

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

DISERTAČNÍ PRÁCE

Příprava, charakterizace a aplikace multifunkčních hybridních
nanostruktur založených na nanočásticích
bakteriálního magnetitu a nulamocného železa

Zdenka Marková

Školitel: prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D.

Olomouc 2013

Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. RNDr. Radku Zbořilovi, PhD. za odborné vedení, za cenné rady a konzultace, které mi poskytl při řešení a vypracování předložené disertační práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Karolíně Šiškové, PhD. a Mgr. Kateřině Holé za trpělivé a obětavé diskuze nad problematikou materiálové chemie a za formální připomínky k této práci, Mgr. Kláře Šafářové, PhD. za pořízení obrazových záznamů pomocí elektronových mikroskopii, Mgr. Zuzce Filipové za uvedení do problematiky kultivací magnetotaktických bakterií, Mgr. Michaele Pečové, PhD. a prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr. za spolupráci v oblasti proteomiky, Mgr. Janu Čudovi a Doc. Jiřímu Tučkovi, PhD. za měření a interpretaci dat z magnetických měření a diskuze nad magnetickými vlastnostmi materiálů, RNDr. Janu Filipovi, PhD. za cenné rady a interpretaci XRD záznamů, Prof. MUDr. Milanovi Kolářovi, PhD. a RNDr. Alešovi Panáčkovi za spolupráci v oblasti identifikace toxicity nanomateriálů vůči mikroorganismů, RNDr. Robertovi Pruckovi, PhD. za měření AAS a Milanovi Vůjtkovi za formální připomínky k této práci. Za umožnění zahraniční studijní stáže, obětavé vedení a cenné rady bych chtěla poděkovat Dr. Aristides Bakandritsos z Univerzity v Patře.

Děkuji také celému týmu Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů za skvělou přátelskou pracovní atmosféru, za cenné rady i připomínky.

Mé obrovské díky patří mému příteli a mé rodině za obětavou podporu a pomoc, kterou mi po celou dobu studia poskytovali.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma příprava, charakterizace a aplikace multifunkčních hybridních nanostruktur založených na nanočásticích bakteriálního magnetitu a nulamocného železa řešila samostatně a že řádně cituji použitou literaturu.

Dále prohlašuji, že mám většinový autorský přínos v publikacích [i–iv] které jsou uvedeny v přehledu publikací v kapitole 7. Přílohy.

V Olomouci, dne 1. července 2013

.....
Mgr. Zdenka Marková

Já, spoluautor a korespondující autor publikací [i–iv] prohlašuji, že Mgr. Zdenka Marková má v těchto publikacích většinový autorský přínos.

.....
prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D.

Seznam publikací, na nichž se autor této disertační práce podílel jako hlavní autor nebo spoluautor v období 2008–2013

- [i] **Z. Markova**, M. Pecova, L. Zajoncova, J. Zboril, R. Zboril, Surface engineering of iron oxide nanoparticles isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense* for biochemical and biomedical applications, *NANOCON 2009, Conference Proceedings*, 311–317 (2009)
- [ii] **Z. Markova**, A. B. Bourlinos, K. Safarova, K. Polakova, J. Tucek, I. Medrik, K. Siskova, J. Petr, M. Krysmann, E. P. Giannelis, R. Zboril, Synthesis and properties of core-shell fluorescent hybrids with distinct morphologies based on carbon dots, *J. Mater. Chem.*, 22(32), 16219–16223 (2012)
- [iii] **Z. Markova**, K. Siskova, J. Filip, K. Safarova, R. Pucek, A. Panacek, M. Kolar, R. Zboril, Chitosan-based synthesis of magnetically-driven nanocomposites with biogenic magnetite core, controlled silver size, and high antimicrobial activity, *Green Chem.*, 14(9), 2550–2558 (2012)
- [iv] **Z. Marková**, K. Šišková, J. Filip, J. Čuda, M. Kolář, K. Šafářová, I. Medřík, R. Zbořil, Air stable magnetic bimetallic Fe-Ag nanoparticles for advanced antimicrobial treatment and phosphorus removal, *Environ. Sci. Technol.*, 47, 5285–5293 (2013)
- [v] M. Pečová, M. Šebela, **Z. Marková**, K. Poláková, J. Čuda, K. Šafářová, R. Zbořil, Thermostable trypsin conjugates immobilized to biogenic magnetite show a high operational stability and remarkable reusability for protein digestion, *Nanotechnology*, 24 (12), 125102 (11 pp) (2013)

Tato práce je založena na výsledcích prací [i–v]. Články [ii] a [iii] byly oceněny „Cenou děkana PřF UP v Olomouci“ v kategorii „Článek v časopise“ za rok 2012.

ANOTACE

Velký vědecký zájem o nanočástice spočívá v jejich unikátních vlastnostech, které jsou způsobeny jejich velikostí na pomezí přechodu mezi krystalem a atomární či molekulární strukturou. Jedna z obecných a velmi stručných definic, které stanovují pojem nanočástice, je ta, která říká, že se jedná o částice, jejichž alespoň jeden rozměr je menší než 100 nm.¹ Tento kritický parametr byl vymezen na základě nových vlastností materiálů, které se objevují právě při překonání tohoto rozměru. Navíc objemové materiály „větších“ rozměrů mají konstantní fyzikální vlastnosti, kdežto u nanomateriálů lze často pozorovat vlastnosti velikostně závislé. Tento jev je spojen se změnou poměru atomů na povrchu částic a atomů, které jsou uvnitř, čímž se ve výrazné míře uplatňují povrchové jevy. Ve vybraných případech může dojít při zmenšení rozměru ke změně elektronové struktury a uplatnění kvantových jevů. V neposlední řadě může v nanosvětě docházet k tvorbě zcela nových forem materiálů s nižší dimensionalitou, což je případ dnes mimořádně studovaných nových alotropů uhlíku (fulleren, trubička, grafen).

Významnou skupinou nanomateriálů jsou nanočástice a kompozity na bázi kovů a jejich oxidů, které nachází uplatnění v řadě odvětví díky svým výborným mechanickým, elektrickým, magnetickým, optickým, katalytickým a jiným fyzikálně-chemickým vlastnostem. Kromě nanočástic samotných mohou být připraveny i bimetalické nanočástice či nanokompozity, které jsou tvořeny více strukturálními identitami nanočásticového charakteru. Takové struktury pak nejen kombinují vlastnosti jednotlivých nanomateriálů, ale často vykazují lepší aktivitu a selektivitu ve srovnání s monometalickými částicemi nebo mohou vykazovat vlastnosti, které nejsou charakteristické pro komponenty tvořící tyto nové vícesložkové systémy. Studium vlastností a příprava anorganicko-organických nanokompozitních materiálů a bimetalických částic tak dnes patří mezi rychle se rozvíjející oblasti vědeckého výzkumu.

Předmětem předložené disertační práce je představení přípravy a vlastností aplikačně významných nanokompozitů založených na kombinaci magnetického materiálu (bakteriálních nanočástic magnetitu, nanočástic nulamocného železa) a druhé funkční složky. Bakteriální magnetické nanočástice (bMNPs) představují biokompatibilní, netoxický systém, jehož obrovskou výhodou je úzká velikostní distribuce částic a velmi dobře definovaná krystalová i magnetická struktura. Takovéto biogenní magnetické nanočástice skýtají široký prostor pro uplatnění v biologických a medicínských aplikacích. Jejich kombinací s identitami

vykazujícími zajímavé optické vlastnosti mohou být připraveny materiály nacházející uplatnění jako duální kontrastní látky v bioaplikacích. Na této bázi byly připraveny „core-shell“ magnetické fluorescenční hybridní nanostruktury založené na kombinaci kvartérních uhlíkových teček (QCDs) a bakteriálního magnetitu. Tento kompozitní systém se ukázal velmi účinný při značení kmenových buněk. Metoda přípravy pak byla zobecněna i na jiné systémy: Ag–QCDs a uhlíkové nanotrubky–QCDs. bMNPs byly také využity pro přípravu hybridního magnetického systému s přírodním polymerem chitosanem. Tento polymer je bifunkční látkou (obsahuje hydroxylové a aminové funkční skupiny), která může sloužit pro ukotvení magnetických částic a jejich spojení s další funkční strukturou. Tento hybridní systém bMNPs–chitosan (mCH) byl použit pro přípravu antibakteriálního kompozitu. Chitosan, díky schopnosti adsorbovat ionty stříbra a za určitých podmínek (pH, teplota) je redukovat, tak hrál klíčovou úlohu při tvorbě nanokompozitu mCH–Ag. Charakterizací tohoto kompozitu byly potvrzeny vynikající antibakteriální a antifungální vlastnosti.

Hybridní systém mCH byl také využit pro imobilizaci proteolytického enzymu trypsinu prostřednictvím kovalentní konjugace karboxylové (protein) a aminové (chitosan) skupiny. Tato modifikace výrazně zlepšila řadu vlastností tohoto enzymu pro proteomické aplikace. Nejen že umožnila jeho magnetickou separaci a jeho opakovatelné využití, ale také zlepšila jeho některé důležité vlastnosti (termostabilitu, dlouhodobou stabilitu, eliminovala autolytické štěpení).

Kromě kompozitů na bázi bakteriálního magnetitu byly vyvinuty také kompozity založené na nanočásticích nulamocného železa (nZVI), které kromě ferromagnetického uspořádání mají velmi významné redukční a adsorpční vlastnosti. Ty byly využity pro přípravu magnetických bimetalických částic Fe–Ag, a to právě sorpcí a redukcí stříbrných iontů ve vodném prostředí. Nanočástice stříbra (AgNPs) a nZVI jsou antimikrobiální látky a tyto vlastnosti bylo potvrzeny i u nově připravených Fe–Ag nanočástic. Navíc se prokázaly být účinné i pro odbourání fosfátů při současné možnosti magnetické separace.

V této práci je tedy popsáno několik nových, aplikačně významných nanokompozitních materiálů. Z hlediska jejich uplatnění v biochemických a biomedicínských aplikacích (magnetické kompozity QCDs či kompozit mCH–trypsin) byl kladen důraz na využití biokompatibilních látek a získání kompozitů požadovaných vlastností cestou environmentálně šetrné chemie („green chemistry“). Také pro přípravu antimikrobiálních systémů (mCH–Ag a Fe–Ag) byly zvoleny jednoduché a cenově dostupné postupy, které mohou být adaptovány do velkokapacitních měřitek, které jsou nezbytné pro jejich uplatnění v environmentálních aplikacích.

OBSAH

| | | |
|-------|---|-----|
| 1 | ÚVOD | 11 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST | 12 |
| 2.1 | Magnetické nanočástice oxidů železa (MNPs) | 12 |
| 2.2 | Magnetozomy, bakteriální magnetit | 14 |
| 2.3 | Nanočástice nulamocného železa (nZVI) | 22 |
| 2.4 | Nanočástice stříbra (AgNPs) | 24 |
| 2.5 | Uhlíkové kvantové tečky | 27 |
| 2.6 | Povrchová modifikace (funkcionalizace) nanočástic | 31 |
| 2.6.1 | Chitosan – přírodní polymer | 32 |
| 2.7 | Bimetalické nanočástice a multikomponentní nanomateriály | 34 |
| 2.7.1 | Základní strukturální typy hybridních nanomateriálů | 36 |
| 3 | KOMENTÁŘE A DISKUZE JEDNOTLIVÝCH PUBLIKAČNÍCH VÝSTUPŮ | 40 |
| 3.1 | Povrchová úprava nanočástic oxidů železa izolovaných z <i>Magnetospirilla gryphiswaldense</i> pro biochemické a biomedicínké aplikace. | 41 |
| 3.2 | Syntéza a vlastnosti core–shell fluorescenčních hybridních nanostruktur na bázi uhlíkových teček | 46 |
| 3.3 | Magnetické antimikrobiální kompozitní materiály založené na chitosanem modifikovaných nanočásticích biogenního magnetitu a nanočásticích stříbra s kontrolovatelnou velikostní distribucí | 48 |
| 3.4 | Na vzduchu stabilní bimetalické nanočástice Fe–Ag pro pokročilé antimikrobiální aplikace a odstranění fosfátů | 50 |
| 3.5 | Termostabilní konjugáty trypsinu imobilizované na biogenním magnetitu vykazující vysokou stabilitu a opakovatelné použití pro proteinové štěpení | 52 |
| 4 | SHRNUTÍ | 55 |
| 5 | SUMMARY | 57 |
| 6 | REFERENCE | 59 |
| 7 | PŘÍLOHY | 71 |
| 7.1 | Příloha 1 | 72 |
| 7.2 | Příloha 2 | 80 |
| 7.3 | Příloha 3 | 95 |
| 7.4 | Příloha 4 | 105 |
| 7.5 | Příloha 5 | 125 |

Seznam použitých zkratek

Označení nanočástic a vzorků

| | |
|--------|--|
| AgNPs | nanočástice stříbra |
| bMNPs | bakteriální magnetické nanočástice |
| CNTs | uhlíkové nanotrubky |
| mCH | hybrid magnetit-chitosan |
| mCH–Ag | nanokompozit magnetit–chitosan–nanočástice stříbra |
| nZVI | nanočástice nulamocného železa |
| QDs | kvantové tečky |
| QCD | kvartérní uhlíkové tečky |

Metody a techniky

| | |
|-----------|---|
| imuno–PCR | polymerázová řetězová reakce pro imunoenzymatický test (Imunno–Polymerase Chain Reaction) |
| MFM | mikroskopie magnetických sil (Magnetic Force Microscopy) |
| MALDI–TOF | hmotnostní spektrometrie (Matrix–Assisted Laser Desorption/Ionisation–Time Of Flight mass spectrometry) |
| MRI | zobrazení magnetickou rezonancí (Magnetic Resonance Imaging) |
| TEM | transmisní elektronová mikroskopie (Transmission Electron Microscopy) |
| SQUID | supravodivý kvantový interferenční magnetometr (Superconducting Quantum Interference Device) |

Ostatní použité zkratky

| | |
|----------------|--------------------------------------|
| ATP | adenosin–5'–trifosfát |
| BCM | biologicky kontrolovaná mineralizace |
| BIM | biologicky indukovaná mineralizace |
| CTAC | chlorid cetyltrimethylamonný |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dw | suché hmotnosti (dry weight) |
| E ⁰ | standardní redoxní potenciál |

| | |
|---------------------------|--|
| EDC | 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid |
| GFP | protein s fluorescencí v zelené oblasti (Green Fluorescent Protein) |
| GTPáza | guanozin trifosfatáza |
| HIV | lidský imunodeficitní virus (Human Immunodeficiency Virus) |
| LD50 | označení pro dávku látky podané testovaným jedincům, která způsobí úhyn 50 % testovaných živočichů do 24 hodin od expozice |
| <i>M. gryphiswaldense</i> | <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> |
| MTB | magnetotaktické bakterie |
| Mms16, MspA, | označení proteinů magnetozomální membrány |
| Mms24, MamJ, | označení proteinů magnetozomální membrány |
| Mms6, MagA, | označení proteinů magnetozomální membrány |
| MamK | označení proteinů magnetozomální membrány |
| MTT | označení testu měření aktivity buněčných enzymů, které jsou schopny redukovat látku 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid |
| NHS | N-hydroxysulfosukcinimid |
| PANAM | poly(amido-aminové) dendrimery |
| SPR | plazmonové rezonanční pásy |
| SDS | dodecylsulfát sodný |
| SDS–elektroforéza | elektroforéza prováděna v prostředí dodecylsulfátu sodného |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| ROS | reaktivní radikály kyslíku (reactive oxygen species) |
| TRITON | polyethylen glykol p- (1,1,3,3-tetramethylbutyl) –fenyl ether |
| UV | ultrafialové záření |
| VIS | viditelné záření |

1 ÚVOD

Cílem předkládané disertační práce byla příprava, studium vlastností a aplikací nových magnetických kompozitních nanomateriálů, které kombinují vlastnosti jednotlivých nanočásticových identit. Jako magnetické komponenty byly použity nanočástice bakteriálního magnetitu (bMNPs) a nanočástice nulamocného železa. Ty byly konjugovány s nanočásticemi stříbra, uhlíkovými kvantovými tečkami nebo trypsinem. Vytvořené hybridní systémy skýtají velký potenciál v oblastech využívajících antimikrobiální materiály, v technologiích čištění vod, v proteomice a v oblasti biomedicíny (značení buněk).

