast koreňa horčice bielej	67
7.3.1.2 Klíčivosť semien horčice bielej	67
7.3.2 Test toxicity na nižších rastlinách.....	68
7.3.2.1 Test inhibície rastu sladkovodnej riasy	68
7.3.2.2 Diskový difúzny test	69
7.4 Kontrolné otázky	70
Literatúra.....	70
Cvičenie č. 8	71
8 Zisťovanie toxického účinku antibakteriálnych textílií a povlakov.....	71
8.1 Legislatíva	72
8.1.1 Charakteristika mikroorganizmov	74

8.2 Praktické cvičenie	75
8.2.1 Testy toxicity polymérnych vlákien a tenkých vrstiev.....	75
8.2.1.1 Postup experimentu	75
8.3 Kontrolné otázky	75
Literatúra	76
Protokol.....	77
9 Pokyny na prípravu protokolu z laboratórneho cvičenia	77
9.1 Kontrolné otázky	78
Literatúra	78

Úvod

Ak hovoríme o nanosvete, máme na mysli oblasť častíc a štruktúr, ktoré sa rozmerovo pohybujú približne v intervale medzi 1 až 100 nm. Nanočastice a nanoštruktúry považujeme za základné stavebné jednotky nanomateriálov. Skúmaním ich vlastností sa zaoberá nanoveda. Praktickým aplikáciám a využiteľnosti nových či neobvyklých vlastností hmoty s obsahom nanočastíc sa venuje nanotechnológia. Hranice nanotechnológie a nanovedy sa nedajú vymedziť úplne presne, je však možné povedať, že sa jedná o interdisciplinárne odbory.

V súčasnosti sú nanotechnológie a nanomateriály prítomné takmer vo všetkých odvetviach priemyslu, od kozmetiky cez textilný, elektro až po vesmírny priemysel. Predmety týkajúce sa nanotechnológií a nanomateriálov by dnes nemali chýbať v portfóliu predmetov vyučovaných na technicky zameraných školách.

Návody na cvičenia *Nanomateriály II* sú pokračovaním návodov na cvičenia *Nanomateriály I*. Táto publikácia rozširuje a dopĺňa predchádzajúce cvičenia o prípravu nanočastíc biologickou, tzv. zelenou metódou a zároveň vysvetľuje mechanizmy vplyvu nanočastíc na živé bunky. V rámci absolvovania predmetu sa študenti oboznámia, s legislatívou, ktorá je platná v oblasti stanovovania toxicity nanočastíc a naučia sa používať niektoré testy na stanovovanie toxických a antibakteriálnych vlastností nanomateriálov. Naučia sa rôzne postupy inkorporácie nanočastíc do polymérnej matrice (in situ a ex situ metódy). Prakticky pripraví polymérne nanokompozity, ktoré je možné použiť na prípravu netkaných textílií a ochranných povlakov. Oboznámia sa s možnosťami prípravy nanovláken metódou elektrostatického zvlákňovania. Precvičia si viacero techník prípravy tenkých polymérnych nanopovlakov a nanofilmov.

Návody na cvičenia *Nanomateriály II* sú určené pre študentov a doktorandov študujúcich v odbore strojárstvo, v študijných programoch materiály, materiálové inžinierstvo a náuka o materiáloch. Taktiež môžu byť inšpiratívne a prínosné aj pre študentov iných technických odborov a interdisciplinárnych smerov.

Autorka

Pod'akovanie

Autorka je vd'achná za spoluprácu a podporu, ktorú jej preukázala FMMR, TU v Košiciach. Tieto návody na cvičenia vznikli vd'aka finančnej podpore projektu Slovenskej grantovej agentúry VEGA 1/0020/22.

Zoznam použitých značiek a symbolov

ABS	absorbancia - bezrozmerná fyzikálna veličina vyjadrujúca množstvo elektromagnetického žiarenia pohlteneho látkou
ABS _{max}	maximálna hodnota absorbancie
AgNPs	ang. silver nanoparticles - nanočastice striebra
CVD	ang. Chemical Vapor Deposition, chemická depozícia z plynnej fázy
DNA	ang. deoxyribonucleic acid - deoxyribonukleová kyselina
EUCAST	ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
IČ	infračervené spektrum
<i>M</i>	označenie pre soľ kovu
<i>Me</i> ⁺	označenie pre ión kovu v roztoku
MPEG	metoxypolyetylén glykol
PANI	polyanilín
PCB	polychlórované bifenyly
PEG	polyetylén glykol
PES	polyétersulfón
PMC	ang. Polymer Matrix Composite - kompozitný materiál s polymérnou maticou
pH	ang. "potential of hydrogen", stupnica pH je logaritmická a nepriamo udáva koncentráciu vodíkových iónov v roztoku.
PP	polypropylén
PPG	polypropylén glykol
PVA	polyvinyl alkohol
PVD	ang. Physical Vapor Deposition, fyzikálna depozícia z plynnej fázy
PVP	polyvinylpyrolidón
ROS	ang. Reactive Oxygen Species
SPR	ang. Surface Plasmon Resonance - povrchová plazmónová rezonancia
SEM	ang. Scanning Electron Microscopy- skenovací elektrónový mikroskop
TEM	ang. Transmission Electron Microscopy- transmisný elektrónový mikroskop
UV-VIS	ang. UV–Visible spectrophotometry - UV-VIS spektrofotometria

Cvičenie č. 1

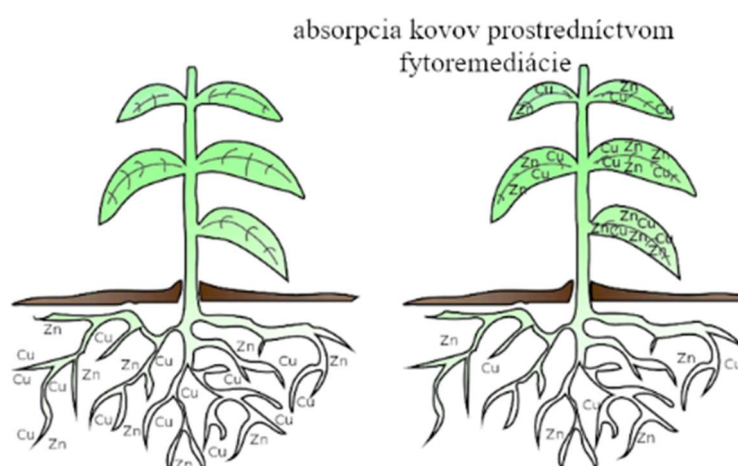
Cieľ cvičenia

Cieľom cvičenia je naučiť študentov pripravovať extrakty z prírodných materiálov (listov, kvetov, plodov rastlín, zelených rias a pod.), ktoré je možné využiť pri biologickej syntéze nanočastíc kovov. Študenti na cvičení získajú skúsenosti s prácou v chemickom aj biologickom laboratóriu. Naučia sa pripravovať živné pôdy potrebné na kultiváciu mikroorganizmov a zvoliť vhodný spôsob prípravy extraktu tak, aby bola dosiahnutá najvyššia výťažnosť pri syntéze nanočastíc.

1 Príprava prírodných extraktov na redukciu iónov kovov

Kovové nanočastice, vďaka svojim jedinečným vlastnostiam, nachádzajú uplatnenie v rôznych oblastiach priemyslu a aj preto patria medzi jeden zo základných stavebných blokov vedného odboru nanotechnológia. Syntéza kovových nanočastíc sa môže uskutočniť pomocou tradičných technológií, akými sú fyzikálne [1] a chemické metódy [2]. V poslednej dobe sa záujem vedcov sústreďuje na ekonomicky prijateľný a hlavne ekologický spôsob syntézy kovových nanočastíc, ktorým je biologická syntéza, často nazývaná aj zelená syntéza (green synthesis).

Fakt, že rastliny sú schopné redukovať ióny kovov, je známy pomerne dlho. V tomto smere boli rastliny historicky využívané pre tzv. fytotŕažbu resp. fytozemediáciu, Obr. 1, čo je extrakcia v pôde sa vyskytujúcich kovov, ktorá by za použitia tradičných metód ŕažby (sanácie) nebola ekonomicky výhodná. Medzi typické rastliny využívané na fytozemediáciu patria: horčica indická, lucerna siata, slnečnica ročná (arzén, urán), peniažtek alpínsky (kadmium a zinok), ambrózia palinolistá (olovo) a transgénne rastliny obsahujúce gény bakteriálnych enzýmov (polychlórované bifenyly (PCB), ortuť).



Obr. 1 Schematické znázornenie fytozemediácie [3]

Akumulované kovy sú potom z rastlín extrahované za pomoci spekania a tavenia. Štúdium tohto typu bioakumulácie kovov viedlo k prelomovému zisteniu: kovy sú rastlinami obvyčajne

ukladané práve vo forme nanočastíc. V prípade využitia tohto typu biosyntézy kovových nanočastíc je možné pozorovať aj určité nevýhody:

- rastliny nemajú dostatočne veľký koreňový systém na hĺbkové čistenie pôdy,
- fytoremediácia je limitovaná veľkosťou plochy znečisteného územia,
- pomalý rast rastlín,
- veľkosť a tvar nanočastíc sú závislé na lokalizácii ich syntézy v rámci rastliny, pretože ich tvorba silne závisí od konkrétnej koncentrácie kovových iónov aj zúčastnených biomolekúl,
- vysoká heterogenita morfológie produkovaných častíc sťažuje potenciálne aplikácie,
- izolácia a purifikácia takto vyrobených nanočastíc z rastlinného materiálu je zdĺhavý a náročný proces s nízkou výťažnosťou,
- prežitie rastlín je ovplyvnené toxicitou kontaminovanej pôdy,
- je tu reálna možnosť preniknutia kontaminovaných rastlín do potravinového reťazca.

Veľkým posunom v tomto smere bolo zistenie posledných rokov, že biosyntetizovať nanočastice kovov za pomoci rastlín možno aj *in vitro*¹. Čo znamená, že na cielenú syntézu nanočastíc je možné využívať iba určité časti rastlín, napríklad listy, kvety, korene, plody a pod. Toto zistenie viedlo viacerých vedcov k skúmaniu možnosti využitia rastlín nielen na akumuláciu ale aj na samotnú syntézu nanočastíc kovov v laboratórnych podmienkach. Ďalším výskumom bolo zistené, že nielen rastliny ale aj riasy, huby, kvasinky a baktérie sú schopné syntetizovať širokú škálu kovových nanočastíc, napr. Au, Ag, Pt, Fe, Cu [4-6].

1.1 Rastlinné extrakty

Riešením odstránenia nevýhod syntézy nanočastíc v bunkách rastlín je použitie extraktov, výťažkov z rastlín, prípadne iného biologického materiálu. Metódy využívajúce rastlinné extrakty sa v súčasnosti tešia veľkému záujmu vedeckej obce. Tento prístup totiž dovoľuje väčšiu kontrolu nad veľkosťou a tvarom produkovaných nanočastíc prostredníctvom zmeny reakčných podmienok (pH, teplota, koncentrácia roztokov a pod.) Syntéza nanočastíc za pomoci rastlinných extraktov tiež umožňuje ľahšiu konečnú purifikáciu. Táto metóda produkcie nanočastíc kovov je v porovnaní so syntézou priamo v bunkách rastlín značne rýchlejšia, pretože redukčné reakcie začínajú v homogenizovanom kvapalnom prostredí prakticky okamžite po zmiešaní reakčných činidiel.

Existuje viacero spôsobov, ktorými je možné pripraviť rastlinný výťažok alebo extrakt. Je možné pripraviť supernatant, výluh, destilát, macerát či tinktúru požadovanej časti rastliny alebo aj mikroorganizmov. Takisto je možné voliť rozličné nosné médiá, napr. olej, voda, alkohol alebo rôzne prchavé látky. Zloženie extraktov je možné ovplyvniť aj podmienkami a spôsobom prípravy, teda zmenou:

- teploty,
- tlaku,
- času lúhovania,

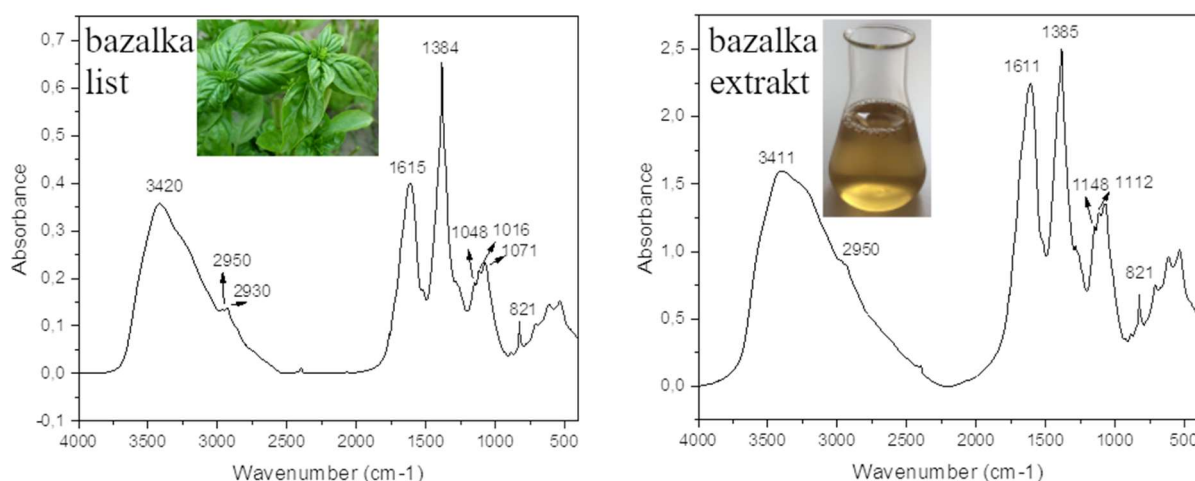
¹ *in vitro* alebo v skúmavke označuje v biológii procesy alebo pozorovanie systému mimo prostredia, v ktorom sa prirodzene nachádza, najmä v roztokoch a na živých pôdach

- koncentrácie,
- odstred'ovania a podobne.

Príprava vodného výluhu či extraktu z rastlín resp. ich častí je pomerne jednoduchý proces. Vo viacerých vedeckých prácach je možné sa stretnúť s postupom spracovania biomasy, ktorý zahŕňa:

- zber,
- premytie biomasy²,
- rozdrvenie a následné lúhovanie pri zvýšenej teplote alebo pri teplote okolia.

Výsledky výskumov ukazujú, že extrakty obsahujú takmer všetky látky, ktoré boli obsiahnuté v pôvodnom biologickom materiáli. Zloženie pôvodnej vzorky a extraktu je možné stanoviť napr. pomocou merania IČ³ spektra [7]. Na Obr. 2 je uvedené porovnanie IČ spektrier listu bazalky a extraktu pripraveného z listov bazalky. Jednotlivé pásy, v oboch spektrách, zodpovedajú príslušným funkčným skupinám a je zrejmé, že po príprave extraktu nedochádza k výrazným zmenám v zložení. Vhodnou voľbou podmienok prípravy extraktu je možné pripraviť aj koncentrovaný extrakt z rastliny. Použitím destilácie je navyše možné separovať niektoré látky prítomné v rastline, a tým upravovať nielen koncentráciu ale aj zloženie výluhu.



Obr. 2 IČ spektrá listu bazalky a extraktu pripraveného z listov bazalky

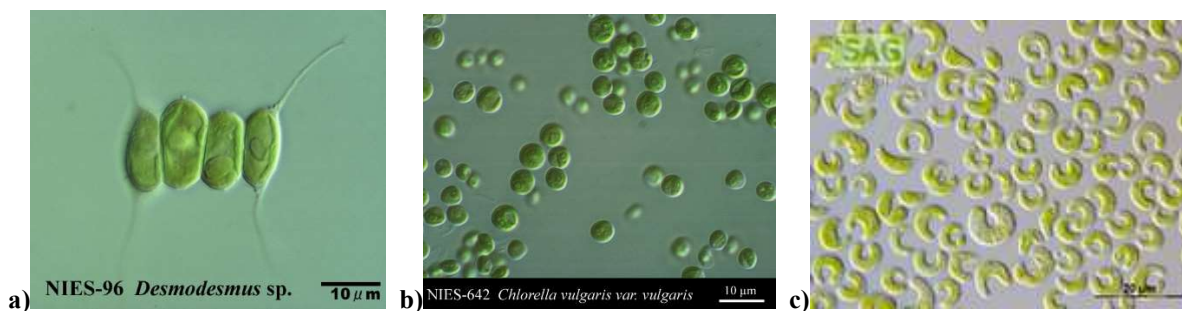
Na prípravu extraktu je možné použiť ktorúkoľvek časť rastliny: koreň, listy, kvety, semená, plody, stonky. Pripravené rastlinné extrakty sa používajú väčšinou čerstvé, ale je ich možné aj krátkodobo skladovať v chladničke. Výhodou použitia extraktov, namiesto napr. listov, je okrem možnosti ľahšieho skladovania a ľahšej spätnej extrakcie nanočastíc aj možnosť ovplyvnenia koncentrácie extraktov, a tým zvýšenia ich účinnosti.

² biomasa je biologický materiál pochádzajúci zo živých alebo nedávno žijúcich organizmov

³ podstatou infračervenej (IČ) spektroskopie je interakcia infračerveného žiarenia s materiálom. Jej hlavným cieľom je určenie chemických funkčných skupín organickej, alebo anorganickej vzorky. Rozličné funkčné skupiny absorbujú IČ žiarenie s charakteristickou frekvenciou pre danú väzbu. Pre identifikáciu a určovanie chemickej štruktúry má najväčší význam stredná infračervená oblasť od 4000 do 400 cm⁻¹

1.1.1 Kultivácia biomasy

Okrem vyšších rastlín je možné pripravovať extrakty aj zo širokého spektra mikroorganizmov a nižších rastlín. Medzi nižšie rastliny zaraďujeme napríklad riasy, Obr. 3 . Medzi najčastejšie používané patria napr.: *Desmodesmus sp.*, *Chlorella kessleri*, *Raphidocelis subcapitata*. Výhodou použitia rias je možnosť ich kultivácie vo veľkých množstvách na živných pôdach (médiách) v laboratórnych podmienkach, bez obmedzení sezónnosťou rastlín. Laboratórne podmienky sú zárukou získania vysokočistého kultivátu (bez znečistenia vonkajším prostredím, ako tomu môže byť pri zbere rastlín vo voľnej prírode).



Obr. 3 Zelené riasy: a) *Desmodesmus sp.*; b) *Chlorella kessleri*; c) *Raphidocelis subcapitata* [8]

Kultivácia je proces, pri ktorom dosiahneme rast mikroorganizmov v laboratórnom prostredí, so zabezpečením potrebných živín a podmienok rastu špecifických pre daný druh mikroorganizmov. Dôležitou nevyhnutnosťou získania čistej kultúry, je dodržiavanie striktných aseptických kultivačných podmienok. Očkovanie média, teda prenesenie časti mikroorganizmov alebo rias na sterilnú živnú pôdu za účelom kultivácie sa označuje aj pojmom inokulácia.

1.1.1.1 Spôsoby kultivácie

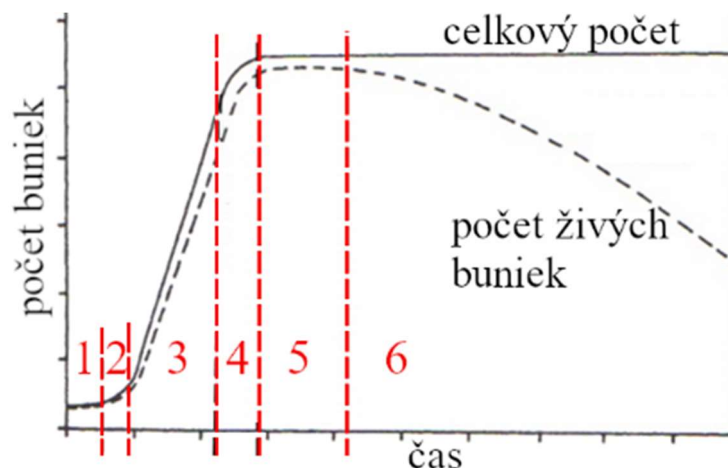
Spôsob kultivácie mikroorganizmov sa volí podľa účelu, pre ktorý sú mikroorganizmy kultivované. Poznáme niekoľko typov kultivácie [9]:

1. Jednorazová kultivácia - je najjednoduchšia a najčastejšie používaná kultivácia, kde sa po zaočkovaní nepridávajú žiadne živiny do média. Mikroorganizmy sa rozmnožujú v určitom ohraničenom objeme kultivačnej pôdy s presne definovaným zložením. Ich rast je obmedzený vyčerpaním živín a nahromadením produktov metabolizmu. Rastová krivka (vysvetlená nižšie) znázorňuje rast mikroorganizmov a pozostáva zo šiestich fáz, Obr. 4. Poznáme dva spôsoby jednorazovej kultivácie:
 - a) statická jednorazová kultivácia - živné médiá sú po zaočkovaní inokulom ponechané v pokoji. Vyčerpanie živín a nahromadenie odpadových produktov metabolizmu sú limitujúce faktory rastu mikroorganizmov,
 - b) submerzná – je dokonalejšia metóda uzatvoreného systému, ktorá pri stálej teplote využíva neustále prevdušňovanie alebo premiešavanie, čo zabezpečuje dokonalejšie využitie živín, intenzívnejšie rozmnožovanie a rovnomerný rast mikroorganizmov v celom objeme. Vyčerpanie živín a nahromadenie splodín metabolizmu spôsobí zastavenie rastu mikroorganizmov.

2. Kontinuálna (prietoková) kultivácia - do kultivačného prostredia sa neustále privádza čerstvé živné médium a súčasne sa v rovnakom objeme odvádzajú produkty metabolizmu mikroorganizmov. Systém tak zabezpečuje, aby boli bunky trvalo metabolicky aktívne.

1.1.1.2 Rastová krivka

Rastová krivka je závislosťou množstva mikroorganizmov (buniek) v živnom médiu od času, Obr. 4. Na základe rastovej krivky je možné stanoviť optimálnu dobu rastu.



Obr. 4 Rastová krivka

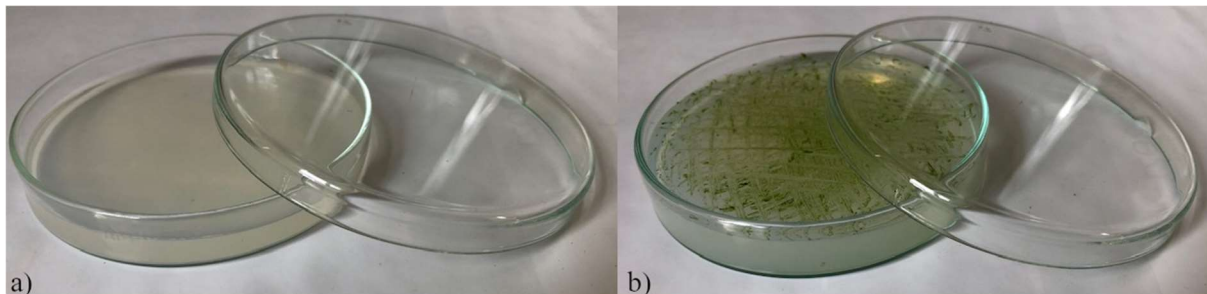
Štádiá rastu mikroorganizmov môžeme v statickom prostredí kultivácie rozdeliť do viacerých fáz:

- 1. lag fáza - adaptácia – obdobie po naočkovaní, takmer žiaden prírastok nových buniek, staršie a menej životaschopné bunky odumierajú, zdravé bunky sa prispôbujú novým podmienkam,
- 2. fáza zrýchleného rastu – zvyšuje sa rast, delenie a intenzita metabolizmu buniek,
- 3. fáza logaritmická (exponenciálna) – fáza intenzívneho rastu, delenia a rozmnožovania sa buniek, ale aj zvýšená metabolická aktivita buniek a tvorba produktov metabolizmu, počet odumretých buniek je v pomere ku prírastku nových buniek minimálny,
- 4. fáza spomaleného rastu – vplyvom postupného vyčerpania živín v médiu a hromadením toxických splodín metabolizmu sa znižuje intenzita rastu, delenia buniek, a narastá počet odumierajúcich buniek,
- 5. stacionárna fáza – vyčerpaním živín a pokračujúcou tvorbou nepriaznivých podmienok v médiu sa koncentrácia novej biomasy vyrovnáva s koncentráciou odumretých buniek,
- 6. fáza odumierania (poklesu) – v dôsledku vyčerpania živín a vysokého obsahu toxických látok v živnej pôde, bunky odumierajú a prírastok nových buniek je zanedbateľný.

1.1.1.3 Kultivačné médiá

Mikroorganizmy je možné kultivovať v rôznych pôdach (kultivačných médiách, živných prostrediach), ktoré podľa konzistencie delíme na: tekuté pôdy, tuhé a polotuhé pôdy.

Tuhé pôdy, Obr. 5a) sa bežne používajú v laboratórnych podmienkach a zabezpečujú rast mikroorganizmov v izolovaných kolóniách. Základom tuhých médií je agar⁴. Pripravujú sa 2-5% koncentrácie agaru a ako zdroj živín sa k agaru pridávajú ďalšie látky. Zloženie pridávaných látok závisí od kultivovanej kultúry a má zabezpečiť prirodzené prostredie, z ktorého boli mikroorganizmy odobraté.



Obr. 5 a) Petriho miska s agarom; b) Petriho miska s naočkovanou riasou (7 dňová kultúra)

Použitie takýchto tuhých agarových médií zabezpečuje statickú povrchovú kultiváciu, kde dĺžka kultivačného procesu je závislá od typu mikroorganizmu. Môže trvať niekoľko hodín až dní, Obr. 5b). Zvyčajne sa očkuje viac agarových platní naraz, aby sa získalo, čo najväčšie množstvo biomasy. Čas zberu je individuálny pre každú kultúru a je závislý od rastovej krivky. Je zrejmé, že po stacionárnej fáze dochádza k značným rozdielom medzi celkovým počtom buniek a počtom živých buniek. Najvhodnejším obdobím pre zber je prechod medzi fázou spomalenia a stacionárnou fázou.

Ďalšími, často používanými médiami sú kvapalné (tekuté) živné médiá (peptónová voda, bujóny). Tekuté médiá vytvárajú najvhodnejšie podmienky pre rozmnožovanie mikroorganizmov. Nevýhodou je, že sa jednotlivé druhy mikroorganizmov nedajú izolovať. Na úspešnosť kultivácie v týchto médiách môžu vplyvať rôzne faktory, ako napríklad: teplota, pH, prísun kyslíka, dusíka, minerálov, vody, svetelné podmienky a podobne [10].

Polotuhé médiá sú spevnené agarom, alebo želatínou, sú to agarové, alebo želatínové gély. Používajú sa pri zisťovaní pohyblivosti a čistoty kultúry, tvorby kolónií a pod.

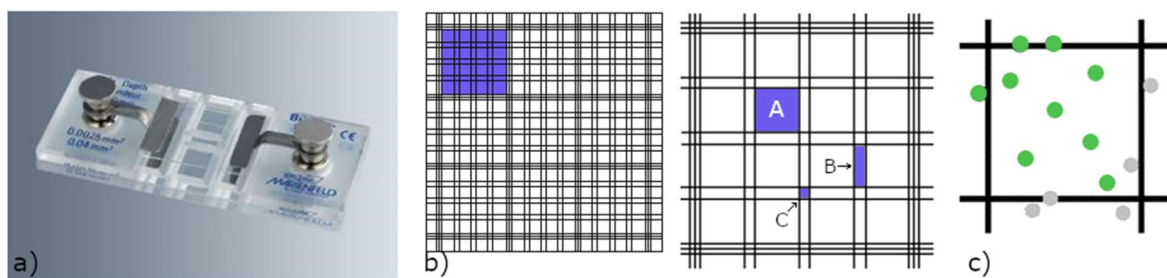
Pri experimentoch, kde sú bunky kultivované za účelom syntézy nanočastíc, teda pôsobia ako redukčné činidlo, je potrebné kvôli porovnateľnosti výsledkov a opakovateľnosti experimentov zabezpečiť približne rovnaký počet buniek v médiu. V opačnom prípade by výsledky experimentov neboli porovnateľné (ak samozrejme sa nesleduje vplyv množstva biomasy na syntézu nanočastíc).

