

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2015

ALEXANDRA DONOVALOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav chemie a biochemie



Žížala hnojní (*Eisenia fetida*) a kvantové tečky

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

RNDr. Ondřej Zítka, Ph.D.

Konzultant:

Mgr. et Bc. Markéta Komínková

Vypracovala:

Alexandra Donovalová

Brno 2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Alexandra Donovalová**
Studijní program: Zootechnika
Obor: Zootechnika
Konzultant: Mgr.Bc. Markéta Komínková
Název tématu: **Žížala hnojní (*Eisenia fetida*) a kvantové tečky**
Rozsah práce: 30-50

Zásady pro vypracování:

1. V poslední době se ukazuje, že živé organismy jsou schopny detoxikovat prostředí pomocí syntézy polovodičových materiálů ve svém těle. Tímto odvětvím nanotechnologií se zabývá nový vědní obor bio-nanotechnologie. Tato schopnost byla prokázána například u žížal, které jsou schopné ve svém těle syntetizovat kvantové tečky (QDs). QDs jsou polovodičové krystaly o velikosti několik nanometrů, které se vyznačují fluorescenčními vlastnostmi. Excitační a emisní spektrum je na rozdíl od organických sloučenin dáno jejich velikostí, nikoli pouze složením. Je předpoklad, že každý organismus je schopen syntetizovat nanočástice o určitém složení a vlastnostech, u žížal se jedná o monokrystaly teluridu kadmia (CdTe), které emitují v zelené oblasti viditelného světla a excitují v ultrafialové oblasti. V této práci bude pro veškeré testování tvorby QDs použita žížala hnojní (*Eisenia fetida*), která mimo jiné slouží jako ukazatel kontaminace půdy.
V práci bude hodnocen vliv biosyntézy QDs na žížalu hnojní (*Eisenia fetida*). Vliv bude hodnocen stanovením antioxidační aktivity a hodnocením exprese genů zapojených v detoxikaci těžkých kovů.
2. Listopad 2013 – Květen 2014: Seznámení se s biologickou problematikou, a pro tento účel studia používanými analytickými a molekulárně biologickými metodami
3. Červen – Srpen 2014: Literární rešerše k dané problematice
4. Září 2014 – Prosinec 2014: Provedení experimentů na žížalách
5. Leden – Duben 2015: Sepsání a odevzdání závěrečné práce

Seznam odborné literatury:

1. LANDSIEDEL, R., E. FABIAN, et al., Toxicity/biokinetics of nanomaterials. Archives of Toxicology.2012, 86(7): 1021-1060.
2. MENG, H., T. XIA, et al., A predictive toxicological paradigm for the safety assessment of nanomaterials. ACS Nano.2009, 3(7): 1620-1627.
3. STURZENBAUM, S. R., M. HOCKNER, et al., Biosynthesis of luminescent quantum dots in an earthworm. Nat Nanotechnol.2013, 8(1): 57-60.

Datum zadání bakalářské práce: listopad 2013

Termín odevzdání bakalářské práce: březen 2015



Alexandra Donovalová
Autorka práce



RNDr. Ondřej Zítka, Ph.D.
Vedoucí práce



doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.
Vedoucí ústavu



doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Žížala hnojní (*Eisenia fetida*) a kvantové tečky** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:

.....



Tato práce vznikla v rámci CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



PODĚKOVÁNÍ:

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce RNDr. Ondřeji Zítkovi, Ph.D. za jeho rady, užitečné připomínky, vstřícnost a ochotu vést tuto práci.

Dále bych velmi ráda poděkovala Mgr. et Bc. Markétě Komínkové za její volný čas, který věnovala mně a mé práci.

Veliké dík patří Prof. Ing. Renému Kizekovi, Ph.D. a Doc. RNDr. Vojtěchu Adamovi a všem pracovníkům Laboratoře metalomiky a nanotechnologií za umožnění vypracování bakalářské práce a za vytvoření přátelské pracovní atmosféry a společnosti.

Abstrakt:

Žížala hnojní (*Eisenia fetida*) a kvantové tečky

Biosyntéza je jednou z nových možností pro syntézu nanočástic. Mimo jiné slouží biosyntéza i jako přirozená obrana organismu proti iontům těžkých kovů. Organismy, které jsou schopné biosyntézy, jsou bakterie, houby, kvasinky nebo žížala hnojní (*Eisenia fetida*). Žížala je schopna biosyntézy na chloragogení tkáni, která slouží jako játra. V práci byla hodnocena schopnost žížaly hnojní provést biosyntézu, charakterizace syntetizovaných nanočástic a vliv biosyntézy na organismus. Během hodnocení bylo zjištěno, že žížala hnojní je schopna biosyntetizovat CdTe kvantové tečky o velikosti 18 nm. Při stanovení vlivu biosyntézy na organismus byla prokázána přítomnost metalothioneinu v organismu, což dokazuje jeho účast při vzniku nanočástic.

Klíčová slova:

Žížala hnojní (*Eisenia fetida*), kvantové tečky (QDs), biosyntéza

Abstract:

Earthworm (*Eisenia fetida*) and quantum dots

Biosynthesis is one of the new possibilities for the synthesis of nanoparticles. Among others, biosynthesis serves as a natural defense against heavy metal ions. The organisms capable of biosynthesis are bacteria, fungi, yeasts or earthworm manure (*Eisenia fetida*). Earthworm is able to biosynthesis at chloragogenous tissue, which serves as a liver. In our study the ability of earthworm manure makes biosynthesis has been evaluated. Further, a characterization of synthesized nanoparticles was done with determination of influence of biosynthesis on organism. During the evaluation there has been found that earthworm is able to biosynthesize the CdTe quantum dots with 18 nm size. During the determination of the effect of biosynthesis on organism was showed the presence of metallothionein in organism, which proving participation of metallothionein in formation of nanoparticles.

Key words:

Earthworm (*Eisenia fetida*), quantum dots (QDs), biosynthesis

OBSAH

1 ÚVOD	11
2 CÍLE PRÁCE	13
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	14
3.1 ŽÍŽALA HNOJNÍ (EISENIA FETIDA).....	14
3.2 KVANTOVÉ TEČKY	15
3.2.1 <i>Stabilita kvantových teček v živých buňkách a fotostabilita</i>	17
3.2.2 <i>Toxicita kvantových teček</i>	17
3.3 METODY SYNTÉZY KVANTOVÝCH TEČEK.....	18
3.3.1 <i>Organokovová metoda</i>	18
3.3.2 <i>Metoda vodního vyluhování – nízkoteplotní reakce</i>	19
3.3.3 <i>Vodní cesta pro syntézu kvantových teček</i>	20
3.3.4 <i>Biosyntéza QDs</i>	21
3.4 METODY CHARAKTERIZACE KVANTOVÝCH TEČEK.....	25
3.4.1 <i>Ultrafialovo-viditelná spektroskopie (UV-Vis)</i>	25
3.4.2 <i>Fotoluminiscenční spektroskopie (PL)</i>	26
3.4.3 <i>Transmisní elektronový mikroskop (TEM)</i>	27
3.4.4 <i>Rentgenová difrakční spektrometrie (XRD)</i>	28
4 MATERIÁL A METODIKA	30
4.1 MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	30
4.1.1 <i>Testovaný organismus</i>	30
4.1.2 <i>Chemikálie použité pro kultivaci žížal</i>	30
4.2 METODY	30
4.2.1 <i>Kultivace žížal</i>	30
4.2.2 <i>Příprava vzorku pro analýzy</i>	31
4.2.3 <i>Spektrofotometrické stanovení</i>	32
4.2.4 <i>Fluorescenční a absorpční spektra</i>	32
4.2.5 <i>Stanovení kadmia</i>	33
4.2.6 <i>Stanovení velikosti částic</i>	34
4.2.7 <i>Mikroskopie histologického preparátu</i>	34
4.2.8 <i>Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP</i>	34

4.2.9	<i>Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH</i>	34
4.2.10	<i>Stanovení koncentrace metalothioneinu</i>	35
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	36
5.1	POTVRZENÍ BIOSYNTÉZY	36
5.1.1	<i>Stanovení kadmia v QDs</i>	36
5.1.2	<i>Spektrofotometrická ověření biosyntézy QDs</i>	37
5.2	CHARAKTERIZACE BIOSYNTETIZOVANÝCH QDs.....	38
5.2.1	<i>Velikost nanočástic a zeta potenciál</i>	38
5.2.2	<i>Výpočet kvantového výtěžku</i>	39
5.3	VLIV BIOSYNTÉZY NA ORGANISMUS	41
5.3.1	<i>Morfologie testovacího organismu</i>	41
5.3.2	<i>Stanovení antioxidační aktivity pomocí metod FRAP a DPPH</i>	42
5.3.3	<i>Stanovení koncentrace metalothioneinu ve vzorku</i>	44
6	ZÁVĚR	46
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	53

1 ÚVOD

Nanočástice jsou vzhledem ke svým vlastnostem a širokému spektru využití vyhledávané v mnoha oblastech. Mezi tyto oblasti se řadí především elektronika, zemědělství a medicína. Nanočástice mohou být syntetizovány za pomoci chemických, fyzikálních a biologických procesů. Mezi tyto patří mimo jiné i syntéza pomocí elektronového paprsku, metody chemického srážení, fotochemická syntéza nebo mikrovlny. Dále mohou být nanomateriály syntetizovány díky využití různých organických nebo anorganických látek (Landsiedel, R., Fabian, E. et al. 2012; Geszke-Moritz, M. and Moritz, M. 2013). Mohou mít různé tvary, jako je trojúhelníkový, kulovitý, šestiúhelníkový, tvar tyčinek nebo trubek (Sandana Mala, John Geraldine and Rose, Chellan 2014).

Kvantové tečky (QDs) jsou nanočástice tvořené několika stovkami až tisíci atomů a vyznačují se fluorescenčními vlastnostmi. QDs se uplatňují především v medicínských a technických oborech (Alivisatos, A. P. 1996). U QDs byly popsány značné toxické vlastnosti, které jsou způsobeny kovovými látkami, ze kterých jsou vyrobeny (Tsoi, K. M., Dai, Q. et al. 2013). Tyto kovové látky zatěžují nejen životní prostředí, ale také omezují klinickou aplikaci QDs (Sandana Mala, John Geraldine and Rose, Chellan 2014). Negativní účinky těchto nanočástic byly prokázány u bakterií, bezobratlých, ryb, řas a také u některých savců (Rivera Gil, P., Oberdörster, G. et al. 2010; Elsaesser, A. and Howard, C. V. 2012). V poslední době byla objevena cesta, jak tyto QDs syntetizovat, aniž by vykazovaly značnou toxicitu. Tímto novým směrem je biosyntéza (Trabelsi, H., Azzouz, I. et al. 2013). Jejimi hlavními výhodami jsou biokompatibilita a schopnost získat suroviny z prostředí. Biosyntéza je na rozdíl od chemické syntézy šetrná k životnímu prostředí (Dhillon, G. S., Brar, S. K. et al. 2012). Může být spuštěna několika sloučeninami – aminy, amidy, karbonylovými skupinami, bílkovinami, alkaloidy a jinými redukčními činidly, která jsou přítomna v biologických extraktech (Asmathunisha, N. and Kathiresan, K. 2013). Mezi organismy, které jsou schopny syntetizovat QDs patří *Escherichia coli* (*E. coli*) (Kang, S. H., Bozhilov, K. N. et al. 2008; Monras, J. P., Diaz, V. et al. 2012), *Klebsiella pneumoniae* (Smith, P. R., Holmes, J. D. et al. 1998), *Rhodobacter sphaeroides* (Bai, H. J., Zhang, Z. M. et al. 2006), *Klebsiella aerogenes* (Holmes, J. D., Smith, P. R. et al. 1995) a dále také kvasinky a houby, jako jsou *Sac-*

Saccharomyces cerevisiae, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulopsis species* (Kowshik, M., Vogel, W. et al. 2002), *Fusarium oxysporum* (Kumar, S. A., Ansary, A. A. et al. 2007) a *Rhodospiridium diobovatum* (Seshadri, S., Saranya, K. et al. 2011). Organismy jsou schopny vytvořit různé typy QDs (ZnS, Cd, CdTe a CdSe) (Bao, H. F., Lu, Z. S. et al. 2010). QDs jsou schopny vytvořit i jiné organismy než jsou mikroby, a to malí savci, jako jsou krysy nebo myši (Jamba, L., Nehru, B. et al. 2000) a žížaly (Tilley, R. D. and Cheong, S. 2013). Kromě živočichů mohou být pro biosyntézu použity i rostliny, které mohou biosyntetizovat jak ve svém organismu, tak je možné využít extrakt z rostlin jako redukční činidlo pro syntézu (Kharissova, O. V., Dias, H. V. R. et al. 2013).

Mimo možnosti získávání nanočástic je biosyntéza také spojena se schopností organismu odolávat toxickým účinkům kovů v prostředí (Wang, F. Y., Shu, L. J. et al. 2013). Bylo zjištěno, že při biosyntéze dochází ke zvýšení exprese genů zapojených v ochraně proti těžkým kovům, ale také naopak ke snížení oxidativního stresu a dalších negativních účinků na organismus v porovnání s nebiosyntetizujícím organismem (Valizadeh, A., Mikaeili, H. et al. 2012; Winnik, F. M. and Maysinger, D. 2013). Pokud nedochází v těle organismu k biosyntéze v přítomnosti kadmia, může dojít ke změnám v genové expresi, zhoršení reprodukce a plodnosti, snížení juvenilní životaschopnosti až ke zvýšení úmrtnosti (Spurgeon, D. J., Svendsen, C. et al. 2004). Biosyntézu je tedy možno považovat za ochranný mechanismus organismu proti kovovým iontům (Nakamori, T. and Kaneko, N. 2013).

2 CÍLE PRÁCE

- Biosyntéza QDs pomocí žížaly hnojní (*Eisenia fetida*) při kontrolovaných podmínkách. Po kultivaci žížal bude následovat extrakce QDs z těl žížal.
- Charakterizace pomocí elektrochemické metody, kdy se bude stanovovat koncentrace kadmia v různých fázích zpracování vzorku. Toto stanovení napomůže k vybrání frakce, která by měla obsahovat QDs.
- Charakterizace vzorku pomocí spektrofotometrických metod. Budou stanovena fluorescenční a absorpční spektra, velikosti nanočástic a jejich zeta potenciál.
- Stanovení vlivu biosyntézy na organismus, kdy bude provedena mikroskopie histologického preparátu pro ověření, zda biosyntéza nezpůsobuje morfologické změny na těle žížaly. Dále bude stanovena antioxidační aktivita pomocí metod FRAP a DPPH a bude stanovena koncentrace metalothioneinu, který působí jako antioxidant.