Disertační práce má dvě hlavní části – teoretickou část a komentáře hlavních publikačních výstupů. V teoretické části budou zmíněny základní vlastnosti individuálních nanočástic oxidů kovů (oxidů železa), kovů (železa, stříbra), uhlíkových nanostruktur (uhlíkových kvantových teček), které jsou podstatou dále diskutovaných hybridních nanomateriálů a bimetalických nanočástic. Charakterizace těchto materiálů je pojednávána z hlediska základních vlastností (magnetické, elektrické, optické), toxicity (antimikrobiální aktivita a toxicita vůči vyšším organismům), přípravy a aplikačního využití. Povrchové modifikace nanočástic jsou často nezbytnou součástí přípravy jak nanočástic samotných, tak i kompozitních materiálů. Nejenže stabilizují připravovaný systém proti agregaci, ale často funkcionalizují jejich povrch (zavedení funkční skupiny) nebo plní jiné funkce (hydrofobicita/hydrofilicita, redukční/oxidační vlastnosti, atd.). Polymer chitosan představuje přírodní látku, která nachází uplatnění v řadě bioaplikací a je v disertační práci diskutován jako významný představitel uhlovodíků, který je využit i v nově připravených multikomponentních systémech. Multikomponentní nanomateriály mohou být tvořeny různě uspořádanými strukturami, sestávajícími z dvou a více nanočásticových identit. V teoretické části bude proto prezentován přehled jejich příprav, uspořádání a vlastností.

Druhá část disertační práce je věnována komentářům publikací, ve kterých byly popsány nově připravené nanomateriály. Tato kapitola je rozdělena dle jednotlivých výstupů (publikací). Budou zde vyzdviženy důležité informace ohledně přípravy a povrchové modifikace bakteriálního magnetitu a jeho funkcionalizace chitosanem (kompozit mCH), příprava a vlastnosti nově připravených multikomponentních nanomateriálů na bázi i) magnetit–chitosan–stříbro (mCH–Ag); ii) magnetit–chitosan–trypsin (mCH–Trypsin); iii) magnetit–kvartérní uhlíkové tečky (m–QCDs a iv) bimetalických částic (Fe–Ag).

V závěru této disertační práce jsou v přílohách uvedeny publikace, na kterých je tato práce založena.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Magnetické nanočástice oxidů železa (MNPs)

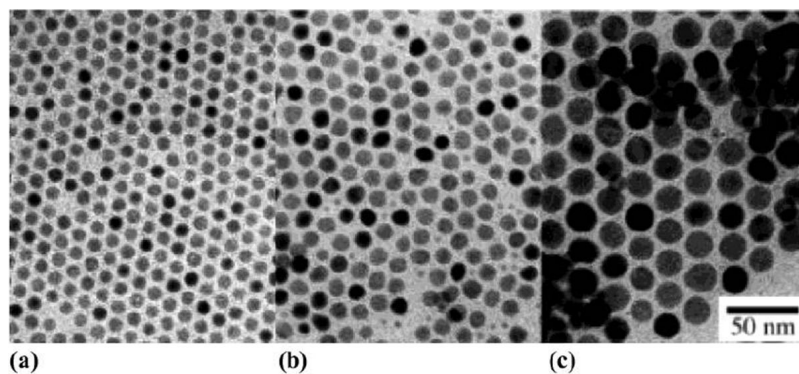
Nanočástice vykazující magnetické vlastnosti patří v posledních letech k nejvíce zkoumaným materiálům nanosvěta. Jak již bylo uvedeno dříve, vlastnosti materiálů se zásadně mění, pokud jejich alespoň jeden rozměr klesne pod určitou hranici, která byla na základě řady teoretických a experimentálních studií ustanovena na 100 nm.¹ U magnetických nanomateriálů se tak projevuje řada anomálních magnetických vlastností, mezi něž patří snížení hodnoty saturační magnetizace, zvýšení koercivity a remanence, jednodomérovost magnetické struktury a superparamagnetismus, asymetričnost hysterezních smyček či vysoké hodnoty diferenciální magnetické susceptibility, které předurčují jejich vysoký aplikační potenciál.² Magnetické nanočástice oxidů železa představují díky svým vlastnostem (netoxicity, biokompatibilita, biodegradabilita) jedny z nejvíce zkoumaných a aplikačně významných materiálů.³⁻⁵ Jejich ferimagnetické (resp. superparamagnetické) formy, jmenovitě magnetit (Fe_3O_4) a maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), dnes patří mezi nejvíce využívané zástupce v bioaplikacích.

Magnetit i maghemit patří mezi ferimagnetické minerály s inverzní spinelovou strukturou.² Magnetit, který se liší od ostatních oxidů železa tím, že ve své struktuře obsahuje dvojmocné i trojmocné ionty železa (tedy $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$), je nejsilnějším přírodně se vyskytujícím magnetem. Tento černý minerál je obsažen v horninách i živých systémech (bakterie, mravenci, holubi), u kterých je zodpovědný za schopnost vnímat a orientovat se vůči geomagnetickému poli. Často se vyskytuje v nestechiometrické formě, což znamená, že některé atomy Fe^{2+} jsou zoxidovány na Fe^{3+} , a tedy poměr jednotlivých forem iontů Fe ve stechiometrickém magnetitu $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0,5$ není zachován.^{2,6} Maghemit ($\gamma\text{-Fe}^{3+}_2\text{O}_3$), který vzniká úplnou oxidací magnetitu, je již tvořen pouze trojmocnými ionty železa. Tento magnetický pigment má své uplatnění v průmyslu (katalyzátor) i bioaplikacích (kontrastní látky).² Nanočástice obou těchto forem oxidů železa (magnetit i maghemit) vykazují superparamagnetické vlastnosti, a to zpravidla v případě kdy jejich velikost klesne pod 30 nm.⁷

Uplatnění magnetických nanočástic bylo popsáno v řadě publikací, např. pro cílený transport aktivních látek, např. léčiv (pokud jsou vystaveny vnějšímu magnetickému poli, mohou být cíleně transportovány do určité oblasti lidského těla, tkáně),^{5,8-11} mohou být také využity jako kontrastní látky pro zobrazení magnetickou rezonancí (MRI),¹²⁻¹⁴ při speciálních

protinádorových terapiích na bázi magnetické hypertermie,^{15,16} pro magnetické značení buněk,¹⁷ nebo pro separační procesy založené na magnetické imobilizaci proteinů, enzymů, ribonukleových kyselin či jiných biosubstancí.^{9,11} Každá potenciální aplikace klade na magnetické nanočástice specifické požadavky. Pro biomedicínské aplikace je nezbytné, aby částice byly stabilní při neutrálním pH a fyziologické iontové síle, často je též preferováno jejich superparamagnetické chování při pokojové teplotě z důvodu koloidní stability. Stěžejní informací je také, zda částice budou použity pro *in vivo* nebo *in vitro* aplikace. Pro *in vivo* aplikace musí být částice obaleny biokompatibilním materiálem (surfaktantem, polymerem), který zaručuje ochranu proti tvorbě agregátů a dovoluje imobilizaci aktivních látek, např. léků. Samotné nanočástice musejí být navíc netoxické, antiimunogenní a dostatečně malé pro svou cirkulaci a průchod skrz kapilární systém orgánů a tkání. Pro *in vitro* aplikace omezení vlastností (velikost, biokompatibilita) není tak stěžejní jako pro aplikace *in vivo*. Důležitým a společným požadavkem pro magnetické částice je především vysoká magnetizace, která zaručuje možnost jejich magnetické separace či jejich řízený pohyb působením vnějšího magnetického pole do místa určení (cílený transport v tkáních).¹⁸

Nejdůležitějším krokem se tak pro řadu aplikací stává samotná metoda přípravy nanomateriálů, která určuje velikost částic, tvar, velikostní distribuci, krystalinitu, povrchové chemické složení (funkční skupiny na povrchu, povrchový náboj), magnetické vlastnosti, ale také strukturní defekty a nečistoty. V posledním desetiletí byla vyvinuta a popsána řada syntetických metod přípravy nanočástic oxidů železa, mezi něž patří: (i) ko–precipitační metody, (ii) termální dekompozice (obr. 1), (iii) hydrotermální syntézy, (iv) sonochemické syntézy, (v) tvorba mikro– a nano–emulzí, (vi) elektrochemické syntézy a (vii) techniky využívající laserové pyrolýzy.^{18–22} Řada konvenčních chemických metod syntézy však často využívá toxické prekurzory reakcí a složité mnohakrokové postupy, které jsou energeticky dosti náročné. Své místo pro přípravu magnetických nanočástic mezi výše uvedenými technikami tak má i přírodní proces biomineralizace, jmenovitě využití železo–redukujících bakterií.^{19,23} Tímto přírodním a životnímu prostředí přátelským procesem je možné získat magnetické částice, které vznikly ve vodném prostředí (namísto organických rozpouštědel), při pokojové teplotě (oproti vysokým teplotám, které jsou při syntézách nezbytné pro dosažení dobré krystalinity) a neutrálním pH.



Obr. 1: Nanočástice oxidu železa připravené termální dekompozicí pentakarbonylu železa. Velikost částic je závislá na poměru koncentrací surfaktant (kyselina olejová): prekurzor železa a na teplotě syntézy (až 260 °C).²²

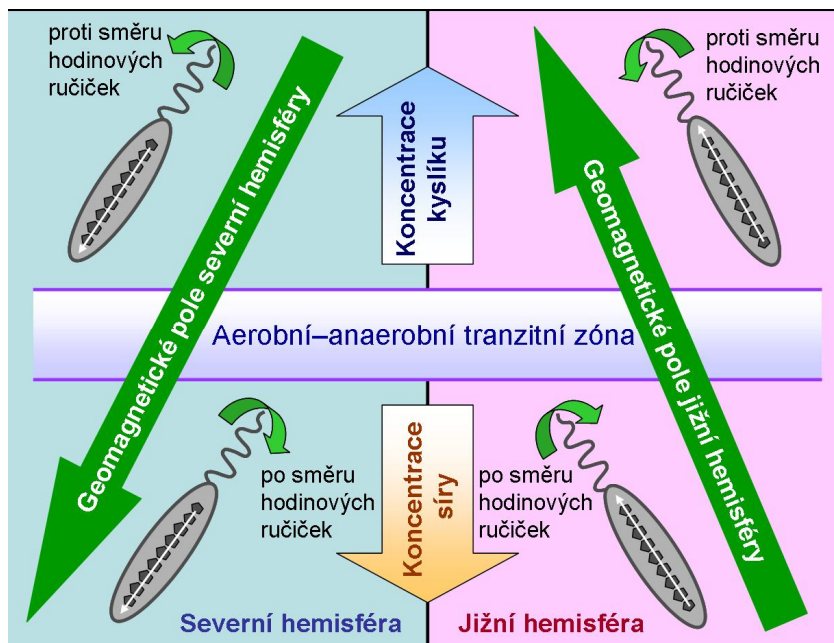
2.2 Magnetozy, bakteriální magnetit

Biominalizace je proces, při kterém v přírodě vznikají minerály působením živých systémů. Všeobecně tyto procesy mohou být rozděleny do dvou kategorií: (i) biologicky indukovaná mineralizace (BIM) a (ii) biologicky kontrolovaná mineralizace (BCM).^{23,24} BIM je extracelulární proces tvorby krystalů, který primárně závisí na okolních podmínkách, jako je pH, pO_2 , pCO_2 , redoxní potenciál, teplota. Původci tohoto procesu jsou mikroorganismy, jejichž metabolity uvolněné do prostředí reagují se specifickými ionty či jinými složkami a dávají tak vzniku minerálům. Tyto částice mají většinou špatnou krystalovou strukturu s množstvím vad, širokou velikostní distribuci a postrádají vzájemnou podobnost morfologie.²⁴ Původci tohoto typu mineralizace oxidů železa jsou většinou anaerobní bakterie jako například Fe(III) redukující bakterie (kmeny *Shewanella*, *Geobacter*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*)^{25,26} nebo síru redukující bakterie (*Archaeoblobus fulgidus*, *Desulfuromonas acetoxidans*).²⁴

Při BCM jsou částice tvořeny intracelulárně a formování krystalu je zcela řízeno mikroorganismem. Celý proces mineralizace probíhá ve speciálních vakuolách, které vytváří specifické chemické prostředí nezávislé na vnějším. Krystaly se uvnitř vytváří pod kontrolou organické matrice (tvořené proteiny a ostatními kompartmenty membrány, jež jsou dány genetickou informací buňky), která zajišťuje vnitřní orientaci krystalu, vysoký stupeň krystalinity, úzkou velikostní distribuci a druhově specifickou morfologii. Tento druh biominalizace je charakteristický pro magnetotaktické bakterie (*Magnetospirillum*

magnetotacticum, *M. gryphiswaldense*) a síru redukující magnetické bakterie (*Desulfovibrio magneticus*).²³

Magnetotaktické bakterie (MTB) jsou fylogeneticky a morfologicky různorodá skupina mikroorganismů (koky, tyčinky, vibria, spirila)^{24,27} zahrnující α -, δ -, γ -proteobakterie a *Nitrospirilla*, tedy zástupce Gram-negativních bakterií. Zástupci spadající mezi Gram-pozitivní bakterie a *Archaea* nebyli dosud popsáni.^{27,28} Společným znakem MTB je schopnost vnímat, orientovat se a pohybovat se podél linií magnetického pole, tedy jev nazývaný se magnetotaxe. Toto chování poprvé popsal v roce 1975 Richard P. Blakemore²⁹ a zavedl pojmy magnetotaxe a magnetotaktické bakterie. Tento typ bakterií byl však poprvé objeven již v roce 1958, kdy Salvatore Bellini popsal unikátní magnetosenzitivní chování vodních bakterií, avšak tenkrát nedošlo k veřejnému publikování jeho objevu.³⁰ Studium těchto bakterií pod transmisním elektronovým mikroskopem odhalilo fyzikální podstatu tohoto zvláštního jevu. Buňka MTB totiž obsahuje jeden nebo více řetězků speciálních organel, magnetozomů, které fungují jako střelka kompasu a umožňují tento způsob orientace.³¹ Zvláštností těchto bakterií je také způsob migrace, která je jednosměrná. MTB nacházející se na severní hemisféře země jsou „sever-hledající bakterie“ (pohybují se na sever), zatímco bakterie nacházející se na jižní hemisféře se označují jako „jih-hledající“ (tedy preferenční pohyb mají na jih). V oblasti rovníku byl popsán výskyt obou variant.^{29,32} Tento způsob migrace vůči geomagnetickému poli zřejmě umožňuje nalezení optimálních životních podmínek, a to zjednodušením jejich orientace z třírozměrné na jednorozměrnou. Existují však i jiné faktory, které ovlivňují pohyb MTB. Příkladem je preference těchto mikroorganismů vyskytovat se v kyslíkaté-bezkyslíkaté tranzitní zóně (v oblasti s velmi nízkými koncentracemi kyslíku), tedy aerotaxe.^{27,33} Schéma kombinovaného vnímání a pohybu bakterií je znázorněno na obr. 2.