⁴ agar je prírodný polysacharid s vysokou gelujúcou schopnosťou, ktorý sa vyrába z červených morských rias. Používa sa ako živné médium na kultiváciu mikroorganizmov a rastlín. Rozpúšťa sa pri 96°C a tuhne pri 40°C. V potravinárstve sa agar používa na ochucovanie, ako stabilizátor aj zahusťovací prostriedok a v mnohých výrobkoch ázijských kuchýň od cukrárskych a pekárenských výrobkov až po mrazené dezerty, rôzne želé, pudinky a pod. V botanike sa využíva pri laboratórnom množení orchideí. Rovnako sa využíva pri výrobe papiera.

1.1.2 Možnosti stanovenia počtu buniek

Veľakrát sa pri experimentoch, ale aj v praxi stretávame s potrebou stanovenia koncentrácie buniek, ktorá udáva počet buniek na určitú objemovú jednotku. Na stanovenie koncentrácie buniek v suspenzii je možné použiť dva základné prístupy. Jeden využíva automatizované počítanie pomocou špeciálnych prístrojov určených pre tento účel. Napríklad, v našom laboratóriu, je možné použiť počítačku buniek EVE™, ktorá okrem koncentrácie buniek stanovuje aj ich viabilitu. Druhý prístup využíva špeciálne počítacie komôrky, ako napr. Bürkerova počítacia komôrka, Obr. 6a) v spojení so svetelným mikroskopom.

Kým prvý prístup je rýchly a vyžaduje iba prípravu správne nariadenej suspenzie buniek a jej zafarbenie trypanovou modrou, druhý je časovo náročnejší a prácnejší.



Obr. 6 a) Bürkerova počítacia komôrka; b) počítacia sieť a c) schéma počítania buniek vo štvorci

Bürkerova počítacia komôrka je tvorená silným podložným sklom s dvoma vyrytými počítacími sieťami s presne danou plochou a hĺbkou ($0,1 \text{ mm}^2$). Počítacia sieť Bürkerovej komôrky je tvorená 9 veľkými štvorcami (každý s plochou $1 \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$, objem $0,1 \text{ mm}^3$), ktoré sú ďalej rozdelené do 16 menších štvorcov (plocha jedného je $0,2 \times 0,2 \text{ mm} = 0,04 \text{ mm}^2$, objem $0,004 \text{ mm}^3$), 24 obdĺžnikov s plochou $0,05 \times 0,2 \text{ mm} = 0,01 \text{ mm}^2$, objemom $0,001 \text{ mm}^3$ a 8 malých štvorčekov, každý s plochou $0,05 \times 0,05 \text{ mm} = 0,0025 \text{ mm}^2$ a objemom $0,00025 \text{ mm}^3$, Obr. 6b).

Pri počítaní buniek pomocou počítacej komôrky je najskôr nanosený malý objem testovanej suspenzie medzi krycie a podložné sklíčko. Pomocou svoriek sa krycie sklíčko pritlačí tak, aby v priestore medzi ním a podložným sklom bola po hrúbke práve jedna bunka (aby nedošlo k vrstveniu buniek). Takto pripravená počítacia komôrka sa vloží do zorného poľa svetelného mikroskopu a po zaostrení sa môže pristúpiť k samotnému počítaniu častíc. Pri počítaní mikroskopických častíc pomocou počítacích komôrok sa započítavajú iba tie, ktoré sa nachádzajú vo vnútri štvorca a častice, ktoré sa z vnútornej alebo vonkajšej strany dotýkajú dvoch zvolených strán (napr. horná a ľavá), Obr. 6c). Tým sa zabráni dvojitému počítaniu častíc. Počíta sa buď vo veľkom alebo v malom štvorci, alebo v obdĺžniku. Na stanovenie koncentrácie častíc v $1 \mu\text{l}$ (1 mm^3) suspenzie sa používa vzorec:

$$X = \frac{a \cdot z}{n \cdot s \cdot h} \quad (1)$$

kde X je koncentrácia buniek v suspenziách,

a je stanovený počet buniek,

z je použité riedenie suspenzie (uvádza sa iba v prípade riedenia, napr. ak bola suspenzia riedená 3x potom $z = 3$),

n je počet opakovaní (počet spočítaných štvorcov),
 s je konštanta, plocha použitého štvorca alebo obdĺžnika,
 h je konštanta, hĺbka komôrky.

Aby meranie bolo štatisticky správne, počet počítaných veľkých štvorcov nesmie byť menší ako 50, obdĺžnikov 20 (jeden obdĺžnik obsahuje 4 malé štvorce) a malých štvorcov 80. Ak sa vo štvorci nachádza viac ako 20-30 buniek, je potrebné roztok zriediť a počítanie buniek zopakovať.

1.2 Praktické cvičenie

1.2.1 Úlohy a experiment

Hlavnou úlohou cvičenia je príprava extraktov z biomasy. Ako experimentálny materiál použijeme rastlinný materiál a zelené sladkovodné jednobunkové riasy. Rastlinný materiál nazbierame v parku alebo záhrade tam, kde je predpokladaná minimálna kontaminácia inými látkami. Použijeme napr. ihličie, listy resp. kvety rastlín. V prípade použitia rias je najprv nutná ich kultivácia. Pred kultiváciou je potrebné pripraviť agarové živné pôdy.

Druhou úlohou je stanovenie počtu rias v danom objeme pomocou počítačky buniek a Bürkerovej komôrky.

Návod na prípravu stuženého živného média (agar)

1. Vysterilizujte všetko laboratórne sklo, ktoré budete používať pri kultivácii (2 hod pri 200°C).
2. Podľa zvoleného počtu Petriho misiek a podľa údajov v Tab. 1 si pripravte potrebné množstvá roztokov: A, B, C a Fe-edta a navážte agarový prášok.

Tab. 1 Živná pôda – Bristol medium [11]

počet Petriho misiek	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
⊖ A [ml]	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
⊖ B [ml]	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
⊖ C [ml]	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
⊖ Fe-edta [ml]	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
agar [g]	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Celkový objem [ml]	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000

3. Do odmernej banky nalejte malé množstvo destilovanej vody a pridajte požadované množstvá jednotlivých roztokov.
4. Odmernú banku doplňte do požadovaného objemu (po rysku) destilovanou vodou.
5. Pripravený roztok prelejte do kadičky a pridajte k nemu navážený agar.
6. Roztok aj s agarom priveďte na varnej platni k varu za stáleho miešania a za mierneho varu varte 15-25 min, kým roztok nez hustne.
7. Vysterilizujte miestnosť, v ktorej sa budú riasy očkovať.
8. V sterilnom boxe rozložte Petriho misy (s priemerom 10 cm). Ešte horúci agar nalejte do Petriho misiek (50 ml do každej). Pri nalievaní dodržujte aseptické podmienky.
9. Agar nechajte v sterilnom boxe stuhnúť (20-25 min).

Postup pre kultiváciu rias a prípravu extraktu z rias

1. Na stuhnuté agarové platne (stále v sterilnom boxe), pomocou biologického očka, naočkujte zelenú riasu *Chlorella kessleri* (*Ch. kessleri*), prípadne inú riasu. Petriho misky prikryte, označte a preneste pod svetelnú rampu.
2. Riasu kultivujte 3 týždne pri teplote okolia a pri svetelných podmienkach 12 hod svetlo a 12 hod tma.
3. Po troch týždňoch riasu jemne zoškrabte a zmyte pomocou špachtličky a destilovanej vody z agarových platní do kadičky.
4. K riasu doplňte destilovanú vodu do objemu 120 ml.
5. Stanovte koncentráciu buniek na 1 ml roztoku. Použite počítaciu buniek EVE™ a Bürkerovú komôrku, výsledky porovnajte.
6. 120 ml rias vo vodnom kúpeli zohrejte na teplotu 75-80°C s výdržou na tejto teplote 10 min.
7. Pripravený extrakt prefiltrujte pomocou papierového filtra, aby ste v maximálnej miere odstránili z extraktu tuhú fázu. Následne odstredte extrakt v centrifúge. Podmienky odstredovania: 9000 ot/min, 20 min.
8. Po odstredení pomocou pipety odoberte číry roztok bez toho, aby sa zvrhla usadenina.
9. Pripravený extrakt nalejte do Erlenmeyerovej banky a označte (dátum prípravy, názov kultúry a meno študenta, ktorý extrakt pripravoval).
10. Odmerajte pH extraktu.
11. Extrakt uskladňujte v chladničke.

Príprava extraktov z rastlín

1. Nazbierajte po 10 g z každého biologického materiálu (listy, kvety, ihličie).
2. Biologický materiál trikrát premyte destilovanou vodou, aby sa odstránili všetky nečistoty.
3. Rozdrvte očistené listy prípadne iný materiál v mažiari.
4. Rozdrvenú masu premiestnite do kadičky a doplňte destilovanou vodou do objemu 120 ml.
5. Rozdrvený materiál vo vodnom kúpeli zohrejte na teplotu 75-80°C s výdržou na tejto teplote 10 min.
6. Pripravený extrakt prefiltrujte pomocou papierového filtra, aby ste v maximálnej miere odstránili z extraktu tuhú fázu. Filtrát následne odstredte v centrifúge. Podmienky odstredovania: 9000 ot/min, 20 min.
7. Po odstredení pomocou pipety odoberte číry roztok bez toho, aby sa zvrhla usadenina.
8. Pripravený extrakt nalejte do Erlenmeyerovej banky a označte. Odmerajte pH extraktu.
9. Extrakt uskladňujte v chladničke.

Pripravené extrakty budú použité pri zelenej syntéze nanočastíc vzácnych kovov (Ag, Au, Pt). Extrakty je možné uchovávať v chladničke maximálne tri týždne.

Počítanie buniek pomocou Bürkerovej komôrky a počítačky buniek

1. Dobré zhomogenizujte bunkovú suspenziu.
2. Napipetujte bunkovú suspenziu na hranu krycieho skla Bürkerovej komôrky tak, aby suspenzia rovnomerne pokrývala celú počítaciu plochu komôrky.
3. Bürkerovu komôrku vložte do zorného poľa mikroskopu a pri malom zväčšení (4x) najprv nájdite počítaciu sieť. Pri väčšom zväčšení (napr. 100x) potom spočítajte bunky v 50 štvorcoch (štvorec A, Obr. 6b)).
4. Vypočítajte priemerný počet buniek v 50 štvorcoch.
5. Stanovte koncentráciu buniek v 1 mm^3 ($1\text{ }\mu\text{l}$) suspenzie.
6. Koncentráciu buniek stanovte aj pomocou počítačky buniek EVE™ a porovnajte získané výsledky.

Použité pomôcky a experimentálne zariadenia

Petriho misky, tretia miska, mikropipety, špičky, kadičky, Erlenmeyerove banky, horák, sterilný box, mikrobiologické očko (inokulačná kľučka), sklenená tyčinka, filtračný papier, lievik, analytické váhy, centrifúga, pH meter, počítačka buniek EVE™, Bürkerová komôrka, chemikálie a experimentálny materiál.

1.3 Kontrolné otázky

1. Definujte pojem fytooremediácia.
2. Akými spôsobmi a podmienkami je možné ovplyvniť zloženie extraktov?
3. Popíšte postup prípravy extraktu.
4. Vymenujte štádiá adaptácie a rastu mikroorganizmov v jednotlivých fázach.
5. Načo slúži Bürkerova komôrka? Nakreslite ju a popíšte princíp počítania pomocou Bürkerovej komôrky.

Literatúra

- [1] Amendola, V., Meneghetti, M. (2009). Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(20), 3805. doi:10.1039/b900654k
- [2] Watanabe, A., Kajita, M., Kim, J., Kanayama, A., Takahashi, K., Mashino, T., Miyamoto, Y. (2009). In vitro free radical scavenging activity of platinum nanoparticles. *Nanotechnology*, 20(45), 455105. doi:10.1088/0957-4484/20/45/455105
- [3] Phytoremediation by Phytoextraction - Phytoremediation, on-line, dostupné a [www: https://en.wikipedia.org/wiki/Phytoremediation#/media/File:Phytoremediation_by_Phytoextraction.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Phytoremediation#/media/File:Phytoremediation_by_Phytoextraction.svg) [22.12.2022]
- [4] Marchiol, L., Mattiello, A., Pošćić, F., Giordano, C., Musetti, R. (2014). In vivo synthesis of nanomaterials in plants: location of silver nanoparticles and plant metabolism. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 101. doi:10.1186/1556-276x-9-101
- [5] Armendariz, V., Herrera, I., Peralta-Videa, J.R., Jose-Yacaman, M., Troiani, H., Santiago, P., Gardea-Torresdey, J.L. (2004). Size controlled gold nanoparticle formation by Avena sativa biomass: use of plants in nanobiotechnology. *Journal of Nanoparticle Research*, 6(4), 377–382. doi:10.1007/s11051-004-0741-4

- [6] Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638. doi:10.1039/c1gc15386b
- [7] Settle, F.: *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. USA: Prentice Hall PTR, 1997. 995 s. ISBN 0131773380
- [8] *Raphidocelis subcapitata*, on-line, dostupné na www: https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=61.81 [01.03.2022]
- [9] Kožurková, M. *Cvičenia z biochémie mikroorganizmov Vysokoškolské učebné texty*, 2011, 102 s. ISBN 978-80-7097-896-2
- [10] Skripta ke cvičení z Obecné mikrobiologie, Cytologie a morfologie bakterií, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, on-line, dostupné na www: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/steril_prace_ockovani_uchovavani.html [01.03.2022]
- [11] Bristol media for Algae, on-line, dostupné na www: <https://biokimicroki.com/bristol-media-for-algae/> [01.03.2022]

Cvičenie č. 2

Cieľ cvičenia

Cieľom cvičenia je príprava nanočastíc striebra biologickou metódou. Študenti si precvičia prípravu a riedenie roztokov v požadovanom množstve a s požadovanou koncentráciou. Naučia sa syntetizovať nanočastice striebra pomocou pripravených extraktov a overiť prítomnosť nanočastíc v roztoku pomocou Tyndallovho javu a UV-VIS spektrofotometrie. Študenti si zároveň precvičia zručnosti pri príprave vzoriek koloidných roztokov nanočastíc na pozorovanie pomocou transmisného a skenovacieho elektrónového mikroskopu.

2 Biologická syntéza nanočastíc Ag

2.1 Teoretický úvod

Kovy sú, už dlhú dobu, neodmysliteľnou súčasťou nášho života a ich objavenie zásadne zmenilo vývoj ľudstva. So stále stúpajúcimi nárokmi spoločnosti na vývoj nových materiálov so špecifickými vlastnosťami (polovodiče, nanomateriály, vysokopevné a korozivzdorné materiály, antibakteriálne povlaky, supravodiče, ultraľahké, katalytické materiály a pod.) narastá aj tlak na ekologickosť výrobných procesov. Nanomateriály, hlavne kvôli ich vynikajúcim vlastnostiam, vyplývajúcim z ich malej veľkosti, patria medzi najatraktívnejšie materiály. V súčasnosti je trendom pripravovať nanočastice kovov takzvanou zelenou syntézou (green synthesis). V zásade existujú dva prístupy:

1. mechanochemická syntéza – táto metóda je alternatívou voči tradičnej chémii, kde namiesto rozpúšťadiel a externého zvyšovania teploty sa využívajú prostriedky vysokoenergetického mletia, ktoré dodávajú reagujúcim látkam mechanickú energiu,
2. roztoková chémia – je to redukcia iónov kovov pomocou biologických redukčných činidiel – pri tejto metóde sa prekursor⁵ kovu rozpustí vo vode alebo inom rozpúšťadle a zmieša sa s vhodným biologickým reaktantom, ktorý slúži ako redukčné aj stabilizačné činidlo.

2.1.1 Mechanochemická syntéza

Mechanochémia je druh chemickej syntézy, ktorá je pri určitých rastlinách prijateľnejšou alternatívou ku klasickej roztokovej chémii. Jej princíp spočíva v mletí práškových reaktantov v špeciálnych vysoko energetických mlynch, bez využitia rozpúšťadiel alebo zvyšovania teploty a tlaku.

Niektoré rastliny, napr. lišajníky, obsahujú redukčné činidlá nerozpustné vo vode, teda produkujú sekundárne metabolity vhodné na redukciu iónov kovov. Mechanochemická metóda umožňuje tieto metabolity využiť pri syntéze nanočastíc. Postup syntézy je pomerne jednoduchý. Napríklad, pri výrobe nanočastíc striebra sa dusičnan strieborný spolu s lišajníkom

⁵ slovo prekursor označuje v chémii východiskovú zlúčeninu, ktorá sa zúčastňuje chemickej reakcie, pričom z nej vzniká iná zlúčenina alebo látka, teda výsledný produkt (napr. nanočastice).

melú v planetárnom mlyne bez potreby pridávania ďalších chemikálií. Veľmi dôležitú úlohu v tomto procese zohrávajú podmienky mletia, ako je rýchlosť mletia, pomer biologického materiálu a prekursora kovu a hlavne čas mletia. Samozrejme, dôležitá je aj konštrukcia mlynu a použité mlecie guľičky (veľkosť, materiál guľičiek a ich množstvo). Pri zvolení vhodných podmienok dôjde k redukcii nanočastíc striebra vďaka reaktantom aktivovaným procesom mletia.

2.1.2 Roztoková chémia

Pri syntéze nanočastíc kovov v roztoku sa ako prekursory používajú soli kovov, oxidy, chloridy, halogenidy, ale aj iné zlúčeniny kovov. Pri príprave strieborných nanočastíc sa najčastejšie ako prekursor striebra používa dusičnan strieborný (AgNO_3 - soľ kyseliny dusičnej) [1, 2], ale rovnako úspešne je možné použiť aj chloridy, napr. AgCl [3]. Pri výrobe nanočastíc zlata sa môže použiť kyselina chlorozlatitá (HAuCl_4) alebo rôzne halogenidy, ako sú: AuCl alebo AuBr [4].

Výskumy potvrdili, že pri syntéze kovových nanočastíc je možné, ako redukčné činidlá úspešne využívať rôzne biologické materiály (mikro aj makro organizmy) [5, 6]. Biologické systémy môžu produkovať nanočastice ako extracelulárne (mimo buniek), tak intracelulárne (vo vnútri buniek), pričom je možné využiť takmer všetky typy biologického materiálu:

- intracelulárne:
 - baktérie, plesne, celé rastliny, riasy, ...,
- extracelulárne:
 - extrakty z celých rastlín, rias alebo ich častí,
 - extrakty plodov alebo šupiek z ovocia,
 - biologické produkty ako napr. med a pod.

Biologické metódy majú, rovnako ako aj ostatné metódy výroby kovových nanočastíc určité výhody a nevýhody:

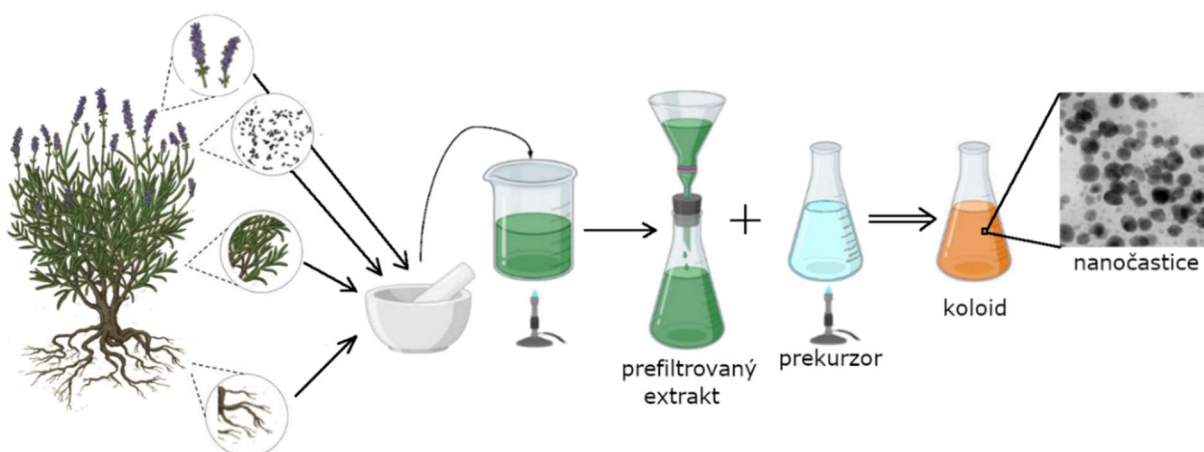
- výhody:
 - nie je potrebné využívať veľké množstvo energie, čo výrobu podstatne zlacňuje,
 - možnosť prípravy extraktov - je lacnejšie pripraviť extrakt a uskladniť ho, než pre každý experiment kultivovať mikroorganizmy,
 - nie sú tu využívané toxické reagenty, ktoré sa ťažko degradujú,
 - je to ľahko prevediteľná metóda,
 - na výrobu nanočastíc môže byť v tomto kontexte využitý aj suchý poľnohospodársky odpad, ktorý je ľahko dostupný, lacný a dobre skladovateľný,
 - výroba je ekologická,
- nevýhody:
 - syntéza nanočastíc pomocou mikrobiálnych buniek so sebou prináša potenciálne riziko patogenity pripravených nanočastíc,
 - kultivácia baktérii prináša potenciálne riziko,

- pri intracelulárnej syntéze pomocou mikroorganizmov vzniká nutnosť následnej extrakcie nanočastíc z mikrobiálnych buniek, čo zvyšuje náročnosť celého procesu výroby,
- kultivácia baktérii je drahšia ako pestovanie rastlín.

V posledných rokoch sa vývoj zelených syntéz v oblasti výroby kovových nanočastíc stal hlavným zameraním výskumníkov. Hlavným dôvodom bolo to, že zelená syntéza je metóda šetrná k životnému prostrediu, predstavujúca iný spôsob myslenia v chémii s cieľom eliminovať toxický odpad, znížiť spotrebu energie a využívať ekologické rozpúšťadlá (voda, etanol, etylacetát atď.). Spomedzi všetkých biomás sa rastliny, resp. ich časti, medzi ktoré patria listy, kvety, plody alebo aj šupky plodov [7], javia najlepšimi kandidátmi na rozsiahlu biosyntézu nanočastíc [8-11].

2.2 Syntéza nanočastíc

Výsledkom biologickej syntézy kovových nanočastíc je koloidný roztok nanočastíc. Na Obr. 7 je znázornená jednoduchá schéma prípravy nanočastíc striebra. Prvým krokom je voľba rastliny, resp. jej časti a príprava extraktu zo zvolenej biomasy.



Obr. 7 Schéma zelenej syntézy strieborných nanočastíc

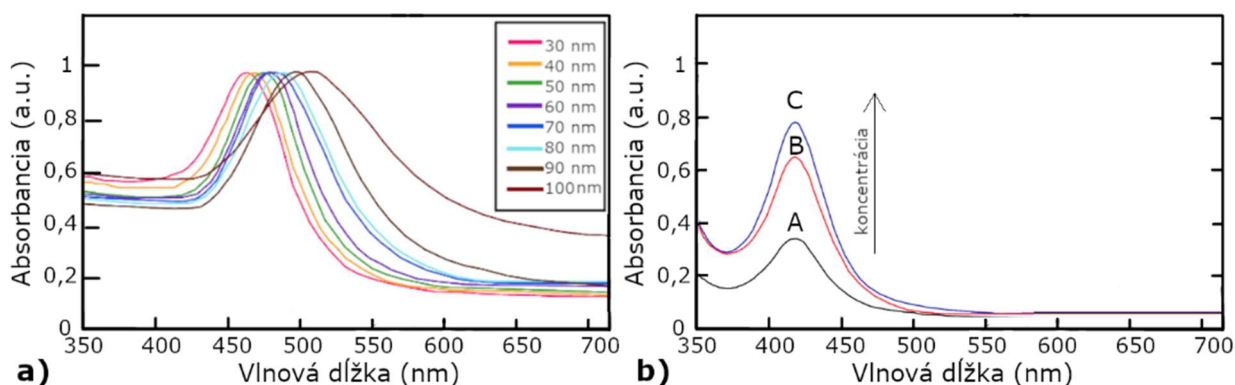
Druhým krokom je príprava prekuzora (iónového roztoku kovu). Voľba vhodnej koncentrácie iónového roztoku je kľúčová pre efektívnu tvorbu nanočastíc. Tretím krokom je zmiešanie extraktu a prekuzora, kde je dôležitý vzájomný pomer látok a podmienky syntézy (teplota, spôsob a intenzita miešania, svetelné podmienky a pod.).



Obr. 8 Tyndallov efekt pri prechode svetla koloidným roztokom nanočastíc striebra

Tvorba nanočastíc a rýchlosť syntézy v značnej miere závisí od zladenia týchto troch krokov. Prítomnosť nanočastíc v roztoku môžeme potvrdiť pomocou Tyndallovho javu, Obr. 8, a pomocou UV-VIS spektrofotometra. Princípom Tyndallovho javu je odraz a ohyb svetla spôsobený prítomnosťou pevných častíc. Intenzita Tyndallovho javu závisí od frekvencie svetla a od hustoty častíc.

Na základe UV-VIS záznamu, teda nameranej absorpčnej krivky (jej tvaru, symetrie, počtu pásov a ich umiestnenia, intenzity absorpčného maxima ABS_{max} a jeho vlnovej dĺžky) je možné približne stanoviť typ syntetizovaných nanočastíc, ich tvar aj veľkosť. Pomerovo je možné vyjadriť aj koncentráciu nanočastíc v meraných roztokoch. Vplyv veľkosti nanočastíc na zmenu maximálnej hodnoty vlnovej dĺžky ABS_{max} je na Obr. 9a). So zvyšujúcou sa veľkosťou nanočastíc sa krivka posúva k vyšším vlnovým dĺžkam. Vplyv koncentrácie nanočastíc v roztoku na priebeh absorpčných kriviek je na Obr. 9b). So zvyšujúcou sa koncentráciou nanočastíc sa zvyšuje aj hodnota ABS_{max} .



Obr. 9 a) zmena absorpčných kriviek nanočastíc Au spôsobená zmenou veľkosti nanočastíc [12]; b) vplyv koncentrácie nanočastíc Ag v roztoku na priebeh ABS [13]

Rastlinné extrakty okrem redukčných obsahujú aj stabilizačné činidlá. Tieto zabraňujú aglomerácií, zoskupovaniu nanočastíc, ktoré vedie k vytváraniu väčších častíc a ich následnému usádzaniu. Stabilitu koloidných roztokov nanočastíc striebra je možné zvýšiť správnym spôsobom uskladnenia. Pri správnom uskladnení vydržia koloidné roztoky bez zmeny aj niekoľko mesiacov až rokov. Pre koloidné roztoky nanočastíc striebra je najvhodnejšie uskladnenie v tme a pri teplote $\sim 5^{\circ}\text{C}$.

2.3 Praktické cvičenie

2.3.1 Úlohy a experiment

Cieľom experimentu je pripraviť nanočastice striebra biologickou metódou (zelenou syntézou). Ako prekursor striebra sa použije dusičnan strieborný a ako redukčné/stabilizačné činidlo sa použijú extrakty z rastlín.

Príprava zásobných roztokov a syntéza nanočastíc Ag

1. Vypočítajte hmotnosť dusičnanu strieborného, potrebného na prípravu zásobného roztoku podľa údajov uvedených v Tab. 2.

Tab. 2 Množstvo a koncentrácia zásobného roztoku

Názov	chemická značka	roztok (ml)	koncentrácia mg/l	popis
dusičnan strieborný	AgNO ₃	1000	1000	prekurzor Ag nanočastíc

- Riedením pripraveného zásobného roztoku AgNO₃ s koncentráciou $c_{(Ag)} = 1000 \text{ mg/l}$, pripravte Θ AgNO₃, ktorý budete používať pri syntéze nanočastíc, Tab. 3. Zároveň, pripravte extrakt (podľa návodu v Cvičení č. 1) alebo použite už pripravený extrakt. Pripravte aj kontrolnú (referenčnú) vzorku, potrebnú pri meraní UV-VIS spektrofotometrom, Tab. 3.

Postup prípravy roztoku AgNO₃:

Do pripravenej odmernej banky s objemom 50 ml nalejte ~20 ml destilovanej vody a následne vypočítané množstvo AgNO₃ s $c_{(Ag)} = 1000 \text{ mg/l}$, premiešajte a dolejte po rysku destilovanú vodu.

Tab. 3 Množstvá a koncentrácie potrebné na experiment

názov	roztok (ml)	koncentrácia	popis
dusičnan strieborný	50	50 mg/l (0,46 mM)	prekurzor Ag nanočastíc
bio extrakt	10	1:10 sušina:H ₂ O	redukčné/stabilizačné činidlo
kontrola	5 ml H ₂ O + 1 ml extrakt		referenčná kontrola pre UV-VIS

- Odmerajte pH roztokov a zapíšte do Tab. 4.