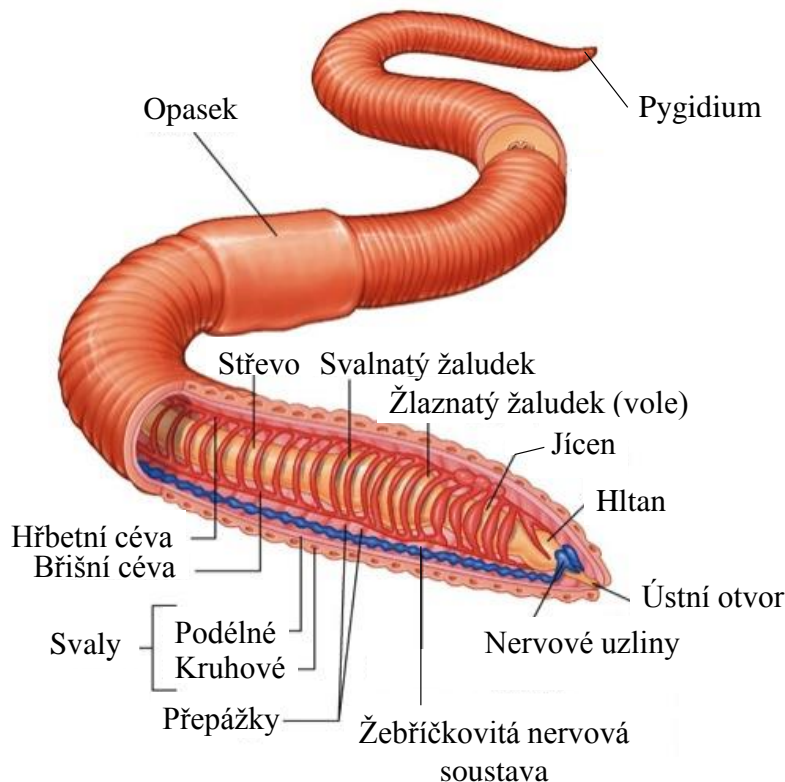
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Žížala hnojní (*Eisenia fetida*)

Obecně se udává, že žížala se podle taxonomického zařazení řadí do kmene kroužkovci (Annelida), podkmene opaskovci (Clitellata), třídy máloštětinatci (Oligochaeta), řádu haplotaxida a podřádu žížaly (Lumbricina). Tělo žížaly je rozděleno na články, které jsou odděleny blanitou přepážkou. Poslední tělní články srůstají v konečný článek, takzvané pygidium. V první třetině těla jsou zduřelé články tvořící opasek a jsou v nich obsaženy kožní žlázy. Výměšky opasku umožňují spojení jedinců a přenos spermií při kopulaci, nebo tvorbu kokonu kolem vajíček. Na povrchu těla mají tenkou pokožku, kterou chrání ochranná vrstva nazývaná kutikula. Ta může u některých druhů opalizovat. Pokožka obsahuje slizové žlázy. Vyprodukovaný sliz chrání suchozemské druhy před vyschnutím a činí je kluzkými. Z pokožky vyrůstají štětinky, které se opírají o povrch a napomáhají k pohybu. Žížaly nevytváří parapodia.

Trávicí trakt je tvořen ústním otvorem, na něj navazuje svalnatý hltan, jícen rozšiřující se ve vole (považuje se za žláznatý žaludek), svalnatý žaludek a rovné střevo zakončené řitním otvorem. Po stranách přední části trávicí trubice jsou vápenaté žlázy, které neutralizují přebytečné organické kyseliny získané z potravy. Na hřbetní straně střeva je vnitřní řasa (typhlosolis), která zvětšuje trávicí plochu a umožňuje rychlejší průchod potravy. Žížala nemá kusadla. Dýchání je zajištěno celým povrchem těla. Cévní soustava je uzavřená, krev obsahující hemoglobin obíhá v cévách na hřbetní (pulsující hřbetní céva) a břišní straně (břišní céva) těla. V břišní cévě krev putuje odpředu dozadu. V každém tělním článku jsou velké cévy propojeny krátkými cévami. Hustá síť kožních vlásečnic zajišťuje okysličování krve. Vylučovací soustavu tvoří metanefridie a chloraogenní epitel. Nervová soustava je tvořena nervovými uzlinami a je nazývána jako uzlinová nervová soustava (gangliová). Nervové uzliny jsou v každém tělním článku a jsou propojeny nervovými vlákny – tvoří takzvanou „žebříčkovitou nervovou soustavu“. Smyslové orgány, které má žížala vyvinuty, jsou hmatové, tvořené štíhlými smyslovými buňkami a světločivé buňky v pokožce. Ty zapřičiňují to, že žížala utíká před světlem, tzn. je fotofobní. Žížaly jsou hermafrodité, to znamená, že mají samičí i samčí

pohlavní soustavu (Sims, R.W. and Gerard, B.M. 1985; Langrova, I. 2010). Anatomie žížaly hnojní je znázorněna na obrázku 1.

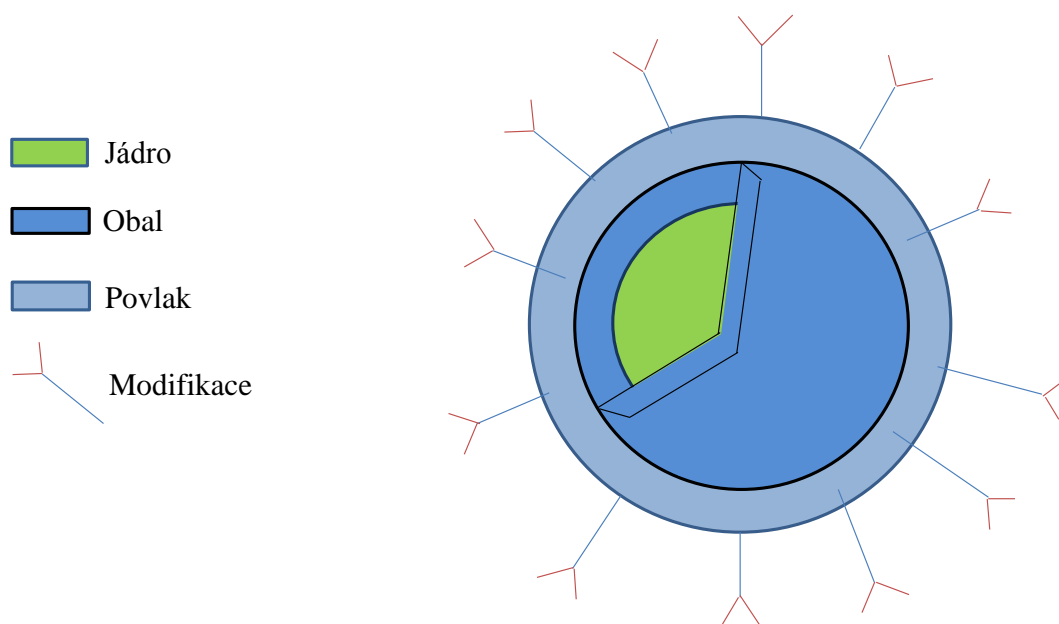


Obrázek 1.: Anatomie žížaly hnojní (*Eisenia fetida*), (převzato z www.mrb-science.wikispaces.com).

3.2 Kvantové tečky

Kvantové tečky (QDs) jsou nanočástice z polovodičových materiálů, které se skládají ze stovek až několika tisíc atomů II a VI skupiny prvků, nebo III a V skupiny prvků. Vyznačují se fluorescenčními vlastnostmi, jejich excitační a emisní spektrum je dáno jejich velikostí. Jejich všestranné využití lze uplatnit při mnoha příležitostech. Velký potenciál zaznamenávají QDs v zobrazovacích technikách v medicínských oborech. Pro bioaplikaci je důležitá správná volba velikosti kvantových teček (Alivisatos, A. P. 1996). QDs se skládají z i) jádra, které tvoří centrální část a spolu s velikostí QDs určuje optické vlastnosti a konečnou strukturu. Okolí jádra tvoří ii) anorganický obal, který je tvořen z několika vrstev polovodičových atomů.

Toxicita QDs je u různých organismů rozdílná. Například u améb (měňavek) nebyl detekován žádný vliv na růst buněk a QDs neměly žádný toxický účinek na buněčnou signalizaci a motilitu buněk; u rostlin se zjistilo, že poměr hladiny redukovaného glutathionu (GSH) vzhledem k oxidovanému glutathionu (GSSG) se snížil a ukazuje na to, že kvantové tečky způsobují oxidativní stres; u živočichů mohou QDs ohrozit nejen mitochondrie, ale i vývoj endoteliálních buněk a mohou vést až k apoptóze (Valizadeh, A., Mikaeili, H. et al. 2012). Absorpce, distribuce, metabolismus, vylučování a toxicita QDs závisí na řadě faktorů odvozených z fyzikálně-chemických vlastností a podmínek okolního prostředí, koncentrace, náboje, velikosti QDs, mechanické stability a v neposlední řadě i na jejich složení (Hardman, R. 2006). CdTe QDs jsou jedny z nejvíce syntetizovaných QDs a jsou široce využívány v průmyslových a biomedicínských aplikacích díky jejich fotoluminiscenci ve viditelné části spektra. Ukázaly se jako slibné při zobrazování v živých buňkách. CdTe QDs emitují v celé oblasti viditelného spektra. Emise CdTe QDs je v rámci viditelného světelného spektra možná v závislosti na velikosti částic od modré přes zelenou, žlutou až k červené. Tyto materiály mají mnoho výhod, jako je dobrá fotostabilita a kvantový výtěžek (Bao, H. F., Lu, Z. S. et al. 2010). Schéma stavby kvantové tečky je uvedeno na obrázku 2.



Obrázek 2.: Stavba kvantové tečky.

3.2.1 Stabilita kvantových teček v živých buňkách a fotostabilita

Bylo zjištěno, že čím větší jsou QDs, tím více klesá jejich stabilita. QDs, které mají průměr jádra 2,9 nm, vykazují vysokou stabilitu v buňkách. Kdežto velké kvantové tečky, které mají průměr jádra 5,9 nm, ztrácí svoji stabilitu ze 70 %. Aby měly QDs dobrou stabilitu v buňkách, je důležité řádně pochopit postup a proces jejich syntézy. Fotostabilita je jednou z nejdůležitějších vlastností QDs. Na jejich stabilitu má velký vliv i okolní prostředí (Mussa Farkhani, Samad and Valizadeh, Alireza 2014).

3.2.2 Toxicita kvantových teček

Toxicita nanomateriálů závisí na základní interakci mezi chemickou složkou a molekulárními drahami v organismu. Nejběžnější molekulární dráhy, které jsou ve spojení s toxicitou zkoumány, jsou spojovány s oxidačním stresem, který ovšem může být jen dočasný a nemusí mít na organismus trvalý negativní účinek. Ačkoliv se QDs mohou zdát jako přínos pro průmysl, mohou pro organismus představovat značné riziko. Jejich toxicita by mohla být rovněž spojena s vlastnostmi nanočástic, jako je jejich velikost a složení. Jedny z nejběžněji využívaných QDs jsou CdTe QDs, které jsou složeny z iontů kadmia a teluru. Toxicita kadmia je studována již déle než 50 let. Je klasifikováno jako karcinogenní látka, která ovlivňuje nejen stabilitu genomu prostřednictvím inhibice transkripce DNA, ale i vznik volných radikálů, vyvolávajících poškození DNA. Na buněčné úrovni vyvolává oxidační stres vyčerpáním antioxidantů, jako je glutathion (GSH). Dále je spojeno s poškozením mitochondrií a narušením signalizace vápníku. Ve sladkovodních živočiších byl zjištěn například oxidační stres v žábách, nebo poškození DNA v trávicím traktu. In vitro studie ukázaly, že CdTe QDs mění aktivitu oxidačních enzymů a mitochondriální funkci, a způsobují oxidační poškození biomolekul (Katsumiti, A., Gilliland, D. et al. 2014). Toxické reakce generované v bakteriálních buňkách jsou podmíněny stresovými podněty, které indukují změny v buněčné struktuře a morfologii buňky. V důsledku tohoto stresu jsou toxické reakce rozděleny do různých typů na základě charakteru toxické látky (Chouhan, R. S., Niazi, J. H. et al. 2014). Toxicita QDs je obecně spojena s jejich malou velikostí, vysokou reaktivitou jejich povrchu, fotolytickou činností a mechanickou stabilitou. Jsou často spojovány

s poškozením respiračního systému, což vede k zánětu plic (Chong, Y., Ma, Y. F. et al. 2014).

3.3 Metody syntézy kvantových teček

QDs byly jedny z prvních nanomateriálů, které se začaly využívat pro sledování nebo zobrazení makromolekul. Existují různé metody syntézy QDs, jež zajišťují jejich odlišné vlastnosti. Syntéza QDs byla poprvé provedena srážením z roztoku, který obsahoval ionty kovu (Ag, Hb, Pb, Zn, Cd, In) pomocí hydroxidu S, Se nebo Te. Byly sledovány jejich vlastnosti, jako je tvar, velikost, homogenita a povrchová struktura (Mussa Farkhani, Samad and Valizadeh, Alireza 2014). V této práci jsou zmíněny tři nejběžnější metody syntézy kvantových teček a také nová metoda používaná pro biologická odvětví.

3.3.1 Organokovová metoda

Tato metoda byla objevena v letech 1990 Steigerwaldem a Brusem a je jednou z nejpoužívanějších. Organokovová metoda pro syntézu kvantových teček se skládá ze tří složek: prekurzorů, organických povrchově aktivních látek a rozpouštědel. Někdy jako rozpouštědla slouží právě povrchově aktivní látky. Jako stabilizační činidlo pro organokovovou syntézu QDs lze využít thioly. Vlnová délka QDs závisí na velikosti krystalů, tudíž je možné ji v průběhu syntézy měnit. K této syntéze jsou potřeba iontové zdroje komponentních materiálů, jako jsou Cd^{2+} ionty. Při syntéze QDs by mělo dojít k i) nukleaci - prekurzory se při vysoké teplotě rozkládají, nebo reagují za vzniku přesycených monomerů a následuje tvorba nanokrystalů a ii) růstu jader z molekulárních prekurzorů (Mussa Farkhani, Samad and Valizadeh, Alireza 2014). Tato metoda vyžaduje přesnou kontrolu teploty, aby se správně oddělila nukleace a růst QDs, které jsou výlučně závislé právě na teplotě. Když je reakční prostředí optimální, prekurzory se chemicky přemění na aktivní atomové nebo molekulové monomery a ty pak tvoří nanokrystaly, které využívají povrchově aktivní molekuly pro ovlivnění růstu (Sahraei, R., Nosrati, M. et al. 2012). Tyto aktivní molekuly ovlivňují tři hlavní body syntézy a to i) rozpuštění a rozpětlení nanokrystalů a podílení se na jejich růstu, ii) koordinaci nenasycených atomů

kovu na povrch kvantové tečky a zabránění vzniku hromadné QD a iii) řízení rychlosti reakce.