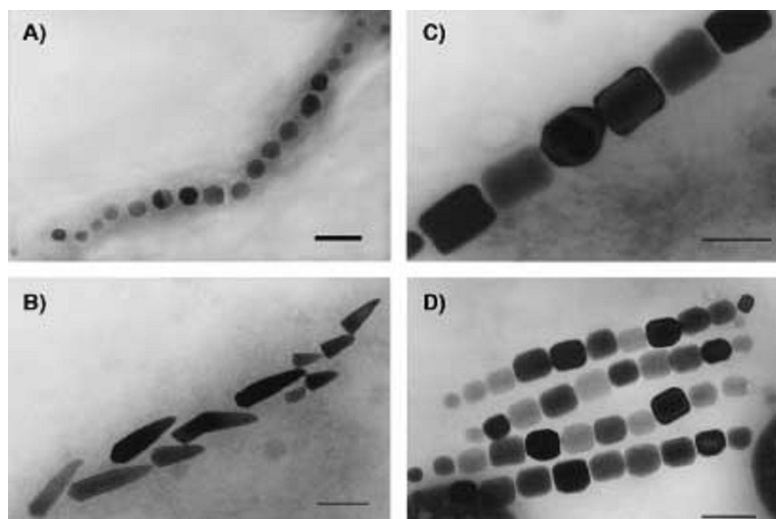


Obr. 2: Schéma znázorňující kombinaci vnímání a pohybu (magnetotaxe, aerotaxe) magnetotaktických bakterií v jižní a severní zemské hemisféře.

Navzdory rozmanitosti těchto bakterií (výskytem i typem) existuje jen limitovaný počet zástupců, kteří byli izolováni v čisté kultuře a u nichž bylo dosaženo úspěšné laboratorní kultivace. Mezi tyto kmeny patří především sladkovodní zástupci rodu *Magnetospirillum* (*M. magnetotacticum*, *M. magneticum* AMB–1, *M. gryphiswaldense* MSR–1).³⁴

Magnetozy jsou orgány tvořené membránou, která obklopuje magnetické nanočástice magnetitu Fe_3O_4 nebo greigitu Fe_3S_4 .^{35,36} Krystaly produkované MTB mají jedinečné vlastnosti, které jsou téměř nedosažitelné pro anorganické syntézy: (i) jsou druhově specifické (určitý druh bakterie je schopen vytvářet krystaly pouze jedné morfologie (obr. 3), velikosti, uspořádání a chemického složení), (ii) mají velmi úzkou velikostní distribuci (spadající do jednodoménové oblasti), (iii) minimum krystalografických defektů, (iv) vysokou čistotu.^{7,33,37–39} Magnetozy se velikostně pohybují v rozmezí 35–120 nm, což je velikostní rozpětí ohraničující oblast, ve které se magnetit i greigit vyskytují ve stabilním magnetickém jednodoménovém uspořádání. Částice s rozměrem nad 100 nm jsou totiž tvořeny více magnetickými doménami, nemají tak jednotnou uniformní magnetizaci a jejich výsledný magnetický moment je daleko nižší, než je tomu u částic jednodoménových. Naproti tomu částice, které mají rozměr menší než 30 nm, vykazují superparamagnetické chování při pokojové teplotě a mají nulovou zbytkovou magnetizaci.⁷ Částice MTB jsou tedy ferimagnetické,^{39,40} vykazují permanentní magnetismus a jsou uspořádány v řetězkových

strukturách (maximální magnetizace tohoto uspořádání), což právě umožňuje těmto bakteriím se pasivně orientovat vůči liniím geomagnetického pole.^{23,31}

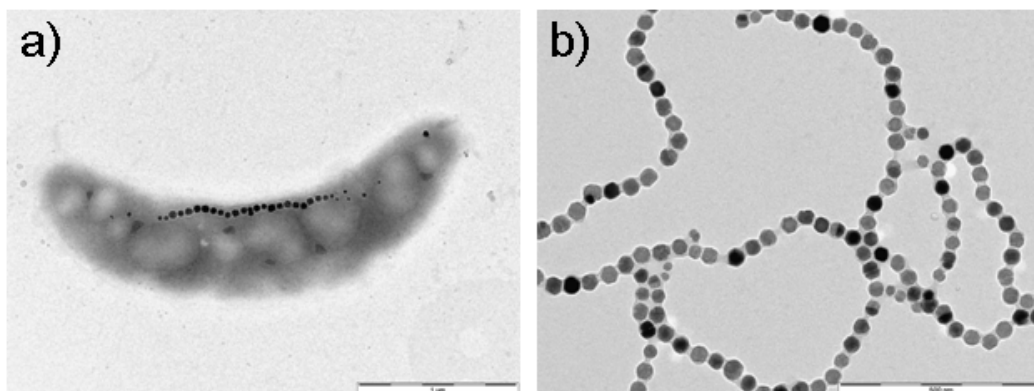


Obr. 3: Krystalová morfologie a vnitrobuněčné uspořádání magnetozomů u různých magnetotaktických bakterií: A) kubooktaedrální, B) špičkového tvaru, C) a D) pseudohexagonální. Magnetozomy jsou uspořádány v jednom nebo více řetzcích. Měrka reprezentuje 100 nm. Převzato z E. Bäuerlein a kol.⁴¹

Magnetozomální membrána je organickou membránou pevně spojenou s magnetickým jádrem a je nepostradatelná pro tvorbu krystalů, stejně jako pro jejich stabilizaci. Tato membrána je tvořena proteiny, mastnými kyselinami, glykolipidy, sulfolipidy a fosfolipidy (z nichž až 50 % tvoří fosfatydelethanolamin).^{33,37} Magnetozomální membrána vzniká zřejmě vchlípením cytoplazmatické membrány za vzniku vezikulu, který uvnitř udržuje podmínky nezbytné pro tvorbu magnetických krystalů (udržuje rozdílné látkové složení, pH, redoxní potenciál mezi vezikulou a vnitřním prostředím samotné buňky).⁴² Proteiny magnetozomální membrány (integrováné nebo asociované) jsou jedinečné a jejich role nejsou většinou doposud zcela objasněné.

Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1 patří mezi laboratorně kultivovatelné zástupce magnetotaktických bakterií kmene *Magnetospirillum* a byla u něj dosažena nejvyšší produktivita magnetozomů.^{43–45} Magnetit u těchto bakterií vzniká jen za velmi nízkých koncentrací kyslíku, a to do 20 mbar. Za aerobních podmínek k jeho tvorbě vůbec nedochází, maximální výtěžnost pak byla popsána při koncentraci kyslíku 0,25 mbar.⁴⁵ Tento kmen je schopen mineralizovat kubooktaedrální krystaly magnetitu, se střední velikostí částic 42 nm,

kterých je v jedné buňce až 60 a jsou uspořádané v řetízku (obr. 4a).⁴⁶ Tyto krystaly mohou být získány z těchto bakterií ve formě suspenze magnetozomů (obr. 4b).

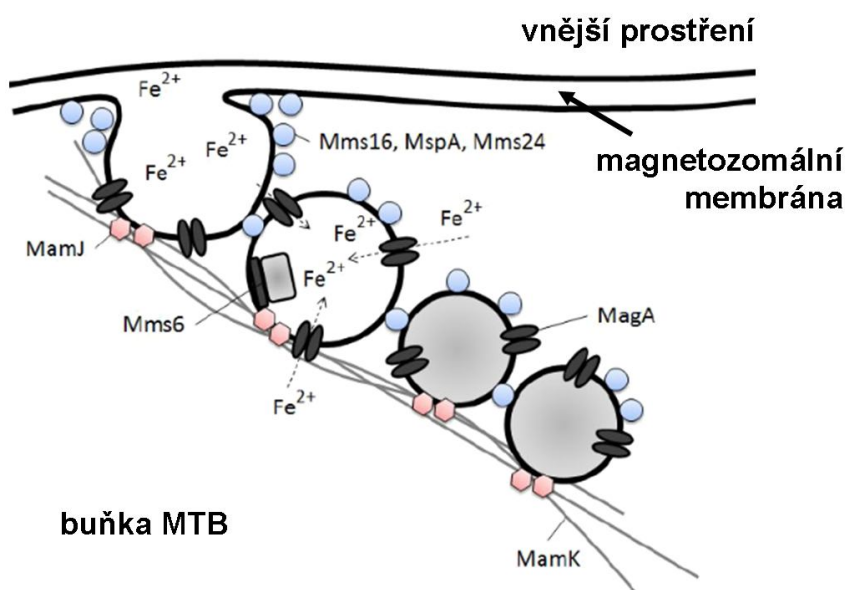


Obr. 4: Záznam a) buňky bakterie a b) magnetozomů z *Magnetospirillum gryphiswaldense* transmisním elektronovým mikroskopem.

Kultivace MTB v laboratorním prostředí je díky specifickým potřebám pro jejich růst a tvorbu magnetozomů (jak již bylo řečeno výše) dosti obtížná. V roce 2003 U. Heyen a D. Schüler⁴⁵ uveřejnili studii týkající se optimalizace kultivačního procesu *Magnetospirilla gryphiswaldense* MSR-1 ve fermentoru za mikroaerobních podmínek, která vedla k významnému zvýšení výtěžku magnetozomů. Optimalizace podmínek procesu (koncentrace kyslíku, nutriční zdroje dusíku, uhlíku a železa) vedla k dosažení maximálního výtěžku magnetitu $6,3 \text{ mg.L}^{-1}.\text{den}^{-1}$ (dw). Koncentrace kyslíku je stěžejní nejen pro tvorbu magnetozomů a jejich výtěžek (vyžadující nízké koncentrace), ale i pro růst samotných buněk (potřeba vyšších koncentrací), jak potvrdil Jian-Bo Sun, který optimalizací média (koncentrace kyslíku, celkové složení kultivačního média) dosáhl výtěžku magnetozomů $16,7 \text{ mg.L}^{-1}.\text{den}^{-1}$ (dw).⁴⁴ Na tuto práci později navázal Yang Liu,⁴³ který navíc optimalizací koncentrace zdroje uhlíku (laktátu sodného), přesněji řečeno snížením jeho koncentrace, dosáhl zvýšení rychlosti růstu buněk, a tím i denního výtěžku magnetozomů na $22,49 \text{ mg.L}^{-1}.\text{den}^{-1}$ (dw).

Biominalizace magnetozomů je unikátní příklad vnitrobuněčné biologické syntézy nanočástic. Ucelený popis jejich formace nebyl dosud vytvořen, přesto existuje řada teorií, které vycházejí především ze studia bakterií druhu *Magnetospirillum*.^{46–48} Proces tvorby magnetozomů v sobě zahrnuje několik stěžejních kroků, mezi které patří formace magnetozomálních vezikulů, přenos železa z extracelulárního prostoru do buňky a do vezikulu magnetozomu a biologicky kontrolovaná mineralizace krystalu magnetitu.²⁴ Ve

své nedávné studii Atsushi Arakaki popsal mechanismus tvorby magnetozomů třemi fázemi.⁴⁸ Prvním krokem je formace magnetozomální membrány vchlípením cytoplazmatické membrány za podpory GTPázy a uspořádání vytvořených vezikulů do řetězkové struktury, která je podpořena cytoskeletárními filenty. Právě přítomnost prázdných a částečně zaplněných vezikulů magnetozomu potvrdil Dennis A. Bazylinski na základě analýz elektronovou mikroskopií.³⁵ Druhým krokem je transport externího železa, kde jako zdroj slouží železnaté a železité sloučeniny (soli) z okolního prostředí. Tento proces je zajišťován transportními proteiny a siderofory. Akumulace železa uvnitř magnetozomálních vezikulů je zajištěna transmembránovými přenašeči železa a je přísně kontrolována oxidačně-redukčním systémem.³⁶ V poslední třetím kroku proteiny magnetozomální membrány (integrální i asociované), které mají důležité funkce v akumulaci a supersaturaci železa, nukleaci krystalu či udržení redukčních podmínek, spouštějí a regulují tvorbu krystalu magnetitu (obr. 5).



Obr. 5: Mechanismus vzniku magnetozomu v bakteriích rodu *Magnetospirillum*. Mms16, MspA, Mms24, MamJ, Mms6, MagA, MamK jsou proteiny magnetozomální membrány, které se účastní tvorby krystalu magnetitu a tvorby uspořádání magnetozomálního řetězku.

Předpokládaná vysoká biokompatibilita magnetozomů nebyla dlouho potvrzena a nebylo ani odhaleno, zdali membrána obsahuje nějaké pyrogenní nebo antigenní látky. Tyto částice představovaly potenciální riziko především díky svému bakteriálnímu původu a proteinům obsaženým v magnetozomální membráně.⁴⁹ Toxické vlastnosti magnetozomů však mohou být dány několika dalšími faktory, jako je jejich rozměr (jen několik desítek nanometrů), který

může zapříčinit ukládání a agregaci těchto nanočástic v těle, či nečistoty, (proteiny, nukleové kyseliny a polysacharidy), které jsou přítomné na jejich povrchu po extrakci z bakteriálních buněk.

V roce 2007 provedl H. Lan první studii týkající se *in-vitro* cytotoxicity (na myších fibroblastech), a to porovnáním s laboratorně připravenými magnetickými nanočásticemi. Tyto testy však prokázaly nižší toxicitu magnetozomů ve srovnání s magnetitem syntetickým.⁵⁰ Nedávná studie zabývající se akutní toxicitou, imunotoxicitou a cytotoxicitou magnetozomů potvrdila, že magnetozomy jsou nanomateriálem o velmi nízké toxicitě.⁵¹ Hodnota LD50 pro králíky byla stanovena na 62,7 mg.kg⁻¹. Histologické vyšetření hlavních orgánů neprokázalo významné patologické změny. Cytotoxické testy neprokázaly ani inhibici, ani stimulaci růstu buněk a též žádné změny v množství buněčné DNA, velikosti buněk a celistvosti buněčné membrány.