Tab. 4 pH roztokov

	označenie	pH
Extrakt	pH _(extr)	
Θ AgNO ₃ s $c_{(Ag)} = 1000 \text{ mg/l}$	pH ₍₁₀₀₀₎	
Θ AgNO ₃ s $c_{(Ag)} = 50 \text{ mg/l}$	pH ₍₅₀₎	
koloid Ag nanočastíc	pH _(AgNPs)	

- Pripravený roztok za stáleho miešania zohrejte vo vodnom kúpeli na teplotu 80°C (kadičku s roztokom prikryte alobalom, aby nedošlo k prílišnému odpareniu).
- Po dosiahnutí teploty, pomaly pridajte 10 ml bio extraktu. Hneď po pridaní extraktu sa začne meniť farba roztoku, čo indikuje tvorbu nanočastíc.
- Počas miešania, v 5 min intervaloch, odoberajte pipetou 3 ml vzniknutého roztoku do kyvety a merajte absorbanciu pomocou UV-VIS spektrofotometra. Meranie opakujte dovtedy, pokiaľ sa pík (ABS_{max}) na UV-VIS zázname nebude pohybovať okolo hodnoty 1 až 1,5. Ako referenčnú vzorku použite kontrolný roztok.
- Pripravený koloidný roztok nanočastíc ochlaďte, urobte fotodokumentáciu všetkých roztokov (prekurzor, extrakt a koloid).
- Overte prítomnosť nanočastíc pomocou Tyndallovho javu, urobte fotodokumentáciu.
- Odmerajte pH_(AgNPs) a zapíšte do Tab. 4.
- Pripravte vzorky na SEM a TEM mikroskopiu, urobte fotodokumentáciu.
- Pripravené roztoky rozdeľte do dvoch Erlenmeyerových baniek, označte ich. Jednu dajte do chladničky a druhú nechajte na svetle. Po 7 a po 14 dňoch znovu odmerajte

absorbanciu. Ak dôjde k zmene priebehu krivky oproti poslednému meraniu, pripravte znovu vzorky na TEM a SEM pozorovanie.

12. Urobte fotodokumentáciu roztokov na 7. a 14. deň.
13. Postup experimentu a výsledky spracujte do protokolu. V protokole vysvetlite proces tvorby nanočastíc, dôvody zmeny farby roztokov, popíšte absorpčné spektrá. Diskutujte o vplyve podmienok uskladnenia na stabilitu koloidných roztokov. Zo záznamov TEM a SEM určte tvar, veľkosť a graficky stanovte veľkostnú distribúciu nanočastíc. Porovnajte TEM a SEM záznamy z jednotlivých dní a diskutujte o výsledkoch.
14. V protokole uveďte všetky merania, výpočty a záznamy týkajúce sa experimentu.

Použité pomôcky a experimentálne zariadenia

Laboratórne sklo (kadičky, Erlenmeyerove banky, skúmavky, lievik a pod.), analytické váhy a príslušenstvo k nim, UV-VIS spektrofotometer, mikrokvyety, mikropipety, miešadlo, centrifúga, ependorfky, chemikálie a bio zložky.

2.4 Kontrolné otázky

1. Definujte pojem Green synthesis.
2. Napíšte výhody a nevýhody zelenej syntézy.
3. Popíšte postup na prípravu nanočastíc striebra pomocou zelenej syntézy.

Literatúra

- [1] Ponarulselvam, S., Panneerselvam, C., Murugan, K., Aarthi, N., Kalimuthu, K., Thangamani, S. (2012). Synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Catharanthus roseus* Linn. G. Don and their antiparasitic activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(7), 574–580. doi:10.1016/s2221-1691(12)60100-2
- [2] Debnath, G., Dutta, S., Saha, A.K., Das, P. (2016). Green synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles (AgNPs) from grass leaf extract *Paspalum conjugatum*, *J. Mycopathol. Res.*, 54, 371–376.
- [3] Ajaypraveenkumar, A., Henry, J., Mohanraj, K., Sivakumar, G., Umamaheswari, S. (2015). Characterisation, Luminescence and Antibacterial Properties of Stable AgNPs Synthesised from AgCl by Precipitation Method. *Journal of Materials Science & Technology*, 31(11), 1125–1132. doi:10.1016/j.jmst.2015.08.005
- [4] Lu, X., Tuan, H.-Y., Korgel, B.A., Xia, Y. (2008). Facile Synthesis of Gold Nanoparticles with Narrow Size Distribution by Using AuCl or AuBr as the Precursor. *Chemistry - A European Journal*, 14(5), 1584–1591. doi:10.1002/chem.200701570
- [5] Hebbalalu, D., Lalley, J., Nadagouda, M.N., Varma, R.S. (2013). Greener Techniques for the Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts, Enzymes, Bacteria, Biodegradable Polymers, and Microwaves. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(7), 703–712. doi:10.1021/sc4000362
- [6] Elemike, E.E., Onwudiwe, D.C., Ekennia, A.C., Katata-Seru, L. (2016). Biosynthesis, characterization, and antimicrobial effect of silver nanoparticles obtained using *Lavandula* × *intermedia*. *Research on Chemical Intermediates*, 43(3), 1383–1394. doi:10.1007/s11164-016-2704-7.

- [7] De Barros, C.H.N., Cruz, G., Mayrink, W., Tasic, L. (2018). Bio-based synthesis of silver nanoparticles from orange waste: effects of distinct biomolecule coatings on size, morphology, and antimicrobial activity. *Nanotechnology, Science and Applications*, Volume 11, 1–14. doi:10.2147/nsa.s156115
- [8] Al Sufyani, N.M., Hussien, N.A., Hawsawi, Y.M. (2019). Characterization and Anticancer Potential of Silver Nanoparticles Biosynthesized from *Olea chrysophylla* and *Lavandula dentata* Leaf Extracts on HCT116 Colon Cancer Cells. *Journal of Nanomaterials*, 2019, 1–9. doi:10.1155/2019/7361695.
- [9] Mohandass, C., Vijayaraj, A.S., Rajasabapathy, R., Satheeshbabu, S., Rao, S.V., Shiva, C., De-Mello, I. (2013) Biosynthesis of Silver Nanoparticles from Marine Seaweed *Sargassum cinereum* and their Antibacterial Activity. *Indian J Pharm Sci.* 75(5), 606-10. PMID: 24403664; PMCID: PMC3877525..
- [10] Khan, M.Z.H., Tarek, F.K., Nuzat, M., Momin, M.A., Hasan, M.R. (2017). Rapid Biological Synthesis of Silver Nanoparticles from *Ocimum sanctum* and Their Characterization. *Journal of Nanoscience*, 2017, 1–6. doi:10.1155/2017/1693416.
- [11] Moshahary, S., Mishra, P. (2020). Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using culinary banana peel extract for the detection of melamine in milk. *Journal of Food Science and Technology*, 58(2), 797–804. doi:10.1007/s13197-020-04791-x.
- [12] Njoki, P.N., Lim, I.-I.S., Mott, D., Park, H.-Y., Khan, B., Mishra, S., et al. (2007) Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(40), 14664–14669. doi:10.1021/jp074902z
- [13] Zhang, H., Peng, M., Cheng, T., Zhao, P., Qiu, L., Zhou, J., et al. (2018) Silver nanoparticles-doped collagen–alginate antimicrobial biocomposite as potential wound dressing. *Journal of Materials Science*, 53(21), 14944–14952. doi:10.1007/s10853-018-2710-9

Cvičenie č. 3

Cieľ cvičenia

Cieľom cvičenia je pripraviť polymérne kompozitné materiály (vlákna) dopované nanočasticami kovov (PVA-AgNPs). Na cvičení študenti využijú ex situ metódu na inkorporáciu nanočastíc do polymérnej matrice. Pripravia roztoky PVA-AgNPs a následne ich zvlákni pomocou metódy elektrostatického zvlákňovania (nanospider), konečným produktom bude netkaná textília. Štruktúru pripravených kompozitov (distribúcia nanočastíc) budú analyzovať pomocou SEM mikroskopie.

3 Kompozitné materiály a ich výroba

V priemyselnej výrobe sa pre rôzne aplikácie používajú čisté kovy a zliatiny kovov. Veľa súčasných priemyselných odvetví však požaduje materiály s neobvyklými kombináciami vlastností, ktoré čisté kovy a ani ich zliatiny nevedia zabezpečiť. Preto sú, vďaka vlastnostiam, ktorým nemôžu konkurovať iné materiály, kompozitné materiály veľmi žiadané a nepostrádateľné.

3.1 Kompozitné materiály

Kompozit je umelo vytvorený materiál, skladajúci sa z dvoch alebo viacerých substancií s rozdielnymi vlastnosťami, ktoré sú chemicky výrazne odlišné. Z makroskopického hľadiska majú jednotlivé zložky rovnomernú distribúciu a spolu dávajú výslednému výrobku nové vlastnosti, ktoré predtým sama o sebe nemala žiadna z jeho substancií.

História kompozitov začína na začiatku 20. storočia. Prvými cieľavedome pripravenými kompozitmi, so znalosťou pojmu „kompozit“, boli sklolamináty - vláknové kompozity (v roku 1940). Kompozitné materiály sa vo všeobecnosti používajú na budovy, mosty a konštrukcie ako sú trupy lodí, panely bazénov, karosérie pretekárskych áut, sprchovacie kúty, vane, skladovacie nádrže, umývadlá, používajú sa v zdravotníctve (protézy, umelé kĺby) a v textilnom priemysle. Čoraz častejšie sa používajú aj vo všeobecných aplikáciách, napr. v automobiloch. Najpokročilejšie kompozitné materiály sa používajú na kozmických lodiach a lietadlách, a v náročných prostrediach. Kompozitné materiály je možné rozdeliť podľa viacerých kritérií:

- podľa použitej výstuže ich delíme na základe:
 - geometrického tvaru: sférické, vláknité, tyčinky, wiskre, nepravidelné tvary a pod.,
 - chemického zloženia: čisté kovy, oxidy, karbidy, nitridy, polyméry, sklo, uhlík, atď.,
- podľa použitej matrice: kovová, polymérna a keramická,
- podľa vlastností:
 - mechanické vlastnosti – sú zásadné pre materiály, ktoré sa používajú ako konštrukčné materiály,
 - špeciálne fyzikálno-chemické vlastnosti – tieto kompozity sa používajú predovšetkým ako funkčné materiály, napr. v meracích prístrojoch,
- podľa usporiadania štruktúry:

- kompozity s usporiadanou štruktúrou,
- kompozity s neusporiadanou štruktúrou,
- podľa rozmerov disperznej fázy:
 - nano-kompozity,
 - mikro-kompozity,
 - makro-kompozity,
- podľa účelu použitia:
 - vysoko-pevné (pri bežných teplotách),
 - žiarupevné,
 - pre špeciálne účely: elektromagnetické, elektródy pre zváranie, vysoko-zátťažové elektrické kontakty, kompozity s antibakteriálnymi vlastnosťami.

3.1.1 Matrica a sekundárna fáza

Každý kompozitný materiál je tvorený matricou a sekundárnou fázou. Matrica je spojitá, v celom objeme a zabezpečuje ochranu výstuže (proti korózii, oxidácii, mechanickému poškodeniu...). Matrica je obvykle poddajnejšia, plní funkciu spojenia jednotlivých častíc výstuže, prenáša vonkajšie zaťaženie na spevňujúcu zložku, má nízku hmotnosť a určuje ďalšie vlastnosti kompozitu (teplotná a chemická odolnosť, odolnosť proti starnutiu, elektrické vlastnosti, zmrštenie pri vytvrdzovaní, ...).

Spevňujúca (sekundárna) fáza zlepšuje vlastnosti výsledného kompozitu:

- fyzikálno-mechanické vlastnosti: modul pružnosti, pevnosť, ťažnosť, rázovú húževnatosť, tvrdosť, koeficient trenia, opotrebenie,
- reologické vlastnosti,
- chemickú odolnosť,
- tepelno-fyzikálne vlastnosti: koeficient tepelnej rozťažnosti, tepelnú vodivosť, tepelnú kapacitu, tepelnú odolnosť,
- optické vlastnosti: farba, index lomu,
- elektrické vlastnosti: elektrická vodivosť, elektrická pevnosť.

Podľa tvaru rozdeľujeme sekundárnu fázou na:

- vlákna: krátke, dlhé, spojené po celej dĺžke výrobku alebo spracované do textilných výrobkov,
- častice: disperzné častice (prášky, vločky, mikrogulôčky), jednorozmerné častice (ihličky, tyčinky), vrstevnaté častice (pásky a doštičky).

Špeciálnym typom sú štruktúrované (vrstvené) kompozity. Tieto kompozity majú špeciálny tvar, kde sa stráca rozdiel medzi matricou a spevňujúcou fázou. Patrí sem napríklad Tetrapak, pneumatiky, preglejky a pod.

3.1.2 Výroba kompozitných materiálov

V procese výroby sa matrica spojí (teplom, tlakom alebo chemickou reakciou) so sekundárnou fázou do tuhej štruktúry. Spôsoby výroby je možné rozdeliť podľa stavu matrice

na: tavné metódy (pretavovanie-rheocasting, vysokoteplotné reakcie v roztavenej matrici, infiltrácia preformy roztavenou matricou, tlakové liatie, difúzne spájanie) a metódy prebiehajúce pri teplote okolia (prášková metalurgia: mechanické legovanie, reakčné mletie). Tiež je možné metódy výroby kompozitných materiálov rozdeliť aj podľa toho, či sa do matrice pridáva sekundárna fáza, ktorá bola vopred pripravená (definovaná veľkosť, tvar, množstvo a zloženie sekundárnej fázy). Takéto metódy sa nazývajú ex situ metódy. Ak sa sekundárna fáza tvorí priamo v procese výroby kompozitného materiálu, metódam sa hovorí in situ metódy. In situ metódy môžu byť uskutočnené pomocou chemickej reakcie (reakčné mletie, vysokoteplotné reakcie v roztavenej matrici) indukovanej teplom alebo mechanicky (mechanochemická syntéza nanočastíc, mechanické legovanie).

Hlavným cieľom všetkých metód prípravy je vystužiť matricu na požadovanú hodnotu a zachovať dostatočné plastické vlastnosti.

Cvičenie bude zamerané na prípravu nanovláknitých polymérnych kompozitných materiálov dopovaných kovovými nanočasticami - netkanej textílie. Na ich výrobu využijeme metódu elektrostatického zvlákňovania, technológiu Nanospider. Preto sa v ďalších kapitolách budeme bližšie venovať iba príprave polymérnych kompozitov dopovaných kovovými nanočasticami.

3.2 Polymérne kompozity dopované kovovými nanočasticami

Kompozity na báze polymérov (PMC) sú materiály vytvorené spojením sekundárnej fázy (plniva) a makromolekulárnej látky (polyméru). Cieľom plnív je zvýšenie tuhosti, pevnosti, rozmerovej stálosti, elektrických parametrov, tepelnej odolnosti a mikrobiálnej toxicity. Inkorporácia nanočastíc do polymérnych matric môže dodať polyméru aj nové vlastnosti napr. elektromagnetické, optické vlastnosti, vysokú chemickú stabilitu, tepelnú stabilitu alebo vyššiu odolnosť voči horeniu [1, 2].

Pre polymérne matrice sú vhodné prakticky všetky polyméry. Voľba matrice závisí od podmienok, pri ktorých bude kompozit používaný, od požiadaviek na jeho vlastnosti a od ceny. Kompozity, podľa druhu použitej matrice, sa rozdeľujú na:

- bio-kompozity - ako matrice využívajú prírodné bio-polyméry, napr. alginát, celulóza, pektín, lignín, škrob, acetát, kaučuk a pod.,
- kompozity využívajúce tradičné (syntetické) polyméry na báze ropy - medzi najpoužívanejšie syntetické polyméry, využívané ako matrica, patria: PVA – polyvinylalkohol, PES – polyétersulfón, PEG – polyetylén glykol, PANI – polyanilín, MPEG – metoxypolyetylén glykol, PP – polypropylén, PPG – polypropylén glykol, PVP – polyvinylpyrrolidón a iné.

Pre zlepšenie vlastností matrice sa niekedy používajú kombinácie dvoch alebo aj viacerých polymérov. Nanokompozity s polymérnou matricou, rovnako ako aj kovové či keramické kompozitné materiály, môžu byť pripravené dvomi postupmi a to: in situ a ex situ metódou [3].

Nanokompozity s polymérnou matricou sú užitočné pre množstvo technologických aplikácií, môžu byť použité napríklad: na tienenie žiarenia s vysokou energiou, ako mikrovlnné absorbéry, optické obmedzovače, polarizátory, senzory, systémy na skladovanie vodíka, športové náčinie, ochranné povlaky a podobne [1].

3.2.1 In situ metóda prípravy polymérnych nanokompozitov

Syntéza nanočastíc in situ v polymérnej matrici je jednoduchou a účinnou metódou na prípravu nanokompozitov. Umožňuje jednostupňovú výrobu nanokompozitov, kde sa nanočastice syntetizujú priamo v procese výroby. In situ proces pozostáva z dvoch krokov:

- zmiešanie prekursora (v prípade striebra ním môže byť AgNO_3), reakčného činidla (v prípade striebra to môže byť napr. extrakt z rastlín alebo NaBH_4) a roztoku polyméru,
- polymerizácia - chemická reakcia, pri ktorej vznikajú z malých molekúl (monomérov) vysokomolekulárne látky (polyméry). In situ vznikajúce nanočastice sú rozptýlené spoiatku v kvapalnom monomére s relatívne nízkou molekulovou hmotnosťou. Po pridaní vhodného iniciátora sa vytvorí homogénna zmes a po vystavení zdroju tepla alebo žiarenia sa zaháji polymerizačná reakcia. Po dokončení polymerizácie sa vytvorí nanokompozit.

Výhodou tejto metódy je, že zabráňuje aglomerácii častíc a zároveň zachováva dobrú priestorovú disperziu nanočastíc v polymérnej matrici. Taktiež je zachovaná termodynamická kompatibilita na rozhraní matrica-sekundárna fáza. Nevýhodou metódy je, že pri nedodržaní presného postupu nezreagované produkty chemických reakcií môžu negatívne ovplyvniť vlastnosti výsledných kompozitov a okrem toho, nevznikne požadované množstvo nanočastíc, čo môže takisto výrazne ovplyvniť výsledné vlastnosti. Pri nedodržaní presného postupu môže dôjsť aj k vzniku nanočastíc rôznych nežiadúcich tvarov a veľkosti.

3.2.2 Ex situ metóda prípravy polymérnych nanokompozitov

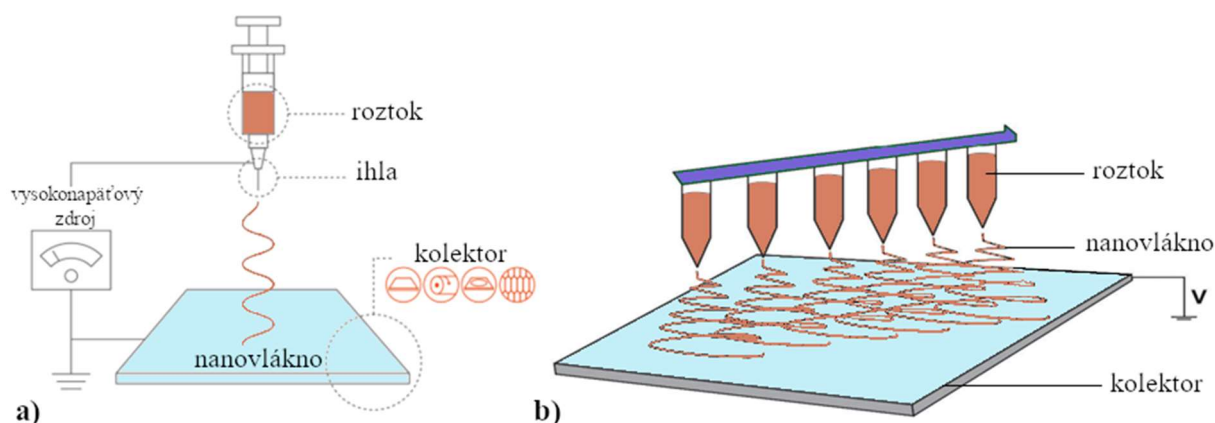
Metóda ex situ je vhodnejšia všade tam, kde sú požadované rozsiahle priemyselné aplikácie. Kľúčovou výzvou súvisiacou s touto metódou je príprava nanočastíc. Pri ex situ spôsobe prípravy sa najskôr syntetizujú nanočastice kovu a následne sa hotové nanočastice primiešajú do polyméru. Po premiešaní oboch zložiek nasleduje polymerizácia, ktorej výsledkom je nanokompozit s inkorporovanými nanočasticami.

Výhodou tejto metódy je, že poznáme veľkosť, tvar aj presné množstvo nanočastíc, ktoré sú pridávané do polyméru. Nevýhodou je možná nerovnomerná distribúcia nanočastíc v polymérnej matrici. Potrebnú distribúciu je možné zabezpečiť napr. využitím ultrazvuku alebo intenzívnym miešaním, čo predlžuje a predražuje proces prípravy nanokompozitov.

3.3 Elektrostatické zvlákňovanie

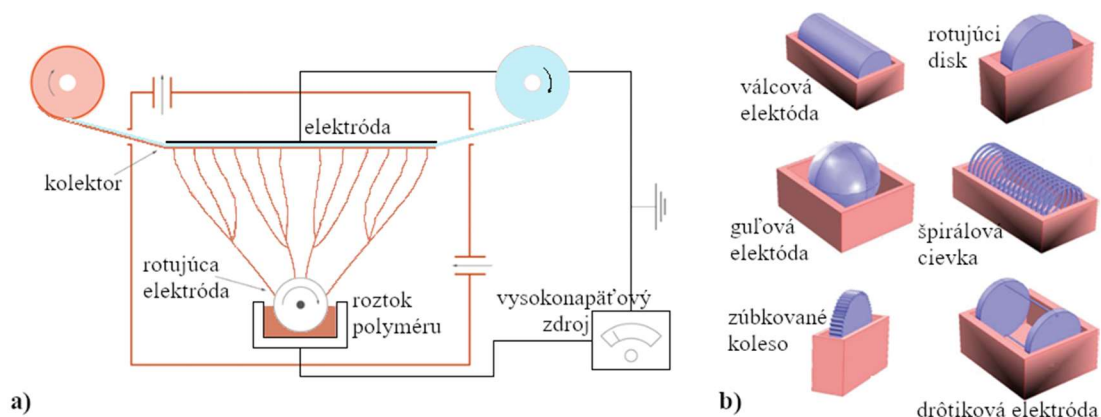
Elektrostatické zvlákňovanie je unikátna technológia, ktorá umožňuje výrobu netkaných textílií tvorených nanovláknami, t.j. vláknami s priemerom 20 až 500 nm. Elektrostatické zvlákňovanie je proces, pri ktorom sa polymérne vlákna vytvárajú aplikáciou vysokého napätia. Princíp je založený na akumulácii náboja na povrchu roztoku polyméru v dôsledku vysokého napätia, ktoré spôsobí, že sa z roztoku vyvrhne tenký prúd polyméru vytvorením Taylorovho kužeľa. Metóda využíva vodivosť polymérnych roztokov a tavenín na ich formovanie pôsobením elektrostatického poľa [4]. Vytrhnuté nanovlákná sa neusporiadane, náhodne ukladajú na zbernej podložke a tak vytvárajú netkanú textíliu. Tento proces nevyžaduje použitie koagulačnej chémie alebo vysokých teplôt na výrobu pevných vlákien z roztoku. Rozlišujú sa dve základné technológie elektrostatického zvlákňovania:

- pomocou ihly - formovanie nanovláken z kvapalného polyméru s pomocou zvlákňovacej ihly v elektrostatickom poli, Obr. 10a). Podmienkou je vysoké napätie v kV a prísun polyméru zo zásobníka. Hlavnou nevýhodou tohto typu elektrostatického zvlákňovania je jeho nízka produktivita súvisiaca s obmedzenou veľkosťou ihly. Systémy elektrostatického zvlákňovania na báze ihly ponúkajú kontrolu nad rýchlosťou podávania roztoku, z ktorého sa vytvárajú vlákna. Vo väčšine prípadov je roztok obsiahnutý v injekčnej striekačke, ktorá je pripojená k pumpe, ktorá dodáva čerstvé množstvo roztoku/suspenzie do ihly. Prietoková rýchlosť je jedným z kľúčových parametrov, ktoré určujú morfológiu vlákna. Pri tejto metóde je možné použiť aj viacero ihiel naraz, Obr. 10b), čo výrazne zintenzívni celý proces [4, 5].



Obr. 10 a) Schematický diagram usporiadania elektrostatického zvlákňovania s jednou ihlou
a b) viacerými ihlami

- bezihlové elektrostatické zvlákňovanie, ktoré umožňuje zvýšiť efektivitu výroby až 100 násobne, pričom je proces jednoduchý a ľahko ovládateľný, Obr. 11a). Proces elektrostatického zvlákňovania začína na povrchu otvorenej nádoby naplnenej pripraveným roztokom, kde sa vlákna vyrábajú prostredníctvom rotujúcich zvlákňovacích elektród.



Obr. 11 a) Schematický diagram bezihlového elektrostatického zvlákňovania a b) typy elektród pre bez ihlové zvlákňovanie [6]

Na obrázku Obr. 11b) sú znázornené rôzne typy elektród používaných pri bezihlovom elektrostatickom zvlákňovaní [6, 7]. Pri elektrostatickom zvlákňovaní bez ihly zvyčajne nie

je možné regulovať prietok roztoku, pretože roztok sa uchováva v otvorenej nádobe s povrchom vystaveným vzduchu. Táto konfigurácia otvoreného zásobníka podporuje odparovanie rozpúšťadla, čo má za následok vyššiu viskozitu roztoku v priebehu času a potenciálne kolísanie medzi menšími a väčšími priermi vlákien vytvorenými v konečnej vzorke. To má vplyv na požiadavky, týkajúce sa homogénosti hrúbky vlákien alebo hmotnosti vlákien na jednotku plochy (g/m^2), ktoré sú vyžadované určitými aplikáciami, napríklad v prípade filtračných aplikácií [4].

Využitie kompozitných materiálov pripravených elektrostatickým zvlákňovaním je veľmi široké. Používajú sa na filtráciu kvapalín aj plynov, v zdravotníctve (tkanivové inžinierstvo, podávanie liečiv, hojenie rán, imobilizáciu enzýmov), v automobilovom priemysle, energetike a ďalších odvetviach ako je stavebníctvo, kozmetika, textilný priemysel, ochrana životného prostredia, ochranné pomôcky atď.

3.4 Praktické cvičenie

3.4.1 Úlohy a experiment

Cieľom experimentu je pripraviť polymérny kompozit dopovaný kovovými nanočasticami pomocou ex situ metódy a následne, z pripraveného kompozitu, pomocou elektrostatického zvlákňovania pripraviť netkanú textíliu. Pomocou SEM analyzovať distribúciu nanočastíc v matici.

Postup práce

1. Pre experiment budete potrebovať dva základné roztoky. Príprava roztokov:
 - a. roztok PVA - pripravte 4x po 45 ml 7,2% roztoku PVA. Po navážení potrebné množstvo PVA nasypete do kadičky s požadovaným množstvom destilovanej vody a nechajte napučať. Pre urýchlenie rozpúšťania PVA umiestnite kadičku na miešadlo s ohrevom, pri teplote 70-80°C a pri stálom miešaní pri 500 ot./min. nechajte zmes premiešavať a zohrievať, kým sa PVA nerozpustí. Pripravte štyri takéto roztoky a označte ich,
 - b. koloidný roztok nanočastíc striebra (AgNPs) – koloid AgNPs pripravte biologickou alebo chemickou metódou (Roztok 1). Z pripraveného roztoku, pomocou odstredenia, pripravte tri vzorky (Roztok 1 - pôvodný, Roztok 2 a Roztok 5) tak, aby obsah nanočastíc v Roztokoch 1, 2 a 5 bol v pomere 1:2:5 (Roztok 2 bude obsahovať raz toľko nanočastíc ako Roztok 1 a Roztok 5, päťkrát toľko ako Roztok 1). Objem všetkých roztokov bude 5 ml, bez ohľadu na koncentráciu nanočastíc.
2. Ex situ príprava kompozitného roztoku PVA-AgNPs:
 - roztoky PVA zohrejte vo vodnom kúpeli na teplotu 50°C pri neustálom miešaní,
 - po dosiahnutí teploty do troch roztokov PVA primiešajte pripravené koloidné roztoky (Roztok 1, Roztok 2 a Roztok 5) a do posledného roztoku PVA primiešajte 5 ml destilovanej vody,
 - homogenizácia - roztoky premiešavajte 20 min a potom ich premiestnite do ultrazvukového kúpeľa na ďalších 10 min. Po ultrazvuku roztoky preneste znovu na

miešadlá a nechajte premiešavať 20 min. Proces homogenizácie prebieha pri teplote 50°C.