Mezi povrchově aktivní látky můžeme zařadit mastné kyseliny, aminy, některé aromatické látky, které obsahují dusík, molekuly s velmi dlouhými řetězci atomů uhlíku, alkyly a alkylfosfonové kyseliny. Syntéza se většinou provádí v tříhrdlé baňce připojené jedním hrdlem k Schlenkově lince (vakuové potrubí). Zbývající volná hrdla jsou utěsněna pryžovou zátkou a slouží pro aplikaci reakčních složek a měření teploty reakčního prostředí. Syntéza obvykle probíhá v inertní atmosféře, protože molekuly reakční složky mohou být pyroforické a některé druhy nanokrystalů mohou být citlivé na vzduch. Aby syntéza proběhla, musí se do baňky přidat organické rozpouštědlo a povrchově aktivní látka, což způsobí rozpuštění organických molekul z formy prášku do kapalného stavu. Baňka se dále udržuje ve vakuu při teplotě 150 až 300 °C po dobu 10 až 20 minut, aby se odstranily těkavé látky. Nakonec se přidají chalkogenidy jako konečné činidlo (Mussa Farkhani, Samad and Valizadeh, Alireza 2014). Přestože se pomocí této metody vyrábí vysoce kvalitní QDs, má však i několik nevýhod. Řadí se mezi ně například nutnost dalšího zpracování QDs za účelem modifikace optických vlastností QDs, nebo jejich modifikace na QDs rozpustné ve vodě. Také toxicita rozpouštědel používaných během syntézy je poměrně vysoká (Williams, Juandria V., Adams, Claire N. et al. 2007).

3.3.2 Metoda vodního vyluhování – nízkoteplotní reakce

QDs syntetizované pomocí organokovové metody využívající alifatické koordinační ligandy jsou rozpustné pouze v nepolárních organických rozpouštědlech. Proto je třeba upravit je tak, aby se staly rozpustnými ve vodě v souladu s biologickým prostředím. Byly vyvinuty dva postupy, jak tohoto cíle dosáhnout a to i) výměnou ligandů, nebo ii) zapouzdřením do obalů kopolymerů a fosfolipidových micel

Výměna ligandů spočívá v tom, že se nahradí hydrofobní ligandy za ligandy se schopností vázat se na povrch QDs a hydrofilních solubilizačních skupin. QDs přeměněné touto metodou jsou nejvíce využívány v biologickém prostředí, přičemž výměna ligandů je obvykle ve spojení se sníženou kvantovou výtěžností a tendencí agregace a vysrážení v pufrech (Surana, K., Singh, P. K. et al. 2014). Bylo prokázáno, že tyto pro-

blémy lze zmírnit hydrofobními ligandy na povrchu QDs a tyto ligandy pokrývají amfifilní molekuly. Příklady amfifilních molekul používaných pro zapouzdření kvantových teček jsou fosfolipidové micely, nebo amfifilní kopolymery. Nátěrem polymeru lze zvětšit velikost QDs o 5 až 10 nm, v závislosti na tloušťce povlaku.

Hydrofilní ligandy použité v těchto dvou metodách jsou složeny z nabitých zbytků (karboxylových kyselin, aminů). Je třeba vzít v potaz, že mnoho fyzikálních vlastností QDs může být ovlivněno povrchovou vrstvou a celkové rozměry QDs jsou závislé na tloušťce povlaku (Mussa Farkhani, Samad and Valizadeh, Alireza 2014).

3.3.3 Vodní cesta pro syntézu kvantových teček

Tyto QDs jsou hydrofilní, což znamená, že jsou rozpustné ve vodě. Za normálních okolností mají hydrofobní povrchové ligandy. V jiném případě mohou být ligandy na povrchu nahrazeny jiným ve vodě rozpustným ligandem, jako jsou molekuly na thiolové bázi (kyselina merkaptouhličítá), peptidy a jiné. QDs mohou být také zapouzdřeny pomocí pláště z materiálů, jako je oxid křemičitý, fosfolipidy, polyethylenglykol (PEG), které zajišťují jejich biokompatibilitu a rozpustnost ve vodním prostředí (Wang, Y. L., Lu, J. P. et al. 2010). Surové materiály, jako organokovové sloučeniny při syntéze kvantových teček jsou zvláště samozápalné, nestabilní, toxické a reakce často nejsou opakovatelné. Navíc je jejich povrch hydrofobní, tudíž tyto kvantové tečky nelze použít při biologickém označování. Přímá vodní syntéza QDs, jako jsou CdTe za použití různých thiolových skupin jako stabilizačního činidla poskytuje účinnou alternativu k této metodě. Použití thiolů umožňuje kontrolu kinetiky syntézy, zajišťují stabilitu, rozpustnost a funkčnost nanočástic. V této metodě se ligandy stávají biokompatibilními a nepotřebují proces výměny (Ji, X. Y., Peng, F. et al. 2014).

Ve srovnání s organokovovou metodou má vodní metoda syntézy QDs několik výhod i nevýhod. Mezi výhody patří nízká cena, může se provádět ve velkém měřítku, syntetizované QDs pomocí této metody lze vysrážet, promýt, vysušit a následně skladovat, přičemž své vlastnosti rozpustnosti ve vodě neztrácí ani po dvou letech. Dále mezi výhody patří jednoduchost metody a vysoká reprodukovatelnost, je možno ovlivnit povrchový náboj a jiné povrchové vlastnosti QDs díky výběru stabilizačního činidla

s vhodnými volnými funkčními skupinami a biokompatibilní povrchové ligandy nepotřebují proces výměny (Sahraei, R., Nosrati, M. et al. 2012).

3.3.4 Biosyntéza QDs

Biosyntéza je jednou z nových možností pro syntézu nanočástic. Mezi její hlavní výhody patří biokompatibilita a schopnost získání surovin z původního prostředí. Biologické systémy nabízejí jedinečné a slibné nanomateriály, které mají předem určené vlastnosti. Na rozdíl od fyzikální či chemické syntézy je biosyntéza šetrná k životnímu prostředí. Biosyntéza nanočástic může být spuštěna několika sloučeninami, jako jsou karbonylové skupiny, terpenoidy, fenoly, aminy, amidy, bílkoviny, barviva, alkaloidy a jiná redukční činidla přítomná v biologických extraktech (Asmathunisha, N. and Kathiresan, K. 2013). Mezi organismy, které jsou schopny syntetizovat kvantové tečky, patří například bakterie (*Escherichia coli*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Klebsiella pneumoniae*), kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodospiridium diobovatum*), houby (*Fusarium oxysporum*) nebo žížaly (*Lumbricus rubellus*, *Eisenia fetida*) (Asmathunisha, N. and Kathiresan, K. 2013). Ačkoli byly organismy vytvořeny různé varianty QDs (ZnS, PdS, CdS, a CdSe) mezi nejvíce syntetizované patří CdTe QDs. CdTe QDs mají relativně vysokou fotoluminiscenci a kvantový výtěžek. Kromě toho vykazují vynikající rozpustnost ve vodě, výbornou stabilitu a biologickou snášenlivost organismem (Mussa Farkhani, Samad and Valizadeh, Alireza 2014).

3.3.4.1 Biosyntéza CdTe kvantových teček pomocí *Escherichia coli*

Bakterie jsou nejrozšířenější organismy na Zemi. Jsou to prokaryotické buňky rozdílné velikosti, tvaru a způsobu získávání energie. Žijí ve všech přírodních podmínkách. *Escherichia coli* je gramnegativní všudypřítomná bakterie, která se velmi často využívá jako modelový organismus při biologických studiích, zejména v molekulární biologii. Většina kmenů *E. coli* je neškodných a mohou být snadno kultivovány za anaerobních nebo aerobních podmínek. Vlastnosti nanočástic (velikost, tvar) je možno ovlivnit změnou parametrů, jako je teplota, pH, koncentrace daných látek, měnící se inkubační doba. Tyto parametry mohou biosyntetickou reakci jak urychlit, nebo naopak zpomalit. Biosyntézu lze ovlivnit i genovou manipulací daných organismů. Bylo prokázáno, že biosyntéza pomocí *E. coli* je nejvýhodnější v porovnání s dosud testovanými organismy

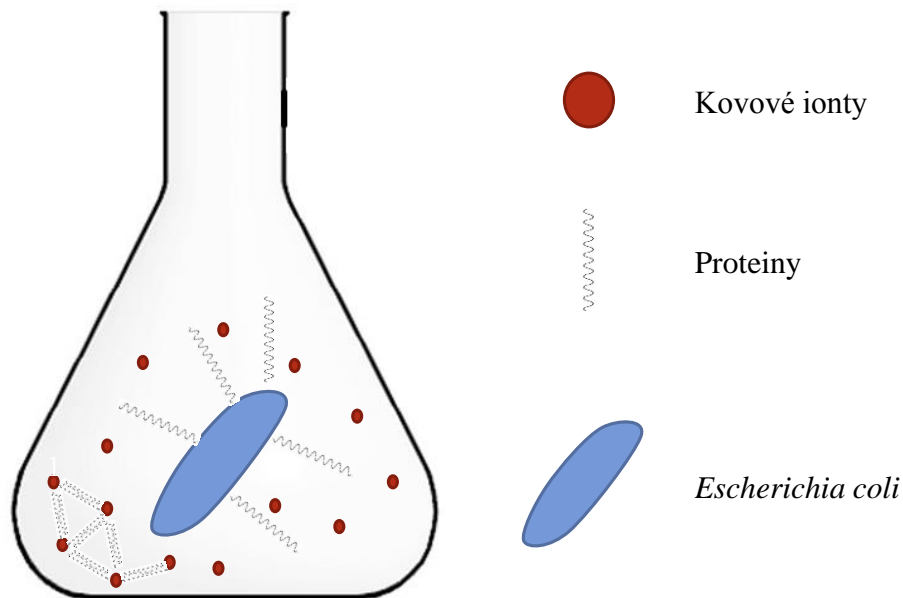
díky své finanční náročnosti a rychlosti biosyntetické reakce (Monras, J. P., Diaz, V. et al. 2012; Quester, K., Avalos-Borja, M. et al. 2013). Biosyntézou získané QDs mají velmi dobré optické vlastnosti i biokompatibilitu (Bao, H. F., Lu, Z. S. et al. 2010). Těžké kovy mají vliv na mikrobiální populaci z hlediska růstu, morfologie, poškození buněčné membrány, změny enzymatické specifity, narušení buněčné funkce, poškození struktury DNA. Mikrobiální populace vystavené toxickým koncentracím těžkých kovů si vyvinuly čtyři toleranční mechanismy, mezi které se řadí i) modifikace membrány, což omezí vstup kovu do buňky, ii) intracelulární nebo extracelulární potlačení specifické vazby na buněčnou stěnu, iii) tolerance k těžkým kovům lze také dosáhnout pomocí extracelulárního vysrážení, kdy mikroorganismy vytváří oxalát, fosfát, nebo sulfid, iv) nebo vytvoří závislost iontů kovů na energii

Ačkoli je biosyntéza pomocí bakterií považována za bezpečnou, nákladově efektivní a ekologickou, přináší také několik nevýhod. Mezi ně se řadí například časová náročnost při kultivaci mikroorganismů, menší možnost kontroly tvarů a velikostí QDs a jejich pomalá syntéza. Vyskytují se také problémy při výběru kmene bakterií, optimalizacích podmínek, jako je pH, inkubační teplota a čas a koncentrace kovových iontů (Mussa Farkhani, Samad and Valizadeh, Alireza 2014). Studie prokázaly, že zatímco některé bakterie jsou schopny syntetizovat nanočástice uvnitř buňky (intracelulárně), jiné je dokáží syntetizovat extracelulárně (Quester, K., Avalos-Borja, M. et al. 2013).

3.3.4.2 Extracelulární biosyntéza

Extracelulární biosyntéza nanočástic umožňuje jejich využití díky možnosti jejich znehynění a vložení takto upravených nanočástic na požadované místo. Díky tomuto jsou oproti nanočásticím syntetizovaných intracelulárně více prakticky využitelné a mají širší využití v optoelektronice, bioimagingu a v senzorových technologiích (Ahmad, Absar, Mukherjee, Priyabrata et al. 2002). Dále mají extracelulárně syntetizované QDs výhodu v tom, že jsou získávány v relativně čistém stavu, bez dalších buněčných proteinů a jejich další zpracování je tak jednodušší (Prathna, T. C., Mathew, Lazar et al. 2010). Takto syntetizované QDs jsou ovlivňovány proteiny, které vylučují organismy. Tyto proteiny zajišťují QDs stabilitu v roztoku a zabraňují jejich aglomeraci (Syed, A. and Ahmad, A. 2013). Mezi organismy schopné extracelulární biosyntézy se řadí například bakterie *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis*, *Klebsiella pneumoniae*, nebo

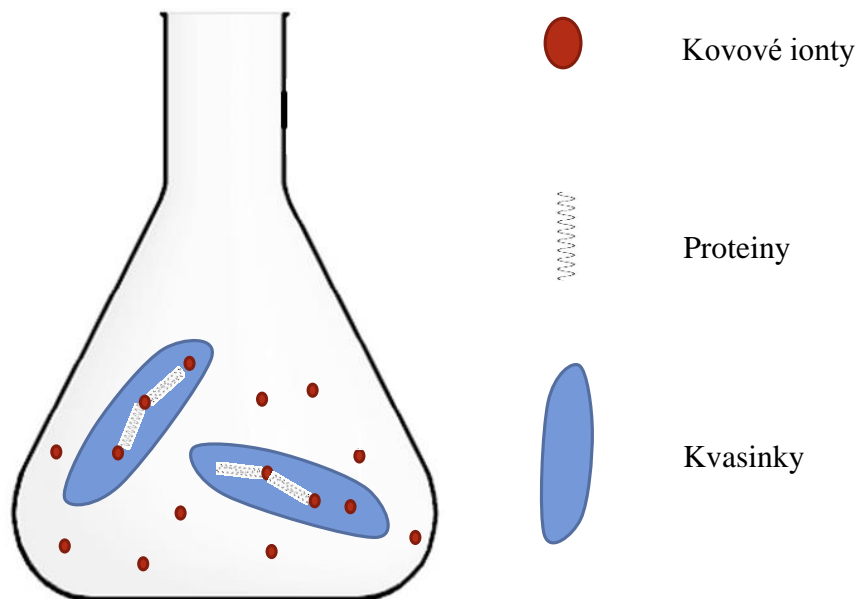
houby *Phanerochaete chrysosporium*, *Puccinia graminis*, *Fusarium oxysporum* (Chen, G. Q., Yi, B. et al. 2014) a *Aspergillus fumigatus* (Prathna, T. C., Mathew, Lazar et al. 2010). Schéma extracelulární biosyntézy je uvedeno na obrázku 3.



Obrázek 3.: Schéma extracelulární biosyntézy pomocí bakterie *Escherichia coli*. Po přidání kovových iontů do prostředí začne bakterie produkovat mimo své tělo proteiny. Ty na sebe začínají vázat kovové ionty a tvoří shluky – QDs.