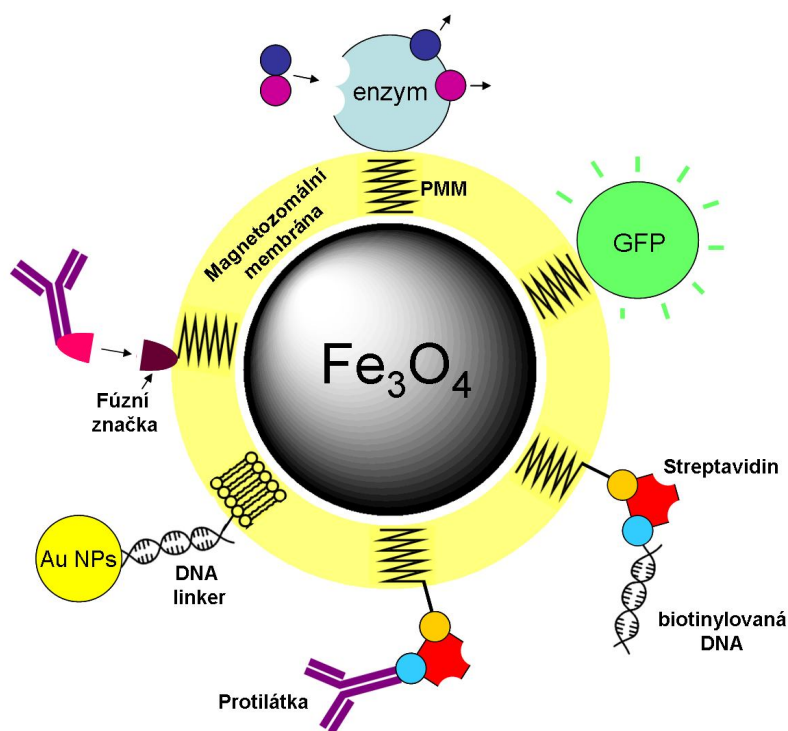
Aplikace magnetozomů mohou být založeny na využití magnetozomální membrány anebo na využití povrchově modifikovaných bakteriálních nanočástic magnetitu (bMNPs). Samotná magnetozomální membrána skýtá řadu možností pro imobilizaci biomolekul skrz širokou škálu biokonjugačních technik (obr. 6).³³ Například biotinylace povrchu magnetozomů a vyvázání streptavidinu, který nabízí další 4 vazebná místa, může být vhodnou biokonjugační technikou pro řadu aplikací.⁵² Biotinylován může být fosfatidylethanolamin (tento fosfolipid, který tvoří přibližně 50 % lipidů magnetozomální membrány, má volnou aminovou skupinu, která je vhodná k vytvoření amidové vazby s biotinem)⁵³ nebo volný N-konec amfifilního peptidu Temporinu L, jehož hydrofobní C-konec může být interkalován do membrány.⁵⁴ Mezi další přístupy patří inkorporace biotinylovaných lipidů do magnetozomální membrány (např. biotinylovaný lipid biotin-DPPE může být zabudován do existujícího obalu pouhým smícháním). Tato metoda je účinnější než klasická konjugační technika a může být při ní imobilizováno až 120 molekul streptavidinu na jeden magnetozom. Na principu takto aktivované magnetozomální membrány byla navržena nová imuno-PCR technologie pro detekci antigenu.⁵⁵ Obdobný konjugát byl použit i k separaci buněk, kdy protilátka imobilizovaná na magnetickém nosiči byla schopna vytvářet konjugáty s antigenem exprimovaným na povrchu buňky. Tento postup byl využit v separaci *Escherichia coli* z bakteriální suspence nebo mononukleárních buněk z periferní krve.⁵⁶

Dalším přístupem je možnost funkcionalizace magnetozomů na úrovni genetické a proteomické manipulace,⁵⁷ tzn. zanesení genu pro požadovaný protein či peptid do genomu za gen kódující membránový protein (nejčastěji se používá zařazení za proteiny MagA, Mms13, Mms16). Vkládané geny nejčastěji kódují GFP, luciferázu, protein A nebo acetát

kinázu a slouží pro ukotvení aktivní molekuly.³³ Na této technologii je založena příprava např. biokatalyzátoru vhodného pro degradaci organofosfátových pesticidů.⁵⁸

Ačkoliv magnetozomy mají velmi nízkou toxicitu, některé jejich složky mohou vyvolat imunitní odpověď (např. endotoxin lipopolysacharid). Kvůli eliminaci tohoto faktoru byla navržena metoda rekonstrukce magnetozomální membrány.⁵⁹ Tomoko Yoshino při této metodě k rekonstrukci využil Mms13 jako selektivní kotvící protein (ten má silnou afinitu k magnetickému jádru) a fosfatidylcholin jako stabilizační látku vytvářející membránu kolem magnetického jádra.

Obalení magnetozomů aminopropyltriethoxysilanem vede ke vzniku vrstvy dávající částicím hydrofilní charakter díky aminovým skupinám, a takto modifikovaných částic (kladně nabitý povrch) bylo využito k vyvázání DNA a RNA (vysoce záporně nabitě) nespecifickou interakcí.⁶⁰ Obdobně vytvoření dendritické vrstvy (PANAM) na magnetozomech vede všeobecně k dosažení kladně nabitých částic, které jsou schopné vyvázat a magneticky purifikovat DNA molekuly z buněčného lyzátu.⁶¹ PANAM–bMNPs byly navrženy také jako vhodný systém pro cílenou dopravu genů pro léčení mozkových nádorových tkání.⁶²



Obr. 6: Schéma možných biomolekulárních technik modifikace magnetozomální membrány.³⁸

Obdobně modifikované magnetozomy byly navrženy jako výhodné materiály i pro zobrazovací techniky MFM (mikroskopie magnetických sil), kterou lze dosáhnout až

100× vyšší citlivosti než klasickou fluorescenční mikroskopií.⁶³ bMNPs díky své vyšší magnetizaci jsou také vhodným materiálem pro MRI zobrazení.^{64–66}

Vysoká magnetizace bMNPs předurčuje tyto částice pro využití v magnetických separacích nejrůznějších materiálů a magneticky cílených transportech léčiv. Magnetozomy byly využity v metodách pro extrakci těžkých kovů, jako je plutonium, ze znečištěných vod⁶⁷ či pro imobilizaci protinádorového léčiva doxorubicinu pro jeho cílený transport.⁶⁸ Možné využití bakteriálního magnetitu je v poslední době diskutováno i v oblasti terapie hypertermií, kde představují díky svým vlastnostem (úzká velikostní distribuce částic, uniformita, čistota) velmi atraktivní materiál.⁶⁹

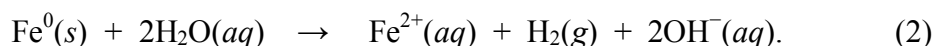
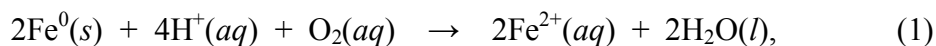
2.3 Nanočástice nulamocného železa (nZVI)

Nanočástice nulamocného železa (nZVI) patří mezi kovové nanočástice s velkým potenciálním uplatněním především v oblasti čištění a sanace znečištěných vod. Nedávné studie dokazují schopnost těchto nanočástic transformovat a adsorbovat širokou škálu běžných kontaminantů životního prostředí, jako jsou organická rozpouštědla nebo nebezpečné anorganické látky. Nanočástice železa v porovnání s mikročásticemi tohoto prvku vykazují řadu výhod, mezi které patří vyšší reakční rychlost při reduktivním odbourávání, potřeba nižších dávek k dosažení stejné kapacity odbourávání, snížení rizika uvolňování nebezpečných a toxických meziproductů a vznik netoxických konečných produktů.⁷⁰ Dále je to možnost jejich „in-situ“ aplikace při čištění podzemních vod, kdy nanočástice železa mohou díky svému nanorozměru „plout“ v podzemí a plnit dekontaminační efekt dlouhodobě i na velkou vzdálenost. Navíc byly odhaleny i jejich antibakteriální vlastnosti, které mohou být využity k eliminaci patogenních mikroorganismů ve vodních prostředích.⁷¹

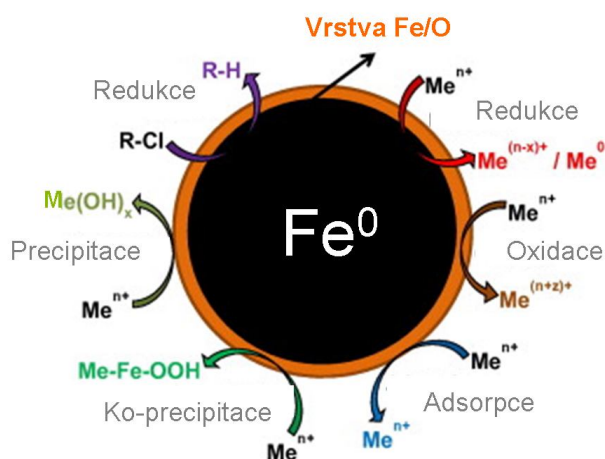
Pro přípravu nZVI bylo vyvinuto několik syntetických metod. Metody mohou být založeny na redukci železnatých Fe^{2+} nebo železitých Fe^{3+} solí do stavu nulamocného železa Fe^0 silným redukčním činidlem, z nichž nejčastěji využívaným je tetrahydroboritan sodný NaBH_4 .^{70,72} Obdobou těchto metod je i redukce vhodného prekursoru nanočásticové povahy. Tato příprava probíhá v pevné fázi (tzv. „solid–state“) ve vodíkové atmosféře za vyšších teplot.⁷³ Jinou metodou přípravy je dekompozice pentakarbonylu železa $\text{Fe}(\text{CO})_5$ v organických rozpouštědlech.⁷⁴ nZVI díky své extrémně vysoké reaktivitě a velké specifické ploše povrchu reagují s okolním prostředím a agregují, což vede ke snížení jejich reaktivity.⁷⁵ Pro potlačení těchto jevů je povrch nanočástic železa modifikován vrstvou polymerů, nebo jsou nanočástice stabilizovány surfaktanty, což vede ke snížení stupně agregace.^{76–79} Také

kombinace těchto nanočástic s prvky kovů jako Pd, Ni, Cu nebo Ag, vedoucí ke vzniku bimetalických částic, prokázaly zlepšení vlastností, např. pro odbourávání nitrátů či dehalogenizace.^{75,80–86}

Nulamocné železo Fe^0 je redukční látkou, která je schopná reagovat s rozpuštěným kyslíkem a do jisté míry i s vodou dle klasických elektrochemických reakčních rovnic:



Tyto korozní reakce mohou být ovlivňovány jak roztokovou chemií, tak přítomností pevných látek. Od 90. let minulého století byla korozní chemie nulamocného železa aplikována pro rozklady a odstranění řady nebezpečných a toxických látek (obr. 7).⁷¹ Jako silně reduktivní látka mohou nZVI odbourávat jak anorganické látky (nitráty, chromany, bromáty, těžké kovy),^{87–98} tak látky organické povahy (halogenové deriváty uhlovodíků, antibiotika či nebezpečný trinitrotoluen).^{72,99–105} Sekundárně mohou probíhat i oxidační procesy, které jsou způsobené reaktivními radikály vznikajícími při korozi železa. Ty mohou dále způsobovat oxidace organických (pesticidy)¹⁰⁶ a anorganických složek.^{107,108} Kromě redukčních vlastností jsou nZVI také schopné adsorbovat látky na svůj povrch. Li a kol. ve své práci odhalili závislost těchto dvou jevů na rozdílu standardních potenciálů E^0 nulamocného železa a odbourávaného prvku, pokud se jedná o odbourávání těžkých kovů.⁹⁰ Ionty (Zn^{2+} , Cd^{2+}), které mají standardní potenciál E^0 velmi blízký nebo více negativní než železo ($-0,41$ V) jsou adsorbovány na povrch nZVI. Ionty s E^0 daleko více pozitivním než má železo (Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+}) jsou nZVI redukovány. Kovy (Ni^{2+} , Pd^{2+}), jejichž E^0 je jen o něco málo pozitivnější než E^0 železa, jsou odbourávány jak redukčním tak sorpčním procesem.



Obr. 7: Schéma různých mechanismů odbourávání anorganických i organických látek.

Antimikrobiální vlastnosti nZVI byly popsány jak pro Gram-pozitivní (*Bacillus subtilis*) tak pro Gram-negativní (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*) bakterie.^{109–113} Nedávná studie vlivu nZVI na Gram-negativní bakterie rodu *Cyanobacteria* (sinice) potvrdila též antibakteriální vlastnosti. Navíc v této studii poukázali na minimální toxický efekt vůči vyšším organismům (řasy, dafnie, vodní rostliny, ryby).¹¹⁴ Obdobně nebyl prokázán negativní dopad těchto nanočástic na plísně (*Aspergillus versicolor*).¹¹¹

Toxicita nZVI je zřejmě založena na fyzickém narušení buněčné membrány a oxidačním stresu způsobeném reaktivními kyslíkovými radikály, které vznikají reakcí oxidovaného železa Fe^{2+} s kyslíkem nebo peroxidem vodíku.¹⁰⁹ Čerstvě připravené nZVI projevují antibakteriální a baktericidní vlastnosti již při nízkých koncentracích jednotek mg/L avšak jeho stárnutí (povrchová oxidace, koroze) a použití povrchových stabilizátorů (surfaktantů, polymerů) významně snižují jeho toxické vlastnosti.^{109,112,115}

nZVI představují díky svým vlastnostem (silné redukční činidlo, velká plocha povrchu, vysoká povrchová reaktivita) novou generaci technologií v čištění a dezinfekci kontaminovaných vod. Jak již bylo popsáno výše, tyto nanočástice jsou vysoce účinné při transformacích a odbourávání řady nebezpečných látek (chlorovaná organická rozpouštědla, pesticidy, polychlorované bifenyly, trinitrotoluen, atd.) i detoxikacích. Environmentální aplikace nZVI jsou navíc akceptovatelné řadou uživatelů a schvalovacích agentur, a to díky cenově přijatelné strážce přípravy a aplikovatelnosti tohoto materiálu.⁷¹ Doposud také nebyla prokázána jejich toxicita vůči vyšším organismům (produkty stárnutí tohoto materiálu jsou netoxické oxidy železa).¹¹⁴

2.4 Nanočástice stříbra (AgNPs)

Nanočástice stříbra (AgNPs) mají jedinečné elektrické,^{116,117} optické,¹¹⁸ katalytické^{119,120} a toxické^{121–124} vlastnosti a byly použity v řadě aplikací od fotovoltaiky, přes biologické a chemické senzory, až po použití jako aditiv majících antimikrobiální účinky v textilních materiálech i medicínských pomůckách. Z pohledu antimikrobiálních vlastností patří AgNPs mezi intenzivně studované materiály, a to díky zvyšující se rezistenci bakterií vůči často používaným klasickým antibiotickým přípravkům. Antimikrobiální vlastnosti elementárního stříbra a jeho solí byly známé a používané již po staletí, mnohem dříve než synteticky připravovaná organická antibiotika.¹²⁵ V posledním desetiletí přinesla řada studií nové poznatky zahrnující vliv velikosti, tvaru a povrchových modifikací na jejich

antibakteriální aktivitu,^{121,126,127} byla též potvrzena toxicita AgNPs vůči plísním^{128,129} a byl studován i jejich vliv na vyšší organismy.¹³⁰