3. Zvlákňovanie – ešte teplé roztoky zvláknite na zariadení Nanospider.
4. Zo získaných vlákien (netkaných textílií) odoberte vzorky na pozorovanie pomocou SEM. Na snímkach zo SEM vyhodnoťte priemer vlákien a distribúciu nanočastíc striebra. Vyhodnoťte vplyv podielu nanočastíc na ich distribúciu v matrici.
5. Protokol z cvičenia vypracujte podľa pokynov uvedených v kapitole 9. Fotodokumentáciu celého procesu výroby nanovlákien priložte k protokolu. Podrobne popíšte podmienky zvlákňovania. V závere vyhodnoťte získané výsledky.

Použité pomôcky a experimentálne zariadenia

Laboratórne sklo (kadičky, Erlenmeyerove banky a pod.), analytické váhy a príslušenstvo k nim, mikropipety, miešadlá, Nanospider, chemikálie.

3.5 Kontrolné otázky

1. Definujte pojmy: kompozit, sekundárna fáza a matrica.
2. Definujte polymér.
3. Vymenujte a popíšte základné procesy inkorporácie nanočastíc do matrice.
4. Čo je elektrostatické zvlákňovanie?
5. Porovnajte výhody a nevýhody metód in situ a ex situ.
6. Vysvetlite teóriu týkajúcu sa vzniku Taylorovho kužľa.

Literatúra

- [1] Belotelov, V.I., Perlo, P., Zvezdin, A.K. (2004). Magneto-optics of Granular Materials and New Optical Methods of Magnetic Nanoparticles and Nanostructures Imaging. Metal-Polymer Nanocomposites, 201–240. doi:10.1002/0471695432.ch7.
- [2] Verma, A., Nath, M., Malhan, N., Ganguli, A.K. (2013). Improved optical properties in nanocrystalline Ce:YGG garnets via normal and reverse strike co-precipitation method. Materials Letters, 93, 21–24. doi:10.1016/j.matlet.2012.11.025.
- [3] Guo, Q., Ghadiri, R., Weigel, T., Aumann, A., Gurevich, E., Esen, C., et al. (2014). Comparison of in Situ and ex Situ Methods for Synthesis of Two-Photon Polymerization Polymer Nanocomposites. Polymers, 6(7), 2037–2050. doi:10.3390/polym6072037.
- [4] Partheniadis, I., Nikolakakis, I., Laidmäe, I., Heinämäki, J. (2020). A Mini-Review: Needleless Electrospinning of Nanofibers for Pharmaceutical and Biomedical Applications. Processes, 8(6), 673. doi:10.3390/pr8060673.
- [5] Ifegwu, O.C., Anyakora, C. (2018). The Place of Electrospinning in Separation Science and Biomedical Engineering. Electrospinning Method Used to Create Functional Nanocomposites Films. doi:10.5772/intechopen.77221.
- [6] Ramakrishnan, R., Gimbut, J., Samsuri, F., Narayanamurthy, V., Gajendran, N., Sudha Lakshmi, Y., et al. (2016). Needleless Electrospinning Technology – An Entrepreneurial Perspective. Indian Journal of Science and Technology, 9(15). doi:10.17485/ijst/2016/v9i15/91538.
- [7] Yan, G., Niu, H., Lin, T. (2019). Needle-less Electrospinning. Electrospinning: Nanofabrication and Applications, 219–247. doi:10.1016/b978-0-323-51270-1.00007-8.

Cvičenie č. 4

Ciel' cvičenia

Ciel'om cvičenia je pripraviť tenké polymérne vrstvy povlakov na sklenenom nosiči. Študenti sa oboznámia s možnosťami prípravy povlakov a prakticky si vyskúšajú prípravu tenkých vrstiev pomocou troch metód povlakovania: dip coating, spin coating a spinless coating. Naučia sa vyhodnocovať kvalitu vrstiev a upravovať podmienky procesov, pre dosiahnutie kvalitnej vrstvy.

4 Povrchová úprava povlakovaním

Povlak je tenká vrstva materiálu, ktorá je nanosená na povrch nejakého predmetu (substrátu). Nanášanie povlakov (náterov) je overený spôsob, ako zvýšiť odolnosť a funkčnosť, poskytnúť dodatočnú bezpečnosť, tlmenie vibrácií, ochranu proti nárazom a ďalšie vylepšenia potiahnutých dielov a produktov. Účel vytvárania povlaku môže byť dekoratívny, funkčný alebo oboje. Povlaky môžu byť aplikované ako kvapaliny, plyny alebo tuhé látky, napr. práškové nátery. Povlak sa má nanášať v kontrolovanej hrúbke a na dosiahnutie tohto sa používa celý rad rôznych procesov, od jednoduchej kefy alebo valčeka až po veľmi nákladné strojové zariadenia a technológie.

Z technologického hľadiska vytvorenia povrchových vrstiev, môžeme procesy tvorby vrstiev rozdeliť na procesy:

1. tepelné - pri ktorých sa roztavený alebo zohriaty materiál nasprejuje na povrch, hrúbka vrstvy je od 20 μm až po niekoľko nm,
2. depozícia z pár – patria sem CVD a PVD procesy,
3. chemické, chemicko-tepelné a elektrochemické techniky, napr. pokovovanie, cementovanie, nitrocementovanie, nitridovanie, karbonitridovanie, alitovanie, morenie, eloxovanie,
4. mechanické – pieskovanie, práškovanie, valčekovanie, brúsenie, finišovanie, otryskávanie,
5. nanášania prídavných vrstiev - termicky, mechanicky, chemicky, elektrochemicky, striekaním náterov, pokovovaním, centrifugáciou a pod.

Tepelné a chemické metódy sú vhodné na vytváranie kovových vrstiev alebo na nanášanie prvkov ako uhlík, kremík, resp. zlúčenín ako sú karbidy, nitrídy alebo intermetalické zliatiny. Mechanické techniky sa používajú hlavne na úpravu povrchov kovových materiálov. Pri potrebe vytvorenia vrstiev z polymérnych materiálov je vhodnejšie používať nízкотеплотné metódy, ako sú: dip coating (ponáranie resp. namáčanie) [1], spin coating (rotačné nanášanie), spinless coating (statické nanášanie), sprejovanie alebo centrifugáciu.

4.1 Dip coating

Namáčanie (ponáranie) je priemyselný proces potáhovania, ktorý sa používa na výrobu potiahnutých tkanín a špecializovaných povlakov, napríklad v biomedicínskej oblasti. Ponáranie sa bežne používa aj v akademickom výskume, kde mnohé výskumné projekty

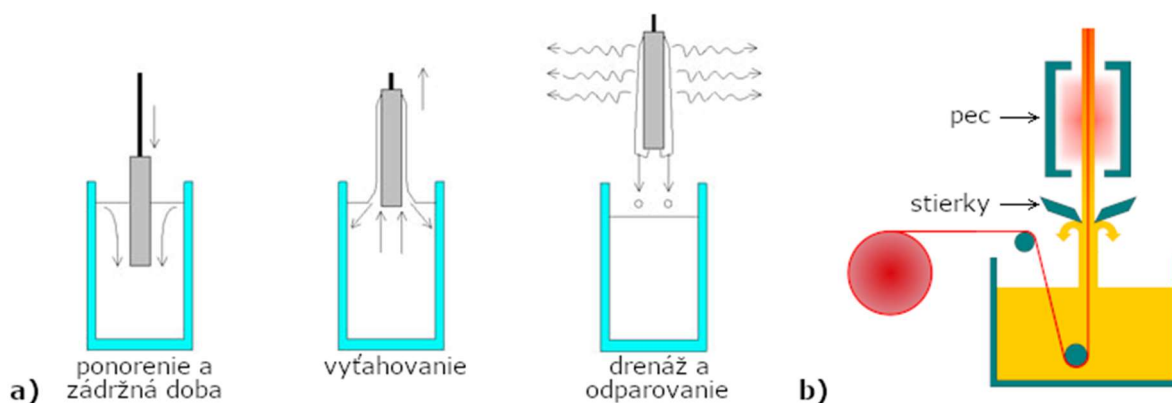
v oblasti chemického a nanomateriálového inžinierstva využívajú techniku ponárania na vytváranie tenkých vrstiev.

Podľa spôsobu prevedenia sa rozlišujú dva základné procesy nanášania:

- kontinuálny,
- diskontinuálny.

Proces nanášania povlaku ponáraním, pri diskontinuálnej metóde, možno rozdeliť do piatich etáp, Obr. 12a):

1. Ponorenie - substrát sa ponorí do roztoku náterovej hmoty konštantnou rýchlosťou.
2. Zádržná doba - substrát ostane úplne ponorený a bez pohybu, aby sa povlakovaciemu materiálu umožnilo prilnúť na povrch.
3. Vyťahovanie - vykonáva sa pri konštantnej rýchlosti a teplote. Rýchlosť vyťahovania určuje hrúbku povlaku.
4. Drenáž - prebytočná kvapalina odteká z povrchu.
5. Odparovanie - rozpúšťadlo sa odparí z kvapaliny a vytvorí sa tenká vrstva.



Obr. 12 a) Schéma etáp procesu namáčania pri jednorazovom procese [1] a b) zjednodušená schéma kontinuálneho procesu povlakovania metódou dip coatingu

Kontinuálny spôsob je znázornený na Obr. 12b). Nepretržitý (kontinuálny) proces sa týka pružných textílií. Vyššie uvedené kroky sa vykonávajú bezprostredne jeden po druhom. Pri tomto postupe sú nad hladinou umiestnené stierky, ktoré upravujú hrúbku vrstvy. Bezprostredne po nanosení povlaku sa substrát zvyčajne vysuší a následne vypáli v peci, čím vznikne požadovaná povrchová vrstva.

Na konečný stav povlaku (tenkého filmu) vplýva mnoho faktorov: funkčnosť pôvodného povrchu substrátu, čas ponorenia, rýchlosť vyťahovania, počet cyklov máčania, zloženie roztoku, koncentrácia, teplota a tlak, poradie roztokov (v prípade ponárania do rôznych roztokov), viskozita roztoku, povrchové napätie, vlhkosť prostredia a uhol, pri ktorom sa substrát ponára. Technika ponárania môže poskytnúť rovnomerné, vysokokvalitné filmy aj na objemných, zložitých tvaroch.

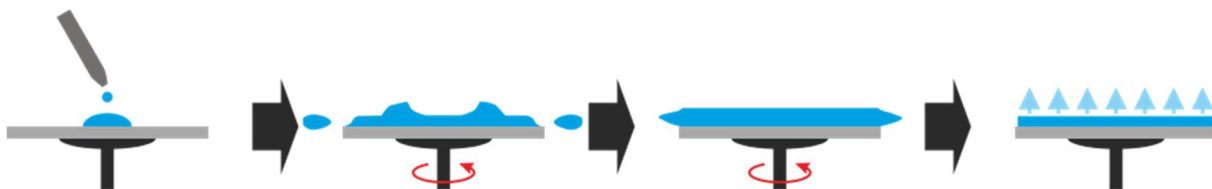
Vďaka svojej jednoduchosti je táto metóda vhodná na automatizáciu. Medzi hlavné výhody procesu patria: nízke investičné náklady, nízke výrobné náklady, možnosť nanosenia rôznych hrúbok povlakov (od 20 nm do 50 μm).

Namáčanie má aj určité nevýhody:

- hrúbka filmu - môže sa meniť zhora nadol ("klinový efekt"),
- proces je relatívne pomalý,
- náročná kontrola hrúbky dielu,
- hrubšie okraje - pri odtokaní prebytočného povlaku sa na spodnej časti dielov môžu vytvárať hrubšie okraje.

4.2 Spin coating

Ďalšou bežne používanou technikou nanášania je rotačné nanášanie. Proces sa využíva na rovnomerné nanášanie organických materiálov alebo rozloženie častíc na rovný povrch, kde hrúbka vytvorenej vrstvy je niekoľko nm až niekoľko μm . Pri tomto procese je povrch substrátu úplne pokrytý povlakom (sólom), Obr. 13. Prvým krokom je nanosenie povlaku (sólu) na povrch. Po nadávkovaní sa substrát aj s povlakom otáča (s osou otáčania vertikálnou k povrchu). Roztok sa otáčaním vytlačí smerom von (odstredivá sila vedie kvapalinu radiálne smerom von), čo vyvoláva vypudzovanie sólu z povrchu a vytvorí sa tenký a rovnomerný film [4, 5]. Posledným krokom je odparovanie resp. sušenie.



Obr. 13 Schematické znázornenie krokov pri rotačnom nanášaní povlaku [4]

Konečná hrúbka filmu závisí od vlastností roztoku: viskozity sólu, rýchlosti sušenia/odparovania, povrchového napätia a kľúčovú úlohu zohráva koncentrácia sólu. Veľký význam majú aj nastavené parametre, ako je uhlová rýchlosť, zrýchlenie a doba nábehu na dosiahnutie konečnej rýchlosti odstred'ovania, čas otáčania. Čím vyššia je uhlová rýchlosť a čím dlhšia je doba otáčania, tým je výsledný film tenší [6].

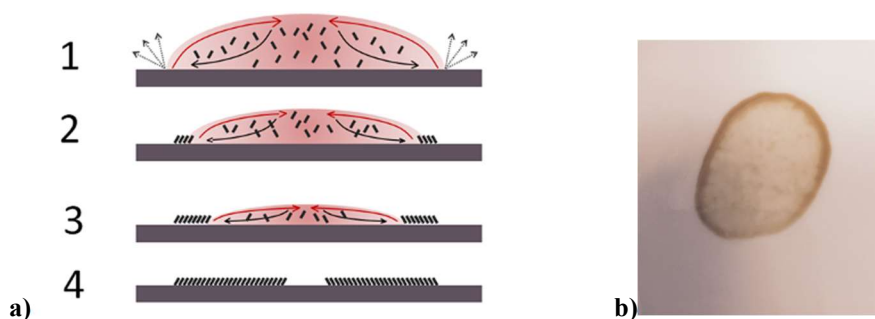
Proces rotačného nanášania je jednoduchý, je ním možné pripraviť tenké a rovnomerné vrstvy a je tu jednoduchá kontrola hrúbky vrstvy. Pri vysokých rýchlostiach odstred'ovania sa skraca aj doba sušenia (v dôsledku vysokého prietoku vzduchu), čo odstraňuje potrebu tepelného spracovania po nanášaní. Spin coating je aj veľmi lacný spôsob, ktorý nevyžaduje drahé zariadenia a procesy s vysokou spotrebou energie.

Proces má aj určité nevýhody:

- je to dávkovací proces, teda proces s jedným substrátom (sólom) – slabá výrobná kapacita,
- využije sa len 10% materiálu – veľmi vysoké straty materiálu,
- rýchle časy schnutia môžu byť aj nevýhodou, keďže môžu viesť k nižšej výkonnosti niektorých konkrétnych nanotechnológií, ktoré si vyžadujú čas na samozostavenie alebo kryštalizáciu,
- môžu sa vyskytnúť chyby vrstvy.

Napriek týmto nevýhodám je však rotačné nanášanie zvyčajne východiskovým bodom pre väčšinu akademických a priemyselných procesov, ktoré vyžadujú tenký a jednotný povlak. Spin coating nanášanie je široko používané vo výskume a vývoji polovodičov a nanotechnológií. V priemyselných sektoroch je možné túto techniku nanášania použiť na potiahnutie malých výrobkov, s rozmermi iba niekoľkých štvorcových milimetrov, až po výrobky, ktoré môžu mať priemer meter alebo aj viac metrov. Ako povlakovací materiál je možné použiť takmer akýkoľvek polymér, nanomateriály a mnohé ďalšie materiály.

Určitou obmenou spin coatingu je statické povlakovanie (spinless coating). Je to proces pri ktorom povlak (sól) nanesený na materiál voľne vysychá, Obr. 14a). Pri vysychaní vzniká interný tok. Kvapky sa zmenšujú a vnútorný tok usporadúva častice k ustupujúcemu okraju kvapky. Ak sa spomalí odparovanie je možné získať vysoko usporiadaný film, avšak povlak nie je rovnomerný po celej šírke substrátu – vznikne typický tvar „coffee staining effect“, Obr. 14b).



Obr. 14 a) Schéma procesu spinless coating; b) „coffee staining effect“

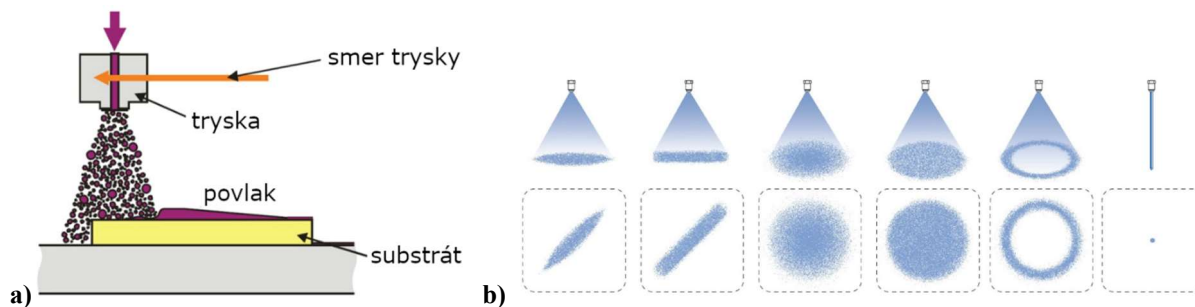
Povlaky a tenké filmy obsahujúce nanočastice sa používajú v rôznych aplikáciách vrátane displejov, senzorov, lekárskeho zariadení, zásobníkov energie a získavania energie. Príklady zahŕňajú použitie oxidu grafénu na aplikácie v elektronike, nanočastice kovov, uhlíkových nanorúrok a kvantových bodiek vo fotovoltaike, displejoch a senzoroch, polymérov a nanokompozitov pri nanolitografickom modelovaní alebo použití nanočastíc kovov na rozptyl svetla a vytváranie nových optických efektov.

4.3 Striekanie

Striekanie je jedným z najbežnejších spôsobov nanášania náterov, tak v priemyselnom meradle, ako aj vo výskume a vývoji. Princíp techniky spočíva v atomizácii a transporte roztoku smerom k substrátu, kde sa nárazom kvapiek na povrch vytvorí film, Obr. 15a). Atomizácia môže byť realizovaná tlakom (bezvzduchovo), stlačeným nosným plynom (zvyčajne vzduchom), elektrostatickým procesom alebo rotáciou [7].

Na rozdiel od nanášania ponorením a odstred'ovaním má nanášanie rozprašovaním veľké množstvo parametrov, ktoré ovplyvňujú proces, vrátane tlaku nosného plynu, otvoru rozprašovacej trysky, vzdialenosti medzi tryskou a vzorkou, uhla dopadu, tvaru rozprašovacieho prúdu a rýchlosti relatívneho pohybu medzi tryskou a vzorkou. Na jednej strane tento vysoký počet parametrov komplikuje proces. Na druhej strane zvyšuje univerzálnosť metódy, pretože parametre je možné upraviť tak, aby umožnili nanášanie

náterových roztokov so širokým rozsahom vlastností (viskozita, veľkosť častíc plniva, prchavosť rozpúšťadla) a tiež na riadenie charakteristík náteru, ako je hrúbka a štruktúra povrchu. Na Obr. 15b) je znázornených niekoľko trysiek s rôznymi vzormi rozprašovania, ktoré môžu byť čiarové, kužeľové, duté kužele alebo čiarové či bodové. Konštrukcia dýzy sa zameriava na rovnomernosť a silu nárazu striekaného prúdu, či už sa dýzy používajú jednotlivo alebo sa prekrývajú.



Obr. 15 a) Schéma povlakovania striekaním [8]; b) typy trysiek [9]

Typické striekacie zariadenie pozostáva zo: zásobníka na stlačený plyn, nádoby na roztok a rozprašovacej dýzy [8]. Striekanie je možné vykonávať voľnými pohybmi pomocou striekacej pištole. Avšak v tomto prípade bude reprodukovateľnosť a homogenita silne závisieť od schopností operátora. Zložitejšie systémy s mechanickým alebo elektronickým riadením počas prevádzky sú schopné zlepšiť reprodukovateľnosť procesu. Napriek veľkému množstvu odpadu vyžaduje nanášanie striekaním relatívne malé množstvo náterového roztoku na plochu substrátu.

4.4 Praktické cvičenie

4.4.1 Úlohy a experiment

Cieľom experimentu je pripraviť tenké vrstvy polymérneho kompozitu dopovaného kovovými nanočasticami metódou dip coating, spin coating a spinless coating na sklenenom nosiči, porovnať a analyzovať kvalitu vrstiev, vplyv viskozity na tvorbu vrstvy a distribúciu nanočastíc (SEM).

Postup práce

1. Očistite sklenené podložky, najprv pomocou saponátu a potom etylalkoholom.
2. Pripravte kompozitné roztoky polyméru dopovaného kovovými nanočasticami s rôznou viskozitou. Pripravte 5, 10 a 15% roztoky. Použite nanočastice rôznych tvarov, čo zaručí roznu farebnosť povlakov (koloid trojuholníkových nanočastíc striebra má modrú farbu, sférické nanočastice vytvárajú žltú farbu).
3. Namáčaním naneste kompozitnú vrstvu na sklenené vzorky a vysušte ich v sušičke pri 50°C počas 20 min.
4. Na rotačné nanášanie použite Spincoater (podmienky: 300 ot/min, 20 s). Po nanosení dosušte vzorku v sušičke pri 50°C počas 20 min.
5. Pri metóde spinless coating nakvapkajte rovnaké množstvo polymérneho roztoku ako v predchádzajúcich experimentoch a vysušte vzorky v sušičke pri 50°C počas 20 min.

6. Vyhodnoťte kvalitu vrstiev v závislosti od viskozity roztokov a použitej techniky prípravy vrstiev. Odmerajte hrúbky vrstiev pomocou mikrometra a navzájom ich porovnajte.
7. Z každej vrstvy pripravte vzorky na pozorovanie pomocou SEM. Vyhodnoťte distribúciu nanočastíc v jednotlivých vrstvách.
8. Do protokolu zapíšte presný postup experimentov aj s obrazovou dokumentáciou, výsledkami a diskusiou výsledkov.

Použité pomôcky a experimentálne zariadenia

Laboratórne sklo (kadičky, Erlenmeyerove banky, podložné sklička a pod.), analytické váhy a príslušenstvo k nim, mikropipety, miešadlo, chemikálie, mikrometer, Spincoater.

4.5 Kontrolné otázky

1. Definujte povlak.
2. Napíšte výhody a nevýhody metódy dip coating.
3. Pre aké konkrétne aplikácie sa používa metóda dip coating?
4. Aký je rozdiel medzi metódou spin coating a spinless coating?
5. Uveďte príklady využitia tenkých vrstiev v medicíne.

Literatúra

- [1] Riau, A.K., Mondal, D., Setiawan, M., Palaniappan, A., Yam, G.H.F., Liedberg, B., et al. (2016). Functionalization of the Polymeric Surface with Bioceramic Nanoparticles via a Novel, Nonthermal Dip Coating Method. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(51), 35565–35577. doi:10.1021/acsami.6b12371
- [2] Dip Coating Technology, dostupné on-line na [www: http://www.apexicindia.com/en/technologies/dip-coating-technology](http://www.apexicindia.com/en/technologies/dip-coating-technology) [7.1.2023]
- [3] Dip Coating, dostupné on-line na [www: https://en.wikipedia.org/wiki/Dip-coating#/media/File:Dip_coating.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Dip-coating#/media/File:Dip_coating.svg) [7.1.2023]
- [4] Tranquillo, E., Bollino, F. (2020). Surface Modifications for Implants Lifetime extension: An Overview of Sol-Gel Coatings. *Coatings*, 10(6), 589. doi:10.3390/coatings10060589
- [5] Moreira, J., Vale, A.C., Alves, N.M. (2021). Spin-coated freestanding films for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(18), 3778–3799. doi:10.1039/d1tb00233c
- [6] Faure, B., Salazar-Alvarez, G., Ahniyaz, A., Villaluenga, I., Berriozabal, G., De Miguel, Y.R., Bergström, L. (2013). Dispersion and surface functionalization of oxide nanoparticles for transparent photocatalytic and UV-protecting coatings and sunscreens. *Science and Technology of Advanced Materials*, 14(2), 023001. doi:10.1088/1468-6996/14/2/023001
- [7] Barroso, G., Li, Q., Bordia, R. K., Motz, G. (2018). Polymeric and ceramic silicon-based coatings – A review. *Journal of Materials Chemistry A*. doi:10.1039/c8ta09054h
- [8] Smith, M.F. (2007). Comparing cold spray with thermal spray coating technologies. *The Cold Spray Materials Deposition Process*, 43–61. doi:10.1533/9781845693787.1.43
- [9] Spray Engineering Info, dostupné on-line na [www: https://www.tecpro.com.au/technical-info/spray-engineering-info/](https://www.tecpro.com.au/technical-info/spray-engineering-info/) [7.1.2023]

Cvičenie č. 5

Ciel' cvičenia

Cieľom cvičenia je vysvetliť študentom princíp vstupu nanorozmerných tuhých látok do bunky. Študenti po absolvovaní cvičenia porozumejú princípu vstupu látok do živých organizmov a budú sa vedieť orientovať aj v problematike mechanizmov toxicity. Budú vedieť vysvetliť, ako nanočastice, napr. striebra, ovplyvňujú životné funkcie buniek. Študenti si prakticky overia vplyv prostredia na životaschopnosť buniek vybranej zelenej riasy.

5 Vstup látok do buniek a mechanizmy toxicity

S rastúcim technickým pokrokom sa zvyšuje počet odvetví, ktoré využívajú nanomateriály. S tým sa súčasne neustále zvyšuje potreba výroby nových nanomateriálov (nanočastíc, nanokompozitov, nanovrstiev a pod.). Vďaka malej veľkosti nadobúdajú nanomateriály unikátne vlastnosti, ktoré zároveň pri určitých podmienkach môžu byť nebezpečné pre všetky živé organizmy. Ľudia môžu byť vystavení nanomateriálom vdýchnutím, kontaktom s pokožkou, požitím alebo injekciou, kedy sa tieto látky dostávajú priamo do krvného obehu. Okolité prostredie, zvieratá a rastliny môžu byť zasiahnuté nanočasticami rozptýlenými v ovzduší alebo vo vode.

Malá veľkosť umožňuje nanočasticám ľahšie prechádzať cez bunkové membrány a iné biologické bariéry, čím sa nanomateriály môžu ľahko dostať do živých organizmov a spôsobiť bunkovú dysfunkciu. Okrem toho, niektoré nanomateriály sú reaktívne alebo katalytické, a preto môžu byť potenciálne toxické. Z toho dôvodu, pre bezpečný vývoj nanotechnológií a bezpečné používanie komerčných nanomateriálov, by mala byť výroba nových nanomateriálov zároveň sprevádzaná výskumami zameranými na vyhodnocovanie rizika a bezpečnosti vznikajúcich materiálov. Je nutné poznať a pochopiť mechanizmy, ktorými sú nanočastice schopné transportovať sa do buniek živého organizmu, a zároveň poznať aj mechanizmy samotnej toxicity nanočastíc na bunku po ich preniknutí.

Najznámejšou a najčastejšie spomínanou látkou, ktorej toxické účinky využívali už starí Rimania, je striebro. Striebro sa ako dezinfekčný prostriedok využívalo aj v staroveku. Vtedy sa ešte nejednalo o nanostriebró, používali sa strieborné nádoby, v ktorých sa skladovali potraviny a strieborné príbory pri stolovaní, kde striebro zabezpečovalo antibakteriálne účinky. V súčasnosti, kedy je výroba nanočastíc striebra veľmi dobre prepracovaná a existuje množstvo metód na syntézu nanočastíc, sa často ako dezinfekčné prostriedky používajú koloidné roztoky striebra. Striebro má okrem antibakteriálnych účinkov aj mnoho ďalších vlastností, ktoré ho uprednostňujú pred ostatnými nanočasticami. Napríklad nanočastice Ag sú chemicky neutrálne ku všetkým tekutinám a liečivám vrátane antibiotík. Výskumy s koloidným striebrom ukázali, že väčšina baktérií a vírusov nedokáže proti nemu vyvinúť sebaobranný mechanizmus. Na účinky koloidného striebra sú najcitlivejšie hlavne jednobunkové organizmy. Koloidný roztok striebra vzniká disperziou nanočastíc Ag⁰ v roztoku, kde veľkosť častíc musí byť do 100 nm (bežne okolo 10 nm), inak by mohlo dôjsť k usadeniu častíc. Vírusy majú veľkosť od 15 do 150 nm, priemerná veľkosť buniek baktérií sa pohybuje okolo 0,3 - 2,0 μm, preto nanočastice

striebra môžu ľahko prenikať priamo do štruktúr patogénov a ničiť ich. Jednobunkových mikrobiálnych patogénov je viac než 97% zo všetkých druhov mikroorganizmov. Podľa zoznamu Svetovej zdravotníckej organizácie, k pôvodcom 670 klasifikovaných chorôb patria napr.:

- baktérie koky, enterokoky, mikrokoky, streptokoky, stafylokoky, pneumokoky, meningokoky, salmonely, bacily, vírusy HIV, chrípkové vírusy, huby a plesne, kandidy a iné.