3.3.4.3 Intracelulární biosyntéza

Intracelulární biosyntéza je atraktivní cestou k získání QDs a je zároveň šetrná k životnímu prostředí. Poskytuje také jednoduchý postup pro získání magnetických živých buněk s aplikací při zobrazovacích metodách a v terapii (Brayner, R., Coradin, T. et al. 2012). Intracelulární biosyntéza probíhá převážně na buněčné stěně, nebo v buňce na cytoplazmatické membráně, v periplazmatickém prostoru, cytoplazmě nebo v jádře (Du, L. W., Xian, L. A. et al. 2011). Při intracelulární biosyntéze jsou nahromaděné částice méně dispergované. Pro jejich uvolnění z buňky je třeba řada dalších postupů, jako je promytí buněk, ultrazvukové rozrušení buněk, nebo reakce s vhodným detergentem (Syed, A. and Ahmad, A. 2013). To ovšem činí tuto metodu obtížnější a časově náročnější. Mezi organismy schopné intracelulární biosyntézy se řadí například kvasinky, nebo houby *Penicillium* (Du, L. W., Xian, L. A. et al. 2011). Schéma intracelulární biosyntézy je uvedeno na obrázku 4.



Obrázek 4.: Schéma intracelulární biosyntézy pomocí kvasinek. Po přidání kovových iontů do prostředí začne kvasinka tyto ionty pohlcovat. V těle se kovové ionty váží na proteiny a tvoří s nimi shluky – QDs.

3.3.4.4 Biosyntéza CdTe kvantových teček pomocí kvasinek

Pro tuto biosyntézu se mohou použít například kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Tyto kvasinky jsou schopny jednoduše a efektivně syntetizovat vysoce fluorescenční CdTe QDs s jednotnou velikostí (2,0 – 3,6 nm). Buňky *Saccharomyces cerevisiae* jsou velmi propracovaný „mini-stroj“, ve kterém řídí buněčné chování tisíce biochemických reakcí. Rychle a přesně reagují na měnící se prostředí. Syntéza QDs vyžaduje, aby dané látky byly v příslušných valenčních stavech, a musí reagovat navzájem na správném místě a ve vhodnou dobu. Tato biosyntéza má vysoký výtěžek (téměř 90 %). CdTe QDs mohou být z kvasinek snadno odebrané a emitují ve vlnové délce 490 – 560 nm s relativně vysokou fotoluminiscencí. Mají vysokou stabilitu, biokompatibilitu (Bao, H. F., Lu, Z. S. et al. 2010).

3.3.4.5 Biosyntéza CdTe kvantových teček pomocí hub

Houby jsou eukaryotické organismy, které žijí v širokém spektru přírodních stanovišť. Jsou to většinou dekompoziční organismy. Jsou výbornými kandidáty pro biosyntézu QDs. Nejběžněji používaná houba je *Fusarium oxysporum*, která je schopna synte-

tizovat vysoce fluorescenční extracelulární CdTe QDs. Výsledným produktem jsou kovové nanočástice o velikosti 20 – 50 nm (Quester, K., Avalos-Borja, M. et al. 2013). Proces biosyntézy využívá iontů Cd a Te ve velmi zředěné formě a umožňuje postupné vytvoření QDs. Tyto QDs jsou biosyntetizovány proteiny, které vylučuje houba. Proteiny zajišťují QDs stabilitu ve vodném roztoku tím, že brání jejich agregaci. Dále byla u těchto QDs prokázána antibakteriální aktivita proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím (Syed, A. and Ahmad, A. 2012; Syed, A. and Ahmad, A. 2013).

3.3.4.6 Biosyntéza CdTe kvantových teček pomocí členovců

Žížaly se využívají jako ukazatelé kontaminace půdy. Jsou schopné provádět biosyntézu CdTe QDs, které emitují v zelené oblasti viditelného spektra. Schopnost biosyntézy byla prokázána například u žížal druhu *Lumbricus rubellus* nebo *Eisenia fetida*. CdTe QDs jsou pak izolovány z chloragenní tkáně a je možné je dále plně využít. Thioly reagují s prekurzory kadmia a jsou považovány za základní jednotku na povrchu výsledné kvantové tečky. Využití těchto QDs je například při zobrazovacích metodách v medicínském oboru (Maboeta, M. S., Reinecke, S. A. et al. 2004; Sturzenbaum, S. R., Hockner, M. et al. 2013).

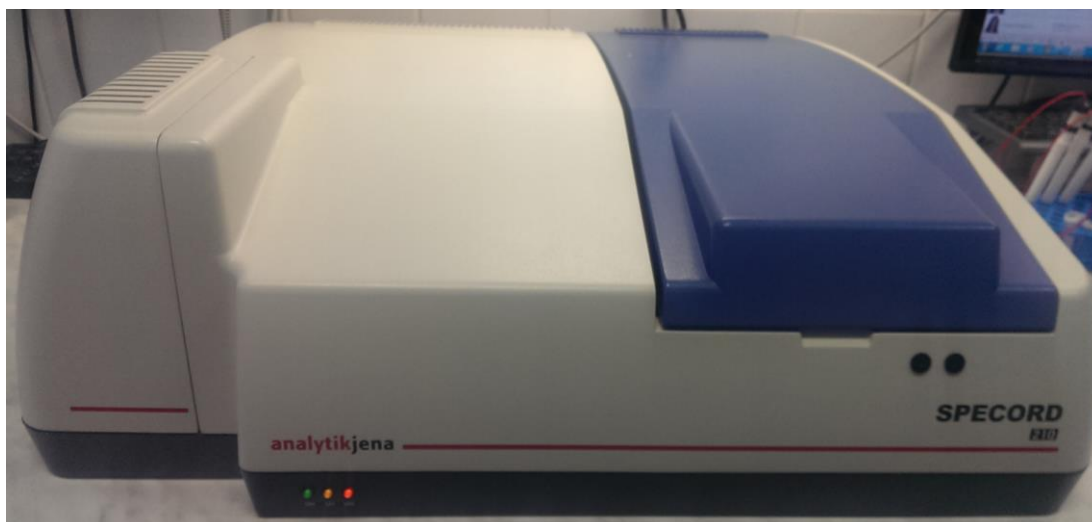
3.4 Metody charakterizace kvantových teček

QDs lze charakterizovat mnoha způsoby. V této práci jsou uvedeny 3 nejznámější metody využívané právě k charakterizaci nejen nanočástic.

3.4.1 Ultrafialovo-viditelná spektroskopie (UV-VIS)

Fungování tohoto přístroje je poměrně jednoduché. Paprsek světla z viditelného a/nebo UV záření je rozdělen na dílčí vlnové délky pomocí hranolu nebo difrakční mřížky. Každá vlnová délka je dále rozdělena na dva paprsky o stejné intenzitě pomocí půl zrcadlového zařízení. Jeden paprsek – paprsek vzorku – prochází kyvetou obsahující roztok, který byl studován na transparentním rozpouštědle. Druhý paprsek – referenční paprsek – prochází kyvetou obsahující pouze rozpouštědlo. Intenzity těchto světelných paprsků jsou měřeny elektronickými detektory a následně porovnány. Ultrafialová část se pohybuje v rozmezí 200 až 400 nm a viditelná část v rozmezí 400 až 800 nm. Různé

sloučeniny mohou mít velmi odlišné absorpční maxima a absorbance. Látky s intenzivní absorpncí musí být měřeny ve zředěném roztoku. Tato metoda vyniká především svojí dostupností, jednoduchostí a relativně nízkou nákladovostí v porovnání s jinými spektrometrickými metodami. Stanovení vzorku o nižší koncentraci bývá ve spojení s touto metodou obtížnější, protože je méně citlivá (Maciel, J. V., Soares, B. M. et al. 2014). Přístroj je zobrazen na obrázku 5.



Obrázek 5.: Specord 210 spektrofotometr, Analytik Jena AG (Analytik Jena, Německo).

3.4.2 Fotoluminiscenční spektroskopie (PL)

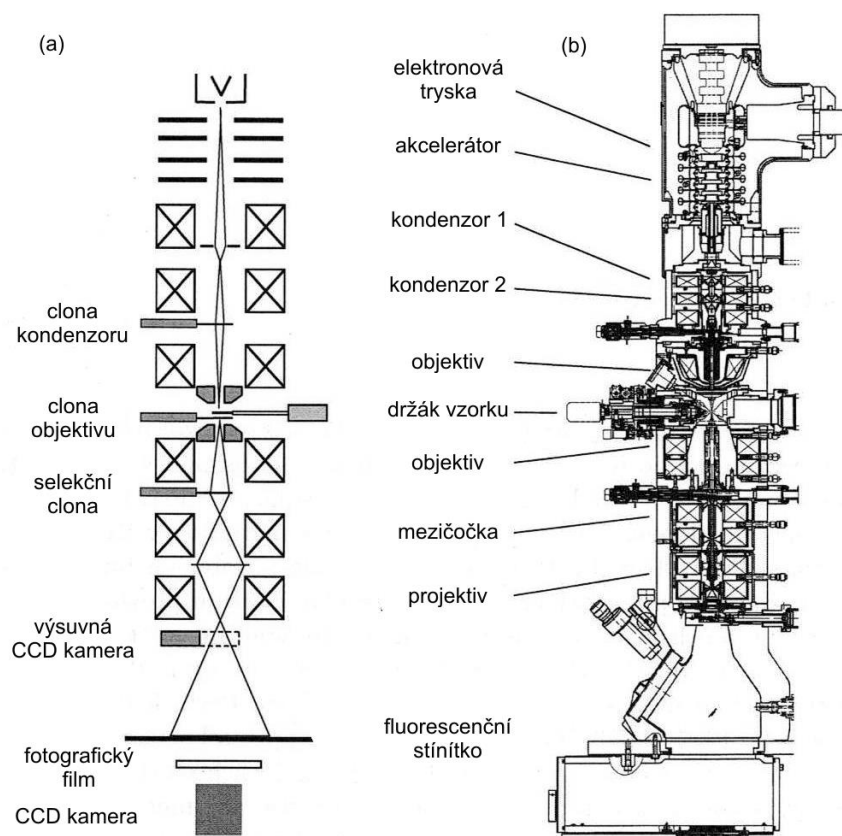
Fotoluminiscenční spektroskopie je metoda, která je bezkontaktní, nedestruktivní a zkoumá elektronickou strukturu materiálu. Mezi její schopnosti patří měření různé excitace, detekční rozsah se pohybuje v rozmezí $0,4 - 2,7 \mu\text{m}$ a schopnost prostorového rozlišení v rozmezí $1 - 2 \mu\text{m}$. Obsah a intenzita spektrální emitované fotoluminiscence je přímým měřítkem důležitých vlastností materiálu. Mezi tyto vlastnosti se řadí i) bandgap determinace, kdy spektrální distribuce z polovodiče může být analyzována na nedestruktivní determinaci elektronického bandgapu. Toto poskytuje nástroje pro kvantifikaci elementárních složek složeného polovodiče, který je životně důležitým materiálem ovlivňujícím působení solárního záření na buňku, ii) stupeň znečištění a detekce defektu, kdy PL spektrum při nízkých teplotách vzorku často ukazují píky související s nečistotami obsaženými v materiálu. Vysoká citlivost této metody umožňuje identifikovat extrémně nízké koncentrace nečistot, které mohou výrazně ovlivnit kvalitu mate-

riálu a výkon přístroje, iii) mechanismy rekombinace, kdy množství PL emitace z materiálu, přímo souvisí s poměrem zářivých a nezářivých rekombinací. Míra nezářivé rekombinace je obvykle spojena s nečistotami ve vzorku, kdy je možné díky této metodě kvalitativně sledovat změnu jakosti vzorku (NREL 2014).

3.4.3 Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

Jedná se o jednu z experimentálních metod, která umožňuje zobrazit mikrostrukturu uvnitř materiálu řádově od několika mikrometrů až po atomové rozlišení. TEM je obdobou světelného mikroskopu, přičemž světelný zdroj je nahrazen zdrojem elektronů, skleněné čočky jsou nahrazeny čočkami elektromagnetickými a místo okuláru je zde fluorescenční stínítko. Celá dráha elektronů musí být ve vakuu. Jedním z důvodů, proč je vakuum nezbytné je to, že ve vzduchu by byl elektron absorbován. Dále by molekuly obsažené ve vzduchu způsobily kontaminaci vzorku. Elektronový mikroskop se skládá ze čtyř hlavních částí: tubusu s elektronovou optikou, vakuového systému, nezbytné elektroniky a softwaru (Safarova, Klara 2008). TEM umožňuje pozorování preparátů do tloušťky 100 nm při vysokém zvětšení s velkou rozlišovací schopností (Williams, DavidB and Carter, C. Barry 2009). Při dopadu elektronů na vzorek může nastat několik situací a to, že i) některé elektrony se absorbují v závislosti na složení a tloušťce vzorku, což způsobuje tzv. amplitudový kontrast obrazu, ii) další elektrony jsou rozptýleny pod malým úhlem, jejichž velikost opět závisí na složení vzorku. Toto způsobuje takzvaný fázový kontrast obrazce, iii) v krystalických preparátech jsou elektrony rozptýleny do odlišných směrů, které se odvíjí od krystalické struktury. Toto způsobuje takzvaný difrakční kontrast obrazu, iv) některé z dopadajících elektronů mohou být odraženy a nazývají se zpětně rozptýlené elektrony, v) dopadající elektrony mohou také způsobit to, že vzorek sám od sebe emituje elektrony. Tyto se nazývají sekundární elektrony, vi) elektrony dopadající na preparát mohou způsobit, že vzorek emituje RTG paprsky, jejichž energie a vlnová délka závisí na chemickém složení vzorku, nebo vii) někdy mohou elektrony způsobit u preparátu emisi fotonů. Toto způsobuje jev, který se nazývá katodoluminiscence.

Konečným výstupem z TEM je trvalý záznam snímku. V současnosti je možné zaznamenávat buď na speciální fotografický materiál, nebo digitálně (Safarova, Klara 2008). Transmisní elektronový mikroskop je znázorněn na obrázku 6.



Obrázek 6.: Transmisní elektronový mikroskop (TEM), (převzato z www.aldebaran.cz).

3.4.4 Rentgenová difrakční spektrometrie (XRD)

Rentgenová difrakční spektrometrie (XRD) je velmi technologicky vyspělá, nedeštruktivní metoda pro analýzu veliké škály materiálů, jako jsou tekutiny, minerály, kovy, katalyzátory, plasty, farmaceutika, keramické materiály či různé polovodiče. Rentgenová difrakční spektrometrie se stala nepostradatelnou metodou pro výzkum, charakterizaci a kontrolu kvality materiálů. Mezi její aplikace se řadí například krystalografie, určování struktury, zkoumání textury, nanomateriály a nebo vysokokapacitní screening polymorfů (Bruker, Corporation). Rentgenová difrakce je tedy velmi efektivní při určení všech anorganických pigmentů a materiálů krom skla. Mezi nové aspekty difrakční metody lze zařadit stále se rozšiřující databázi látek, což dělá tyto metody nedostižitelné při identifikaci neznámých složek a jsou velice spolehlivé (Grygar, Tomas, Bezdicka, Petr et al. 2006).