Pro přípravu AgNPs byla doposud popsána řada metod. Metody založené na chemické redukci stříbrných solí využívají tetrahydroboritan sodný, plynný vodík, kyselinu askorbovou, hydrazin, hydroxyamin, jednoduché cukry nebo i polymery, např. poly(vinylpyrrolidon) jako redukující látky.^{131–133} V posledních letech byla popsána i řada tzv. „environmentálně přátelských“ metod.¹³⁴ Pro zabránění srůstání nanočástic do větších agregátů se v mnoha případech do reakční směsi přidávají ligandy, jako například citráty, popř. polymery, které zabraňují tvorbě nežádoucích mikro– a makro–struktur.¹³⁵ Mezi fyzikální metody využívané pro přípravu AgNPs patří γ –radiolýza, kterou mohou vznikat organické radikály hrající roli redukčních složek v reakční směsi,¹³⁶ dále reakce mohou být iniciovány elektronovým,¹³⁷ mikrovlňným,¹³⁸ UV¹³⁹ zářením nebo termální dekompozicí prekurzorů.¹⁴⁰

AgNPs jsou vysoce účinné při absorbování a rozptylu světla a jejich zbarvení je závislé na velikosti a tvaru částic. U AgNPs (stejně jako i u nanočástic zlata nebo mědi) mohou být pozorovány ve spektru absorpční pásy ve viditelné oblasti světla. Tyto pásy jsou známé jako povrchové plazmonové rezonanční (SPR) pásy a jejich původ je v interakci vodivostních (volných) elektronů nanočástic se zářením o vhodné vlnové délce.¹⁴¹ Rezonanční efekt je závislý na řadě vlastností. Vedle velikosti a tvaru nanočástic je důležitá také povrchová úprava či stupeň agregace.¹

Důležitou vlastností AgNPs, uplatňující se např. v elektricky vodivých lepidlech, je závislost jejich bodu rozpustnosti na povrchové energii částic. Bod tání může významně klesat s rostoucí povrchovou energií, tedy se snižující se velikostí částic.¹⁴² V tomto ohledu mohou být AgNPs použity jako vodivostní plniva do elektricky vodivých lepidel tvrzených při nízkých teplotách, čímž lze dosáhnout jejich vyšší účinnosti.^{131,143}

U AgNPs, stejně jako u iontového stříbra, byly prokázány silné antimikrobiální vlastnosti, které si našly uplatnění v řadě kosmetických a medicínských přípravků. AgNPs jsou baktericidní látky pro široké spektrum Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií,^{144–147} zahrnující i druhy rezistentní proti antibiotikům.¹⁴⁸ Fungicidní vlastnosti byly potvrzeny pro kvasinky typu *Aspergillus*, *Candida* nebo *Saccharomyces*.^{129,149} Lara a kol. také zkoumali vliv těchto nanočástic na viry, jmenovitě HIV. V této studii byla potvrzena anti-HIV aktivita a to jak v počáteční fázi virové replikace, tak během životního cyklu HIV–1 viru po jeho vstupu do buňky.¹⁵⁰

Na mechanismus antimikrobiálního účinku neexistuje jednotný pohled a ačkoliv doposud byla provedena řada studií, názory jednotlivých vědců se velmi liší. Jeden z pohledů je založen na možnosti, že AgNPs se ve vodě postupně rozpouští za vzniku stříbrných iontů Ag^+ , které pak způsobují toxický efekt vůči mikroorganismům.¹⁵¹ V jiných studiích je vysoká antimikrobiální aktivita AgNPs připisována jejich velmi malé velikosti, a tím i velké ploše povrchu, která napomáhá fyzickému narušení integrity buněčné membrány a proniknutí nanočástic do cytoplazmy mikroorganismu.¹⁵² Další mechanismus inhibice mikroorganismů pak může být založen na interakci AgNPs s thiolovými skupinami L-cysteinových zbytků proteinů, čímž může docházet k deaktivaci jejich enzymových funkcí, nebo na interakci s genetickou složkou buňky vedoucí k inhibici translace transkriptázy.^{151,153} V sekundární fázi může též docházet k uvolňování Ag^+ , které způsobují poškození intracelulárních struktur.¹⁵⁴ Pro efektivitu antimikrobiálních vlastností jsou důležitými vlastnostmi AgNPs především velikost, tvar a stupeň agregace.

Cytotoxické vlastnosti stříbra (vedoucí k apoptóze i u lidských buněk) jsou všeobecně známé. AgNPs vykazují vyšší cytotoxicitu než jejich mikročástice, čímž je jejich účinnost připisována právě nanorozměrům. K cytotoxicitě těchto nanočástic zřejmě přispívají jak nanočástice samotné, tak i ionty stříbra, které se z nich uvolňují.^{151,155} AgNPs mohou překonat bariéru buněčné membrány volným průnikem nebo narušením její integrity skrz vazbu na proteiny obsahující thiolovou skupinu. Poté zřejmě nanočástice pronikají do mitochondrií, kde narušují řetězec buněčného dýchání. Povrch nanočástic stříbra je pravděpodobně místem redukce kyslíku za vzniku tzv. reaktivních radikálů kyslíku (ROS), tedy například hydroxylového radikálu $-\text{OH}$, peroxidu vodíku H_2O_2 nebo extrémně reaktivního superoxidového aniontového radikálu O_2^- .¹⁵¹ Přítomnost AgNPs v buňce ovlivňuje normální funkci mitochondrií narušením transportního řetězce elektronů, vyšší produkce ROS pak urychluje buněčné dýchání a snižuje produkci ATP.^{156,157} Sekundárním účinkem ROS je poškození proteinů, DNA a peroxidace lipidů.¹⁵¹ Ionty stříbra, které mohou být z nanočástic v buňce uvolněné, se mohou vázat na proteiny a nukleové kyseliny a ovlivňovat tak jejich funkci.¹⁵⁸ Navíc AgNPs pravděpodobně ovlivňují vnitrobuněčný transport vápníku a způsobují chromozomální defekty vedoucí k deformacím cytoskeletonu a inhibici buněčné proliferace.¹⁵⁹

AgNPs jsou toxické jak pro mikroorganismy, tak pro lidské buňky, ovšem při výrazně vyšších koncentracích, což dovoluje jejich testování v biomedicínských aplikacích. U prokaryotických buněk mohou nanočástice projít skrz jednoduchou buněčnou stěnu a dostat se do kontaktu s genetickým materiálem. Naproti tomu eukaryotické buňky jsou chráněny

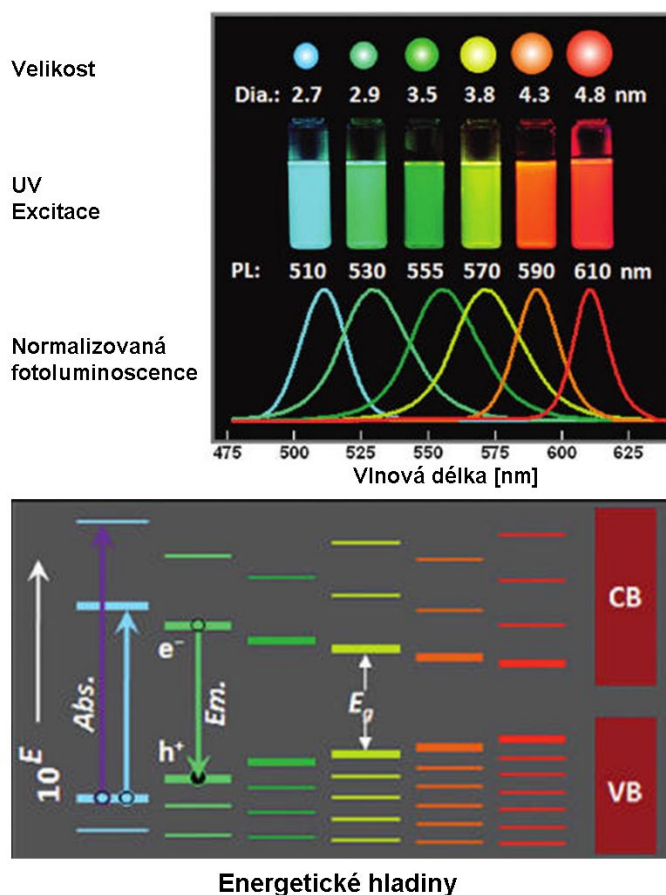
více-membránovým systémem zahrnujícím mitochondriální a jadernou membránu, které tvoří bariéry při průniku nanočástic k místům účinku. Navíc buňky vyšších organismů jsou chráněné imunitním systémem, který je schopen působit proti „napadení“ potenciálně toxickými nanočásticemi.¹⁵¹ AgNPs tak lze využít k eliminaci patogenních bakterií či plísní a to při relativně nízkých koncentracích, které nejsou toxické pro buňky lidské.¹⁶⁰

Nejvýznamnější uplatnění našlo nanočásticové stříbro především díky svým antimikrobiálním vlastnostem. *In vivo* a *in vitro* studie^{161,162} ukazují, že antimikrobiální obvazy obsahující tyto nanočástice mají protizánětlivé účinky vedoucí k zlepšení hojení ran a byly již v roce 1998 zavedeny do komerční produkce.¹⁵¹ Vědci též prokázali potlačení exprese prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-12 těmito nanočásticemi, čímž dochází k indukci apoptózy zánětlivých buněk.¹⁶³ AgNPs jsou též anti-angiogenní látky, tedy působící proti tvorbě cév. Gurunathan a kol. ve své práci využil tuto vlastnost pro cílenou aktivaci PI3K/Akt signální dráhy a demonstrovali jejich možné využití v diabetické retinopatii.¹⁶⁴ Známé jsou dnes i cytotoxické vlastnosti stříbrných nanočástic, které mohou vést až k buněčné smrti a nejvíce se podobá působení chemoterapeutik. Těchto účinků by tak mohlo být využito k inhibici proliferace tumorů nebo k vývoji nových protinádorových terapií.^{151,164}

2.5 Uhlíkové kvantové tečky

Koloidní nanokrystaly o velikosti několika nanometrů, známé jako kvantové tečky (QDs), vykazují jedinečné optické a elektrochemické vlastnosti. QDs mají diskrétní rozdělení energetických hladin, obdobně jako třeba molekuly. Energetické hladiny těchto struktur jsou závislé na několika faktorech, a to na tvaru, struktuře, chemickém složení QDs a především na jejich velikosti. Důležitou vlastností je optická schopnost teček se zabarvovat.¹⁶⁵ Elektrony excitované elektromagnetickým zářením ze základní energetické hladiny do hladiny s vyšší energií mohou po určité době přejít zpět na základní hladinu za uvolnění energie (emise elektromagnetického záření nebo i tepla) o delší vlnové délce než při excitaci (emitované záření může nabývat hodnot v rozpětí 0,4–2 μ m).¹⁶⁶ Vzdálenost energetických hladin je závislá na velikosti kvantových teček (jak je patrné z obr. 8), tzn. že obdobná závislost platí i pro absorpci světla, která spadá do ultrafialové až viditelné oblasti. Tato závislost způsobuje, že „velké“ tečky emitují v červené oblasti spektra (červený posuv) a naopak „malé“ emitují v modré části spektra (modrý posuv).¹⁶⁵ Fotoluminiscenční vlastnosti QDs jsou srovnatelné s klasickými fluorofory. Významnou vlastností QDs je však jejich výborná fotostabilita, která předurčuje jejich využití ve fluorescenční mikroskopii. Dvěmi nejběžnějšími skupinami QDs

jsou polovodičové kvantové tečky (jejichž základ tvoří anorganické krystaly těžších prvků) a uhlíkové kvantové tečky (jejichž prekurzory jsou organické povahy).



Obr. 8: Fotoluminiscenční spektra kvantových teček typu CdSe/ZnS jsou silně závislá na jejich velikosti, která se odvíjí od šířky zakázaného pásu (E_g), tedy od vzdálenosti pasu vodivostního (CB) a valenčního (VB). Převzato z Algar a kol.¹⁶⁷

QDs tvořené polovodičovými nanokrystaly o velikosti několika nanometrů, mohou existovat jako samostatné, nebo uspořádané do klastrů. Nejčastějším strukturním uspořádáním je „core–shell“ struktura, kde jeden typ polovodiče vytváří jádro (např. CdSe) a druhý tvoří obal (např. ZnS). Ačkoliv QDs o složení CdSe/ZnS doposud patří mezi nejvíce využívané v biologických aplikacích, mohou být také připravené z prvků IV. skupiny (například Si), polovodičů III.–V. skupiny (InP, InAs) či II.–VI. skupiny (CdSe, CdTe). Fotoluminiscence QDs je dána výběrem jejich složení a volbou jejich velikosti, což se odráží v oblasti emise charakteristického záření.¹⁶⁷ Tenká pasivační vrstva sulfidu zinečnatého zvyšuje fluorescenční výtěžek a stabilitu kvantových teček. Nezbytná organická vrstva na povrchu zaručuje hydrofilitu těchto materiálů a umožňuje ukotvení aktivních složek, např. protilátek. Způsob

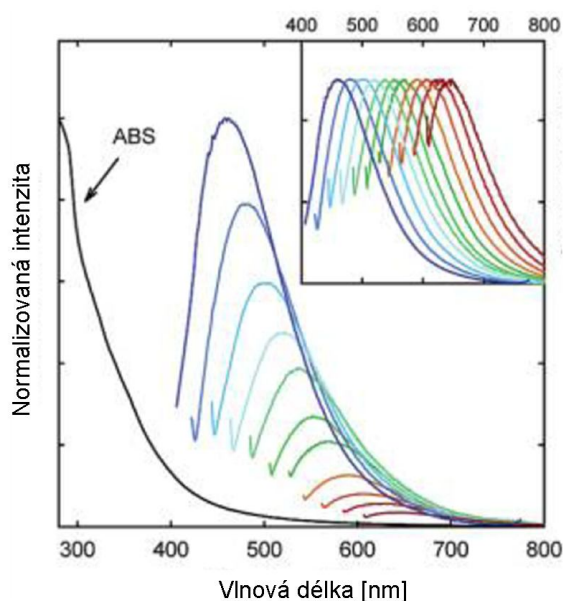
a ekologická stránka přípravy tohoto typu kvantových teček (často extrémní podmínky) spolu s jejich vysokou cenou představují významný aspekt v jejich využití.^{168,169} Problémem v řadě aplikací (*in vivo*) představuje i vysoký obsah těžkých prvků majících často toxický charakter.¹⁷⁰

Nanomateriály založené na povrchově pasivovaných uhlíkových strukturách, které jsou tvořeny nanočásticemi s velikostí pod 10 nm, tzv. uhlíkové kvantové tečky, mohou též vykazovat fotoluminiscenční vlastnosti. Tyto uhlíkové QDs kombinují vlastnosti tradičních polovodičových QDs, jmenovitě luminiscenční emise závislá na velikosti samotných částic a na vlnové délce absorpčního záření, rezistenci k fotovybělení, jednoduchost modifikace povrchu, s vlastnostmi novými. Mezi ty patří například velmi nízká toxicita, chemická inertnost a jednoduchost přípravy bez nutnosti složitých, zdoluhavých a nákladných kroků přípravy.¹⁷¹ Vnitřní uhlíková struktura QDs je převážně založena na hybridizaci typu sp^2 , která je typická i pro nanokrystalický grafit, čímž se liší od tzv. nanodiamantů, jejichž struktura je založena na sp^3 hybridizaci. Ačkoliv původ fluorescence uhlíkových QDs nebyl doposud zcela objasněn, je známa její závislost na vlnové délce excitačního záření. Právě tímto jevem se uhlíkové QDs nejvíce liší od nanodiamantů, jejichž fotoluminiscence má původ v bodových strukturních defektech a je pro ně typická silná absorpce při 569 nm a emise v oblasti 700 nm.¹⁷¹