Ako všetky látky, aj striebro má limity, ktoré stanovujú jeho toxicitu pre jednotlivé podmienky použitia. Pri veľmi nízkych koncentráciách $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ až $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (1-10 ppm) nebola dokázaná akútna cytotoxicita voči bunkám cicavcov, ale bola stanovená pri koncentráciách vyšších ako $30 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, čiže 30 ppm.

Treba pamätať aj na to, že striebro a jeho ióny zabíjajú nielen choroboplodné baktérie, ale aj baktérie telu prospešné až nevyhnutné, ako napr. baktérie rodu *Lactobacillus* a pod. Avšak nadmerné používanie koloidného striebra má negatívne účinky aj pre samotného človeka, kedy nadbytok striebra v tele spôsobuje chorobu nazývanú argýria⁶.

5.1 Vstup látok do buniek

Príjem a výdaj látok patrí medzi základné životné procesy nevyhnutné pre existenciu všetkých živých organizmov⁷ [1]. Táto komunikácia sa uskutočňuje cez bunkové povrchy, ktoré oddeľujú bunku od vonkajšieho prostredia. Veľký význam v tejto komunikácii má cytoplazmatická membrána, ktorá sa skladá z dvoch vrstiev lipidov, medzi ktorými sú molekuly bielkovín. Membrána je vďaka takejto štruktúre polopriepustná (semipermeabilná), čo znamená, že selektívne prepúšťa potrebné látky z a do bunky. Má polotekutý charakter, kde molekuly lipidov a bielkovín sa medzi sebou voľne pohybujú. Látky, ktoré membránou prechádzajú môžeme rozdeliť do 3 základných skupín:

1. látky ľahko prestupujúce, bez nejakých špecifických mechanizmov (pasívny transport), patria sem malé nábojovo neutrálne molekuly:
 - kyslík, dusík, voda, alkohol, močovina, prípadne niektoré hormóny alebo liečivá,
2. látky prechádzajúce priamo cez membránu (aktívny transport) s využitím špecifických proteínov (prenášačov), nachádza sa tu veľké množstvo látok metabolizujúcich v bunke, ktoré, aj keď sú veľmi malé, neprechádzajú cez membrány voľnou difúziou alebo osmózou:
 - cukry, aminokyseliny, karboxylové kyseliny,
 - jednoduché anorganické ióny: H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} ,

⁶ argýria alebo argyróza je stav spôsobený nadmerným vystavením chemickým zlúčeninám striebro alebo striebornému prachu. Najdramatickejším príznakom argýrie je, že koža sa zmení na modrú alebo modrosivú

⁷ bunka je najmenšia stavebná a funkčná jednotka všetkých živých organizmov. Existujú dva základné typy bunky, takzvané prokaryotické (neobsahujú jadro) a eukaryotické (obsahujú jadro). Prokaryoty sú jednobunkové organizmy, eukaryoty môžu byť jednobunkové alebo mnohobunkové

3. aktívny transport pomocou vytvorenia membránovej vezikuly⁸ na plazmatickej membráne, ktorá uzavretím obalí transportujúcu látku, čím dochádza k jej presunu do vnútra bunky,
týmto spôsobom sa transportujú:
- proteíny, vírusy alebo tuhé zložky potravy.

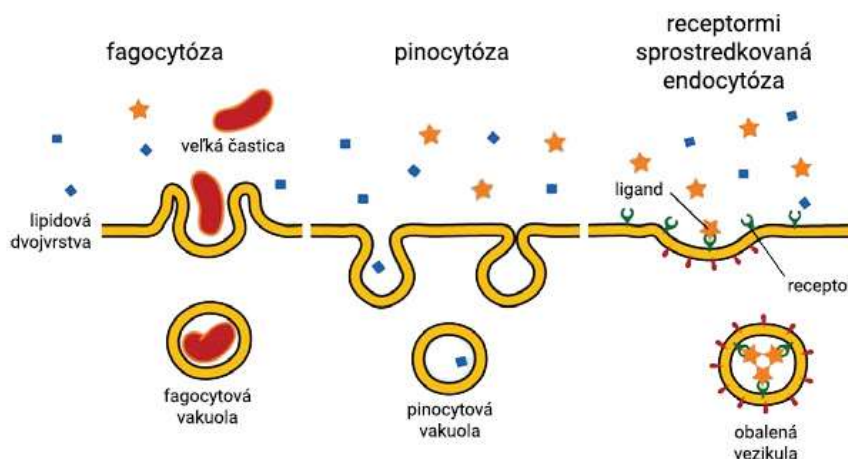
Veľké molekuly a častice, teda nano a mikročastice vytvorené umelým spôsobom, budú pri interakcii s bunkami využívať tretí spôsob transportu. Tieto mechanizmy sa nazývajú cytózy. Sú to veľmi dynamické procesy, ktoré zahŕňajú splývanie (fúziu) membrán, kedy sa vytvoria mechúriky obaľujúce transportované častice a následnú vezikuláciu, teda odštiepovanie mechúrikov. Cytózy môžu prebiehať na povrchu buniek, medzi bunkami, ale aj vo vnútri buniek. Podľa smeru transportu častíc delíme cytózy na:

- endocytózu – presun častíc do vnútra bunky,
- exocytózu – presun častíc z vnútra bunky do vonkajšieho prostredia.

Keďže endocytóza prebieha rýchlejšie ako exocytóza, pri vyšších koncentráciách sa nestačia transportované nanočastice úplne vylučovať a zostávajú v bunke, čím môžu spôsobiť poškodenie vnútrobunkových štruktúr.

Rozlišujeme tri druhy endocytózy, Obr. 16:

1. fagocytóza - grécky *fág* = jesť,
2. pinocytóza - grécke *pino* = nápoj,
3. receptormi sprostredkovaná endocytóza:
 - klatrinom sprostredkovaná endocytóza,
 - kaveolou sprostredkovaná endocytóza.



Obr. 16 Schematické znázornenie troch typov endocytózy [2]

Fagocytóza je prijímanie tuhých látok ($\geq 0,5 \mu\text{m}$) do bunky z okolitého prostredia. Fagocytujúce bunky majú schopnosť meňavkovitého (amébovitého) pohybu. Bunka môže

⁸ vezikula, čiže transportný vačok alebo membránový vačok je relatívne malá vnútrobunková štruktúra obklopená fosfolipidovou membránou (fosfolipidy patria medzi zložené lipidy obsahujúce fosfor a sú hlavnou časťou všetkých bunkových membrán). Úlohou vezikul je skladovať a transportovať niektoré zložitejšie organické látky a taktiež ich niekedy tráviť

meniť svoj tvar a pomocou plazmatickej membrány vytvára panôžky (pseudopódie), ktorými obalí častice, čím ich tak vznikom fagocytovej vakuoly uzavrie vo svojom vnútri. Fagocytóza u prvokov predstavuje základný spôsob prijímania potravy (týmto spôsobom sa niektoré jednobunkové organizmy živia). Mnohobunkovým živočíchom slúži fagocytóza ako nešpecifická vrodenná imunita. Fagocytóza sa u týchto živočíchov zúčastňuje na pohlcovaní baktérií, vírusov, odumretých a opotrebovaných buniek. Týmto spôsobom sa do bunky dostávajú aj nanočastice.

Pinocytóza predstavuje prijímanie látok vo forme roztoku (mimobunkové tekutiny). Bunky takto prijímajú látky rozpustené v extracelulárnej tekutine, napríklad živiny. Zväčša ide o malé častice, ale aj rôzne plyny. K príjmu látok dochádza preliačením plazmatickej membrány dovnútra bunky, čím vzniká priehlbina, ktorá sa zväčšuje a následným spojením okrajov vydutiny vznikne vezikula. Vezikula obsahuje časť okolitej tekutiny spolu s látkami, ktoré sú v nej rozpustené. Nakoniec dôjde k jej odtrhnutiu odškrténím vo forme malého mechúrka. Vezikula sa môže v bunke buď rozpadnúť, pričom jej obsah difunduje do cytoplazmy, alebo môže prísť k jej zlúčeniu s lyzozómom⁹ a k následnému štiepeniu látok, ktoré sa v nej nachádzajú.

Receptormi sprostredkovaná endocytóza predstavuje selektívny transport látok (hormónov, proteínov, metabolitov). Pri tomto procese sa makromolekula, ktorá má byť prenesená cez cytoplazmatickú membránu, najprv naviaže na konkrétny receptor. Receptory sú buď difúzne rozptýlené po povrchovej membráne, alebo sa hromadia v špecializovaných úsekoch, nazvaných „coated pits“. V prípade, že receptory sú rozptýlené po membráne, sa po naviazaní ligandu¹⁰ zhluknú. Z druhej strany cytoplazmatickej membrány je povlak tvorený polypeptidmi¹¹, z ktorých najväčší je klathrin. Molekuly klathrinu tvoria mriežku päť- a šesťuholníkov, akýsi kôš, ktorý vtiahne celú obalenú jamku s receptormi a naviazaným ligandom dovnútra bunky. Odškrténím vzniká opláštený, klathrinový vačok, tzv. dopravný vezikul, v ktorom je naviazaná časť predaná endozómom. V endozónoch sa receptor uvoľní z komplexu s ligandom a vracia sa v transportnom vaku späť do cytoplazmatickej membrány k opakovanému použitiu. Prenesená makromolekula zostáva v bunke. V porovnaní s podobnou, ale nešpecifickou pinocytózou je endocytóza sprostredkovaná receptorom viac než 1000x účinnejšia [3].

Kaveolou sprostredkovaná endocytóza - kaveoly sú stabilné morfológické jednotky na plazmatickej membráne definované predovšetkým svojím obalom. Kaveolám sa pripisuje mnoho rôznych funkcií, ako napríklad signalizácia a predovšetkým dobre regulovaná

⁹ lyzozómy sú sférické organely s jednoduchou membránou. Slúžia na odbúravanie endogénneho a exogénneho materiálu v bunkách a bunkových štruktúrach, ktoré stratili funkčnosť. V mŕtvych, alebo nevratne poškodených bunkách membrány lyzozómov praskajú a enzýmy rozložia celý obsah bunky

¹⁰ ligand v biochémii označuje látku, molekulu, ktorá vytvára komplex s biomolekulou. Ligand je signálna molekula, ktorá sa viaže na väzobné miesto cieľového proteínu. Väzba ligandov prebieha pomocou slabých molekulových interakcií, ako sú iónové väzby, vodíkové väzby alebo Van der Waalsove sily. Vďaka tomu je väzba ligandov väčšinou reverzibilná a len zriedkavo dochádza k tvorbe ireverzibilných kovalentných väzieb

¹¹ polypeptid je polymér aminokyselín spojených peptidovými väzbami. Peptid je organická chemická zlúčenina, ktorá vzniká zlúčením viac aminokyselín (max 100). Aminokyseliny v peptide sú navzájom pospájané amidovou väzbou, táto forma viazaná je nazývaná tiež peptidová väzba

endocytóza. Rozdiel medzi klatrinom a kaveolou sprostredkovanou endocytózou je v tom, že proces je podmienený hlavne zložením membrány [3]:

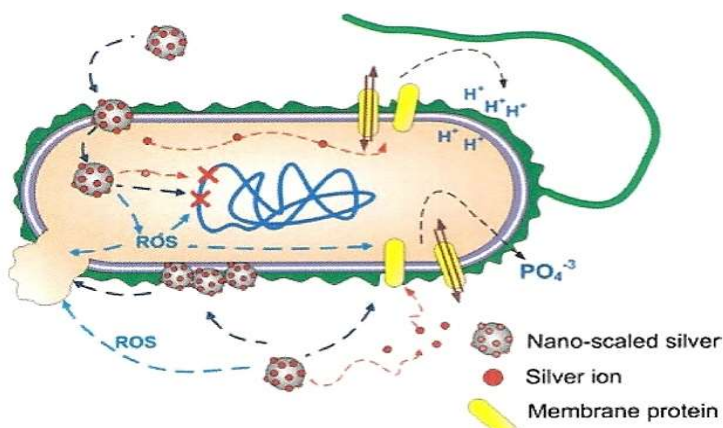
- klatrín - bielkoviny¹²,
- kaveoly – lipidy¹³.

5.2 Mechanizmy toxicity nanočastíc striebra

Keďže nanočastice sú menšie ako bunka, môžeme konštatovať, že sú schopné neriadene sa kamkoľvek premiestňovať a prenikať, a tým priamo poškodzovať bunky mikroorganizmov. Niektoré nanolátky, ako napr. striebro, dokážu vyvíjať toxicitu v každej forme, či priamo vo forme nanočastíc alebo aj uvoľňovaním iónov, ktoré sú pre bunku rovnako toxické. Niektoré štúdie uvádzajú, že iónové striebro vykazuje prudšiu toxicitu než nanočastice striebra. Vo vodnom prostredí sa však potvrdila vyššia toxicita nanočastíc v porovnaní s iónovým striebrom [4].

Mnohé výskumy boli zamerané na preukázanie biocídnych účinkov striebra na rôznych druhoch vírusov, baktérií, húb a rias, avšak len málo štúdií bolo zameraných na objasnenie mechanizmov, ktorými striebro toxicitu vyvíja. Z dostupných zdrojov vyplýva, že medzi najpravdepodobnejšie mechanizmy toxicity nanočastíc striebra alebo uvoľnených Ag^+ iónov patria, Obr. 17:

- narušenie funkčnosti bunkovej steny, bunkových membrán,
- tvorba ROS,
- poruchy replikácie DNA.



Obr. 17 Mechanizmy toxicity striebra a strieborných iónov [4]

¹² bielkovina alebo proteín je vysokomolekulárna prírodná látka, ktorej základ tvorí jeden alebo viac reťazcov zložených z jednotlivých aminokyselín. Z chemického hľadiska ide o kopolyméry (kombinované polyméry) vytvárané z monomérnych jednotiek L- α -aminokyselín spojených peptidovými väzbami

¹³ lipidy alebo tuky sú prírodné látky živočíšneho aj rastlinného pôvodu, málo rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Chemicky ide o látky skladajúce sa z uhlíka, vodíka a kyslíka. Lipidy sú estery vyšších karboxylových kyselín a alkoholov, respektíve ich derivátov. Patria do skupiny nepolárnych molekúl biogénneho pôvodu

Všetky negatívne účinky vyvolané toxicitou striebra majú vplyv na správnu funkciu metabolizmu mikroorganizmov, čo v konečnom dôsledku inhibuje ich rast, prípadne vyvolá chorobu buniek alebo ich usmrtenie.

5.2.1 Narušenie funkčnosti bunkových membrán

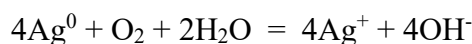
Pri priamej interakcii s bunkovou membránou sú nanočastice striebra schopné prilnúť k povrchu bunky a ovplyvňovať jej funkčnosť. Na vysvetlenie dôvodov interakcie nanočastíc s bunkou existujú dve hypotézy:

1. na základe prvej je pravdepodobnosť interakcie spôsobená elektrostatickou príťažlivosťou medzi navzájom opačne nabitými bunkovými membránami a nanočasticami (povrchový náboj nanočastice je ovplyvnený krycímí činidlami),
2. druhá hypotéza predpokladá, že nanočastice Ag^0 prilnú hlavne v miestach, v ktorých enzýmy bunkových membrán obsahujú síru alebo fosfor:
 - síra je potrebná pri syntetických procesoch, je súčasťou proteínov, v ktorých sa vyskytuje v redukovanej forme (thiolové skupiny) a tie sú súčasťou enzýmov dýchacieho reťazca,
 - fosfor je takisto dôležitý pri syntetických pochodoch. Väzbovým miestom interakcie iónov Ag^+ s bunkovou membránou sú napr. fosfolipidy. V dôsledku interakcie s fosforom dochádza k vychytávaniu fosforečnanov iónmi striebra a k ich úniku, výsledkom je:
 - a. výrazný nedostatok fosforu, ktorý spôsobí spomalenie rastu bunky,
 - b. vzájomná interakcia pôsobí na správnu funkčnosť bunky, zvyšuje sa priepustnosť membrán a zároveň sa narúša dýchanie bunky.

Pri nepriamej interakcii sú nanočastice schopné generovať ióny Ag^+ , ktoré takisto vplývajú na funkčnosť bunkových membrán. Uvoľňovanie iónov je výsledkom reakcie nanočastíc s H_2O_2 , k tejto reakcii dochádza v bunkových membránach, kde je vysoká koncentrácia H^+ iónov:



Druhým možným spôsobom pre oxidačné rozpustenie nanočastíc Ag^0 a uvoľňovanie iónov je reakcia:



Ióny Ag^+ sa podobne ako nanočastice viažu na transportné proteíny bunkových membrán a na fosfolipidy, ktoré:

- spôsobujú ich destabilizáciu,
- ovplyvňujú priepustnosť,
- narúšajú dýchanie.

5.2.2 Tvorba ROS

Nevyhnutnou súčasťou života aeróbných mikroorganizmov je tvorba reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré sa v bunkách tvoria prirodzene ako vedľajšie produkty pri metabolizme

kyslíka. Ku ROS patria napríklad: hydroxylový radikál, peroxid vodíka, superoxidový anión a singletový kyslík. ROS sa významne podieľajú na udržaní homeostázy bunky a zohrávajú aj dôležitú úlohu signálnych molekúl. Tvoria sa prevažne v organelách, ako je endoplazmatické retikulum, v peroxizómoch, ale najmä v mitochondriách. Zvýšená koncentrácia ROS môže spôsobiť významné poškodenie bunky, preto sú procesy generovania ROS v bunke zároveň aj neustále potláčané. Deje sa to špecifickými alebo nešpecifickými systémami, čím je udržaná ich veľmi nízka koncentrácia (menej ako 10^{-8} M) v bunke. ROS sú v bunke neustále produkované a eliminované, z čoho vyplýva, že je to dynamický parameter, ktorého množstvo je pri správnej funkcii bunky udržiavané v rovnováhe. Narušenie tejto rovnováhy vedie k oxidačnému stresu pri náraste koncentrácie, alebo k reduktívnemu stresu pri poklese koncentrácie ROS. [5, 6].

Oxidačný stres je teda nerovnováha medzi antioxidačnou kapacitou bunky a množstvom voľných radikálov. Tvorba oxidačného stresu je preto výsledkom poruchy rovnováhy na rôznych úrovniach v bunke. Z tohto dôvodu sa v bunke vyrábajú enzýmy, ktoré sú zodpovedné za detoxikáciu bunky a bojujú s oxidačným stresom. Antioxidačné enzýmy teda plnia obrannú funkciu.

Toxický potenciál nanočastíc striebra na bunky závisí od veľkosti a tvaru nanočastíc. Tieto charakteristiky určujú mieru vyvolania tvorby reaktívnych foriem kyslíka. Striebro ako kov pôsobí na mikroorganizmy v prítomnosti rozpusteného kyslíka ako katalyzátor a podporuje tvorbu voľných radikálov. Práve takto vyvolaná nadprodukcia ROS je mnohými štúdiami potvrdená ako hlavná príčina biotoxicity nanočastíc striebra [6].

Ich nadmerná tvorba vyvoláva v bunke oxidačný stres:

- ióny striebra vyvolávajú tvorbu voľných radikálov tým, že narúšajú enzýmy dýchacieho reťazca prostredníctvom vzájomnej interakcie s thiolovými skupinami týchto enzýmov, ktoré sú obsiahnuté v mitochondriách a v cytoplazme,
- Ag^+ zároveň potláčajú oxidačné reakcie ako je dehydrogenáza¹⁴, ktorá je potrebná pre redukčné pochody. Táto interakcia má za následok vznik ROS. Pri interakcii vzniká hlavne nebezpečný hydroxylový anión, ktorý znemožňuje dýchanie bunky,
- vysoká úroveň voľných radikálov priamo poškodzuje proteíny a lipidy bunkových membrán, mitochondrie, cytoplazmu a DNA.

Tvorba ROS vyvoláva morfológické zmeny v bunke:

- zmršťovanie cytoplazmy,
- odtrhnutie cytoplazmatickej membrány od bunkovej steny, čím bunková stena stráca funkčnosť selektívnej bariéry medzi vonkajším prostredím a vnútro bunky,
- poškodením cytoplazmatickej membrány dochádza k následnému úniku intracelulárneho obsahu,
- ROS zároveň spôsobuje kondenzáciu bunkového jadra - mutácie DNA.

¹⁴ dehydrogenáza je veľký enzymatický komplex, ktorý je prvým článkom v tzv. dýchacom reťazci bunkového dýchania. Hrá zásadnú úlohu pri procesoch bunkového dýchania a okysličenia

5.2.3 Poruchy replikácie DNA

DNA je nositeľkou genetickej informácie, ktorá určuje špecifické vlastnosti bunky, pri baktériách DNA vytvára jadrovú hmotu – nukleoid. Jadrová hmota baktérií na rozdiel od eukaryotov (rias, húb) nie je oddelená od cytoplazmy jadrovou membránou, čím sa stáva oveľa zraniteľnejšou. Ióny Ag^+ ako aj nanočastice po preniknutí do cytoplazmy začínajú negatívne ovplyvňovať funkčnosť DNA:

- dochádza k interakcii medzi iónmi Ag^+ a fosforečnanovou skupinou vytvárajúcou väzby v reťazci,
- podobne vplývajú ióny Ag^+ aj na plazmidy¹⁵,
- vzájomné interakcie spôsobujú kondenzáciu DNA a stratu schopnosti reprodukcie.

5.3 Praktické cvičenie

Úloha: Zostrojte rastové krivky pre zelenú jednobunkovú riasu *Ch. kessleri*. Riasu kultivujte v troch prostrediach: živný roztok Milieu Bristol, destilovaná voda a iónový roztok striebra s koncentráciou 0,98 mM.

Rastová krivka - postup

1. Do sterilného boxu umiestnite tri Erlenmeyerove banky, v každej bude po 50 ml roztoku. V prvej bude ako kontrola destilovaná voda, v druhej živný roztok Milieu Bristol a v tretej iónový roztok striebra.
2. Do všetkých pripravených roztokov naočkujte 1 očko rias.
3. Banky s riasou uskladnite pri izbovej teplote, kontinuálnom osvetlení a počas celej doby experimentu roztok minimálne 3x denne premiešavajte. Počas ~14 dní sledujte a vyhodnocujte množstvo rias v roztoku,
4. Vyhodnoťte:
 - hodnoty pH minimálne na začiatku a na konci skúšky,
 - každých 24 hod stanovte množstvo rias v 1 cm³,
 - zostrojte rastové krivky.
5. Do protokolu zapíšte presný postup experimentov aj s obrazovou dokumentáciou, výsledkami a diskusiou výsledkov. Na základe rastových kriviek porovnajte jednotlivé prostredia a vysvetlite ich vplyv na vitalitu buniek.

Pomôcky a zariadenia

Erlenmeyerove banky, biologické očko, živný roztok Milieu Bristol, iónový roztok striebra (AgNO_3), pH meter, svetelná rampa, sterilný box, počítačka buniek alebo Bürkerova komôrka.

¹⁵ plazmid je relatívne krátka, dvojvláknová, do kruhu uzavretá molekula DNA nachádzajúca sa v cytoplazme bunky. Plazmidy sú typické pre prokaryotické organizmy, ale vyskytujú sa aj u jednoduchých eukaryotov. Plazmidy nesú gény, ktoré nie sú nevyhnutné pre základné životné procesy v bunke, ale môžu sa stať nevyhnutnými za určitých špecifických podmienok. Častým príkladom génov umiestnených na plazmidoch baktérií je gén odolnosti voči antibiotiku

5.4 Kontrolné otázky

1. Popíšte princíp toxicity nanočastíc striebra. Aké účinky majú nanočastice striebra z lekárskeho hľadiska?
2. Aké sú mechanizmy toxicity nanočastíc striebra?
3. Koľko druhov endocytóz poznáme?
4. Schematicky znázornite tri druhy endocytózy.
5. Definujte lipidy. Aká je ich funkcia?
6. Čo je to ROS?
7. Aká koncentrácia nanočastíc striebra spôsobuje akútnu cytotoxicitu?
8. Definujte bielkoviny.

Literatúra

- [1] Kittnar, O., a kol. Lékařská fyziologie. Praha: Grada, 2011, s. 11. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [2] Príjem a výdaj látok, on line, dostupné na www: <https://biopedia.sk/bunka/prijem-a-vydaj-latok> [26.9.2022]
- [3] Endocytóza: typy a ich vlastnosti, funkcie, príklady - Veda - 2022 (warbletoncouncil.org).
- [4] Říhová Ambrožová, J., Čiháková, P., Škopová, V. Studium biocidních účinků nanočástic stříbra, Acta Environmentalica Universitatis Comenianae, 23, 1, 2015, 05-15. ISSN 1335-0285.
- [5] Požgayová, M. Vliv oxidativního stresu na proteom bioloužících bakterií, Diplomová práce, 2017, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Ústav biochemie, Brno.
- [6] Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q., & Li, P. (2020). Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field. Nanoscale Research Letters, 15(1). doi:10.1186/s11671-020-03344-7

Cvičenie č. 6

Cieľ cvičenia

Cieľom cvičenia je osvojiť si základy z oblasti toxikológie a zvlášť ekotoxikológie. Študenti sa oboznámia so základným rozdelením testov toxicity, legislatívou a základnými pojmami v tejto oblasti. Naučia sa postupy pri vykonávaní testov toxicity a princíp vyhodnocovania testov.

6 Toxikológia, toxicita, ekotoxikológia a ekotoxicita

Pojmy ako toxikológia, toxicita, ekotoxikológia a ekotoxicita, prípadne jedovatosť sú dôležité aj v oblasti materiálových vied, hlavne ak sa jedná o materiály so štruktúrou nanometrických rozmerov. Preto je nevyhnutné zadefinovať tieto pojmy a vedieť sa orientovať v možnostiach stanovovania toxických vlastností.

Vznik slova toxikológia je možné vysvetliť spojením gréckych slov *toxón* (šíp) alebo *toxikon* (jedovatá látka) a *logos* (veda, rozprava). Toxikológia je medicínsky vedný odbor, ktorý využíva poznatky biologických vied, ako sú napr.: molekulárna biológia, genetika, botanika, zoológia, mikrobiológia, alebo lekárske a chemické vied ako: analytická, anorganická, organická chémia a biochémia. Okrem zosumarizovania poznatkov o jedoch a ich účinkoch sa zaoberá vzájomným pôsobením chemických látok a živého organizmu. Toxikológia je príbuzná farmakológii, ktorá študuje priaznivé aj nepriaznivé účinky liečiv [1, 2].

Toxicita je schopnosť látky poškodzovať živý organizmus. Závisí od jej fyzikálno-chemických vlastností, spôsobu vstupu látky do organizmu, metabolizmu látky, frekvencie podania, veľkosti dávky a pod. Toxicita je veľmi široký pojem a existuje množstvo metód jej klasifikácie a hodnotenia.

Ekotoxikológia je vedná disciplína, ktorá sa zaoberá štúdiom a hodnotením vplyvu toxických látok na organizmy v ich prostredí [1]. Ekotoxikológia je v súčasnosti chápaná ako interdisciplinárny vedný odbor kombinujúci predovšetkým poznatky vedy študujúcej ekosystémy (ekológia) a vedy študujúcej interakcie chemických látok so živými organizmami (toxikológia).

Ekotoxicita je vlastnosť látky, ktorá má buď okamžitý alebo oneskorený nepriaznivý účinok na životné prostredie tým, že je bioakumulovaná¹⁶ alebo pôsobí toxicky na biotické systémy.

Hlavný rozdiel medzi toxikológiou a ekotoxikológiou je v tom, že toxikológia, ako vedný odbor sleduje pomocou rôznych metód účinky škodlivín, resp. jedov na laboratórne zvieratá s cieľom interpretácie výsledkov na človeka, kým ekotoxikológia pracuje s biologickými modelmi nachádzajúcimi sa priamo v danej lokalite, inými slovami sa zaoberá negatívnym pôsobením toxických látok na organizmy, populácie, spoločenstvá a ekosystémy.