XRD vychází z těchto dvou principů, mezi které se řadí i) krystalografické uspořádání látek a ii) interakce rentgenového záření s částicemi, které tvoří krystalickou mřížku.

Pokud známe hodnoty mezivzrostů různých minerálů a zjistíme-li hodnotu mezivzrostu látky pomocí XRD analýzy, můžeme určit, jaký minerál ji tvoří. Při XRD analýze se využívá charakteristického rentgenového záření, které obsahuje spektrální linie s přesně měřitelnými vlnovými délkami (Lach, Vladimír and Daňková, Marcela 1991). Přístroj pro rentgenovou difrakční spektrometrii je zobrazen na obrázku 7.



Obrázek 7.: Přístroj využívaný pro metodu rentgenové difrakční spektrometrie – Spectro xepos (Spectro CS, Česká republika).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiály a chemikálie

4.1.1 Testovaný organismus

Chov žížaly hnojní (*Eisenia fetida*) pochází z ekotoxikologické laboratoře Ústavu ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Česká republika.

4.1.2 Chemikálie použité pro kultivaci žížal

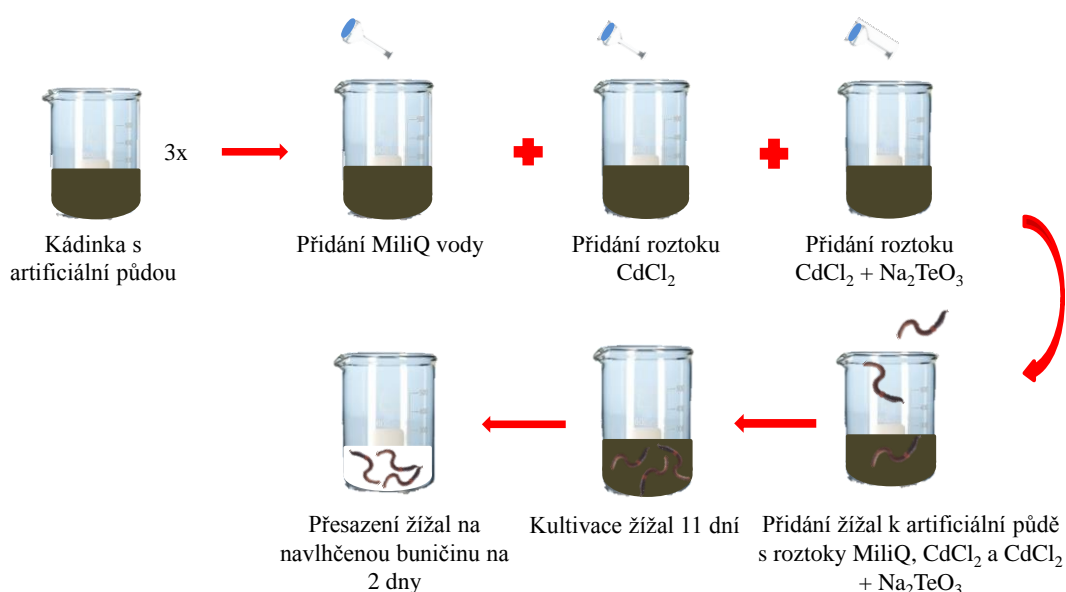
Chemické látky uvedené v textu byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a splňují specifikaci American Chemical Society (ACS), pokud není uvedeno jinak. K experimentu byl použit kadmium chlorid (CdCl_2) a telluričitan sodný (Na_2TeO_3). Deionizovaná voda byla připravena pomocí zařízení AQUAL 25 (Aqual s.r.o., Brno, Česká republika). Deionizovaná voda se dále čistila za pomoci přístroje Direct-Q vybaveným UV lampou od společnosti Millipore (Billerica, MA, USA).

4.2 Metody

Pro tento experiment bylo použito několik metod. Jako první bylo využito metod spektrofotometrických. Následovalo stanovení biochemické a elektrochemické.

4.2.1 Kultivace žížal

Žížaly byly kultivovány po dobu 11 dnů v umělé půdě s přísadou iontů kovů. Po uplynutí kultivační doby byly žížaly přesazeny na navlhčenou buničinu, kde byly ponechány 2 dny. Zde probíhalo vyčištění střev žížal. Schéma kultivace žížal je zobrazeno na obrázku 8.



Obrázek 8.: Schéma kultivace žížaly hnojní (*Eisenia fetida*). Byly přichystány 3 kádinky s artificiální půdou (150 g na 3-4 žížaly), do kterých byly přidány roztoky kovových prekurzorů. Varianty roztoků byly MiliQ voda (Kontrola), roztok CdCl_2 (Cd) a roztok $\text{CdCl}_2 + \text{Na}_2\text{TeO}_3$ (CdTe). Tyto roztoky byly po jednom smíchány s artificiální půdou, čímž bylo dosaženo 30% vlhkosti. K takto připravené půdě byly přidány žížaly a nechaly se kultivovat po dobu 11 dní. Po uplynutí kultivační doby byly žížaly vybrány a přemístěny na navlhčenou buničinu na 2 dny, kde došlo k vyčištění jejich střev.

4.2.2 Příprava vzorku pro analýzy

Žížaly byly v třecí misce zalaty tekutým dusíkem a rozdrčeny pomocí tloučku z důvodu uvolnění biosyntetizovaných nanočástic z buněk. Následovala centrifugace vzorku pro odstranění částí těl žížal. Získaný roztok s nanočásticemi byl vysrážen pomocí 2-propanolu. Po opětovné centrifugaci takto dojde k oddělení sražených nanočástic od ostatních nesražených látek v roztoku. Nakonec byl vzniklý pelet rozpuštěn vodou a takto připravený vzorek byl použit k analýzám. Podrobný postup přípravy vzorku je zobrazen na obrázku 9.



Obrázek 9.: Schéma přípravy vzorků pro analýzy. Do třecí misky byly umístěny žížaly po více kusech. Následně byly zmrazeny tekutým dusíkem. Po zmražení následovalo rozdrcení žížal pomocí tloučku na hustou hmotu, která byla zředěna MiliQ vodou (na 1 žížalu byl použit 1 ml MiliQ vody). Takto připravený vzorek byl přepipetován do mikrozkušavek centrifugován (25000 g, 10 °C, 10 minut). Po centrifugaci byl supernatant přemístěn do nové mikrozkušavky, kde se k němu přidal 1 ml 2-propanolu (1:1). Vzorek byl opět centrifugovat při stejných podmínkách. Po centrifugaci následovalo odpipetování supernatant do nové mikrozkušavky. Tento supernatant byl následně použit pro analýzy.

4.2.3 Spektrofotometrické stanovení

Spektroskopické techniky jsou velmi jednoduché, nákladově efektivní, rychlé a ne-destruktivní. Fluorescenční spektroskopie je kvantitativní spektroskopická analýza, která je velmi citlivá, pokud jde o organické a anorganické sloučeniny. Obecně nevyžaduje použití činidel nebo předúpravu vzorků před jejich charakterizací (Guzman, E., Baeten, V. et al. 2015).

4.2.4 Fluorescenční a absorpční spektra

Fluorescenční a absorpční spektra byla měřena pomocí přístroje Tecan Infinite 200 PRO (Tecan, Maennedorf, Švýcarsko). Absorpční spektra byla měřena v rozsahu od 300 do 500 nm. Pro měření fluorescence byla použita excitační vlnová délka 400 nm a

emisní vlnové délce v rozmezí od 440 do 850 nm. Zisk detektoru byl nastaven na 100. Vzorky byly umístěny do UV-transparentní 96 jamkové mikroděstičky s plochým dnem od společnosti CoStar (Corning, USA). Do jamek bylo napipetováno 100 μl vzorku a 100 μl vody, která sloužila jako kontrola.

Data z fluorescenční spektroskopie byly použity pro výpočet kvantového výtěžku. Kvantový výtěžek byl vypočítán pomocí rovnice:

$$\phi_X = \phi_{ST} \left(\frac{Grad_X}{Grad_{ST}} \right) \left(\frac{\eta_X^2}{\eta_{ST}^2} \right)$$

Kdy indexy ST označují standard a X testovanou látku, ϕ značí fluorescenční kvantový výtěžek, Grad určuje integrace fluorescence a absorbance zanesené do grafu a η představuje refrakční index rozpouštědla.

4.2.5 Stanovení kadmia

Stanovení kadmia bylo prováděno za pomoci Diferenční pulsní voltametrie přístrojem 797 VA Computrace (Metrohm, Švýcarsko), s použitím tříelektrodeového zapojení, které sestává z i) visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE), která byla zároveň použita jako pracovní elektroda, ii) platinové pomocné elektrody a iii) chloridostříbrné referenční elektrody (Ag/AgCl/3M KCl).

Pro zpracování dat byl použit software 797 VA Computrace od společnosti Metrohm. Před použitím byly všechny vzorky zbaveny kyslíku pomocí argonu (99,999 %), kterým byly propláchnuty. Jako pomocný elektrolyt byl použit acetátový pufr (0,2 M CH_3COONa a CH_3COOH , pH 5). Podpurný elektrolyt byl po každé analýze vyměněn. Parametry, které byly použity při měření, jsou následující: počáteční potenciál = -1,3 V, konečný potenciál = 0,2 V, odkysličení argonem = 90 s, depozice = 240 s, časový interval = 0,04 s, step potenciál = 5 mV, modulace amplitudy = 25 mV, adsorpční potenciál = -1,15 V, objem vstříkovaného vzorku = 20 μl , objem měřeného roztoku = 2 ml (20 μl vzorku + 1980 μl acetátového pufru).

4.2.6 Stanovení velikosti částic

Distribuce velikosti částic a jejich průměrná velikost byla stanovena pomocí rozptylu laserového světla na přístroji Malvern Zeta sizer (NANO-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, U. K.). Roztok nanočástic s destilovanou vodou o objemu 1,5 ml ($c = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) byl napipetován do polystyrénové latexové buňky. Následně se vzorek měřil při úhlu detekce, který tvořil 173° . Vlnová délka byla 633 nm, indexu lomu byl 0,30, skutečný indexu lomu byl 1,59 a teplota byla 25°C .

4.2.7 Mikroskopie histologického preparátu

Tkáňové parafínové bločky byly nařezány pomocí mikrotomu. Jednotlivé řezy byly umístěny na podložní sklíčko, kde byly fixovány a následně obarveny pomocí barvení hematoxylin-eosin. Mikroskopie byla prováděna pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus DP73 (Olympus Czech Group, s.r.o., Česká republika).

4.2.8 Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP

Tato metoda je založena na redukcí železitých komplexů jako je 2,4,6-tripyridyl-S-triazin (TPTZ) s chloridem železitým (FeCl_3). V tomto případě dochází po redukcí k tvorbě barevných komplexů (Sulc, M., Lachman, J., et al. 2007). Základním úkonem byla příprava tří reagensů, které byly smíchány v poměru 1:1:10 (TPTZ: FeCl_3 :acetátový pufr). Následně bylo do plastových kyvet pipetováno 150 μl reagensie a 3 μl vzorku. Absorbance byla měřena při $\lambda = 605 \text{ nm}$. Pro tuto analýzu byl použit přístroj BS 400 automatický spektrofotometr (Mindray, Čína).

4.2.9 Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH

Je to metoda založena na schopnosti stabilního volného radikálu reagovat s donory vodíku. Při této reakci se po redukcí antioxidantem (AH) nebo radikálem ($\text{R}\cdot$) roztok odbarví. Tento jev si můžeme vysvětlit následující reakcí:



Do plastových kyvet bylo napipetováno 150 μl reagensie R1 a následně bylo přidáno 15 μl vzorku. Absorbance byla měřena při $\lambda = 505 \text{ nm}$. Pro tuto analýzu byl použit přístroj BS 400 automatický spektrofotometr (Mindray, Čína).

4.2.10 Stanovení koncentrace metalothioneinu

Koncentrace metalothioneinu se měří pomocí Diferenční pulsní voltametrie - Brdičkova reakce. Voltametrie je elementární elektrochemická metoda prováděna na všech elektrochemických analyzátoch. Z tohoto důvodu je velmi dobře přístupná a snadno použitelná. Voltametrie je dostatečně spolehlivá metoda a lze pomocí ní testovat široké spektrum antioxidantů bez použití specifických činidel. Bylo prokázáno, že voltametrie má svůj potenciál při stanovování oxidačního stresu (Pohanka, M., Hynek, D. et al. 2012).

Pro stanovení koncentrace metalothioneinu bylo využito přístroje 747 VA Stand připojeného k 693 VA Procesor a 695 Autosampler (Methrom, Švýcarsko) za použití standardních cel se třemi elektrodami a s chlazením vzorku během měření na 4 °C pomocí Julabo F25 (JULABO, Německo). Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s kapkou o velikosti 0,4 mm², byla použita jako pracovní elektroda. Ag/AgCl/3 M KCl elektroda byla použita jako referenční elektroda a platinová elektroda byla použita jako pomocná elektroda. Analyzované vzorky byly před měřením zbaveny kyslíku probubláním argonem (99,999 %) po dobu 120 s. Dále byl použit Brdičkův elektrolyt obsahující 1 mM Co(NH₃)₆Cl₃ a 1 M amoniakální pufr NH₃(aq) + NH₄Cl, pH = 9,6. Podpurný elektrolyt byl měněn po každém analyzovaném vzorku. Parametry měření byly následující: počáteční potenciál = -0,7 V, konečný potenciál = -1,75 V, modulační čas = 0,057 s, časový interval = 0,2 s, step potenciál = 2 mV, modulace amplitudy = -250 mV, Eads = 0 V, objem vstříkovaného vzorku = 25 μl , objem měřeného roztoku = 2 ml (25 μl vzorku + 1975 μl Brdičkova elektrolytu).

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

V této práci byla testována schopnost biosyntézy pomocí žížaly hnojní (*Eisenia fetida*) a vliv biosyntetického procesu na organismus.

Žížaly byly chovány v umělé půdě o 30% vlhkosti, které byla docílena přidáním vody s kovovými prekurzory. Varianty připravovaných roztoků byly MiliQ voda (Kontrola), roztok CdCl_2 (Cd) a roztok $\text{CdCl}_2 + \text{Na}_2\text{TeO}_3$ (CdTe), vše v koncentraci 50 μg na 1 g půdy. Produkty všech 3 variant byly porovnávány v celé práci.