Uhlíkové QDs byly poprvé připraveny, a tím i objeveny, jako vedlejší produkt při výrobě jednotěnných uhlíkových nanotrubelek obloukovým výbojem na grafitových elektrodách v inertním plynu.¹⁷² Pro přípravu uhlíkových QDs byla později navržena řada metod. Mezi „top-down“ metody (upravována nebo též rozbíjena je vyšší uhlíková matrice) patří metody využívající obloukový výboj,¹⁷² laserovou ablací¹⁷³ nebo elektrochemickou oxidací (např. grafitu,^{174,175} uhlíkových nanotrubelek¹⁷⁶). Pro tzv. „bottom-up“ metody (při nichž uhlíkové QDs vznikají z molekulových prekurzorů) je pro získání QDs často nezbytná řada purifikačních metod (dialýza, elektroforéza, centrifugace a další separační techniky). Do této skupiny patří spalovací (termální oxidace glycerolu,¹⁷⁷ kyseliny askorbové^{178,179}), syntetické v přítomnosti podpůrné matrice¹⁸⁰, mikrovlnné techniky¹⁸¹ či extrémní dehydratace sacharidů (např. koncentrovanou kyselinou sírovou).¹⁸²

Uhlíkové QDs vykazují silnou optickou absorpci v UV oblasti s přesahem do viditelné oblasti světelného záření (na obrázku 9 je znázorněn příklad absorpčního a emisního spekter).¹⁷¹ Právě vlnová délka excitačního záření spolu s jeho intenzitou silně ovlivňuje fotoluminiscenci uhlíkových QDs. Ačkoliv fotoluminiscence je nejpodstatnější vlastností uhlíkových QDs, nebyla její podstata doposud objasněna. Obdobně nebyla prokázána ani

úloha povrchové pasivace těchto struktur, ačkoliv je zřejmě závislá na způsobu jejich přípravy. Například uhlíkové QDs připravené laserovou ablací vykazují fotoluminiscenční vlastnosti, pouze pokud je jejich povrch upraven určitou organickou složkou^{173,183} či pokud jsou připravovány přímo v přítomnosti látek jako PEG_{200N}, které zřejmě obdobně pasivují povrch.¹⁸⁴ Několik studií potvrdilo, že pasivace povrchu má vliv na jejich kvantový výtěžek.^{184,185} Naproti tomu při přípravě uhlíkových QDs elektrochemickou oxidací nebyla potvrzena nutnost pasivace pro dosažení fotoluminiscenčních vlastností.^{186,187} Přesto se předpokládá, že zde roli pasivace přebírá přítomnost iontů nebo karboxylových skupin na povrchu teček. Zhao a kol.¹⁷⁴ dokázali rozdělit uhlíkové QDs získané elektrochemickou oxidací do dvou velikostních frakcí, na nichž demonstrovali, že fotoluminiscence uhlíkových QDs může být závislá pouze na jejich velikosti. To naznačuje, že emise QDs závislá na různé excitační vlnové délce může být případně ovlivněna i velikostní heterogenitou vzorků.



Obr. 9: Příklad absorpčních (ABS) a fotoluminiscenčních spekter uhlíkových QDs (zaznamenávaných s 20 nm přírůstkem). V pravém horním rohu jsou zaznamenána normalizovaná spektra na kvantový výtěžek. Převzato z Sun a kol.¹⁸⁸

Toxicita uhlíkových QDs byla zkoumána několika skupinami. Ray a kol.¹⁸⁹ provedli experimenty buněčné viability na buňkách HepG2 a na nádorové linii lidských hepatocelulárních buněk jater (tzv. MTT testem a stanovení viability tryptanovou modří). Pro nejvyšší zkoumanou koncentraci uhlíkových QDs, která představuje 10^2 až 10^3 krát vyšší koncentraci než je běžně používaná pro zobrazovací studie, byla viabilita buněk snížena na

75 %. Sun a kol.^{190,191} obdobně provedli nejen *in vitro* cytotoxicitní testy (lidské prsní nádorové buňky MCF-7 a lidské buňky nádoru tlustého střeva), ale také *in vivo* působení uhlíkových QDs a určení buněčné mortality, proliferace a viability. Tato studie prokázala více než 80 % buněčnou viabilitu při koncentracích 0,1 mg/mL. Při čtyřtýdenních *in vivo* testech na myších typu CD-1 nebyly prokázány žádné klinické příznaky a nebyly pozorovány žádné abnormality a nekrózy na orgánech.

Výborné optické vlastnosti, jednoduchá příprava, chemická inertnost, nízká toxicita a dobrá biokompatibilita předurčují jejich využití v technikách biologického značení *in vitro* i *in vivo*.^{191–193} Schopnost příjmu uhlíkových QDs buňkami je zřejmě způsobena endocytózou s teplotní závislostí (při nízkých teplotách je proces potlačen), avšak úplně přesný mechanismus tohoto procesu není doposud znám.¹⁷¹

Dalšími oblastmi aplikačního využití těchto struktur je použití ve fotokatalýze¹⁹⁴ nebo v optických senzorech.¹⁹⁵ Nedávná studie také popsala schopnost uhlíkových QDs fotoredukovat kovy, jmenovitě stříbrné ionty na elementární stříbro za použití monochromatické Xe obloukové lampy.¹⁹⁶

2.6 Povrchová modifikace (funkcionalizace) nanočástic

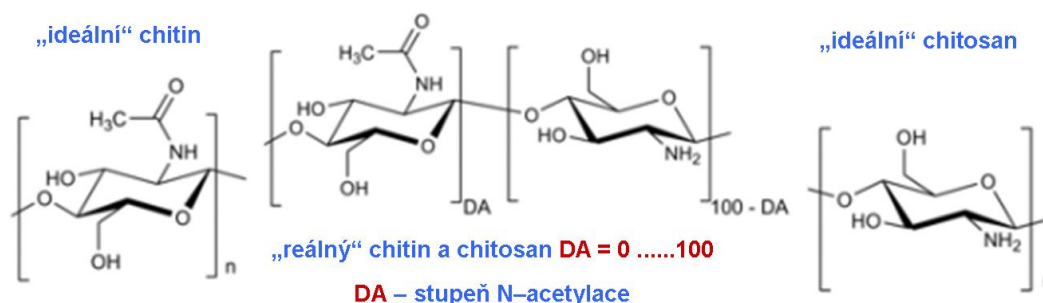
V biologických aplikacích jsou obvykle monodisperzní nanočástice povrchově upraveny adsorpcí uhlovodíků o různých délkách řetězců pro zaručení stability, biokompatibility a hydrofility. Existuje široká škála organických molekul, které mohou být využity k povrchové modifikaci nanočástic. Mezi monomerní látky patří například kyselina citrónová, glutamová, monosacharidy, dopamin, algináty, silany, lipidy (tvorba lipidových micel). Polymerní látky mohou být přírodní povahy (chitosan, dextran, polysacharidy, proteiny, nukleové kyseliny) nebo syntetické (polyethylenglykoly, dendrimery či kopolymerní látky).^{3,4}

Nanočástice, které jsou vysoce monodisperzní, s vysokou krystalinitou a minimem krystalografických defektů, jsou většinou stabilizované uhlovodíky s dlouhým řetězcem, které způsobují hydrofobní charakter jejich povrchu. Pro takové nanočástice je nezbytná adsorpce surfaktantu nebo jeho výměna. Adsorpce surfaktantu se dosahuje použitím molekul amfifilního charakteru, které obsahují jak hydrofobní (zaručuje adsorpci na hydrofobní molekulu na povrchu nanočástice), tak hydrofilní část (orientovanou do okolního prostředí a dávající nanočásticím hydrofilní povahu a zaručující rozpustnost ve vodě). Pro přímou výměnu hydrofobního řetězce na povrchu nanočástic za surfaktant se používají bifunkční

molekuly. Jedna funkční skupina je zpravidla schopna vytvořit silnou chemickou vazbu přímo s povrchem nanočástice. Druhá funkční skupina na druhém konci řetězce molekuly má polární charakter, takže nanočástice jsou dobře dispergovatelné ve vodě a je umožněna jejich pozdější povrchová funkcionalizace aktivními molekulami.³ Velká část technik přípravy nanočástic je založena na nukleačních reakcích, které probíhají přímo v prostředí, které obsahuje polymerní látky nebo surfaktanty. Jejich chemická povaha a koncentrace pak ovlivňuje stabilitu částic, jejich uspořádání, tvar a velikost. Pro stabilizaci nanočástic, popř. funkcionalizaci jejich povrchu jsou často využívány techniky, kdy v prvním kroku jsou připraveny nanočástice (např. koprecipitačními metodami) a v druhém kroku jsou povrchově modifikovány.⁴

2.6.1 Chitosan – přírodní polymer

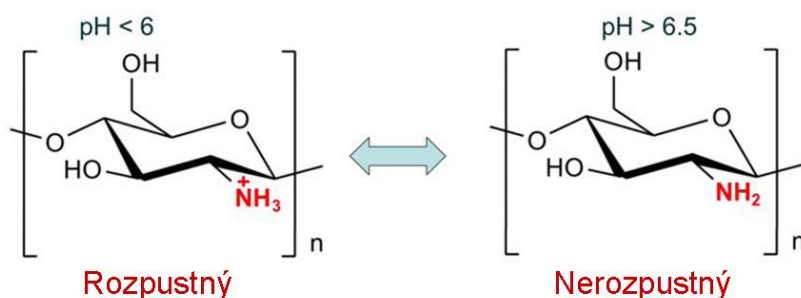
Chitosan je polymer, který se přirozeně vyskytuje v některých plísniích (*Mucoraceae*),¹⁹⁷ ale pro jeho průmyslové využití je připravován alkalickou deacetylací jiného přírodního polymeru – chitinu, který je druhým (po celulóze) nejvíce rozšířeným polymerem produkovaným biosyntézou na světě. Chitosan je poly[β -(1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glukopyranóza] a jeho struktura je naznačena na obr. 10.¹⁹⁸ Chitosan je tedy kopolymer sestávající z N-acetyl-D-glukozaminové a D-glukozaminové jednotky, jejichž zastoupení se může lišit a je závislé na stupni deacetylce.¹⁹⁹ Tento polykationtový polymer obsahuje jednu aminovou a dvě hydroxylové skupiny na jednu glukozaminovou jednotku. Uhlíková kostra je zde velmi podobná celulóze, tvoří ji β -1,4-D-glukozamin s variabilním stupněm N-acetylce.²⁰⁰



Obr. 10: Schéma přechodu mezi chitinem a chitosanem, který je závislý na stupni deacetylce (DA). Pokud má polymer DA < 50 %, mluvíme o chitinu, pokud je DA > 50 %, jedná se o chitosan. Převzato z Kumiraska a kol.¹⁹⁸

Hlavními komerčními zdroji chitinu jsou schránky vodních organismů, mušle, odpad z krevet, mořští raci. Ve světě jsou ročně sklizeny milióny tun chitinu, a proto chitosan představuje levný a snadno dostupný biopolymer.²⁰⁰ Chitosan se získává termochemickou deacetylací chitinu v alkalickém prostředí. Nejběžnějšími metodami přípravy jsou hydrolyzy acátové pozice chitinu hydroxidem sodným, draselným nebo bezvodým hydrazinem či síranem hydrazinu.²⁰¹ Reakční podmínky deacetylce určují molekulovou hmotnost polymeru a stupeň deacetylce.

Chemické a biologické vlastnosti polymeru chitosanu jsou závislé na jeho struktuře (stupni deacetylce a molekulové hmotnosti). Komerčně dostupný chitosan (společnost Sigma-Aldrich) je dodáván ve dvou variantách, o nízké a vysoké molekulové hmotnosti. Chitosan o nízké molekulové hmotnosti spadá s délkou řetězce do oblasti 20–190 kDa se stupněm deacetylce do 75 %. Chitosan o vysoké molekulové hmotnosti má délkou řetězce v rozmezí 190–375 kDa se stupněm deacetylce nad 75 %.²⁰⁰ Chitosan je rozpustný v kyselých vodných roztocích o pH menších než 6, a to díky protonizaci aminové skupiny, která se stane kladně nabitou. Naproti tomu při pH větších než 6 je aminová skupina deprotonovaná, chitosan tak ztrácí svůj náboj a stává se nerozpustným (obr. 11). Zóna přechodu mezi rozpustným a nerozpustným stavem je tedy mezi pH 6–6,5, jelikož disociační konstanta chitosanu pKa (~ 6,5) je závislá na stupni N-deacetalce, molekulové hmotnosti a též na metodě přípravy.²⁰² Další vlastností závislou na struktuře chitosanu je viskozita, která vzrůstá se vzrůstající koncentrací, snížením teploty a vzrůstem stupně deacetylce.



Obr. 11: Schéma chitosanu při přechodu mezi rozpustnou a nerozpustnou formou, která je závislá na pH prostředí. Převzato z Kumiraska a kol.¹⁹⁸

U chitosanu a jeho derivátů byla prokázána toxicita proti bakteriím, kvasinkám i parazitům. Jumaa a kol.²⁰³ ve své práci popsali antibakteriální účinek chitosanu vůči bakteriím *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Aspergillus niger*. Ve své studii (porovnání dvou typů chitosanu) odhalili závislost toxicity na délce

řetězce a stupni deacetylace a optimální účinek inhibice při pH 5–5,3. Chitosan, stejně jako i jeho deriváty, vykazují antifungální aktivitu např. pro *Fusarium oxysporium* druh *vasinfectum*, *Alternaria solani* a *Valsa mali*,²⁰⁴ a dokonce byla odhalena i jeho toxicita proti parazitům.²⁰⁵ Těchto několik uvedených studií, ale i řada dalších jednoznačně popisují toxické vlastnosti proti mikroorganizmům, které mohou být využity v řadě aplikací eliminujících patogenní organizmy při infekčních nemocích nebo v potravinářském průmyslu.