¹⁶ bioakumulácia predstavuje nárast koncentrácie cudzorodých látok v tkanivách organizmov v dôsledku expozície z prostredia alebo príjmu z potravy

Výsledky toxikologických a ekotoxikologických sledovaní poskytujú exaktné informácie, ktoré môžu indikovať riziká súvisiace so vstupom xenobiotík¹⁷ do ekosystémov, vrátane ľudskej populácie [2].

6.1 Ekotoxikológia

Vedná disciplína ekotoxikológia je pomerne mladý vedný odbor, ktorý stojí na hranici medzi odbormi environmentálnej chémie, toxikológie, ekológie a biológie. Je dôležitou medziodborovou vednou disciplínou zaoberajúcou sa posudzovaním stavu životného prostredia a vplyvu ľudskej činnosti na životné prostredie. Zatiaľ najpodrobnejšie rozpracovaná časť sa týka expozície a následnej intoxikácie živých organizmov vo vodnom (akvatickom) prostredí. Ekotoxikológia sa zaoberá predovšetkým štúdiom a hodnotením vplyvu škodlivých látok na voľne žijúce organizmy v ich prostredí, prípadne pôsobením škodlivých látok zo životného prostredia na človeka, či už priamo zo zložiek prostredia (voda, pôda, vzduch), alebo aj prostredníctvom prirodzených, alebo človekom riadených procesov. Ako o samostatnej vednej disciplíne sa o ekotoxikológii začalo hovoriť až od konca 60. rokov 20. storočia [2].

Toxicita je v kontexte ekotoxicity definovaná ako účinok cudzorodých látok na spoločenstvá organizmov (rastlín a živočíchov). Jedná sa o mieru vplyvu toxických látok spôsobujúcich chorobné zmeny na živých organizmoch. Toxicita látok voči životnému prostrediu sa nedá hodnotiť jednoduchou kvantifikovateľnou veličinou, preto nie je možné stanoviť „hodnoty“ ekotoxicity dvoch látok a vzájomne ich porovnať. Testované látky sú na základe vykonaných testov buď negatívne alebo pozitívne. Ekotoxikologické testy sa delia podľa viacerých hľadísk, nižšie v texte sú uvedené len niektoré z nich:

- podľa doby expozície: akútne, semiakútne, semichronické a chronické,
- podľa priebehu testu: statické, semistatické a prietokové,
- podľa pokročilosti testovacieho systému:
 - 1. generácia (klasické testy) - výhodou je vysoká jednoduchosť, opakovateľnosť a porovnateľnosť výsledkov, výsledky sú validované. Nevýhodou je obmedzená a vysoko špecifická výpovedná hodnota a taktiež obmedzený počet štandardizovaných postupov. Navyše sú tieto testy vhodné skôr na stanovenie akútnych účinkov,
 - 2. generácia (mikrobiotesty) - alternatívne testy a mikrobiotesty, ktoré zatiaľ neboli regulujúcimi organizáciami validované. Ich výhodou je predovšetkým miniaturizácia a skrátenie inkubačnej doby, rýchlosť a jednoduchosť. Mikrobiotesty možno rozdeliť do troch skupín, a to na mikrobiotesty využívajúce pokojové štádiá zooplanktónu, riasové mikrobiotesty a bakteriálne testy toxicity,
 - 3. generácia (biosenzory, biosondy, biomarkery) - biosenzory patria do skupiny chemických senzorov a využívajú vysokú citlivosť a selektivitu aktívnych biologických látok alebo živých organizmov (pstruh potočný *Salmo trutta*). Biomarkery sú biochemickými, fyziologickými alebo histologickými indikátormi expozície alebo

¹⁷ xenobiotikum - cudzorodá látka, ktorá je organizmu alebo prostrediu cudzia, nie je produktom ani medziproduktom fyziologického metabolizmu

vpływ xenobiotík. Medzi biosondy je možné zaradiť čipy implantované, napr. pod kožu rýb, ktoré zaznamenávajú biochemické a hematologické zmeny nositeľa.

- 4. generácia (on-line systémy s diaľkovým prenosom dát),

- podľa trofickej¹⁸ úrovne testovaných organizmov sa biotesty 1. generácie delia na:
 - biotesty s producentmi - riasové testy toxicity (so sinicami, s morskými či so sladkovodnými riasami; môžu využívať jednodruhové alebo multidruhové kultúry) a biologická skúška na *Lemna minor* a *Lemna gibba*, pri ktorých sa sleduje inhibícia rastu,
 - biotesty s konzumentami - bezstavovce (hmyz, kôrovce, obrúčkavce), stavovce (ryby, obojživelníky),
 - biotesty s deštruentmi - baktérie (testy jednodruhové alebo s komplexnými spoločenstvami baktérií, najčastejšie sa hodnotí inhibícia rastu alebo definovaná metabolická aktivita), mikrobiálne testy na kvasinkách a vláknitých hubách,
- podľa testovanej matrice: voda, pôda, vzduch, sediment, odpad, chemická látka.

Toxické účinky danej látky závisia od jej koncentrácie a dávky, spôsobu kontaktu s organizmom, od metabolitov látky a od miesta účinku.

Účinok je odpoveďou organizmu na expozíciu látkou, kde je možné hodnotiť buď:

- účinok akútny – bezprostredný po jednorazovej dávke toxickéj látky,
- účinok chronický – po dlhodobom styku s látkou.

Veľmi dôležitým pojmom je dávka, čo predstavuje množstvo toxickéj látky, ktoré sa dostane do organizmu a je ním absorbované. Uvádza sa v hmotnostných jednotkách na jednotku hmotnosti organizmu za jednotku času (napr. mg/d, kg/d).

Dávka, rovnako ako účinok, sa delí na dávku:

- akútnu - koncentrácia, ktorá zvyčajne spôsobí smrť organizmu,
- chronickú - koncentrácia, hlboko pod prahovou hodnotou s dlhodobým pôsobením.

6.1.1 Legislatíva

V Slovenskej republike sú pre ekotoxikologické testy odporúčané metódy identické s európskymi ISO a OECD normami, nižšie je uvedených niekoľko noriem na stanovenie toxicity:

- STN EN ISO 6341: 2013-08: Kvalita vody. Stanovenie inhibície pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Skúška akútnej toxicity (ISO 6341: 2012). 24-48 hod test pri štandardných podmienkach. (C.2/OECD 203)
- STN 83 8303: 1999: Skúšanie nebezpečných vlastností odpadov. Ekotoxicita. Skúšky akútnej toxicity na vodných organizmoch a skúšky inhibície rastu rias a vyšších kultúrnych rastlín.

¹⁸ trofický - výživný, výživový, potravný

- STN EN ISO 7346-1: 1999. Kvalita vody. Stanovenie akútnej letálnej toxicity látok na sladkovodných rybách [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. Časť 1: Statická metóda (ISO 7346-1: 1996 alebo C.1/OECD 203).
- STN EN ISO 7346-2: 1997: Kvalita vody. Stanovenie akútnej letálnej toxicity látok na sladkovodných rybách [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. Časť 2: Semistatická metóda.
- STN EN ISO 8692: 2005-02: Kvalita vody. Skúška inhibície rastu sladkovodných rias *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum*. (C.3/OECD 201).
- STN EN ISO 10260 (1999): Kvalita vody. Meranie biochemických parametrov. Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie chlorofylu a.
- STN EN ISO 20079: Kvalita vody. Stanovenie toxického účinku zložiek vody a odpadovej vody na *Lemna minor* (žaburinku). Skúška inhibície rastu (ISO 20079: 2005) – 7 dní pri štandardnom osvetlení v živnom médiu sa sleduje počet stielok.
- STN EN ISO 11348-2: 2009: Kvalita vody. Stanovenie inhibičného vplyvu vzoriek vody na svetelnú emisiu *Vibrio fischeri* (Skúška luminiscenčných baktérií). Časť 2: Metóda používajúca dehydrované baktérie.

Základným podstatným údajom hodnotiaci toxicitu, ktorý uvádza aké percento testovacích jedincov reaguje po expozícii s testovanou látkou, je ED (effective dose) - efektívna dávka (účinná dávka, účinná koncentrácia) a EC (effective concentration) efektívna koncentrácia:

- ED - efektívna dávka = účinná dávka - uvádza, aké percento testovacích jedincov reaguje po expozícii testovanou látkou.
- ED₅₀ - efektívna dávka, pri ktorej reaguje 50% testovacích jedincov.
- ED₀ - efektívna dávka, pri ktorej nereaguje žiadny testovaný jedinec.
- ED_x - efektívna dávka, pri ktorej reaguje x% testovacích jedincov.
- EC₅₀ je polovica maximálnej efektívnej koncentrácie (half maximal effective concentration), je to miera koncentrácie látky, ktorá vyvoláva 50% reakciu, teda 50% úhyn, prípadne 50% zníženie rastu alebo rastovej rýchlosti vo vzťahu ku kontrolnej vzorke. EC₅₀ je miera koncentrácie vyjadrená v molárnych jednotkách M, kde 1 M je ekvivalentné 1 mol/l.

Miera toxicity sa v prípade vysoko toxických látok vyjadruje „smrteľnou dávkou“ LD (lethal dose) alebo pre plyny a pary „smrteľnou koncentráciou“ LC (lethal concentration).

- LC₅₀ je špeciálny prípad EC₅₀. LC₅₀ je letálna koncentrácia látky, ktorá je smrteľná pre 50% organizmov v teste toxicity. LC₅₀ možno určiť pre akúkoľvek dobu expozície, ale najbežnejšia doba expozície je 96 hodín. Ďalšie bežné doby trvania sú 24, 48 a 72 hodín.
- LC_x - najnižšia letálna koncentrácia chemickej látky vo vzduchu, ktorá môže spôsobiť úmrtie človeka alebo úhyn zvieratá.
- LD₅₀ - letálna dávka, je to množstvo látky podanej naraz, ktorá spôsobí smrť 50% skupiny pokusných jedincov, inou ako inhalačnou cestou. Zvyčajne sa vyjadruje ako množstvo podanej látky, napr. mg na 100 g (pre menšie zvieratá) alebo na kg telesnej hmotnosti testovaného zvieratá (pre väčšie testované subjekty: potkan, myš). Látka je tým toxickejšia, čím je nižšia jej číselná hodnota LD₅₀. Pri hodnotách LD sa uvádza

druh testovacieho organizmu (myš, potkan, pes atď.) a spôsob podania testovanej látky (tráviacou sústavou, kožou a pod.).

- LD_x - letálna dávka chemickej látky, pri ktorej uhynie x% testovacích jedincov.
- IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) je mierou účinnosti látky pri inhibícii špecifickej biologickej alebo biochemickej funkcie. IC_{50} je kvantitatívna miera, ktorá udáva, koľko konkrétnej inhibičnej látky (napr. liečiva) je potrebné na in vitro inhibíciu daného biologického procesu alebo biologickej zložky o 50%. Hodnoty IC_{50} sú typicky vyjadrené ako molárna koncentrácia.

Ďalšími základnými údajmi o akútnej toxicite sú hodnoty:

- NOAEL - najvyššia dávka alebo expozičná koncentrácia testovanej vzorky, ktorá nevyvolá žiadne pozorovateľné účinky v porovnaní s kontrolnou skupinou (No Observable Effect Level).
- LOAEL - najnižšia dávka alebo expozičná koncentrácia testovanej vzorky, pri ktorej sú pozorované účinky na organizmus v porovnaní s kontrolnou skupinou (Lowest Observable Adverse Effect Level).
- NOAEC - koncentrácia, pri ktorej nebol pozorovaný škodlivý účinok (No Observable Effect Concentration).
- LOAEC - najnižšia koncentrácia, pri ktorej bol pozorovaný škodlivý účinok (Lowest Observable Adverse Effect Concentration).

6.1.2 Testy toxicity

Toxicita látky alebo aj jedovatosť je schopnosť látky spôsobiť poškodenie organizmu, okrem jedovateho účinku sem patria aj karcinogénny, teratogénny, mutagénny účinok a genotoxicita, Tab. 5. Pri posudzovaní toxicity je kľúčová koncentrácia toxického látky a doba jej pôsobenia.

Tab. 5 Účinky toxicity

Akútna toxicita (do 24 hod., 48 hod.)	Rýchla smrť (letálny účinok)
Chronická toxicita (týždne, viac ako 3 mesiace)	Porucha rastu, rozmnožovania
Karcinogénne účinky látok	Porucha orgánov (vznik nádorov), smrť
Mutagénne účinky látok	Porucha orgánov (mutácia buniek), smrť
Teratogénne účinky látok	Priamy vplyv na budúce generácie
Genotoxicita látok	Možný vplyv na budúce generácie

Pri hodnotení vzorky sa používa odporúčaná sekvencia testov, ktorá zahŕňa limitný test, overovací test, orientačný test a základný test. Limitným testom sa zisťuje, či látka vykazuje toxické účinky (100% eluent alebo koncentrácia 100 mg.l⁻¹). Ak je limitný test negatívny (nie je pozorovaná odpoveď testovaného systému), nasleduje overovací test. Ak je overovací test negatívny, testovanie sa končí. Ak je overovací test pozitívny, rovnako ako pri pozitívnom výsledku limitného testu s odpoveďou >50% (miera sledovanej odpovedi >50%), nasleduje orientačný test (stanovuje rozmedzie, v ktorom možno očakávať hodnotu EC_{50} , výsledkom je najvyššia orientačná koncentrácia vzorky OC 0, ktorá nemá účinok na testovaný organizmus a najnižšia orientačná koncentrácia OC 100, pri ktorej dochádza k 100% odpovedi testovaného systému). Pomocou výsledkov orientačného testu sa pripraví koncentračný rad, ktorý sa použije pre základný test. Výsledkom základného testu je určenie hodnoty EC_{50} (LC_{50} , IC_{50}) [3].

Toxicita sa podľa rýchlosti pôsobenia látky na organizmy delí na akútnu a chronickú toxicitu. Pri akútnej toxicite sa jedovatý účinok prejavuje veľmi rýchlo, vždy po niekoľkých minútach či hodinách. Pri chronickej toxicite sa účinok prejaví po týždňoch, mesiacoch. Kým pri akútnej toxicite je ovplyvnený priamo jej vystavený organizmus, pri chronickej toxicite sa jej prejavy zisťujú až na ďalších vývojových generáciách (problémy s plodnosťou, degenerácia na potomkoch, ...). Prechodnou kategóriou medzi testami akútnej a chronickej toxicity sú testy semichronickej toxicity, založené na hodnotení fyziologických prejavov s obdržaním výsledkov v krátkej dobe (počas 5 až 7 dní). Vodohospodárska toxikológia sa zaoberá hlavne akútnou toxicitou, založenou na testoch akútnej toxicity [4].

6.1.2.1 Testy akútnej toxicity

Testy akútnej ekotoxicity slúžia na hodnotenie toxických látok, ktorých účinky sa prejavujú v krátkom čase po jednorazovom podaní látky. V praxi sa test akútnej toxicity stanovuje na perloočkách, semenách, riasach a baktériách. Dôležitými parametrami pri použití akútnych testov toxicity je hodnota LC_{50} , pri testoch inhibičných potom hodnoty IC_{50} a EC_{50} . Pri akútnej toxicite na živočíchoch sa zisťuje úmrtnosť, teda mortalita. Pre správne stanovenie týchto hodnôt je potrebné zadefinovať nasledovné podmienky:

- doba pôsobenia toxického látky,
- zadefinovaný organizmus,
- teplota a svetelný režim.

6.1.2.2 Semichronické testy

Pri testoch semichronickej toxicity sú testované organizmy vystavené opakovanej dennej expozícii chemickej látky, alebo môže ísť o expozíciu po významnú časť života testovaného organizmu. Dávka testovanej látky je o niečo nižšia ako v prípade akútnych testov toxicity.

Semichronické testy sa od testov akútnej toxicity líšia druhom testovaných organizmov. V prípade akútnej toxicity testy prebiehajú na živých organizmoch, kým v semichronických testoch využívame semená rastlín [5]. Rozdiel predstavuje interpretácia získaných výsledkov. Postup práce je viacmenej zhodný, výsledky musia byť prezentované podľa príslušného testu a vzorca pre výpočet. Inhibícia pre rast koreňa rastliny pri semichronickej toxicite sa stanovuje podľa vzťahu:

$$I = \frac{H_k - H_v}{H_k} 100 \quad (\%) \quad (2)$$

kde I - inhibícia rastu koreňa,

H_k - priemerná dĺžka koreňa meraná v kontrole (mm),

H_v - priemerná dĺžka koreňa meraná v pre danú koncentráciu (mm),

Príklady organizmov využívaných pri akútnych a semichronických testoch, Obr. 18:

- test inhibície rastu koreňa kultúrnej rastliny - semená: *Sinapis alba* L. (horčica biela, vyššia rastlina), expozičná doba 72 hod,
- test inhibície rastu žaburinky menšej (vyššia vodná rastlina) - *Lemna minor*,
- stanovenie akútnej toxicity látok na sladkovodnej rybe - *Brachydanio rerio* alebo *Poecilia reticulata*,

- v oblasti odpadov - perloočka – *Daphnia magna* (kôrovce) expozičná doba 48 hod,
- respiračný test s aktivovaným kalom - mikroorganizmy *Vibrio fischeri*,
- kvalitatívna metóda - diskový difúzny test (DDT) - *Escherichia coli*¹⁹, *Desmosesmus*.



Obr. 18 Semená *Sinapis alba* L.; *Lemna minor*; *Brachydanio rerio*; *Poecilia reticulata*; *Escherichia coli*; *Desmosesmus*; *Daphnia magna*; *Vibrio fischeri* (zľava doprava)

6.1.2.3 Chronické testy

Testy chronickej toxicity sa využívajú na zhodnotenie nepriaznivých vplyvov toxických látok pri ich dlhodobom pôsobení na organizmy. Prejavy dlhodobého pôsobenia toxikkej látky na organizmus sa prejavia väčšinou až na ďalších vývojových štádiách testovaných organizmov. Výsledky testov semichronickej aj chronickej toxicity slúžia na stanovenie hodnôt NOAEL a LOAEL.

6.2 Kontrolné otázky

1. Definujte pojem toxicita a ekotoxicita.
2. Aké je rozdelenie testov toxicity podľa doby expozície?
3. Definujte hodnoty ED, EC₅₀, LD₅₀ a IC₅₀. Aký je medzi nimi rozdiel?
4. Zostrojte vývojový algoritmus testovania a slovne ho popíšte.
5. Nájdite v dostupnej literatúre informácie o testoch delených podľa priebehu testu: statické, semistatické a prietokové. Popíšte jednotlivé testy aj s príkladmi použitých organizmov a postupmi skúšok.

Literatúra

- [1] Máchová, J., Svobodová, Z., Vykusová, B. Ekotoxikologické hodnocení výluhů tuhých průmyslových odpadů. Vodňany: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, 1994, 50 s. ISBN 8085887002.
- [2] Pauková, Ž. Základy toxikologie a ekotoxikologie, Nitra 2020, Vydala Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre vo Vydavateľstve SPU, s. 70. ISBN 978-80-552-2165-6

¹⁹ *Escherichia coli* (*E. coli*) je anaeróbná gramnegatívna bíchkatá tyčinkovitá baktéria žijúca v hrubom čreve teplokrvných živočíchov. Je jedným z najdôležitejších zástupcov črevnej mikrobioty a jej prítomnosť je potrebná pre správny priebeh tráviacich procesov v čreve

- [3] Kočí, V., Mocová, K. Ekotoxikologie pro chemiky. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2009, 199 s. ISBN 978-80-7080-699-9.
- [4] Ambrožová, J. Aplikovaná a technická hydrobiologie, Vydavatelství VŠCHT, 2007, s. 226. ISBN 9788070805213
- [5] Takáčová, A., Semerád, M., Filová, A., Molnárová, M., Fargašová, A. Cvičenia z ekotoxikológie, Katedra environmentálnej ekológie, 2018, on line, dostupné na [www: https://enviro-edu.sk/pluginfile.php/163/block_html/content/Cvic%CC%8Cenia%20z%20ekotoxikolo%CC%81gi_fin_dopl.MM.pdf](https://enviro-edu.sk/pluginfile.php/163/block_html/content/Cvic%CC%8Cenia%20z%20ekotoxikolo%CC%81gi_fin_dopl.MM.pdf) [26.9.2022]

Cvičenie č. 7

Cieľ cvičenia

Cieľom cvičenia je stanoviť toxicitu nanočastíc striebra, zlata a iónového roztoku striebra na jednobunkovej riaske *Ch. kessleri* a semenách horčice bielej. Študenti si pri experimentoch vyskúšajú postupy pri stanovovaní toxicity kovových nanočastíc, precvičia si laboratórne zručnosti, naučia sa vyhodnocovať testy toxicity a stanovovať stupeň toxicity zvolených látok.

Poznámka: teória aj postupy experimentov sú prispôsobené k možnostiam laboratória nanomateriálov na Ústave materiálov a inžinierstva kvality, FMMR, TUKE.

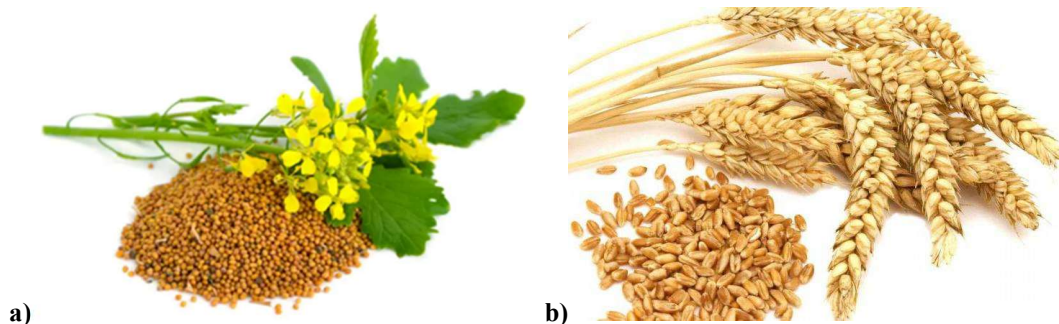
7 Test na zelených riasach a na vyšších rastlinách

7.1 Test toxicity na vyšších rastlinách

7.1.1 Charakteristika organizmov

Horčica biela, Obr. 19a), je rastlina z rodu horčica (*Sinapis*), patrí do čeľade kapustovitých (*Brassicaceae*). Pestuje sa v celej Európe. Má vysokú stonku (do 1 m). Je to jednoročná, skoro jarná rastlina, jej drobné olejnaté semená obsahujú 20–25% oleja, cca. 25% proteínov a glukozinolát sinalbín.

Pestuje sa predovšetkým pre semeno, z ktorého sa vyrábajú doplnky jedál. Olej je využívaný v potravinárskom priemysle, na technické účely, na výrobu mydiel, vo farmaceutickom a kozmetickom priemysle. Rastlina zároveň patrí medzi krmné plodiny. Semeno rastliny je na kapustovité rastliny pomerne veľké, je žlté alebo belavo žlté, guľovitého tvaru. Dosahuje priemer 1,5 - 4 mm, hmotnosť tisícich semien sa pohybuje od 3 do 6,8 g [1].



Obr. 19 a) Stonka s kvetmi a semená horčice bielej [2]; b) pšenica letná [3]

Pšenica letná je najrozšírenejšia obilnina, Obr. 19b). Dorastá do výšky 50-130 cm a je to jedno alebo dvojročná trsnatá tráva. Celé zrno obsahuje v 100 g približne: 1450 kJ (350 kCal), 12 g bielkovín, 2 g tukov, 70 g glycidov, 2 g nestráviteľných súčastí (buničiny), 40 mg vápnika, 330 mg fosforu, 3,71 mg železa, 120 mg horčika a ďalej menšie množstvá vitamínov B1, B2, B6 a PP, stopové množstvá vitamínov C a A. Pšeničné zrno sa skladá z jadra (endospermu), aleurónovej vrstvy (nachádza sa pod obalovými vrstvami zrna, pod otrubami), z obalových častí a klíčka.

7.1.2 Krátkodobé testy klíčivosti na semenách *Sinapis alba*

Krátkodobé testy (Short-term Test of Germination) boli vyvinuté na overenie neškodnosti úžitkových vôd získaných z prečistených odpadových vôd, ktoré by mohli byť použité napríklad pre zavlažovanie poľnohospodárskych plodín. Testuje sa vplyv vody na klíčenie semien a rast koreňov horčice bielej *Sinapis alba* alebo pšenice letnej *Triticum aestivum* (odroda: Akira „E3“) v počiatočných štádiách vývoja [1]. V testoch toxicity predstavujú horčica a pšenica zástupcov kultúrnych plodín a vyšších rastlín. Tento test je zároveň možné použiť aj na overovanie vplyvu toxicity iných ako odpadových roztokov, napr. koloidných roztokov nanočastíc kovov.

Základný test spočíva v kultivácii semien na podložkách (filtračný papier) nasýtených roztokmi skúmanej látky a porovnáva sa so semenami, ktoré rastú na podložke nasýtenej kontrolnou kvapalinou, najčastejšie destilovanou vodou.

Vzhľadom k možným zmenám stavu semien a klíčivosti, je potrebné pred testom overiť kvalitu semien a podmienky testovania pomocou testu toxicity na štandardne (roztok $K_2Cr_2O_7$). Testy akútnej toxicity so štandardmi sa vykonávajú a vyhodnocujú za rovnakých podmienok, a rovnakým spôsobom ako základné testy. Rozpätie EC_{50} , ktoré má kultúra pri dobe kultivácie 72 hodín splňať je 10-50 mg/l. V takom prípade je ju možné použiť na test toxicity.

7.1.2.1 Test inhibície rastu koreňa horčice bielej

Pri tomto teste sa využíva citlivosť klíčiacych semien, v počiatočných štádiách vývoja rastliny, na prítomnosť toxických látok v roztoku. Skúška prebieha počas 72 hodín pri teplote okolia (20-22°C). Vzorky sú počas testovacej doby uchovávané v tme. Princíp testu spočíva v kultivácii semien pri uvedených podmienkach a pri rôznych koncentráciách toxickej látky prítomnej v testovanom médiu.

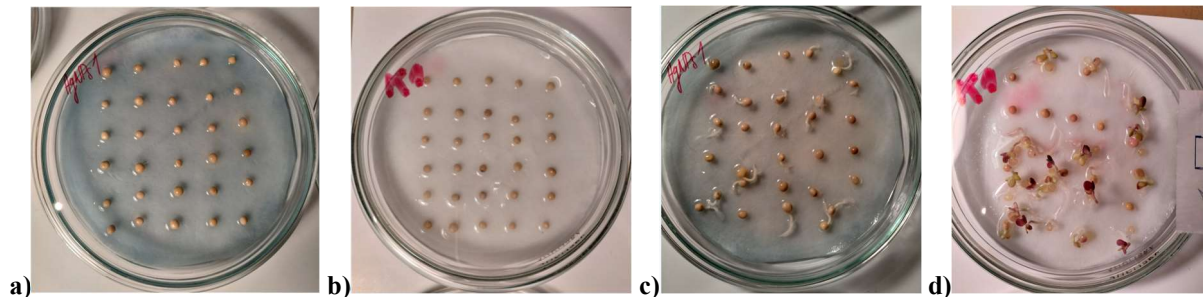
Najprv sa robí predbežná skúška, pri ktorej sa testuje nezriedená látka (tri paralelné skúšky na 30 semenách a dávka testovaného roztoku je 10 ml). Súčasne sa robí aj skúška s kontrolou. Z výsledkov troch paralelných skúšok sa vypočíta aritmetický priemer. Výsledok je buď pozitívny alebo negatívny [4].

Skúška je negatívna, ak v porovnaní s kontrolou je inhibícia rastu koreňa <30% alebo stimulácia <75%. Skúška je pozitívna, ak v porovnaní s kontrolou je inhibícia rastu koreňa $\geq 30\%$ alebo stimulácia $\geq 75\%$. Ďalšie skúšky sa nerobia ak, v porovnaní s kontrolou, je inhibícia rastu koreňa $\geq 30\%$ a <50% alebo stimulácia $\geq 75\%$. V teste sa pokračuje základnou skúškou ak, v porovnaní s kontrolou, je inhibícia rastu koreňa $\geq 50\%$ a stanovuje sa hodnota IC_{50} [4].