5.1 Potvrzení biosyntézy

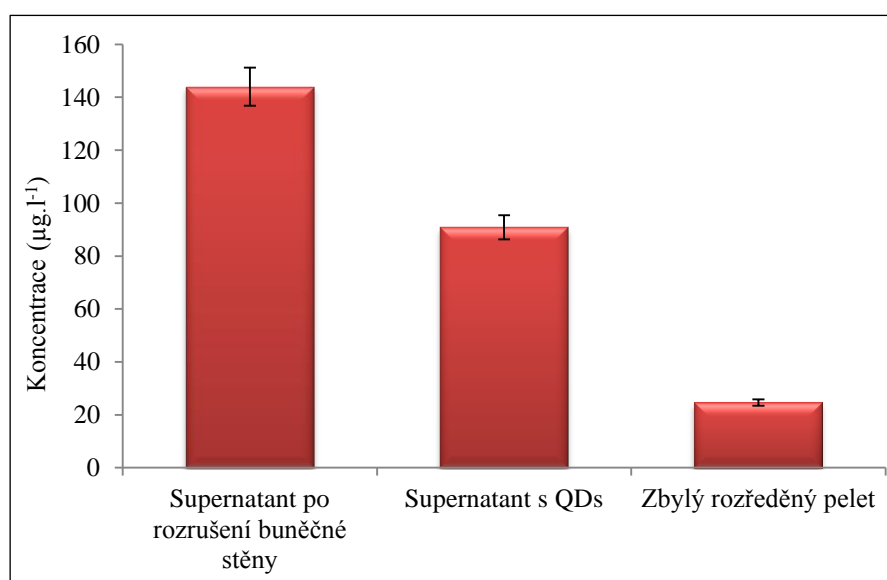
Potvrzení, že biosyntéza v těle žížaly hnojní proběhla, bylo provedeno pomocí spektrofotometrických metod a pomocí stanovení koncentrace kadmia ve vzorcích.

5.1.1 Stanovení koncentrace kadmia v QDs

Tato charakterizace byla prováděna za účelem zjištění přítomnosti Cd^{2+} iontů ve vzorcích. Díky stanovení koncentrace jsme zjistili, zda je možnost, že se ve vzorku vyskytují QDs, které byly z těchto Cd^{2+} iontů syntetizovány. Následně jsme mohli provést výběr vzorků, které tyto ionty obsahovaly. Tyto vzorky byly podrobeny dalším analýzám.

Stanovení koncentrace kadmia ve vzorcích bylo prováděno v různých fázích zpracování vzorku dle kapitoly 4.2.2. V průběhu získávání biosyntetizovaných QDs byly odebrány tři vzorky, ve kterých byla stanovena koncentrace Cd^{2+} iontů. První analyzovaný vzorek (supernatant po rozrušení buněk) byl odebrán po rozdrcení žížal tloučkem a naředění vzorku MiliQ vodou, druhý vzorek (supernatant s QDs) byl odebrán po přidání 2-propanolu a následné centrifugaci a třetí vzorek (zbylý rozředěný pelet) byl připraven po poslední centrifugaci. Nejvyšší koncentrace kadmia byla stanovena ve vzorku po rozrušení buněčné stěny. Hodnota koncentrace se pohybovala v rozmezí 144 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Lze si tento výsledek vysvětlit přítomností volných iontů kadmia, které nebyly vázány v tělech žížal a nebyly tedy přeformovány do podoby QDs. Druhý ze vzorků byl vysrážen pomocí 2-propanolu. Zde byla stanovena druhá nejvyšší koncentrace kadmia, která

se pohybovala v rozmezí $91 \mu\text{g.l}^{-1}$. Domníváme se, že tato hodnota koncentrace Cd^{2+} iontů je způsobena přítomností QDs, jelikož QDs se v prostředí izopropanolu sráží a ve vodném prostředí jsou rozpustné. V posledním vzorku byla naměřena nejnižší koncentrace kadmia $25 \mu\text{g.l}^{-1}$. Tato peleta opět obsahuje volné ionty Cd^{2+} , které nebyly formovány do QDs. Výsledky byly zaneseny do grafu (Obr. 10).



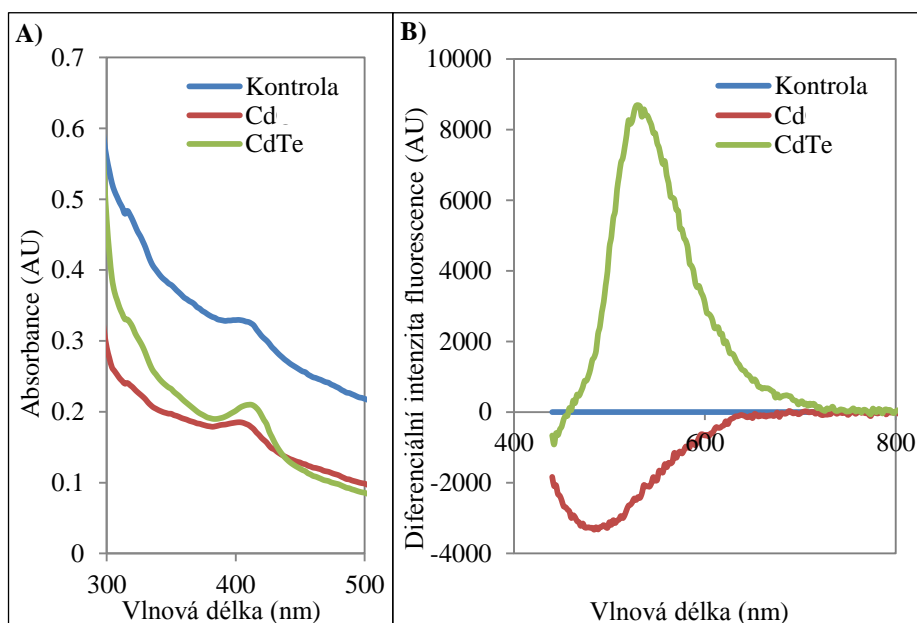
Obrázek 10.: Stanovení kadmia ve vzorku s QDs v různých fázích jeho zpracování. V první fázi jsme rozrušili buněčnou stěnu, ve druhé fázi se provedlo vysrážení QDs pomocí 2-propanolu a následná centrifugace, kdy byl následně použit supernatant a zbylý pelet se rozředil pomocí MiliQ vody a posloužil jako třetí vzorek.

5.1.2 Spektrofotometrická ověření biosyntézy QDs

Pro potvrzení biosyntézy u kultivovaných žižal byly pořízeny absorbanční a emisní skeny roztoků připravených dle postupu v kapitole 4.2.2. Pro analýzy byly použity všechny tři kultivované varianty (kontrola, Cd, CdTe).

Hodnota absorpčního maxima přesráženého roztoku nanočástic se pohybovala okolo 400 nm u všech tří porovnávaných variant (Obr. 11A). Při této vlnové délce byl následně měřen emisní sken. Od jednotlivých emisních skenů byl odečten emisní sken roztoku kontrolní varianty, díky čemuž byly získány diferenční spektra (Obr. 11B). Graf diferenčních spekter ukazuje na nárůst fluorescence ve vzorku CdTe, u kterého byl předpoklad průběhu biosyntézy, oproti kontrolním variantám C a Cd. Tyto výsledky

potvrzují přítomnost fluorescenčních nanočástic ve variantě CdTe. Oproti tomu u kontrolní varianty ani u varianty Cd nebyl zaznamenán nárůst fluorescence, které by naznačoval přítomnost QDs. Pro CdTe QDs získané z žížal kultivovaných ve variantě s prekurzory CdTe bylo stanoveno emisní maximum v hodnotě 550 nm, což odpovídá zelené emisi.



Obrázek 11.: (A) Graf absorpčního skenu všech tří testovaných kultivačních variant žížal a (B) diferenční emisní sken těchto variant při excitační vlnové délce 400 nm. Vyhodnocení emisního skenu, z něhož byl následně proveden odečet hodnoty kontroly od hodnoty vzorků.

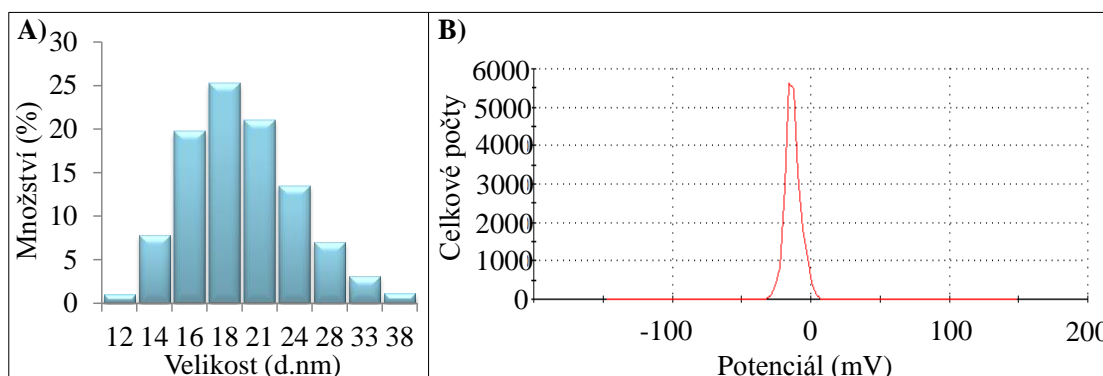
5.2 Charakterizace biosyntetizovaných QDs

Získané QDs byly charakterizovány metodami, které určily velikost těchto nanočástic, zeta potenciál a také kvantový výtěžek.

5.2.1 Velikost nanočástic a zeta potenciál

Velikost nanočástic je jeden z nejdůležitějších parametrů, který společně s modifikací předurčuje biologické vlastnosti a celkový dopad QDs na organismus. Stanovovala se jak velikost přítomných částic ve vzorku, tak zeta potenciál vzorku.

Vzorek byl naředěn a napipetován do kyvety, která byla následně umístěna do přístroje. Běžnou syntézou připravené QDs se zelenou emisí vykazují velikost částic 3 – 5 nm (Duan, J. L., Song, L. X. et al. 2009). V případě žížalami biosyntetizovaných CdTe QDs byla velikost částic stanovena na 18 nm (Obr. 12A). Trojnásobná stanovená velikost biosyntetizovaných QDs v porovnání s laboratorně syntetizovanými je pravděpodobně způsobena při biosyntéze vzniklou výraznou modifikací QDs. Zeta potenciál vykazoval hodnotu -12 (Obr. 12B). Tato hodnota ukazuje na nižší stabilitu QDs. Zhu a kol. testovali stabilitu QDs v živých buňkách pomocí metod LDI-MS a ICP-MS. Zjistili, že čím jsou QDs větší, tím více ztrácí svoji stabilitu (Zhu, Z. J., Yeh, Y. C. et al. 2011). Za obecné hranice mezi stabilními a nestabilními částicemi je považována +30 až -30 mV, částice, které mají zeta potenciál mimo tyto meze, se považují za stabilní (Instruments Ltd., Malvern 2011).

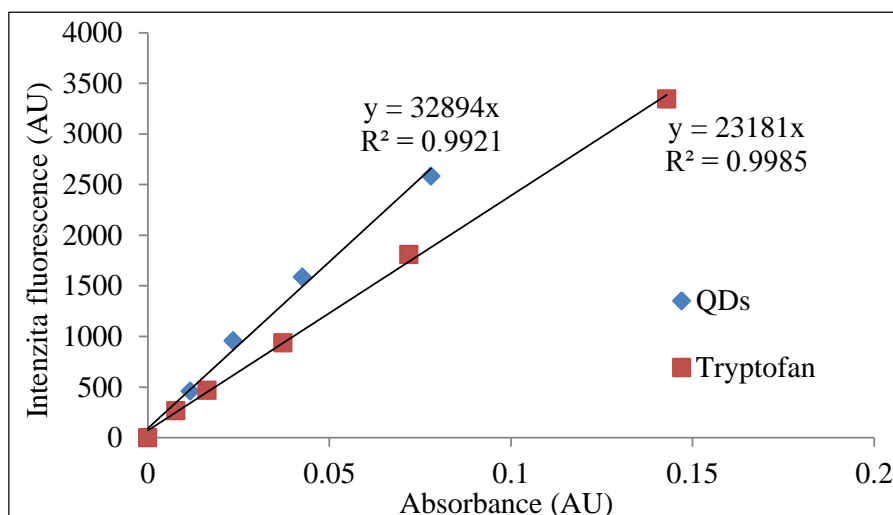


Obrázek 12.: (A) Stanovení distribuce velikosti biosyntetizovaných QDs (B) a zeta potenciálu ze vzorku CdTe pomocí Malvern Zeta sizeru (NANO-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, U.K.).

5.2.2 Výpočet kvantového výtěžku

Kvantový výtěžek (Φ) vyjadřuje podíl molekul, které se rozkládají prostřednictvím vydané excitační energie. Hodnota Φ může být v rozsahu od 0 (v případě, že žádné fotony nevyvolávají fluorescenci) do 1,0 (v případě, že všechny fotony vyvolávají fluorescenci). Hodnota kvantového výtěžku může být maximálně 1,0 (Taiz, Lincoln and Zeiger, Eduardo 2010).

Pro výpočet kvantového výtěžku bylo nutné nejdříve charakterizovat vzorek pomocí fluorimetru a stejnou charakterizaci je třeba provést i pro standardní látku, v našem případě byl jako standard použit tryptofan. Změřené hodnoty absorbance byly následně odečteny od hodnot rozpouštědla a tento postup byl proveden i u fluorescence. Hodnoty lineárního úseku obou analyzovaných látek (QDs a standard) byly následně zaneseny do grafu (Obr. 13). Hodnotu Grad_x jsme následně zanesli do vzorce pro výpočet kvantového výtěžku. Vypočtená hodnota Φ hodnota byla stanovena na 0,2. Duan a kol. zjistili, že při běžné syntéze QDs po optimalizaci podmínek, jako jsou reakční teplota a čas, nebo hodnota pH byl kvantový výtěžek v rozmezí 0,4 – 0,6 (40 – 60 %) (Duan, J. L., Song, L. X. et al. 2009). Hodnota Φ 0,2 nám poukazuje na to, že se povedlo z řížal získat QDs s poměrně dobrým kvantovým výtěžkem.



Obrázek 13.: Zanesení hodnot absorbance a fluorescence získaných biosyntetizovaných QDs a hodnot standardu (tryptofanu) do grafu. Hodnoty x byly použity pro výpočet Φ .