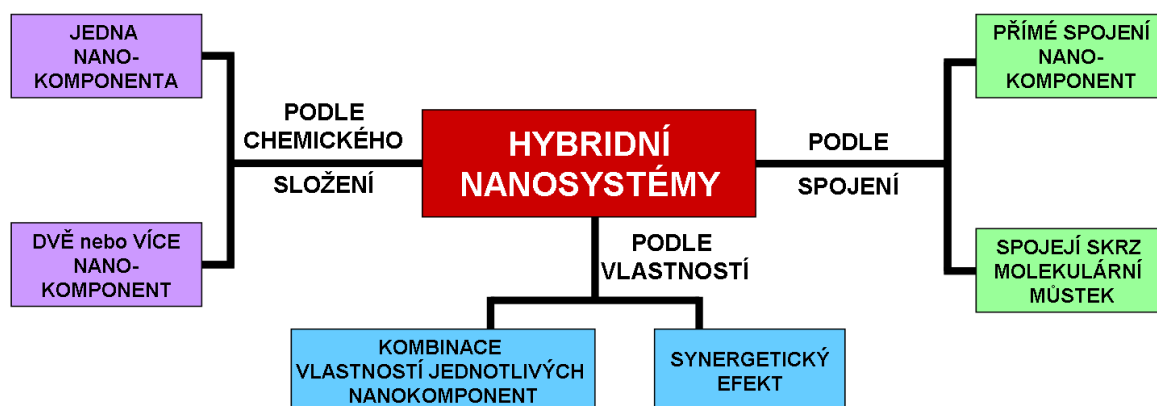
Chitosan patří mezi netoxické, biologicky kompatibilní polymery pro vyšší organismy, což bylo prokázáno řadou *in vitro* i *in vivo* studií. Např. Rao a kol.²⁰⁶ v testech akutní toxicity chitosanu na myších neodhalili žádné významné patologické změny jako podráždění očí nebo kůže ani pyrogenní vlastnosti. Arai a kol. dokonce ukázali, že hodnota LD50 chitosanu pro myši je větší než 16 g/kg (při orálním požití), což je hodnota srovnatelná s hodnotou LD50 pro sacharózu.²⁰⁰ Též existuje celá řada studií porovnávajících jednotlivé deriváty chitosanu, jejich biodistribuci v živých systémech stejně jako jejich biodegradaci.^{200,207} V závislosti na chemické modifikaci se liší i jejich působení na živé systémy, ale většina studií potvrzuje, že se jedná o skupinu látek v podstatě netoxické povahy. Navíc byly odhaleny jeho specifické biologické vlastnosti, jako je biodegradabilita, analgetické, protinádorové, hypocholesterolické, antimikrobiální a antioxidační funkce, které jsou závislé na fyzikálních vlastnostech tohoto polymeru (stupeň a homogenita deacetylace, délka řetězce).²⁰⁰

Díky svým vlastnostem a minimální toxicitě patří chitosan k bezpečným a přístupným materiálům nacházejícím uplatnění v řadě aplikací. Z biochemicko-farmaceutických aplikací nachází své uplatnění v technikách hojení kostních tkáních, chrupavek, jater, nervového systému, ran, dále jako nosič léčiv, peptidů/proteinů, růstových faktorů, antibiotik, vakcín, kde se využívá ke kontrolovanému uvolnění těchto biologicky aktivních látek. Dále je využíván k tvorbě membrán, genové terapii (chitosan velmi dobře váže záporně nabitě molekuly, tedy i DNA) či pro zobrazovací techniky (chitosan je chelatační činidlo pro těžké kovy).²⁰⁰

2.7 Bimetalické nanočástice a multikomponentní nanomateriály

Bimetalické nanočástice a multikomponentní nanomateriály, obsahující dvě a více komponent (hybridní struktury, kompozitní materiály), poutají v posledních letech velkou pozornost hlavně díky synergetickým vlastnostem pocházejícím právě z interakcí odlišných nanodomén (obr. 12).²⁰⁸ Multikomponentní nanosystémy představují širokou škálu

nanomateriálů, které se liší chemickým složením, vlastnostmi i typem propojení jednotlivých komponent (obr. 12).



Obr. 12: Klasifikace hybridních nanomateriálů podle tří odlišných kritérií. Převzato z López-Lorente a kol.²⁰⁹

Z chemického hlediska mohou takovéto struktury být anorganické (křemíkové nanosféry, borazinové nanotrubky, polovodičové kvantové tečky, nanočástice kovů a jejich oxidů), organické (fulereny, uhlíkové nanotrubky, dendrimery) nebo smíšené (uhlíkové nanotrubky funkcionalizované ferocenem, zlaté nanočástice funkcionalizované cyklodextriny nebo také nanostruktury funkcionalizované biomolekulami) povahy.^{8,209} Nanočásticové složky v těchto strukturách mohou být k sobě vázány skrz organické nebo anorganické molekulové můstky, nebo mohou být přímo vázány jedna k druhé.²⁰⁹ Například dvě kvantové tečky mohou být k sobě vázány skrz molekuly obsahující dvě thiolové skupiny nebo kvantová tečka může přímo vzniknout a růst na povrchu uhlíkových nanotrubek.

Výhody multikomponentních struktur spočívají ve třech aspektech. Prvním je možnost spojení různých vlastností, které jsou charakteristické pro jednotlivé komponenty. Ty mohou být nezávisle optimalizovány volbou rozměrů a ostatních parametrů jednotlivých komponent. Příkladem může být kombinace optických a magnetických vlastností (např. nanokrystaly Co/CdSe), které mohou nalézt uplatnění v bioanalýzách s optickým rozlišením umožňující též magnetickou manipulaci.²¹⁰ Druhým aspektem je získání nových vlastností multikomponentních nanosystémů, které nejsou typické pro jednotlivé složky, ze kterých je systém utvořen. Příkladem je např. kombinace magnetického a polovodičového materiálu (tenká feromagnetická vrstva na polovodičových nanostrukturách) v spinově–světlo emitujících diodách, tzv. Spin–LED. Feromagnetická vrstva polarizuje elektrony v polovodiči, které po rekombinaci s volnými dírami vyzařují kruhově polarizované

elektrony.²¹¹ Třetí výhodou je dosažení synergetického efektu, tedy významného zlepšení určitých vlastností.²⁰⁸ Takovéto nanostruktury vykazují zajímavé magnetické, magneto-optické, plazmonické a polovodičové vlastnosti.

2.7.1 Základní strukturní typy hybridních nanomateriálů

2.7.1.1 Nanočásticové struktury typu jádro-slupka (core-shell)

Tento druh uspořádání vícesložkových nanočástic patří mezi nejčastější. Jeho typickými představiteli jsou polovodičové kvantové tečky, kde jeden typ polovodiče vytváří jádro kvantové tečky (např. CdSe) a druhý tvoří jeho obal (např. ZnS).¹⁶⁷ Tenká pasivační vrstva sulfidu zinečnatého v tomto typu uspořádání zvyšuje fluorescenční výtěžek a stabilitu kvantových teček. Jinými představiteli jsou multifunkční nanostruktury, kde jádro je tvořeno magnetickým materiálem (nanočástice oxidů železa) a slupka kovem (zlato, stříbro).²¹² Magnetické jádro dává hybridní struktuře magnetické vlastnosti, a tím možnost cílené manipulace. Vrstva zlata na povrchu umožňuje přímou imobilizaci biomolekul (ribonukleové kyseliny) nebo obdobně jako vrstva stříbra může představovat plazmonově aktivní složku pro optická zobrazení. Mechanismus vzniku těchto struktur je založen na růstu vrstvy na předem připravených nanočásticových strukturách. Příkladem může být růst vrstvy Au za nízkých teplot na povrchu nanočástic magnetitu Fe_3O_4 redukcí HAuCl_4 v přítomnosti oleaminu jako stabilizátoru a redukčního činidla. Pokud po vzniku Fe_3O_4 -Au struktury je do redukčního prostředí přidán AgNO_3 , pak je možná i formace třetí stříbrné vrstvy.²¹²

2.7.1.2 Heterodimerní nanočástice

Vznik těchto struktur je založen na nukleaci a růstu druhé komponenty na již předem připravených nanočásticích. Tento mechanismus je obdobný jako u struktur jádro-slupka a liší se v tvorbě zárodku a růstu druhého typu nanočástic. Tento proces je lokalizován jen do určitého místa na povrchu předem připravených částic a neprobíhá homogenně na celém jejich povrchu. Kritickým faktorem úspěšné syntézy těchto struktur je poměr nanočástic nosiče a koncentrace prekurzoru vznikajících částic, která musí být nižší než je potřebná k vytvoření homogenní vrstvy. Při procesu růstu nanočástice na povrchu je také důležitá nižší energie tohoto procesu, než je potřebná k nukleaci druhé nové částice.³ Příkladem může být příprava Au- Fe_3O_4 nanočástic, které vznikají dekompozicí pentakarbonylu železa $\text{Fe}(\text{CO})_5$ na povrchu Au nanočástic.²¹³ Struktury tohoto typu je možné získat i metodami založenými na

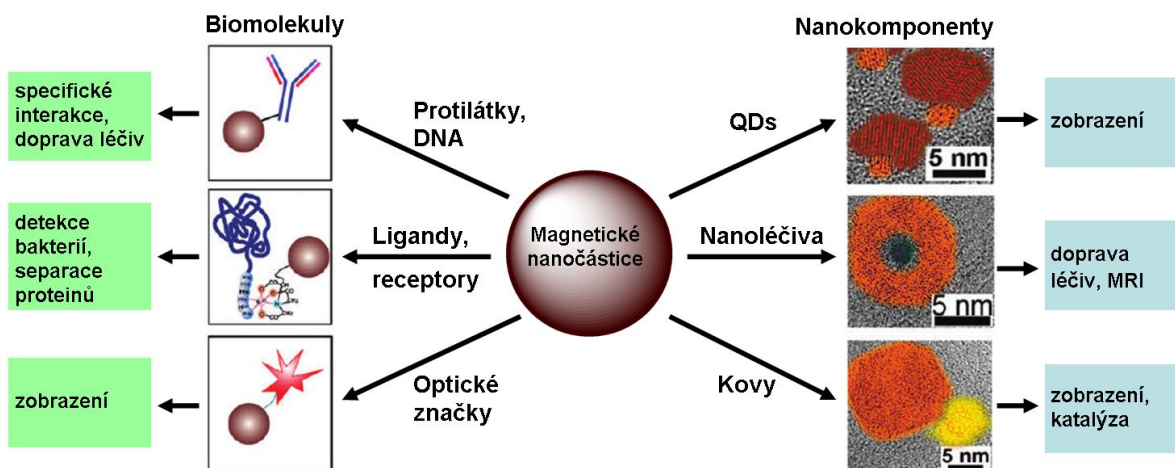
přenosu elektronů mezi dvěma komponenty během nukleace, která je závislá na polaritě použitých rozpouštědel.³

2.7.1.3 Multikomponentní hybridní struktury

Inkorporace různých nanomateriálů do micelárních struktur může být jedním z jednoduchých mechanismů přípravy vícefunkčních hybridních struktur. Příkladem může být inkorporace magnetických nanočástic (hydrofobní Fe_3O_4), polovodičových kvantových teček (CdSe/ZnS), molekul doxorubicinu a poly(laktik–glykolové) kyseliny do hydrofóbní části Pluronic–F127 micel.²¹⁴ Základem těchto nanostruktur je biokompatibilní nosič, např. poly(laktik–glykolová) kyselina, která umožňuje kontrolované uvolnění hydrofobních komponent majících terapeutické účinky (doxorubicin, protinádorové léčivo) přímo v buňkách. Ostatní komponenty zde hrají též důležité role. Magnetické nanočástice Fe_3O_4 umožňují magnetickou kontrolu nad micelami a mohou být též využity pro zobrazení magnetickou rezonancí MRI. Kvantové tečky pak mohou sloužit pro optické zobrazení k identifikaci distribuce v živých systémech na buněčné úrovni.

2.7.1.4 Magnetické hybridní nanomateriály

Nanočásticové magnetické materiály díky svým vlastnostem (tvar a velikostní distribuce částic v řádech několika jednotek až desítek nanometrů, možnost kontrolovat pohyb vnějším magnetickým polem, či možnost jejich využití jako zobrazovací sondy pro MRI) nacházejí uplatnění v široké škále biologických, biochemických, medicínských nebo environmentálních aplikací. Multifunkční hybridní nanomateriály, jejichž základ je tvořen právě magnetickými nanočásticemi, lze obecně rozdělit do dvou hlavních skupin (jak je znázorněno na obr. 13).⁸ První skupinu tvoří molekulárně funkcionalizované magnetické nanočástice. Molekuly mající biologickou funkci, jako jsou protilátky, ligandy, receptory, proteiny, léčiva, mohou být imobilizovány na magnetické částice, které tak mohou získat biologickou funkci a vysokou selektivitu a sensitivitu k požadovaným procesům. Druhou skupinou jsou nanomateriály, které v sobě kombinují více funkčních nanostruktur, často tvořící “core-shell“ struktury nebo heterodimerní částice.



Obr. 13: Schéma znázorňující multifunkční magnetické nanokompozitní materiály a jejich potenciální aplikace. Převzato z Gao a kol.⁸

V molekulárně funkcionalizovaných hybridních materiálech plní magnetické nanočástice funkci zobrazovacího sensoru (MRI), umožňují cílenou dopravu aktivních látek, jejich magnetickou separaci, popř. mohou plnit i jinou specifickou funkci, jak je tomu u terapie hypertermií.¹⁰ Biomolekuly imobilizované na povrchu MNPs pak mají dle své povahy specifické funkce. Imobilizace ligandu či protilátky na povrchu nanočástice umožňuje její vysoce selektivní interakci s jinou biomolekulou (antigenem). Magnetické navedení hybridních struktur do místa účinku spojené s vysokou afinitou jen k určitým entitám umožňuje jejich využití v detekcích bakterií, patogenů, nádorových buněk, specifických buněk, v cílené dopravě léčiv, terapeutických genů (krátké fragmenty RNA nebo siRNA), nádorově–specifických ligandů, nebo také pro cílenou terapii kmenovými buňkami.^{3,9} Imobilizace proteinů, enzymů, nukleových kyselin či jejich fragmentů na vhodně povrchově upravený magnetický nosič umožňuje jejich purifikace za využití magnetické separace nebo je lze „recyklovat“ a opakovaně je použít. Tohoto se využívá především při získávání biologických molekul ze složitých směsí (extrakce DNA z krve za využití MNPs modifikovaných dendrimery)²¹⁵ nebo pro opakovatelné použití enzymů v katalytických reakcích (imobilizace trypsinu na MNPs a jeho využití v proteomice)²¹⁶. Konjugací magnetických nanočástic s organickými barvivy lze vizualizovat biologické procesy jak technikami MRI, tak optickým zobrazováním. Ačkoliv fluorescenční značení nanočástic patří mezi velmi rozšířené techniky hlavně v oblastech *in vivo* analýz, doposud využívané organické značky jsou limitovány omezeným průnikem fluorescenčního záření skrz tkáň. Pro tato zobrazení jsou dnes požadovány fluorofory emitující záření v oblastech vlnové délky nad 700 nm, tedy v blízké infračervené oblasti.⁸ Z tohoto pohledu se jeví být zajímavou skupinou

uhlíkové kvantové tečky, u kterých by mohlo být dosaženo emise záření v této oblasti vhodnou volbou prekurzoru a jejich povrchové modifikace.