Postup základnej skúšky

1. Do Petriho misky (s priemerom 120-140 mm) sa položí filtračný papier (v dvoch prípadne troch vrstvách alebo sa položí tenká vrstva vaty, ktorá sa prikryje filtračným papierom, používa sa filtračný papier s veľkosťou pórov $>10\ \mu m$), ktorý sa nasýti testovaným roztokom. Štandardne sa testuje 10 ml roztoku. Roztok sa riedi v rôznych koncentráciách (zvyčajne sa pripraví 5 až 10 riedení) a pripravujú sa tri paralelné skúšky z každej koncentrácie.

2. Do každej Petriho misky (už s testovaným roztokom) sa poukladajú semená tak, aby medzi nimi bola dostatočná vzdialenosť a aby pri klíčení nedošlo k vzájomnému ovplyvneniu sa koreňkov, Obr. 20a). Rovnakým postupom sa pripraví aj kontrola, Obr. 20b), ako kontrolný roztok sa používa destilovaná voda alebo zried'ovacia voda²⁰ [4, 5].



Obr. 20 Petriho misky s poukladanými semenami horčice bielej: a) koloidný roztok nanočastíc striebra; b) kontrola; c) koloidný roztok nanočastíc striebra po 72 hod; d) kontrola po 72 hod

3. Po 72 hodinách sa presne odmeria dĺžka koreňov každej rastliny a pri každej koncentrácii riedeného roztoku Obr. 20c, d).
4. Hodnoty IC_{50} sa vyhodnocujú pre každú paralelnú skúšku zvlášť a vypočíta sa z nich aritmetický priemer. Jednotlivé hodnoty sa nesmú líšiť o viac ako 30% [4].

Grafický postup vyhodnotenia testu

Pre každé riedenie sa vypočíta aritmetický priemer dĺžky koreňa L_v v mm z oboch vzoriek jednej koncentrácie (nulové hodnoty sa tiež započítavajú do priemeru). Následne sa vypočíta inhibícia rastu I_μ koreňa po 72 hod v porovnaní s kontrolou [4, 5]:

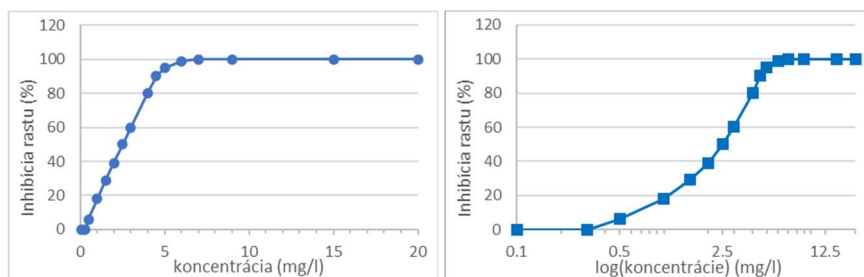
$$I_\mu = \frac{L_c - L_v}{L_c} 100 \quad (\%) \quad (3)$$

kde I_μ - inhibícia rastu koreňa v (%), ak je $I_\mu < 0$ ide o stimuláciu rastu,

L_c - aritmetický priemer dĺžky koreňa meraný v kontrole (mm),

L_v - aritmetický priemer dĺžky koreňa meraný v testovanom roztoku (mm).

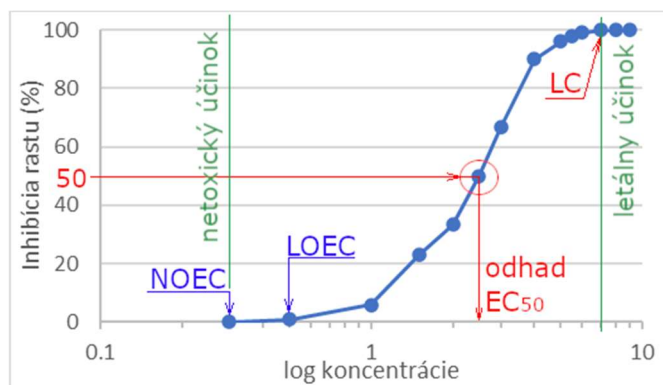
Z vypočítaných hodnôt sa zostroja dva grafy. V prvom je na osi x koncentrácia testovaného roztoku a na osi y inhibícia rastu koreňa. V druhom grafe je na osi x logaritmus koncentrácie roztoku a na osi y inhibícia rastu koreňa. Príklady grafov pre teoretické hodnoty sú uvedené na Obr. 21.



Obr. 21 Ideálne krivky závislosti inhibície rastu od koncentrácie

²⁰ kontrola: zried'ovacia voda, resp. živný roztok, vždy bez skúšaného vodného výluhu

Podľa získaných hodnôt sa určia hodnoty NOEC, LOEC a LC. Výsledné hodnoty EC_{10} , EC_{50} , EC_{90} sa získavajú lineárnou regresiou (preložením priamky a pomocou rovnice priamky), kedy sa inhibícia rastu dá do závislosti na dekadickom logaritme koncentrácie alebo sa priamo odčítajú z grafu, Obr. 22. Pri výslednom hodnotení je treba brať do úvahy aj fakt, že látky obsiahnuté vo vzorke môžu mať aj stimulačný efekt.



Obr. 22 Vyhodnotenie výsledkov

7.1.2.2 Test klíčivosti semien *Sinapis alba*

Pri teste klíčivosti sa stanovuje počet vyklíčených semien v pomere ku celkovému počtu testovaných semien. Test sa robí pri rovnakých podmienkach ako test inhibície rastu koreňa vyššej rastliny, s tým rozdielom, že sa vyhodnocuje tak, že vyklíčené semená sa spočítajú po 24, 48 a 72 hodinách. Z výsledkov sa vypočíta aritmetický priemer a zostrojí sa histogram závislosti deň ku percentu vyklíčených semien, pre každú koncentráciu. Podľa vzťahu (3) sa vypočíta inhibícia rastu. Rovnako ako v predchádzajúcom prípade sa vyhodnocujú: LC, NOEC, LOEC, EC_{10} , EC_{50} a EC_{90} .

7.2 Test toxicity na zelených riasach

Skúška inhibície rastu sladkovodných rias je štandardizovaná metodikou STN EN ISO 8692: 2005-02: Kvalita vody. Skúška inhibície rastu sladkovodných rias *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* [6] a STN 83 8303: 1999: Skúšanie nebezpečných vlastností odpadov. Ekotoxikita. Skúšky akútnej toxicity na vodných organizmoch a skúšky inhibície rastu rias a vyšších kultúrnych rastlín [4]. Pri testoch je v rámci dostupnosti možné použiť aj iné sladkovodné zelené riasy ako napr. *Scenedesmus quadricauda* alebo *Chlorella kessleri*.

7.2.1 Charakteristika organizmov

Nižšie rastliny sú fylogeneticky najstaršou vetvou eukaryotických rastlín. Všeobecne sa nazývajú riasy (lat. *algae*). Bunky rias obsahujú tylakoidy, ktoré sú v porovnaní so sinicami, organizované do osobitných organel - chloroplastov. Hlavným fotosyntetickým pigmentom je, podobne ako u všetkých vyšších rastlín, chlorofyl *a*. Keďže domovom rias je voda, ich životné prostredie je, na rozdiel od suchozemských podmienok, pomerne stabilné. Ich morfológia je preto pomerne jednoduchá a často ich telo pozostáva len z jednej bunky. Ani mnohobunkové riasy nemajú telo diferencované na typické rastlinné pletivá. Z asimilačných farbív majú zelené riasy (*Chlorophyta*) prítomné chlorofyl *a+b*, β -karotén a xantofyly. Zásobnou látkou je škrob [7].

Chlorella (*Ch. kessleri*) patrí medzi najmenšie zelené riasy (~5 µm), Obr. 3b), so stielkou bunkového typu. Často vytvára kolónie. Jej význam pravdepodobne vzrastie až v budúcnosti, pretože sa ukazuje ako výborný zdroj potravy pre kozmonautov v prípade dlhších letov. Je nenáročná na živiny a pomerne rýchlo vytvára veľké množstvo biomasy [7]. V priaznivých podmienkach sa množí až neuveriteľnou rýchlosťou, 4x za 20–24 hodín. Obsahuje všetkých 8 aminokyselín potrebných pre život, vitamíny (viac ako 20), minerály, chlorofyl, mastné kyseliny, špecifický *Chlorella* rastový faktor a vlákninu. Zo sušiny tvoria proteíny 50–60%, preto má dokonalú výživovú hodnotu.

Na testovanie sa používajú aj iné typy rias: *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus subspicatus* alebo *Kirchneriella subcapitata*.

7.2.2 Diskový difúzny test

Diskový difúzny test (Kirby-Bauer test) je štandardizovaná metóda definovaná Európskou komisiou pre testovanie citlivosti EUCAST a patrí k najstarším metódam testovania na antimikrobiálnu citlivosť [8]. Diskový difúzny test je kvalitatívna metóda na stanovenie citlivosti bakteriálneho kmeňa na antibiotiká. Kmeň je citlivý alebo rezistentný podľa veľkosti inhibičnej zóny okolo disku na tuhej pôde. Ak je priemer inhibičnej zóny menší ako stanovená hranica, znamená to, že bakteriálny kmeň je na antibiotiká rezistentný a podanie testovaného antibiotika by nebolo účinné [8, 9].

Táto metóda nemeria stupeň citlivosti – kmeň je vždy buď citlivý alebo rezistentný. Teoreticky by bolo možné merať aj presný stupeň citlivosti ale len za prísne štandardných podmienok, ktoré v praxi obvykle nemožno dodržať. Teória difúzneho testu [9]:

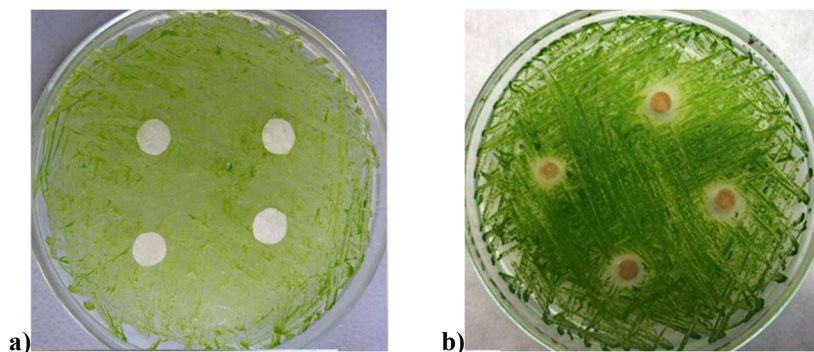
- antibiotikum difunduje z disku položeného na povrch naočkovanej agarovej pôdy,
- naočkované baktérie sa časom množia, no v dôsledku prílivu antibiotika blízko disku a podľa stupňa svojej citlivosti sa prestávajú množiť. V určitom okamihu a v určitej vzdialenosti od disku antibiotikum už nedokáže množenie baktérií zastaviť a ani pokračujúci prílev antibiotika medzitým narastenú bakteriálnu populáciu už neohrozí. Zakladá sa okraj inhibičnej zóny, ktorý sa neskôr ozrejmi ďalším rastom baktérií. Koncentrácia antibiotika na okraji práve vznikajúcej inhibičnej zóny sa volá kritická koncentrácia, tento pojem nemá klinický význam,
- na veľkosť zóny má vplyv citlivosť kmeňa, fyzikálne vlastnosti antibiotika a pôdy, hrúbka pôdy, rýchlosť množenia kmeňa. Čím sa kmeň množí pomalšie, tým je zóna pri rovnakej citlivosti kmeňa väčšia, Obr. 23. Je zrejmé, že nie je možné stanoviť univerzálne hraničné priemery inhibičných zón pre jednotlivé látky.

Chyby pri vyhodnocovaní testu:

- zistená citlivosť je arteficiálne vyššia (umelo vyvolaná), ak je agarová pôda príliš tenká, ak má kmeň zníženú rastovú rýchlosť, ak došlo k tzv. predifúzii antibiotika pri neskorom vložení misiek do termostatu alebo pri ich pomalom prehrievaní (preplnený termostat), alebo ak bolo riedke bakteriálne inokulum,

- kmeň sa naopak zdá byť rezistentnejší, ak je použitý disk exspirovaný, ak je pôda príliš hrubá, alebo ak je použité inokulum príliš husté. Rovnako môže ovplyvniť výsledok aj neštandardné zloženie pôdy ovplyvňujúce difúziu antibiotika.

Podmienky testu (disky, pôdy) je preto nutné pravidelne testovať pomocou referenčných kmeňov o známej citlivosti.



Obr. 23 a) Vzorky bez inhibičnej zóny; b) s vytvorenou inhibičnou zónou

Diskový difúzny test – postup:

1. kolónie mikroorganizmov sa resuspendujú do sterilného fyziologického roztoku (1 až $2 \cdot 10^8$ mikroorganizmov/ml),
2. 25 μ l vznikutej suspenzie, najneskôr 15 min od prípravy, rovnomerne naniesieme na agarové platne nakláňaním na všetky strany,
3. pomocou Pasteurovej pipety odoberieme prebytočnú suspenziu z naočkovanej pôdy a pôdu necháme chvíľu zaschnúť,
4. najneskôr 15 min od naočkovania, v prípade testovania citlivosti bakteriálnych kmeňov na nanočastice, na naočkovanú pôdu nanášame prázdne disky (6 mm priemer), na ktoré mikropipetou naniesieme koloidný roztok testovaných nanočastíc. Ako kontrola slúži roztok AgNO_3 ,
5. inkubujeme v termostate pri cca 35°C alebo pod svetelnou rampou a dĺžka inkubácie závisí od typu zvolených mikroorganizmov,
6. po inkubácii sa citlivosť prejaví inhibičnou zónou – priemer inhibičnej zóny sa meria v mm,
7. výsledok porovnáme s tabuľkovými hodnotami a stanovíme, či je kmeň na antibiotiká alebo nanočastice citlivý alebo rezistentný:
 - citlivý (C),
 - intermediárne citlivý (I) – izolovaný kmeň je slabo citlivý - účinná hladina antibiotika/nanočastíc v sére sa dosiahne len pri zvýšenom dávkovaní alebo v mieste, kde sa antibiotikum prirodzene koncentruje (napr. moč u cicavcov),
 - izolovaný kmeň je rezistentný (R).

Ak tabuľky nie sú k dispozícii, priemery inhibičných zón jednotlivých koncentrácií sa porovnávajú s kontrolou, navzájom medzi sebou a vyvodí sa záver.

7.2.3 Test inhibície rastu rias vo výluhu

Princíp testu spočíva v stanovení toxického účinku vodou vylúhovateľnej látky alebo látok prítomných vo vode na inhibíciu rastu a rozmnožovania chlorokokálnej riasy.

Test sa začína predbežnou skúškou, kde sa testuje neriedený výluh (robia sa tri paralelné testy) a živný roztok ako kontrola. Výsledky predbežnej skúšky sa hodnotia rovnako ako v prípade predbežnej skúšky inhibície rastu koreňa vyššej rastliny. Ak je skúška pozitívna potom sa pristúpi k základnej skúške.

Pri základnej skúške sa toxický účinok sleduje v jednotlivých koncentráciách sledovanej látky (5 až 10 koncentrácií) a porovnáva sa s kontrolou v čistom živnom médiu. Množstvo skúšobného roztoku je 50 až 70 ml. Testované roztoky sa nalejú do Erlenmeyerových baniek, ku ktorým sa pridá potrebné, rovnaké množstvo riasového inokula.

Riasové inokulum²¹ pre test sa odoberá z exponenciálne rastúcej inokulačnej kultúry. Najprv sa zistí hustota inokulačnej kultúry v počítacej komôrke alebo pomocou počítačky buniek. Objem riasovej suspenzie sa zistí výpočtom podľa rovnice (4). Počiatočná hustota riasovej suspenzie po naočkovaní by mala zodpovedať počtu 10 000 buniek/cenóbií²² v 1 ml [4].

$$x = \frac{(V \cdot c)}{a} \quad (4)$$

kde x – potrebný objem inokula,

c – požadovaná hustota riasovej kultúry na začiatku testu v 1 ml (v tomto prípade 10 000 cenóbií),

V – množstvo testovaného roztoku v ml,

a – hustota inokulačnej kultúry, počet v ml.

Kultivačné banky sa so vzorkami a s inokulom uzavrujú buničinovými zátkami a umiestnia sa do termostatu s osvetlením 6 000 až 10 000 luxov a teplotou $25 \pm 2^\circ\text{C}$, prípadne pod svetelnú rampu pri teplote $25\text{--}27^\circ\text{C}$. Test prebieha po dobu minimálne 72 hodín, počas tejto doby sa vzorka aspoň trikrát denne premiešava (bez aerácie). Od začiatku až po koniec testu sa hodnotí rast buniek v nasadených koncentráciách s frekvenciou raz denne. Pri zvolenej dlhšej dobe expozície sa hodnotenie vykonáva rádovo v dvoch až štvordňových intervaloch [6]. Hustota buniek sa zisťuje pomocou počítacej komôrky alebo počítačky buniek. Zo získaných údajov sa zostroja rastové krivky. Hodnoty IC_{50} sa vyhodnocujú pre každú paralelnú skúšku zvlášť a vypočíta sa z nich aritmetický priemer. Jednotlivé hodnoty sa nesmú líšiť o viac ako 30% [4].

Základom výpočtu IC_{50} je rastová krivka zostrojená pre jednotlivé koncentrácie, ktoré sa porovnávajú ku kontrole (hustota riasových kultúr sa vyjadruje v $\ln(c_x)$). Najprv sa zostrojí grafická závislosť: čas v dňoch (os x) a $\ln(c_x)$ (os y). Určenie inhibície prípadne stimulácie rastu je založené na porovnaní plôch pod rastovými krivkami testovaných roztokov a v kontrole.

²¹ inokulum – očkovacia látka, v širšom slova zmysle materiál obsahujúci mikroorganizmy alebo vírusové častice, ktoré môžu byť prenesené na hostiteľa, prípadne kultivačné médium

²² cenóbiom – funkčné zoskupenie, kolónia buniek jednobunkových rias vytvorená delením jednej materskej bunky. V cenóbiu je vždy rovnaký počet buniek (4, 16, 32 a pod. - charakteristické pre každý druh) pochádzajúcich z tej istej materskej bunky

Plocha A pod rastovou krivkou sa vypočíta pre každú koncentráciu podľa:

$$A = \frac{(N_n - N_0) \cdot t_1}{2} + \frac{(N_1 + N_2 - 2N_0) \cdot (t_2 - t_1)}{2} + \dots + \frac{(N_{n-1} + N_n - 2N_0) \cdot (t_n - t_{n-1})}{2} \quad (5)$$

kde N_n – počet buniek/cenóbií v 1 ml v čase t_n ,

N_1 – počet buniek/cenóbií v 1 ml v čase t_1 ,

N_0 – počiatočná hustota buniek/cenóbií v 1 ml,

t_n – doba n -tého merania testu od začiatku, v dňoch,

t_1 – doba prvého merania testu od začiatku testu, v dňoch.

Z hodnôt A sa pre každý roztok aj koncentráciu vypočíta inhibícia (stimulácia) I_{Ai} :

$$I_{Ai} = \frac{A_c - A_i}{A_c} \cdot 100 \quad (6)$$

kde I_{Ai} – inhibícia rastu (ak je $I_A < 0$ ide o stimuláciu rastu), %,

A_c – priemerná plocha pre kontrolu,

A_i – priemerná plocha v sledovanej koncentrácii.

Na konci testu sa z nameraných hodnôt zisťuje rastová rýchlosť kultúry μ , rovnica (7):

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n} \quad (7)$$

kde N_n – počet buniek/cenóbií v 1 ml na konci testu,

N_0 – počet buniek/cenóbií v 1 ml na začiatku testu,

t_n – doba trvania testu v dňoch.

Z rastových rýchlostí sa pre každú skúšanú koncentráciu aj kontrolnú koncentráciu stanoví inhibícia I_μ , resp. stimulácia rastu:

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100 \quad (8)$$

kde I_μ – percento inhibície rastu (ak je $I_\mu < 0$ ide o stimuláciu rastu),

μ_c – rastová rýchlosť v kontrole, d^{-1} ,

μ_i – rastová rýchlosť v sledovanej koncentrácii, d^{-1} .

Hodnoty inhibície I_{Ai} , resp. I_μ a skúšanej koncentrácie výluhu c_i sa vynesú do súradnicového systému. Zobrazenými bodmi sa preloží priamka a z priesečníka preloženej priamky a súradnice inhibície 50% sa z osi x odčíta príslušná hodnota $72hIC_{50}$ [6], Obr. 22. V prípade použitia hodnoty I_μ sa používa označenie I_rC_{50} (index r značí použitie hodnoty rastovej rýchlosti), pre obdobne pri použití hodnoty I_A sa používa označenie I_bC_{50} (index b značí použitie hodnoty veľkosti vytvorenej biomasy).

7.3 Praktické cvičenie

Úlohy:

1. Stanovte toxicitu daných roztokov na semenách horčice bielej. Použite test inhibície rastu koreňa kultúrnej rastliny a klíčivosti semien (STN 83 8303).
2. Stanovte toxicitu daných roztokov na jednobunkovej riase *Ch. kessleri*. Na sledovanie ekotoxicity na *Ch. kessleri* použite test inhibície rastu rias a diskový difúzny test.

Upozornenie: so vzorkami pracujte podľa predpisov pre prácu so škodlivými látkami a látkami nebezpečnými pre životné prostredie!

7.3.1 Testy toxicity na vyššej rastline

7.3.1.1 Rast koreňa horčice bielej

Postup práce pri stanovovaní toxického účinku látok obsiahnutých vo vodnom výluhu na klíčivosť semien a rast koreňa horčice bielej:

1. Testovaný organizmus: semená horčice bielej (*Sinapis alba*) s klíčivosťou minimálne 90%, stredná veľkosť semien 1,5 až 2,5 mm, okrovo-žlté.
Podmienky testu: teplota: $21 \pm 2^\circ\text{C}$. Množstvo vodného výluhu (testovaného roztoku) 10 ml na každú Petriho misku. Počet testovacích jedincov: 30 semien na každej Petriho miske (rovnomerne – pravouhlá sieť 6x5 semien). Dĺžka expozície max 72 hodín, bez osvetlenia.
2. Pripravte kontrolný roztok (voda) a testované roztoky s rôznymi koncentráciami (minimálne 5, maximálne 10 koncentrácií). Objem roztokov je 10 ml. Na prípravu zásobných roztokov a vodného výluhu sa používa deionizovaná voda.
3. Semená pred použitím sterilizujete: na 20 min ponorte semená do 10% roztoku chlórnanu sodného (NaClO), potom ich premyte destilovanou H_2O (použite min 300 ml vody). Premývajte dovtedy, kým neprestanete cítiť chlór.
4. Z filtračného papiera vystrihnite kruhy podľa veľkosti dna použitých Petriho misiek. Na dno každej Petriho misky vložte po dva filtračné papiere a navlhčite ich 10 ml testovaného roztoku, resp. vodou (kontrola). Na navlhčené filtračné papiere rovnomerne pinzetou rozmiestnite po 30 semien. Petriho misky zakryte druhým dielom.
5. Takto pripravené Petriho misky umiestnite do termostatu.
6. Po 72 hodinách odmerajte a zaznamenajte dĺžky všetkých koreňov semien testovaných vo výluhu aj nasadených v kontrole.
7. Podrobne popíšte postup testu (podľa kapitoly 9) a urobte fotodokumentáciu.

7.3.1.2 Klíčivosť semien horčice bielej

Testovaný organizmus a podmienky testu sú rovnaké ako pri teste rastu koreňa (kapitola 7.3.1.1 body 1 až 5), rozdiel je len vo vyhodnotení, vzorky sa vyhodnocujú po 24, 48 a 72 hodinách. Pri každom počítaní klíčkov, urobte fotodokumentáciu a podrobne popíšte postup experimentu.

Vyhodnotenie testov

Základným sledovaným parametrom pre hodnotenie testov je priemerná dĺžka koreňa, resp. klíčivosť – koľko semien vykličilo. Do výsledkov sa započítava aj počet nevykličných semien. Do aritmetického priemeru sa tieto semená započítavajú ako semená s nulovou dĺžkou koreňa. Ak semeno vykličí, ale nevytvorí korienok, započítava sa táto hodnota do aritmetického priemeru rovnako ako nulová. Testy vyhodnoťte podľa návodu uvedeného v teórii.

Platnosť testu

Výsledky testov sa považujú za platné, ak sú splnené nasledujúce požiadavky:

- klíčivosť semien v kontrole je najmenej 90%,
- stanovená hodnota IC₅₀ štandardu dichrómanu draselného (K₂Cr₂O₇) alebo inej kontroly pre testované semená je v rozmedzí 10-50 mg/l.

7.3.2 Test toxicity na nižších rastlinách

7.3.2.1 Test inhibície rastu sladkovodnej riasy

Na test ekotoxicity na sladkovodnej riasie použite zelenú riasu *Ch. kessleri*. Sledujte inhibíciu rastu rias spôsobenú toxickým účinkom testovanej látky. Hodnotí sa nárast/pokles koncentrácie biomasy v jednotlivých sériách s koncentračnými hladinami experimentálnej látky po 24, 48 a 72 hodinách. Maximálna doba expozície je 72 hodín.

Postup experimentu

1. Pripravte si Erlenmeyerove banky, podľa počtu experimentálnych roztokov, plus jednu pre kontrolný roztok (väčšinou živné médium alebo voda).
2. Vypočítajte potrebné riedenia testovaných roztokov. Napr. prvá banka obsahuje 50 ml testovaného neriedeného roztoku, druhá obsahuje 90% testovaného roztoku + 10% H₂O, tretia 80% + 20% H₂O, atď.
3. Banku s vodou potrebnou na riedenie roztokov a so živným médium, ostatné sklo, ktoré budeme používať pri experimente dáme sterilizovať na 20 min pri teplote 121°C.
4. Do vysterylizovaných baniek, okrem banky s kontrolou a 100% testovacím roztokom, pridáme potrebný objem toxickéj látky. Celý pokus musí prebiehať v sterilných podmienkach.
5. Následne, do pripravených baniek, pomocou pipety pridáme vypočítané množstvo inokula, podľa rovnice (4). Zásobná kultúra je vhodná na test vtedy, keď je rast rias približne v polovici exponenciálnej fázy. Keďže rastovú krivku pre riasu *Ch. kessleri*, sme zostrojili na predchádzajúcom cvičení, vieme presne, na ktorý deň kultivácie máme v roztoku požadované množstvo buniek. Pre overenie odoberte vzorku buniek a stanovte ich počet pomocou počítačky buniek EVETM.
6. Po pridaní rias Erlenmeyerove banky umiestnite do bioshakera a kultivujte pri svetelných podmienkach 18 hod svetla a 6 hod tmy (1700 lux) pri konštantnej teplote 25°C.
7. V intervaloch 24, 48 a 72 hod stanovte množstvo rias v roztokoch pomocou počítačky buniek EVETM, Bürkerovou komôrkou a merajte absorbanciu pomocou UV-VIS spektrofotometra (vlnová dĺžka 750 nm).
8. Podrobne popíšte postup testu (podľa kapitoly 9) aj s fotodokumentáciou.

Vyhodnotenie testu

Inhibíciu rastu rias je možné stanoviť viacerými metódami.

1. Jedna z nich je pomocou spektrofotometra, kedy meriame absorbanciu (*ABS*) rias každých 24, 48 a 72 hod, pri vlnovej dĺžke 750 nm. Z hodnoty *ABS* vypočítame počet buniek pomocou vzťahu:

$$PB = \frac{(ABS_{750} + 2439328 \cdot 10^{-9})}{111 \cdot 10^{-9}} \quad (9)$$

kde: PB – počet buniek v 1 ml testovanej riasovej suspenzie,
 ABS_{750} – hodnota ABS pri vlnovej dĺžke 750 nm.

Inhibíciu rastu rias vypočítajte podľa vzťahu:

$$I = \left(1 - \frac{PB}{k}\right) 100 \quad (\%) \quad (10)$$

kde: k – počet buniek v kontrolnej suspenzii,

PB – počet buniek v suspenzii s testovanou látkou v 1 ml.

2. Pomocou nameraných hodnôt zostrojte závislosť log koncentrácie na percente množstva rias. Stanovte hodnoty: LC, NOEC, LOEC, EC₁₀, EC₅₀ a EC₉₀.
3. Vypočítajte rastovú rýchlosť μ , rovnica (7), a integrál biomasy A , rovnica (5), alebo plochy pod rastovými krivkami v jednotlivých vzorkách a z týchto hodnôt v porovnaní s kontrolnou koncentráciou stanovte inhibície I_μ a I_A , rovnice (8) a (6).