5.3 Vliv biosyntézy na organismus

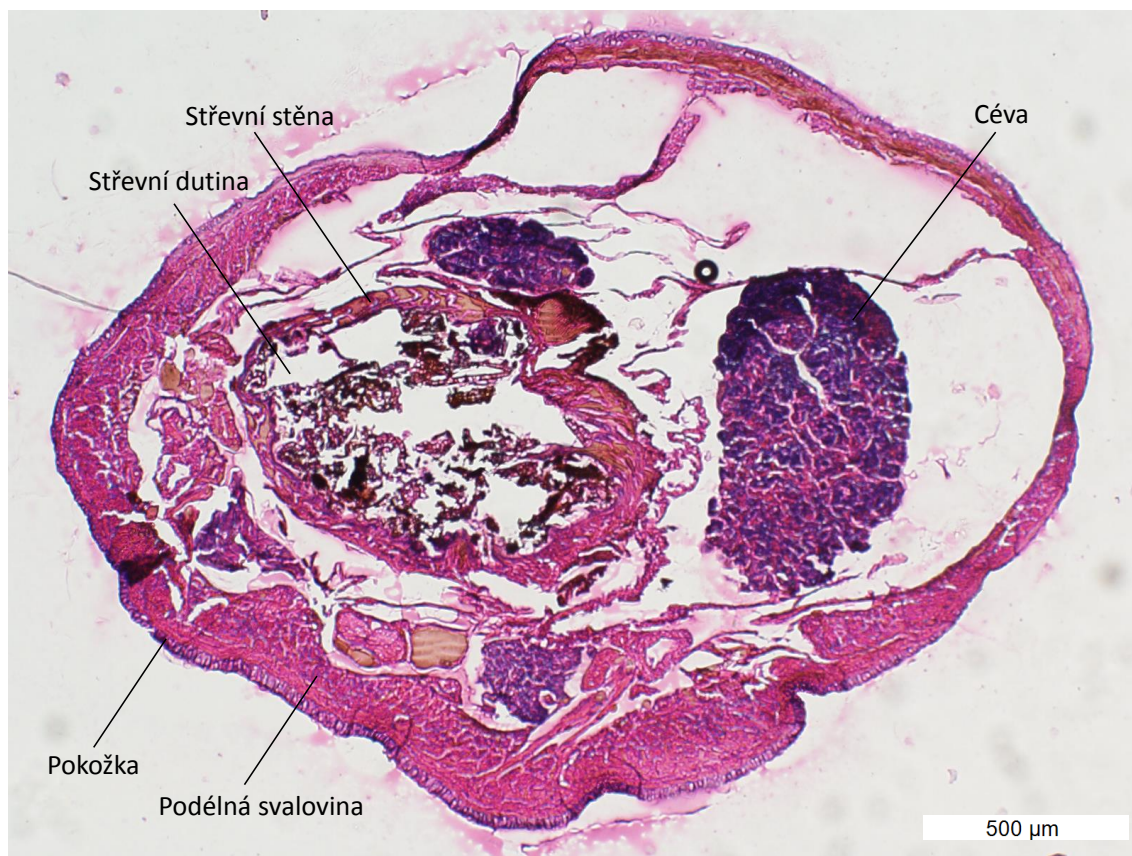
Další důležitou otázkou bylo, jaký má biosyntetický proces vliv na organismus, případně z jakého důvodu v organismu probíhá.

5.3.1 Morfologie testovacího organismu

Pro odhalení morfologických změn v těle žížal při průběhu biosyntézy byly připraveny histologické preparáty, které byly mikroskopovány s využitím mikroskopu Olympus DP73 (Olympus Czech Group, s.r.o., Česká republika)

Žížaly byly po usmrcení uzavřeny do bločků, odvodněny a zality parafinem. Následně byly z takto připravených žížal připraveny histologické řezy, které byly fixovány na podložní sklíčko. Pro lepší viditelnost a rozpoznatelnost vzorku bylo použito barvení hematoxylin-eosin. Na obarvené a osušené vzorky byla přidána kapka DPX montovacího média a následně bylo přiloženo krycí sklíčko. Takto připravené vzorky se mohly mikroskopovat.

Na obrázku č. 14 lze vidět příčný řez tělem žížaly. Uprostřed těla je viditelná hlavní velká céva a střevo, kdy na povrchu střeva v chloragogení tkáni probíhá biosyntéza QDs. Dále na obrázku lze vidět podélnou svalovinu, která žížalám napomáhá pohybu a pokožku, která je pokryta kutikulou. Morfologické změny v tělech žížal nebyly patrné a nejsou tedy prezentovány všechny kultivované varianty.



Obrázek 14.: Histologický preparát – příčný řez tělem žížaly hnojní (*Eisenia fetida*) při 40x násobném zvětšení a po obarvení hematoxylin-eosinem.

5.3.2 Stanovení antioxidační aktivity pomocí metod FRAP a DPPH

Biosyntéza slouží mimo jiné i jako přirozená obrana organismu proti iontům těžkých kovů. Antioxidační aktivita je charakterizována jako schopnost směsi látek inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin a vyjadřuje počáteční průběh antioxidačního procesu při určité koncentraci antioxidantu (Sulc, M., Lachman, J. et al. 2007). Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí metod FRAP a DPPH. Postup obou metod je popsán v kapitole Materiál a metodika (podkapitola 4.2.8 a 4.2.9)

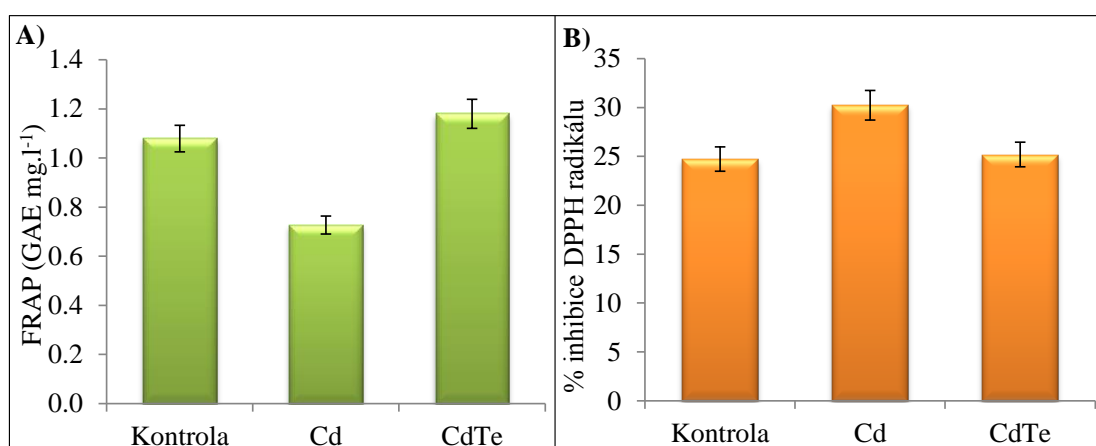
Naměřené výsledky byly nejdříve přepočteny na ekvivalentní množství kyseliny gallové a na 1 g proteinu.

Z výsledků měření antioxidační aktivity metodou FRAP (redukční schopnost vzorku hodnocená intenzitou redukce železitých iontů) vyplynulo, že ve srovnání s kontrolou při aplikaci Cd^{2+} iontů do půdy byl pozorován pokles redukční schopnosti

vzorku o 36 %. Tento pokles byl pravděpodobně způsoben zvýšenou aktivitou redukčních činidel vyvolanou přítomností toxických Cd^{2+} iontů (Obr.15A). Na rozdíl od účinku Cd^{2+} iontů při společném účinku Cd^{2+} a Te^{2-} iontů, k poklesu redukční schopnosti vzorku oproti kontrole nedocházelo, naopak redukční schopnost vzorku byla zvýšená o 9 %.

Při měření antioxidační aktivity vzorku metodou DPPH (antioxidační aktivita je zjišťována schopností vzorku zhaset uměle připravený radikál DPPH) byl pozorován v případě aplikace samotných Cd^{2+} iontů v porovnání s kontrolou nárůst o 20 %, což bylo pravděpodobně způsobeno zvýšenou antioxidační obranou organismu vůči oxidačnímu stresu vyvolaného přítomností toxických Cd^{2+} iontů (Obr. 15B). V případě společné aplikace Cd^{2+} a Te^{2-} iontů ke statisticky významnému nárůstu nedocházelo, což lze vysvětlit nižší toxicitou a také nižším oxidačním stresem.

Komínková a kol. při měření antioxidační aktivity pomocí metody FRAP zjistili, že při přidání Cd^{2+} iontů do prostředí dochází k poklesu redukční schopnosti organismu. Kontrola je srovnatelná s účinky komplexu CdTe. Při metodě DPPH zjistili nárůst antioxidační aktivity vůči oxidačnímu stresu po přidání Cd^{2+} iontů do prostředí. CdTe komplex byl opět srovnatelný s kontrolou (Kominkova, M., Michalek, P. et al. 2014). Tato charakteristika podkládá naše výsledky, které se shodují.



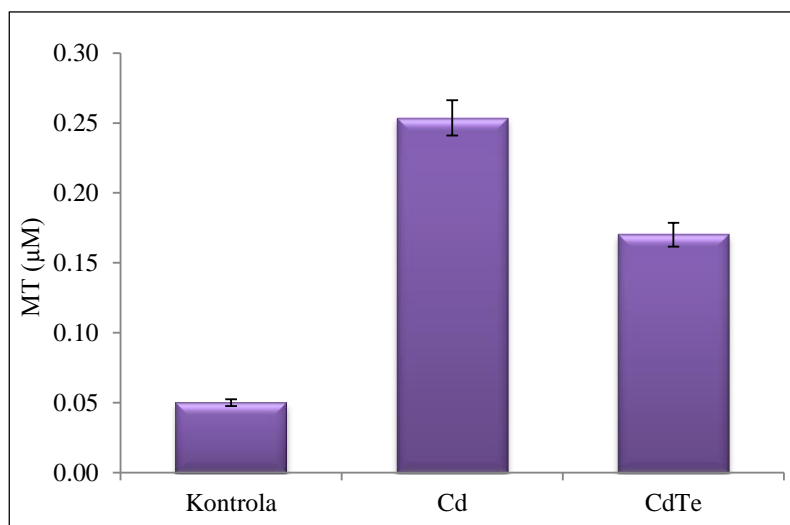
Obrázek 15.: (A) Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP (B) a DPPH. Pomocí metody FRAP byl zjištěn pokles redukční schopnosti vzorku Cd o 36 % v porovnání s kontrolou. Pomocí metody DPPH byl zaznamenán nárůst antioxidační aktivity vzorku Cd vůči oxidačnímu stresu o 20 % v porovnání s kontrolou. Dále bylo zjištěno,

že samotné Cd^{2+} ionty jsou pro organismus toxičtější, než když tvoří komplex s ionty Te^{2-} .

5.3.3 Stanovení koncentrace metalothioneinu ve vzorku

Další metodou, jak stanovit dopad procesů či sloučenin na organismus je stanovení koncentrace metalothioneinu. Metalothionein je nízkomolekulární neenzymatický protein, který je bohatý na cystein, je prostý aromatických aminokyselin a je tepelně stabilní. Thiolové skupiny cysteinu umožňují metalothioneinu vázat se na esenciální a neesenciální kovy s vysokou afinitou. Hraje roli v homeostatické regulaci esenciálních kovů (Cu, Zn), aby plnily enzymatické a metabolické požadavky organismu. Další jeho důležitá role je při detoxikaci stopových kovů, jako je Ag, Cd, Hg. Metalothionein chrání organismus před oxidačním stresem (Li, Y. Q., Yang, H. Z. et al. 2015).

Stanovení koncentrace metalothioneinu proběhlo pomocí Diferenční pulzní voltametrie s Brdičkovou reakcí (Obr. 16). Koncentrace metalothioneinu byla v kontrolní variantě stanovena na $0,05 \mu\text{M}$. Oproti tomu ve variantě Cd bylo stanovena 5x vyšší koncentrace metalothioneinu, a to $0,25 \mu\text{M}$. Toto zvýšení koncentrace metalothioneinu ukazuje na obranu organismu vůči negativnímu působení kadmia. Metalothionein detoxikuje aplikované kadmium pomocí vazby do své struktury. V kultivační varianta žížal CdTe byla však stanovena koncentrace metalothioneinu nižší, než ve variantě Cd, a to o 32 %. Tento rozdíl poukazuje na snížení negativních dopadů kadmia na organismus v případě, že je spuštěn biosyntetizující proces. Výsledek podobně jako stanovení antioxidační aktivity v předchozí kapitole potvrzuje ochranný vliv biosyntézy vůči působení těžkých kovů.



Obrázek 16.: Stanovení koncentrace metalothioneinu ve vzorcích kontroly, Cd a CdTe. Při porovnání s kontrolou byla ve vzorku Cd stanovena 5x vyšší koncentrace metalothioneinu. Ve vzorku CdTe byl v porovnání se vzorkem Cd pozorován pokles koncentrace metalothioneinu o 36 %.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo provedení biosyntézy QDs pomocí žížaly hnojní (*Eisenia fetida*), následná charakterizace těchto QDs a stanovení vlivu biosyntézy na daný organismus. Byla provedena kultivace žížal za daných podmínek a po uplynutí kultivační doby byly žížaly zpracovány na vzorky použitelné pro analýzy. Pomocí stanovení koncentrace Cd^{2+} iontů byla identifikována a potvrzena frakce s přítomností QDs. Následně byly získané kvantové tečky a kontrolní vzorky charakterizovány pomocí fluorescenční a absorpční spektra, a také byla určena biosyntetizovaných velikost QDs a jejich zeta potenciál. Z naměřených hodnot pomocí spektrofotometrie byl také vypočítán kvantový výtěžek pro získané QDs. Následovalo posouzení vlivu biosyntetického procesu na žížaly v porovnání s dvěma kontrolními variantami žížal. Byla provedena mikroskopie histologického preparátu žížaly za účelem zjištění morfologických změn, a také stanovení antioxidační aktivity metodami FRAP a DPPH. Jako další parametr schopnosti organismu se vyrovnat s aplikovanými ionty Cd^{2+} byla stanovena koncentrace metalothioneinu, který se podílí na detoxikaci iontů kovů.

Získané QDs vykazovali emisní maximum v 550 nm, což udává zelenou emisi těchto QDs. Pro zeleně emitující CdTe QDs je v literatuře uváděna velikost 3-5 nm. Na základě analýzy velikosti částic pomocí zeta sizeru byla velikost získaných QDs stanovena na 18 nm. Trojnásobná stanovená velikost biosyntetizovaných QDs v porovnání s laboratorně syntetizovanými je pravděpodobně způsobena při biosyntéze vzniklou výraznou modifikací QDs. Zeta potenciál se pohyboval v hodnotě -12, což ukazuje na nižší stabilitu nanočástic. Kvantový výtěžek biosyntetizovaných QDs byl v porovnání s fluorescenčním standardem tryptofanu vypočten na 0.2.

Následovalo stanovení vlivu biosyntézy na organismus. Byla provedena mikroskopie histologického preparátu žížaly hnojní za účelem zjištění morfologických změn. Biosyntéza však žádné morfologické změny na těle žížaly hnojní nezapříčinila. Z pohledu antioxidační aktivity měřené pomocí metod FRAP a DPPH bylo zjištěno, že v případě probíhající biosyntézy je efekt iontů Cd^{2+} na organismus nižší, než v případě kdy k biosyntéze nedochází. Při využití metody FRAP byla stanovena redukční schopnost varianty CdTe vyšší o 9 % v porovnání s žížalami bez přidání kovových iontů.