7.3.2.2 Diskový difúzny test

Na stanovenie toxicity látok pomocou diskového difúzneho testu použite zelenú jednobunkovú riasu *Ch. kessleri*. Sledujte tvorbu inhibičnej zóny. Postup experimentu:

1. Vysterilizujte Petriho misky (2 hod pri 200°C).
2. Pripravte živné 2% agarové médium (živný roztok Milliev Bristol). V sterilnom boxe nalejte živné médium do Petriho misiek. Po jeho stuhnutí naočkujte riasu.
3. Vysterilizované disky (priemer 6 mm) vystrihnuté z filtračného papiera poukladajte na riasou naočkovanú agarovú platňu (5 diskov na každú Petriho misku). Na každý disk kvapnite požadované množstvo testovaného roztoku tak, aby sa roztok neroztiekol a aby bol disk celý presiaknutý testovaným roztokom. Snažte sa nepohnúť diskom, ináč by došlo ku skresleniu výsledkov.
4. Po nakvapkaní testovaného roztoku uzavrite Petriho misky, označte vzorky a preneste ich pod svetelnú rampu s osvetľovacím cyklom 12 hod:12 hod tma:svetlo. Teplota kultivácie by mala byť 24±2°C.
5. Po 7 a 14 dňoch odmerajte veľkosť inhibičnej zóny v milimetroch, v dvoch na seba kolmých smeroch. Z týchto dvoch hodnôt vypočítajte priemernú hodnotu. Za okraj sa považuje okraj viditeľný voľným okom. Takto odmerajte a vypočítajte veľkosť inhibičnej zóny pre každý disk.
6. Výsledky spracujte do tabuľky aj graficky.
7. Testovanú riasu vyhodnoťte: citlivá, stredne citlivá alebo rezistentná na testovanú látku (C, I, R).
8. Podrobne popíšte postup testu (podľa kapitoly 9) aj s fotodokumentáciou.

Pomôcky a zaradenie

Petriho misky s priemerom 120 až 140 mm, filtračný papier väčšej pórovitosti, pinzeta, odmerné banky, milimetrové meradlo, nožnice, termostat pre teplotu 20°C. Počítačka buniek EVE™, UV-VIS spektrofotometer, sterilný box, bioshaker, mikropipety 50 a 10 ml, sklenená tyčinka, lievnik, pH meter.

7.4 Kontrolné otázky

1. Čo sa vyhodnocuje pri diskovom difúznom teste?
2. Napíšte vzťah pre stanovenie inhibície rastu koreňa vyššej rastliny.
3. Prečo nemožno diskovú metódu použiť na meranie stupňa citlivosti kmeňa?

Literatúra

- [1] Kočí, V., Mlejnek, M. Test semichronické toxicity se semeny Sinapis alba, on line, dostupné na www: <https://old.vscht.cz/uchop/udalosti/skripta/15r/Test%20semichronick%E9%20toxicity.htm>
- [2] On line, dostupné na www: <https://optolov.ru/sk/balkon-i-lodzhiya/gorchica-belaya-kak-siderat-kogda-seyat-i-kak-ubirat-gorchica.html> [15.11.2022]
- [3] On line, dostupné na www: [Pšenica - najstaršia kultúrna plodina - Detox tela.sk](https://detox tela.sk/psenica/), <https://detox tela.sk/psenica/> [15.11.2022]
- [4] STN 83 8303: 1999: Skúšanie nebezpečných vlastností odpadov. Ekotoxicita. Skúšky akútnej toxicity na vodných organizmoch a skúšky inhibície rastu rias a vyšších kultúrnych rastlín, Január 1999.
- [5] Říhová Ambrožová, J. Krátkodobý test klíčivosti. Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník. Praha: VŠCHT Praha, 2007. dostupné na www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=K023, http://147.33.74.135/knihy/uid_es-006/ebook.help.htm,
- [6] STN EN ISO 8692: 2005-02: Kvalita vody. Skúška inhibície rastu sladkovodných rias *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* Nižšie rastliny (riasy), on line, dostupné na www: <https://biopedia.sk/rastliny/nizsie-rastliny-riasy> [15.11.2022]
- [7] Nižšie rastliny (riasy), on line, dostupné na www: <https://biopedia.sk/rastliny/nizsie-rastliny-riasy>, [21.02.2023]
- [8] Konečná, N. Testování citlivosti mikroorganismů diskovou difúzní metodou, Diplomová práce, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2018
- [9] Disková metoda, on line, dostupné na www: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/disktest/disktest.htm> [26.9.2022]

Cvičenie č. 8

Cieľ cvičenia

Cieľom cvičenia je stanoviť toxicitu (antibakteriálne účinky, schopnosť zabrániť tvorbe biofilmov) polymérnych vrstiev a netkaných textílií pripravených z kompozitu PVA-AgNPs (polymérna matrica dopovaná nanočasticami striebra). Študenti sa na cvičení naučia ako odoberať vzorky z materiálu na test toxicity, osvoja si postup testu a naučia sa testy vyhodnocovať.

8 Zisťovanie toxického účinku antibakteriálnych textílií a povlakov

Polyméry sú v súčasnosti široko používaným materiálom. Používajú sa čisté polyméry ale aj polyméry dopované rôznymi látkami. Prídavok sekundárnej fázy k polymérnej matici mení a vylepšuje pôvodné vlastnosti polyméru, napr. zvýši sa pevnosť, zmenia sa vodivostné vlastnosti, optické alebo aj antimikrobiálne.

Polyméry možno rozdeliť do dvoch kategórií [1]:

- prírodné polyméry (biopolyméry), ktoré zahŕňajú: hodváb, gumu, celulózu, vlnu, jantár, keratín, kolagén, škrob a DNA. Biopolyméry plnia kľúčové funkcie v organizmoch, pôsobia ako štrukturálne proteíny, funkčné proteíny, nukleové kyseliny, štrukturálne polysacharidy a molekuly skladujúce energiu,
- syntetické polyméry - pripravujú sa chemickou reakciou, často v laboratóriu. Príklady syntetických polymérov zahŕňajú PVC (polyvinylchlorid), polystyrén, syntetický kaučuk, silikón, polyetylén, neoprén a nylon. Syntetické polyméry sa používajú na výrobu plastov, lepidiel, farieb, mechanických častí a mnohých bežných predmetov. Rozdeľujeme ich do dvoch kategórií:
 - termosety – vytvárajú pri vytvrdzovaní nezvratné chemické väzby, je ich možné nevratne zmeniť na nerozpustný polymér, je ich možné vytvrdiť pomocou tepla alebo žiarenia (epoxidy, polyestery, akrylové živice, polyuretány a vinylestery, bakelit, kevlar a vulkanizovaná guma),
 - termoplasty sú po vychladnutí tuhé ale ohybné a dajú sa tvarovať pri určitej teplote, pri zahrievaní sa roztavia na kvapalinu (akryl, nylon, teflón, polypropylén, polykarbonát a polyetylén).

Polyméry a polymérne kompozity sa využívajú hlavne v textilnom priemysle, medicíne, na úpravy rôznych povrchov, automobilovom priemysle aj v elektrotechnike. Textilný priemysel ich využíva na prípravu tkaných aj netkaných textílií, v poslednej dobe hlavne s antibakteriálnymi vlastnosťami.

Textílie a povrchy s antimikrobiálnou²³ úpravou sa v zdravotníctve využívajú už veľmi dlho, typickým príkladom sú obvazy so striebrom, ktoré sa využívajú hlavne pri ošetrovaní popálenín alebo chronických rán [2]. V posledných desaťročiach sa však výroba antibakteriálnych textílií výrazne rozšírila. V medicíne okrem obväzov sa využívajú aj antibakteriálne chirurgické nite, masky, rukavice, oblečenie aj posteľné priadlo. Textílie s antibakteriálnou úpravou našli využitie aj v iných odvetviach, ako napríklad šport: funkčné oblečenie, spodné prádlo, ponožky. Pre automobilový priemysel sa vyrábajú antibakteriálne látky na potahy sedadiel. Netkané textílie s antibakteriálnou úpravou sa využívajú na filtráciu vody alebo vzduchu, napr. filtre do vysávačov.

Striebro, či vo forme nanočastíc alebo iónového striebra, je dlhodobo známe antibakteriálnymi účinkami. Taktiež iné kovy, ako meď a jej zliatiny (mosadz, bronz, meď-nikel-zinok a iné) majú antimikrobiálne vlastnosti. Niektoré kovy, ako zlato, získajú tieto vlastnosti so zmenšením ich rozmeru na nano veľkosť. Ďalším typom materiálov s antimikrobiálnymi vlastnosťami sú fotokatalytické materiály (TiO_2 , ZnO). Stručný zoznam niektorých anorganických nanoštruktúrovaných materiálov, používaných na textilných substrátoch kvôli ich antimikrobiálnym vlastnostiam, je zhrnutý v Tab. 6.

Tab. 6 Charakteristika anorganických nanoštruktúrovaných materiálov na textíliách [3]

nanoštruktúrované materiály	popis a použitie
TiO_2	antibakteriálny, fotokatalyzátor, samočistiaci, hydrofilný, super hydrofóbny, UV ochrana, čistenie vody a vzduchu, degradácia farbiva, senzor plynu, solárne články
AgNPs , Ag^+	toxické, elektricky vodivé, antimikrobiálne, dezinfekčné, elektricky vodivé, UV ochrana, protiplesňové
ZnO	fotokatalytický, antibakteriálny, UV ochrana, elektricky vodivý
Cu	elektricky vodivá, antibakteriálna, UV ochrana, elektricky vodivá
Fe_3O_4 - magnetit	superparamagnetický
MgO	vysoká špecifická povrchová plocha
Au	elektricky vodivé, antibakteriálne, protiplesňové, elektricky vodivé
Ga	antibakteriálne
C nanorúrky	antistatické, elektrická vodivosť, absorpcia, antimikrobiálne, elektricky vodivé, spomaľujúce horenie, antistatické, absorbér chemikálií

Kovové a anorganické nanoštruktúry sa môžu na povrchy nanášať priamo, alebo sa môžu inkorporovať do rôznych organických nosičov, napr. lipozómy, cyklodextríny, nano a mikrokapsuly, dendriméry alebo neorganických nosičov, ako sú polyméry.

8.1 Legislatíva

Uvedenie takýchto špeciálnych textílií s antibakteriálnou úpravou aj do bežného života a rozšírenie ich používania vyžaduje zavedenie noriem, ktoré stanovujú nielen bezpečnú dávku

²³ pojem "antimikrobiálny" označuje niečo, čo je škodlivé pre mikróby. Pretože definícia mikróbov (alebo mikroorganizmov) je veľmi všeobecná, niečo, čo je „antimikrobiálne“, by mohlo mať škodlivý účinok na celý rad organizmov, od prospešných až po škodlivé a mohlo by zahŕňať bunky cicavcov, a typy buniek spojené s chorobami, ako napr. baktérie, vírusy, prvoky a huby. Užitočnosť látok s antibakteriálnymi vlastnosťami je možné hodnotiť aj ich schopnosťou selektívneho zneškodňovania buniek. Selektivita sa týka schopnosti bojovať proti určitému typu alebo triede organizmu (vírusy, baktérie, huby)

antibakteriálnych zložiek v materiáli, ale stanovujú aj presné podmienky testovania takýchto látok [4-6]. Doteraz bolo publikovaných niekoľko štandardných metód na hodnotenie antimikrobiálnej aktivity na textilných produktoch.

Medzi najdôležitejšie štandardy patria [7]:

- kvalitatívne - zahŕňajú objavenie sa inhibičnej zóny, napr.:
 - AATCC 147: 2004 Antibakteriálna aktivita textilných materiálov: paralelné pruhy - metóda hodnotí schopnosť textílie brániť rastu mikroorganizmov (bakteriostatická aktivita),
 - ISO 20645: 2004 Textílie - Stanovenie antibakteriálnej aktivity - Agarový difúzny tanierový test,
 - JIS L 1902: 2008 Testovanie antibakteriálnej aktivity a účinnosti na textilných výrobkoch,
- kvantitatívne metódy - absorpčné metódy, napr.:
 - AATCC 100: 2004 Testovacia metóda pre antibakteriálne úpravy textilných materiálov. Metóda poskytuje vyhodnotenie baktericídnej (zabíjanie baktérií) a bakteriostatickej (inhibícia rastu baktérií) aktivity látkového materiálu počas 24-hodinového kontaktu s testovanými baktériami. Pri tejto metóde sa štandardizujú mikrobiálne koncentrácie a baktérie sú zásobované živinami počas celej inkubačnej doby.
 - ISO 20743: 2014 Stanovenie antibakteriálnej aktivity textilných výrobkov. Norma sa vzťahuje na všetky textilné výrobky vrátane látok, vaty, nití a materiálov na odevy, bytové zariadenie a rôzny tovar bez ohľadu na typ použitého antibakteriálneho činidla (organické, anorganické, prírodné alebo umelé) alebo spôsob aplikácie (vstavaná, dodatočná úprava).

Agarové difúzne metódy alebo kvalitatívne metódy sú veľmi jednoduché, rýchle a veľmi užitočné, keď sa hodnotí len niekoľko vzoriek. Kvantitatívne alebo sorpčné metódy poskytujú hodnoty antimikrobiálnej aktivity založené na redukcii rastu, sú však časovo a materiálovo nákladnejšie.

Čo sa týka hodnotenia protiplesňovej aktivity, najdôležitejšími normami pre textilný sektor sú UNE-EN 14119: 2004, ktorá popisuje metódy hodnotenia pôsobenia mikroskopických húb na textílie, čo je kvalitatívna technika, a ISO 13629-2 :2014, ktorá tiež hodnotí antimykotickú aktivitu na textíliách, avšak s použitím techniky plate-count, pričom konečný výsledok je kvantitatívneho typu. Na vyhodnotenie aktivity mikroorganizmov v iných typoch materiálov, ako sú plasty alebo polyméry, sa používajú normy UNE-EN ISO 846:199814 alebo ASTM G2115 [7]. Sú rozpracované špecializované normy pre jednotlivé testované materiály resp. výrobky. Napríklad, norma UNE-EN ISO 16187: 201416 špecifikuje kvantitatívne metódy hodnotenia antibakteriálnej aktivity v obuvi a jej komponentoch. Nedávno bola zverejnená nová špecifická norma pre sektor obuvi a komponentov na hodnotenie kvantitatívnej aktivity húb: UNE-EN ISO 20150:2020. Obidve sa používajú v obuvníckom sektore na hodnotenie všetkých druhov materiálov v obuvi a komponentoch, v ktorých sú alebo boli použité antibakteriálne úpravy [8].

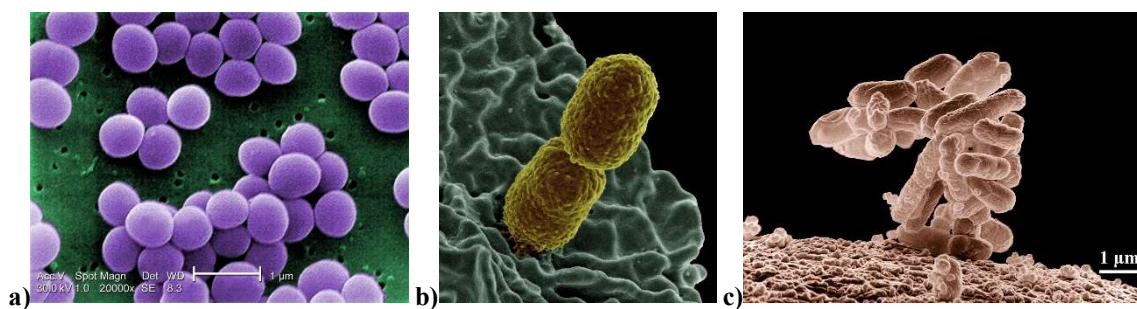
Ďalšou normou, ktorá sa vzťahuje na plastové materiály a iné neporézne povrchy, je ISO 22196: 2011, ktorá špecifikuje metódu hodnotenia antibakteriálnej aktivity antibakteriálne upravených plastov a iných neporéznych povrchov výrobkov (polyméry a keramika), vrátane medziproduktov. Norma ISO 846 opisuje testy na vyhodnotenie účinkov a šírenia baktérií na neporéznych povrchoch, ktoré sa líšia od povrchov pokrytých normou ISO 22196 [6, 8].

Pre každý normovaný test je presne stanovená veľkosť resp. hmotnosť testovanej vzorky. Okrem toho, ak bolo zistené znečistenie textilnej vzorky, sú presne stanovené aj možnosti jej úpravy, napr. sterilizácia (v autokláve pri $121^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $103 \text{ kPa} \pm 5 \text{ kPa}$, 15-20 min; je možné použiť aj plynný etylénoxid; γ žiarenie resp. iné metódy, ktoré povoľuje konkrétna norma), alebo v prípade tkaných, či netkaných textílií je tu možnosť vzorky vyprať podľa ISO 6330. Takisto sú v norme presne stanovené aj podmienky kultivácie a očkovania mikroorganizmov, ich koncentrácia pre konkrétny test a zloženie a množstva živných roztokov. Norma presne udáva aj postup a metódy vyhodnocovania testu, posudzovania účinnosti skúšky a obsah protokolu o skúške.

Pri všetkých testoch sú presne zadefinované kmene, ktoré je treba používať, napríklad pri testovaní antibakteriálnych účinkov textilných výrobkov sa používajú *Staphylococcus aureus* a *Klebsiella pneumoniae*, pri meraní antibakteriálnej aktivity plastov a iných neporéznych povrchov sa odporúča *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*.

8.1.1 Charakteristika mikroorganizmov

Staphylococcus aureus (ľudovo zlatý stafylokok) je grampozitívna, anaeróbná baktéria guľatého tvaru, Obr. 24a). Je to bežný člen mikrobioty tela, často sa nachádza v horných dýchacích cestách a na koži. Zvyčajne sa správa ako komenzálny (spolu žijúci) organizmus, no v niektorých prípadoch sa môže stať patogénom a spôsobovať infekcie kože, dýchacieho systému a otravu jedlom [9].



Obr. 24 *Staphylococcus aureus* a); *Klebsiella pneumoniae* b); *Escherichia coli* c) [9]

Klebsiella pneumoniae je gramnegatívna, nepohyblivá, zapuzdrená, laktózu fermentujúca, anaeróbná tyčinkovitá baktéria tvoriaca súčasť bežnej flóry v ústach, tráviacom trakte a na koži, Obr. 24b). Môže spôsobiť pneumóniu [9].

Escherichia coli (skrátene *E. coli*) je to anaeróbná, gramnegatívna, bičíkatá, tyčinkovitá baktéria žijúca v hrubom čreve teplokrvných živočíchov. Je jedným z najdôležitejších zástupcov črevnej mikrofóry a jej prítomnosť je potrebná pre správny priebeh tráviacich procesov v čreve Obr. 24c) [9].

8.2 Praktické cvičenie

Úlohy

Stanovte toxicitu netkaných textílií pripravených na Cvičení 6 a tenkých povlakov pripravených na Cvičení 7.

Poznámka: postupy experimentov sú prispôsobené možnostiam laboratória nanomateriálov na Ústave materiálov a inžinierstva kvality, FMMR, TUKE.

8.2.1 Testy toxicity polymérnych vlákien a tenkých vrstiev

8.2.1.1 Postup experimentu

Na stanovenie toxicity polymérnych kompozitných vlákien a tenkých vrstiev (PVA-AgNPs kompozit s rôznym obsahom nanočastíc striebra) použite diskový difúzny test, ktorý bude mierne upravený pre dané podmienky. Ako testovací organizmus použite zelenú jednobunkovú riasu *Ch. kessleri*, prípadne *Desmodesmus sp.* Sledujte tvorbu a veľkosť inhibičnej zóny. Postup experimentu:

1. Vysterilizujte Petriho misky (2 hod pri 200°C). Pripravte živné médium (2% agar, živný roztok Milliev Bristol). Pri sterilných podmienkach naočkujte riasu.
2. Z testovaného materiálu (vlákien a vrstiev) vystrihnite disky s priemerom 6 mm, prípadne štvorce so stranou 4,5 mm.
3. Vzorky vysterilizujte pod germicídnym žiarikom. Vysterilizované vzorky poukladajte na naočkovanú riasu (5 vzoriek na každú misku). Snažte sa nehýbať Petriho miskami pri ukladaní vzoriek na agar, došlo by ku skresleniu výsledkov.
4. Petriho misky označte a preneste ich pod svetelnú rampu s osvetľovacím cyklom 12 hod:12 hod tma:svetlo. Teplota kultivácie by mala byť 24±2°C.
5. Po 7 a 14 dňoch urobte záznam o tvorbe inhibičnej zóny.
6. Vyhodnoťte priemer inhibičnej zóny, zapíšte presné hodnoty v [mm], priemer inhibičnej zóny sa meria v dvoch na seba kolmých smeroch a za okraj sa považuje okraj viditeľný voľným okom. Výsledky spracujte aj graficky.
7. Pomocou nameraných hodnôt zostrojte závislosť log koncentrácie nanočastíc striebra v jednotlivých vzorkách na veľkosti inhibičnej zóny. Stanovte hodnoty: LC, NOEC, LOEC, EC₁₀, EC₅₀ a EC₉₀.
8. Do protokolu zapíšte presný postup experimentu aj s obrazovou dokumentáciou, výsledkami a diskusiou výsledkov.

Pomôcky a zaradenie

Petriho misky s priemerom 120 až 140 mm, pinzeta, pipety, odmerné banky, milimetrové meradlo, nožnice, termostat, počítačka buniek EVETM, sterilný box, pipety 50 a 10 ml, sklenená tyčinka, lievik.

8.3 Kontrolné otázky

1. Uveďte niekoľko príkladov použitia antibakteriálnych vrstiev.
2. Definujte mikroorganizmy, plesne, kvasinky, riasy.

3. Definujte biofilm, popíšte ako sa tvorí a aké má signálne mechanizmy.
4. Použitím externých zdrojov si naštudujte a definujte grampozitívne a gramnegatívne baktérie.

Literatúra

- [1] Čo je polymér? Definícia a príklady (greelane.com), dostupné on line na [www: https://www.greelane.com/sk/science-tech-math/veda/definition-of-polymer-605912/](https://www.greelane.com/sk/science-tech-math/veda/definition-of-polymer-605912/) [19.1.2023]
- [2] Kotz, P., Fisher, J., McCluskey, P., Hartwell, S. D., & Dharma, H. (2009). Use of a new silver barrier dressing, ALLEVYN®Ag in exuding chronic wounds. *International Wound Journal*, 6(3), 186–194. doi:10.1111/j.1742-481x.2009.00608.x
- [3] Dastjerdi, R., Montazer, M. (2010). A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(1), 5–18. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.03.029
- [4] ČSN EN ISO 20645 – Plošné textilie – Zjišťování antibakteriální aktivity – Zkouška šíření agarovou destičkou. *Textile fabrics - Determination of antibacterial activity - Agar diffusion plate test (ISO 20645:2004)*.
- [5] ISO 20743: 2007 Stanovenie antibakteriálnej aktivity textilných výrobkov.
- [6] ČSN ISO 22196 Měření antibakteriální aktivity na plastech a jiných neporézních površích, 2021.
- [7] Antimicrobial Materials - HSI (hsmagazine.com), dostupné on line na [www: https://www.hsmagazine.com/article/antimicrobial-materials/](https://www.hsmagazine.com/article/antimicrobial-materials/) [19.1.2023]
- [8] Pinho, E., Magalhães, L., Henriques, M., & Oliveira, R. (2010). Antimicrobial activity assessment of textiles: standard methods comparison. *Annals of Microbiology*, 61(3), 493–498. doi:10.1007/s13213-010-0163-8
- [9] Baktérie, dostupné on line na [www: https://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page](https://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page) [19.1.2023]

Protokol

9 Pokyny na prípravu protokolu z laboratórneho cvičenia

Písomný záznam, tzv. protokol, podrobne popisuje experimentálnu časť laboratórneho cvičenia. Počas laboratórneho cvičenia je študent povinný si robiť podrobné poznámky, aby mohol vypracovať kvalitný protokol. Pre vyhodnocovanie údajov je potrebné si do zošita zapisovať všetky číselné údaje, namerané hodnoty, prípravné výpočty, výsledky merania a všetky ostatné pozorovania. Protokol z laboratórneho cvičenia musí byť spracovaný tak, aby aj po dlhšom čase poskytoval kompletný obraz o vykonanom experimente a umožnil jeho zopakovanie a overenie. Základné členenie protokolu:

1. Úvodná strana:

- pracovisko, názov práce, meno a priezvisko autora, dátum vypracovania protokolu.

2. Prvá strana:

- zadanie – cieľ cvičenia, laboratórneho zadania,
- teoretický úvod – vysvetlí princíp úlohy a uvedie krátku teóriu k problematike, definuje pojmy, vysvetlí vzorce pre prípadné výpočty.

3. Ďalšie strany:

- úlohy – v tejto časti sa konkrétne popíšu aj dielčie ciele a úlohy, ktoré študent počas cvičenia bude vykonávať,
- podrobný postup práce – popíšu sa všetky vstupné chemikálie, pomôcky, podmienky prípravy a postup práce. V prípade použitia laboratórnych zariadení a postupoch pri meraní sa uvádzajú iba skutočne použité prístroje a chemikálie. Pri popisovaní postupu sa opisujú kroky experimentu vlastnými slovami a neodpisuje sa zadanie a návod,
- výsledky a diskusia – v tejto časti sa uvedú namerané hodnoty, výpočty, všetky výsledky, fotodokumentácia, grafy (napr. veľkostná distribúcia imageJ, SEM a TEM, vývoj a priebeh nanočastíc počas časového obdobia, vývoj nanočastíc, koncentrácia, stabilita a pod.). Zároveň študent diskutuje o dosiahnutých výsledkoch, prípadne uvedie porovnanie so známymi faktami, resp. výsledkami iných autorov. Výsledky a namerané hodnoty sa spracujú prehľadne do tabuliek. Pri vzorových výpočtoch treba uviesť každý výpočet použitý pri vyhodnocovaní. Súčasťou protokolu je správne grafické spracovanie nameraných a vypočítaných závislostí,
- záver - v závere by mali byť vyhodnotenú odpovede na otázky:
 - a. čo bolo cieľom laboratórneho cvičenia,
 - b. čo bolo zistené a s akou presnosťou, za akých podmienok,
 - c. svoj pohľad, prínos.

Protokol samostatne vypracuje a odovzdá každý študent z každého laboratórneho cvičenia, ktorého sa zúčastnil a to v tlačenej aj .pdf forme, v danom termíne a rozsahu po dohode s vyučujúcim. Hodnotenie protokolov spolu s hodnotením prípravy na vyučovaciu hodinu budú zohľadnené pri hodnotení laboratórnych cvičení.

Tabuľky

Názov tabuľky je vždy nad uvedenou tabuľkou. Každá tabuľka musí byť číslovaná a v texte musí byť odvolanie sa na príslušnú tabuľku pri interpretácii výsledkov. Dôležité je uvádzať pri všetkých hodnotách aj jednotky.

Grafy a obrázky

Názvy pre grafy a obrázky sa udávajú pod nimi, musia byť presné, bez potreby čítania ďalšieho textu. Obrázok alebo graf musí jasne znázorňovať o čo sa jedná, písmo musí byť čitateľné. Súradnicové osi musia byť riadne popísané vrátane príslušnej jednotky. Každý graf a obrázok musí byť popísaný a vysvetlený v texte.

9.1 Kontrolné otázky

1. Charakterizujte význam laboratórneho protokolu.
2. Čo musí obsahovať laboratórny protokol?
3. Z akých častí sa skladá laboratórny protokol?

Literatúra

- [11] Velgosová, O., Mačák, L. Nanomateriály I, Návody na cvičenia I. Vydavateľ: Technická univerzita v Košiciach, Košice, 2023, s. 87. ISBN 978-80553-4340-2

Autor:

doc. Ing. Oksana Velgosová, PhD.

Technická univerzita v Košiciach, Fakulta materiálov, metalurgie a recyklácie, Ústav materiálov a inžinierstva kvality

Recenzent:

RNDr. Anna Mražíková, PhD.

Za odbornú, obsahovú a jazykovú úpravu textov zodpovedá autor.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani jeho časť nemožno reprodukovat' bez súhlasu majiteľa práv:

© Technická univerzita v Košiciach, Fakulta materiálov, metalurgia a recyklácie

© doc. Ing. Oksana Velgosová, PhD.

Názov: Nanomateriály II

Podnázov: Návody na cvičenia II

Vydavateľ: Technická univerzita v Košiciach

Druh publikácie: skriptá

Rok: 2023

Vydanie: prvé

Náklad: 50 ks

Rozsah: 79 strán

ISBN: 978-80-553-4341-9