Oproti tomu žížaly pouze s přidavkem Cd^{2+} vykazovali oproti kontrole snížení redukční schopnosti a to o 35 %. U metody DPPH byl také zaznamenán tento trend, jelikož antioxidační aktivita byla ve variantě s ionty Cd^{2+} zvýšena oproti kontrole o 20 %. Oproti tomu u CdTe varianty nedošlo k změně v antioxidační aktivitě. Podobný jev byl pozorován i u analýzy metalothioneinu, který se podílí na detoxikaci a homeostáze kovů v organismu. V případě chovu žížal v prostředí Cd^{2+} byla stanovena o 36 % vyšší koncentrace metalothioneinu, než ve variantě s probíhající biosyntézou.

Výsledky této práce ukazují na pozitivní vliv biosyntézy na vyrovnávání se organismu s těžkými kovy. Dále zde byly představeny bisyntetizované QDs, které lze využívat například v optice, v různých průmyslových odvětvích, anebo v medicíně při zobrazovacích metodách. Biosyntéza může být v budoucnu cestou jak získávat biokompatibilní a ekologicky šetrné nanočástice. Nabízí se také možnost využít například při remediacích, kdy se žížaly nasadí do kontaminované půdy.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AHMAD, A., P. MUKHERJEE, et al., Enzyme Mediated Extracellular Synthesis of CdS Nanoparticles by the Fungus, *Fusarium oxysporum*. *Journal of the American Chemical Society*.2002, **124**(41): 12108-12109.

ALIVISATOS, A. P., Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*.1996, **271**(5251): 933-937.

ASMATHUNISHA, N. and K. KATHIRESAN, A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*.2013, **103**: 283-287.

BAI, H. J., Z. M. ZHANG, et al., Biological synthesis of semiconductor zinc sulfide nanoparticles by immobilized *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnology Letters*.2006, **28**(14): 1135-1139.

BAO, H. F., Z. S. LU, et al., Extracellular microbial synthesis of biocompatible CdTe quantum dots. *Acta Biomaterialia*.2010, **6**(9): 3534-3541.

BRAYNER, R., T. CORADIN, et al., Intracellular biosynthesis of superparamagnetic 2-lines ferri-hydrate nanoparticles using *Euglena gracilis* microalgae. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*.2012, **93**: 20-23.

BRUKER, C. "Rentgenová difrakce XRD." from <http://www.bruker-sro.cz/rentgenova-difrakce-xrd>.

DHILLON, G. S., S. K. BRAR, et al., Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*.2012, **32**(1): 49-73.

DU, L. W., L. A. XIAN, et al., Rapid extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by the fungus *Penicillium* sp. *Journal of Nanoparticle Research*.2011, **13**(3): 921-930.

DUAN, J. L., L. X. SONG, et al., One-Pot Synthesis of Highly Luminescent CdTe Quantum Dots by Microwave Irradiation Reduction and Their Hg²⁺-Sensitive Properties. *Nano Research*.2009, **2**(1): 61-68.

ELSAESSER, A. and C. V. HOWARD, Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*.2012, **64**(2): 129-137.

GESZKE-MORITZ, M. and M. MORITZ, Quantum dots as versatile probes in medical sciences: Synthesis, modification and properties. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*.2013, **33**(3): 1008-1021.

GRYGAR, T., P. BEZDICKA, et al. (2006) Moderní mikroanalytické metody identifikace pigmentů.

GUZMAN, E., V. BAETEN, et al., Evaluation of the overall quality of olive oil using fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*.2015, **173**: 927-934.

- HARDMAN, R., A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environmental Health Perspectives*.2006, **114**(2): 165-172.
- HOLMES, J. D., P. R. SMITH, et al., Energy-dispersive X-ray analysis of the extracellular cadmium sulfide crystallites of *Klebsiella aerogenes*. *Archives of Microbiology*.1995, **163**(2): 143-147.
- CHEN, G. Q., B. YI, et al., Facile green extracellular biosynthesis of CdS quantum dots by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*.2014, **117**: 199-205.
- CHONG, Y., Y. F. MA, et al., The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots. *Biomaterials*.2014, **35**(19): 5041-5048.
- CHOUHAN, R. S., J. H. NIAZI, et al., Chemical toxicity detection using quantum dot encoded *E. coli* cells. *Sensors and Actuators B-Chemical*.2014, **196**: 381-387.
- INSTRUMENTS LTD., M., Stabilita suspenzí a disperzí - proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité? *CHEMAGAZIN*.2011, **4**: 14 - 16.
- JAMBA, L., B. NEHRU, et al., Effect of selenium supplementation on the influence of cadmium on glutathione and glutathione peroxidase system in mouse liver. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*.2000, **13**(3): 299-304.
- JI, X. Y., F. PENG, et al., Fluorescent quantum dots: Synthesis, biomedical optical imaging, and biosafety assessment. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*.2014, **124**: 132-139.
- KANG, S. H., K. N. BOZHILOV, et al., Microbial synthesis of CdS nanocrystals in genetically engineered *E. coli*. *Angewandte Chemie-International Edition*.2008, **47**(28): 5186-5189.
- KATSUMITI, A., D. GILLILAND, et al., Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*.2014, **153**: 39-52.
- KHARISSOVA, O. V., H. V. R. DIAS, et al., The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*.2013, **31**(4): 240-248.
- KOMINKOVA, M., P. MICHALEK, et al., Biosynthesis of Quantum Dots (CdTe) and its Effect on *Eisenia fetida* and *Escherichia coli*. *Chromatographia*.2014, **77**(21-22): 1441-1449.
- KOWSHIK, M., W. VOGEL, et al., Microbial synthesis of semiconductor PbS nanocrystallites. *Advanced Materials*.2002, **14**(11): 815-818.
- KUMAR, S. A., A. A. ANSARY, et al., Extracellular biosynthesis of CdSe quantum dots by the fungus, *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*.2007, **3**(2): 190-194.
- LACH, V. and M. DAŇKOVÁ (1991). Mikrostruktura stavebních látek. Brno, Vysoké učení technické.

- LANDSIEDEL, R., E. FABIAN, et al., Toxicokinetics of nanomaterials. *Archives of Toxicology*.2012, **86**(7): 1021-1060.
- LANGROVA, I. (2010). Zoologie bezobratlých. Praha, Česká zemědělská univerzita.
- LI, Y. Q., H. Z. YANG, et al., Cadmium Accumulation and Metallothionein Biosynthesis in Cadmium-Treated Freshwater Mussel *Anodonta woodiana*. *Plos One*.2015, **10**(2).
- MABOETA, M. S., S. A. REINECKE, et al., The relationship between lysosomal biomarker and organismal responses in an acute toxicity test with *Eisenia Fetida* (Oligochaeta) exposed to the fungicide copper oxychloride. *Environmental Research*.2004, **96**(1): 95-101.
- MACIEL, J. V., B. M. SOARES, et al., Simple and Fast Method for Iron Determination in White and Red Wines Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.2014, **62**(33): 8340-8345.
- MONRAS, J. P., V. DIAZ, et al., Enhanced Glutathione Content Allows the In Vivo Synthesis of Fluorescent CdTe Nanoparticles by *Escherichia coli*. *Plos One*.2012, **7**(11): 1-10.
- MONRAS, J. P., V. DIAZ, et al., Enhanced Glutathione Content Allows the In Vivo Synthesis of Fluorescent CdTe Nanoparticles by *Escherichia coli*. *Plos One*.2012, **7**(11).
- MUSSA FARKHANI, S. and A. VALIZADEH, Review: three synthesis methods of CdX (X = Se, S or Te) quantum dots. *IET nanobiotechnology / IET*.2014, **8**(2): 59-76.
- NAKAMORI, T. and N. KANEKO, Biomarker responses reveal that food quality affects cadmium exposure in the soil collembolan *Folsomia candida*. *Environmental Pollution*.2013, **176**: 165-170.
- NREL (2014). "Photoluminescence Spectroscopy." 1. from http://www.nrel.gov/pv/measurements/photoluminescence_spectroscopy.html.
- POHANKA, M., D. HYNEK, et al., Voltammetry Assay for Assessment of Oxidative Stress linked Pathologies in Brain Tumor suffered Childhood Patients. *International Journal of Electrochemical Science*.2012, **7**(12): 11978-11992.
- PRATHNA, T. C., L. MATHEW, et al. (2010). Biomimetic Synthesis of Nanoparticles: Science, Technology & Applicability.
- QUESTER, K., M. AVALOS-BORJA, et al., Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*.2013, **54-55**: 1-27.
- RIVERA GIL, P., G. OBERDÖRSTER, et al., Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future. *ACS Nano*.2010, **4**(10): 5527-5531.
- SAFAROVA, K. (2008). "Transmisní elektronová mikroskopie." from <http://atmilab.upol.cz/texty/TEM-teorie.pdf>.

- SAHRAEI, R., M. NOSRATI, et al., Facile "green" synthesis and characterization of CdSe nanoneedles: An alternative to organometallic synthetic routes. *Materials Letters*.2012, **68**: 153-156.
- SANDANA MALA, J. G. and C. ROSE, Facile production of ZnS quantum dot nanoparticles by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 2918. *Journal of Biotechnology*.2014, **170**: 73-78.
- SESHADRI, S., K. SARANYA, et al., Green Synthesis of Lead Sulfide Nanoparticles by the Lead Resistant Marine Yeast, *Rhodospiridium diobovatum*. *Biotechnology Progress*.2011, **27**(5): 1464-1469.
- SIMS, R. W. and B. M. GERARD (1985). Earthworms: Keys and notes for the identification and study of the species. London, The Linnean Society of London and the Estuarine and Brackish-Water Sciences Association.
- SMITH, P. R., J. D. HOLMES, et al., Photophysical and photochemical characterisation of bacterial semiconductor cadmium sulfide particles. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*.1998, **94**(9): 1235-1241.
- SPURGEON, D. J., C. SVENDSEN, et al., Responses of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by measurement of juvenile traits in a specifically designed test system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.2004, **57**(1): 54-64.
- STURZENBAUM, S. R., M. HOCKNER, et al., Biosynthesis of luminescent quantum dots in an earthworm. *Nature Nanotechnology*.2013, **8**(1): 57-60.
- SULC, M., J. LACHMAN, et al., Selection and evaluation of methods for determination of antioxidant activity of purple- and red-fleshed potato varieties. *Chemické Listy*.2007, **101**(7): 584-591.
- SULC, M., LACHMAN, J., ET AL., Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické Listy*.2007: 7.
- SURANA, K., P. K. SINGH, et al., Synthesis, characterization and application of CdSe quantum dots. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.2014, **20**(6): 4188-4193.
- SYED, A. and A. AHMAD, Extracellular biosynthesis of platinum nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*.2012, **97**: 27-31.
- SYED, A. and A. AHMAD, Extracellular biosynthesis of CdTe quantum dots by the fungus *Fusarium oxysporum* and their anti-bacterial activity. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*.2013, **106**: 41-47.
- TAIZ, L. and E. ZEIGER (2010). "Quantum yield." Fifth edition. from <http://5e.plantphys.net/article.php?id=68>.
- TILLEY, R. D. and S. CHEONG, Earthworms lit with quantum dots. *Nature Nanotechnology*.2013, **8**(1): 6-7.

- TRABELSI, H., I. AZZOUZ, et al., Subacute toxicity of cadmium on hepatocytes and nephrocytes in the rat could be considered as a green biosynthesis of nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*.2013, **8**: 1121-1128.
- TSOI, K. M., Q. DAI, et al., Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies. *Acc Chem Res*.2013, **46**(3): 662-671.
- VALIZADEH, A., H. MIKAEILI, et al., Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity. *Nanoscale Research Letters*.2012, **7**: 1-14.
- VALIZADEH, A., H. MIKAEILI, et al., Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity. *Nanoscale Research Letters*.2012, **7**.
- WANG, F. Y., L. J. SHU, et al., Perspectives on the Toxicology of Cadmium-based Quantum Dots. *Current Drug Metabolism*.2013, **14**(8): 847-856.
- WANG, Y. L., J. P. LU, et al., Rapid synthesis of CdSe nanocrystals in aqueous solution at room temperature. *Bulletin of Materials Science*.2010, **33**(5): 543-546.
- WILLIAMS, D. and C. B. CARTER (2009). The Transmission Electron Microscope. *Transmission Electron Microscopy*, Springer US: 3-22.
- WILLIAMS, J. V., C. N. ADAMS, et al., Hydrothermal Synthesis of CdSe Nanoparticles. *Industrial & Engineering Chemistry Research*.2007, **46**(13): 4358-4362.
- WINNIK, F. M. and D. MAYSINGER, Quantum Dot Cytotoxicity and Ways To Reduce It. *Accounts of Chemical Research*.2013, **46**(3): 672-680.
- ZHU, Z. J., Y. C. YEH, et al., Stability of quantum dots in live cells. *Nature Chemistry*.2011, **3**(12): 963-968.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Anatomie žížaly hnojní (*Eisenia fetida*), (převzato z www.mrb-science.wikispaces.com).

Obrázek 2: Stavba kvantové tečky.

Obrázek 3: Schéma extracelulární biosyntézy pomocí bakterie *Escherichia coli*.

Obrázek 4: Schéma intracelulární biosyntézy pomocí kvasinek.

Obrázek 5: Specord 210 spektrofotometr, Analytik Jena AG (Analytik Jena, Německo).

Obrázek 6: Transmisní elektronový mikroskop (TEM), (převzato z www.aldebaran.cz).

Obrázek 7: Přístroj využívaný pro metodu rentgenové difrakční spektrometrie – Spectro xepos (Spectro CS, Česká republika).

Obrázek 8: Schéma kultivace žížaly hnojní (*Eisenia fetida*).

Obrázek 9: Schéma přípravy vzorků pro analýzy.

Obrázek 10: Vyhodnocení absorpčního maxima pomocí absorbančního skenu (**A**) a vyhodnocení emisního skenu, z něhož byl následně proveden odečet hodnoty kontroly od hodnoty vzorků (**B**).

Obrázek 11: Stanovení kadmia ve vzorku biosyntetizovaných QDs v různých fázích jeho zpracování.

Obrázek 12: Stanovení distribuce velikosti biosyntetizovaných QDs (**A**) a zeta potenciálu (**B**) pomocí Malvern Zeta sizeru (NANO-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, U.K.).

Obrázek 13: Zanesení hodnot absorbance a hodnot standardu (tryptofanu) do grafu.

Obrázek 14: Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP (**A**) a DPPH (**B**).

Obrázek 15: Stanovení koncentrace metalothioneinu ve vzorcích kontrola, Cd a CdTe.

Obrázek 16: Histologický preparát – příčný řez tělem žížaly hnojní (*Eisenia fetida*).