Také možnost inkorporace více nanorozměrných komponent v jednu entitu přitahuje velký zájem především z pohledu získání multifunkčních materiálů. Magnetické nanočástice mohou sloužit k ukotvení kovových částic (stříbra, zlata, platiny, mědi), částic oxidů kovů (oxidu titaničitého) nebo složitějších struktur (polovodičových nebo uhlíkových kvantových teček). Příklady jejich strukturního uspořádání i principy jejich přípravy byly obecně popsány již výše (kap. 2.7.1). Magnetické nanočástice (dávající systému magnetické vlastnosti) často tvoří matici pro imobilizaci nebo přímo vznik nanočástic jiné povahy. Ty pak podle svého chemického složení, velikosti nebo tvaru mohou dát vzniklému systému vlastnosti optické (Au, Ag, Pt, QDs), katalytické (TiO_2), antimikrobiální (Ag, Cu) nebo elektrické (uhlíkové nanotrubičky).¹ Příkladem nanokompozitních částic mohou být částice, jejichž jádro je tvořeno nanočásticí kobaltu, která je obalena polovodičovou vrstvou CdSe.²¹⁰ Patří tak mezi čistě-anorganické částice, které vykazují fotoluminiscenční a magnetické vlastnosti. Mezi čistě anorganické materiály patří i Au- a Ag-obalené nanočástice magnetitu, které v sobě kombinují magnetické a tzv. „plazmonické“ vlastnosti.²¹² Navíc vhodnou kombinací kovů Au a Ag a volbou tloušťky povrchové vrstvy, kterou tvoří, může docházet k posunu absorpčního píku připravených částic do nižších nebo vyšších vlnových délek a cíleně tak ovlivňovat jejich optické vlastnosti. Jiným typem magnetických kompozitních materiálů tvoří anorganicko-organické systémy. Příkladem mohou být kompozity, ve kterých jsou funkční jednotky dány nanočásticemi kovů nebo jejich oxidů avšak nezbytná je i přítomnost polymeru (popř. monomeru), který stabilizuje strukturu, kotví její jednotlivé komponenty nebo umožňuje dále kompozit funkcionalizovat. Významnou skupinou tohoto typu jsou např. systémy založené na oxidech železa a stříbrných nanočásticích.^{160,217-219} Magnetické, optické (SERS), katalytické, antimikrobiální či antivirální vlastnosti těchto materiálů pak předurčují jejich široké použití v různých odvětvích a aplikacích.

3 KOMENTÁŘE A DISKUZE JEDNOTLIVÝCH PUBLIKAČNÍCH VÝSTUPŮ

Tato část disertační práce obsahuje shrnutí a komentář nejdůležitějších výsledků, prezentovaných autorem v publikacích ve vědeckých periodikách zaměřených na materiálovou vědu. Rozbor jednotlivých publikací, na kterých se autor podílel, popř. jejich rozšíření, je řešen formou volného komentáře a plné znění těchto publikací je uvedeno v příloze (kap. 7). Jednotlivé výstupy jsou zaměřeny na povrchovou modifikaci bakteriálního magnetitu, který byl použit jako biokompatibilní magnetický nosič o uniformní velikosti částic, na jehož základě byly připraveny kompozitní materiály specifických vlastností. Dále byl také připraven kompozitní nanomateriál založený na nanočásticích nulamocného železa, které byly využity jako bifunkční matrice, mající magnetické a redukční vlastnosti. Připravené nanomateriály byly charakterizovány řadou technik a byly také stanoveny základní vlastnosti předurčující jejich aplikace. Jednotlivé kapitoly popisující připravené nanostrukturní materiály jsou následně vztaženy k jednotlivým publikacím:

(i) Povrchová úprava nanočástic oxidů železa izolovaných z *Magnetospirilla gryphiswaldense* pro biochemické a biomedicínké aplikace.

(Surface engineering of iron oxide nanoparticles isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense* for biochemical and biomedical applications).

(ii) Syntéza a vlastnosti „core–shell“ fluorescenčních hybridních nanostruktur na bázi uhlíkových teček.

(Synthesis and properties of core–shell fluorescent hybrids with distinct morphologies based on carbon dots).

(iii) Magnetické antimikrobiální kompozitní materiály založené na chitosanem modifikovaných nanočásticích biogenního magnetitu a nanočásticích stříbra s kontrolovatelnou velikostní distribucí.

(Chitosan-based synthesis of magnetically–driven nanocomposites with biogenic magnetite core, controlled silver size, and high antimicrobial activity).

(iv) Na vzduchu stabilní bimetalické nanočástice Fe–Ag pro pokročilé antimikrobiální aplikace a odstranění fosforu.

(Air stable magnetic bimetallic Fe–Ag nanoparticles for advanced antimicrobial treatment and phosphorus removal).

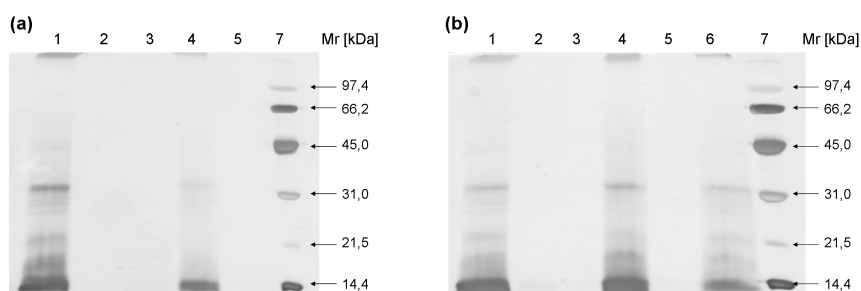
(v) Termostabilní konjugáty trypsinu imobilizované na biogenním magnetitu vykazující vysokou stabilitu a opakovatelné použití pro proteinové štěpení.

(Thermostable trypsin conjugates immobilized to biogenic magnetite show a high operational stability and remarkable reusability for protein digestion).

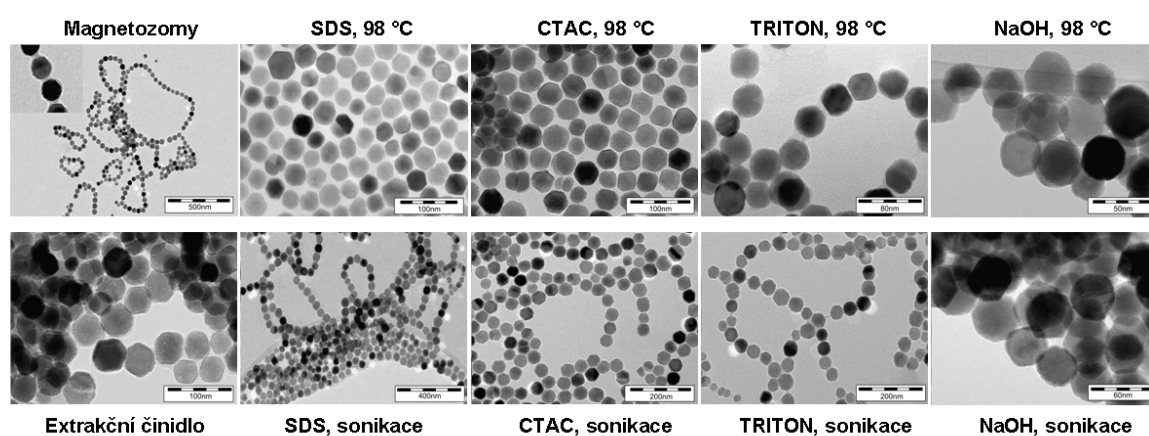
3.1 Povrchová úprava nanočástic oxidů železa izolovaných z *Magnetospirilla gryphiswaldense* pro biochemické a biomedicínké aplikace

Bakteriální magnetit, který vzniká biologicky kontrolovanou mineralizací, je díky svým unikátním vlastnostem velmi zajímavou alternativou laboratorně připravovaných magnetických částic. Pro přípravu těchto nanočástic byla v naší laboratoři zavedena procedura kultivace kmene *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR–1 v laboratorním 10L fermentoru (R'Alf Plus System, Bioengineering AG, Switzerland). Magnetit ve formě magnetozomů byl izolován metodou založenou na mechanickém rozrušení bakteriální membrány a následně purifikován magnetickou separací boron–neodymovým magnetem.

Pro modifikaci povrchu byla zvolena metoda odstranění magnetozomální membrány a následné obalení (stabilizace, funkcionalizace povrchu) polymery. Pro odstranění membrány bylo testováno několik činidel: dodecylsulfát sodný SDS, chlorid cetyltrimethylammonný CTAC, polyethylen glycol p–(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl ether TRITON, 2M hydroxid sodný NaOH a extrakční roztok chloroform:methanol:hexan, 1:1:1. Jejich působení bylo podpořeno sonikací nebo vyšší teplotou (98 °C). Z provedené SDS–elektroforézy (obr. 13) a porovnání TEM záznamů (obr. 14) jednotlivých vzorků byla činidla SDS a NaOH při použití vyšší teploty nejlepšími detergenty a byla dále používány pro odstranění magnetozomální membrány z povrchu nanočástic.



Obr. 13: SDS-elektroforetické dělení zbytkových proteinů magnetozomální membrány po její solubilizaci: působením (a) vyšší teploty a (b) sonikací. Linie 1: magnetozomy, linie 2: SDS, linie 3: CTAC, linie 4: TRITON, linie 5: NaOH, linie 6: extrakční činidlo lipidů, linie 7: standard proteinů.



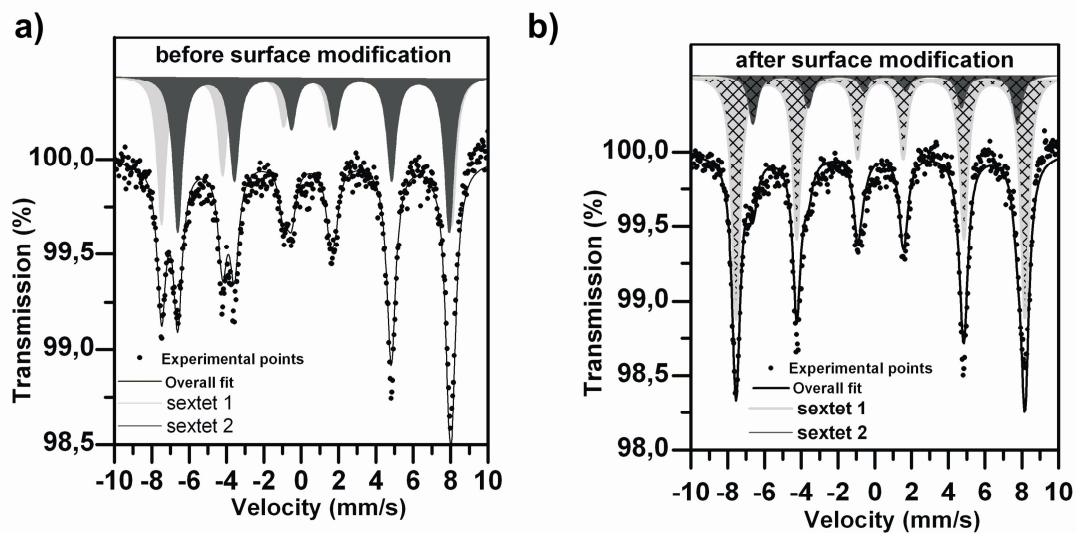
Obr. 14: TEM zobrazení a porovnání jednotlivých vzorků po odstranění magnetozomální membrány.

Jelikož vzorky, u kterých byla magnetozomální membrána odstraněna působením surfaktantů SDS a CTAC, vykazovaly velmi malý stupeň agregace (jak je vidět i na snímcích v obr. 14), byl též změřen povrchový náboj těchto částic (zeta potenciál, tab. 1). Pro částice po odstranění membrány záporným surfaktantem SDS byl stanoven zeta potenciál velmi negativní (-50 mV), pro částice, kdy byl použit kladný surfaktant CTAC, naopak pozitivní (51 mV). Tyto hodnoty naznačují, že povrch bakteriálního magnetitu byl částečně stabilizován adsorpcí těchto surfaktantů. Z tohoto důvodu byla pro některé aplikace zvolena cesta odstranění magnetozomální membrány metodou saponifikace, tedy působením 2 M roztoku NaOH.

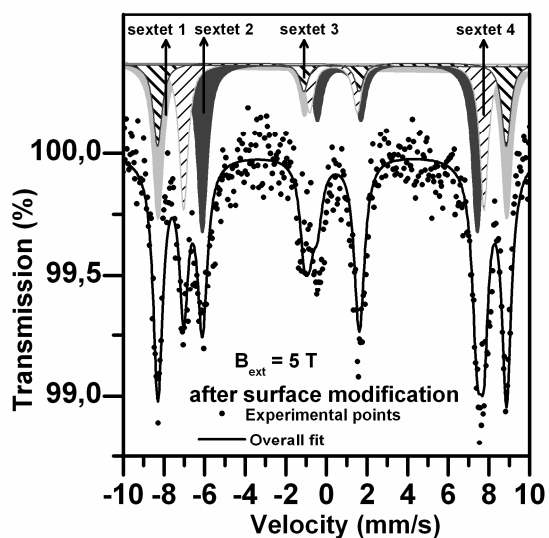
Tab. 1: Stanovení hodnot zeta potenciálu pro vzorky, u kterých byla odstraněna magnetozomální membrána surfaktanty SDS a CTAC při 98 °C.

| Vzorek | Inkubace | Zeta potenciál [mV] |
|----------------|------------|---------------------|
| magnetozomy | – | -23 ± 6 |
| vzorek po SDS | 98 °C, 1 h | -50 ± 9 |
| vzorek po CTAC | 98 °C, 1 h | 51 ± 5 |

Dále byl také sledován vliv teploty (98 °C), která je zapotřebí k odstranění magnetozomální membrány, a která může způsobit částečnou oxidaci povrchu těchto částic. Mössbauerovou spektroskopií za pokojové teploty bylo odhaleno, že již magnetit získaný ve formě magnetozomů je nestechiometrický (obr. 15a). Tato skutečnost může být dána třemi faktory. Prvním jsou neoptimální podmínky během kultivace samotných bakterií, které je někdy obtížné přesně nastavit a udržet po celou kultivační dobu. Druhým pak může být proces izolace magnetozomů, kdy je potřeba vysokých tlaků k rozbití buněčné stěny a třetím je jejich dlouhodobé uchování, při kterém též může být povrch částečně oxidován vodným kyslíkovým prostředím, ve kterém jsou magnetozomy standardně uchovávány. Magnetozomy, které byly inkubovány 1 h ve vodném prostředí při 98 °C, vykazovaly vyšší stupeň oxidace (obr. 15b). Poměr jednotlivých fází Fe–O byl určen Mössbauerovou spektroskopií za pokojové teploty v externím magnetickém poli 5 T (obr. 16). Složení Fe-O fází magnetických částic po inkubaci při 98 °C tak bylo stanoveno na (68 ± 5) % magnetitu a (32 ± 5) % maghemitu. Pravděpodobně tak vlivem podmínek během izolace, purifikace a odstranění magnetozomální membrány vzniká magnetická core-shell struktura o složení nanočástic magnetit–maghemit. Parametry jednotlivých Fe–O fází jsou uvedeny v tab. 2.



Obr. 15: Mössbauerova spektra získaná za pokojové teploty a bez působení vnějšího magnetického pole; (a) purifikované magnetozy, (b) magnetozy inkubované 1 h při 98 °C.



Obr. 16: Mössbauerovo spektrum magnetozy inkubovaných 1 h při 98 °C, které bylo získáno za pokojové teploty ve vnějším magnetickém poli 5 T.

Tab. 2: Mössbauerovy parametry magnetožomů a magnetožomů inkubovaných 1 h při 98 °C.

| Vzorek | B_{ext} [T] | komponenta | $\delta \pm 0,02$ [mm/s] | $\Delta E_Q \pm 0,02$ [mm/s] | $B_{\text{hf}} \pm 0,5$ [mm/s] | $RA \pm 2$ [%] | pozn. |
|-----------------------------|----------------------|------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------|---|
| magnetožomy | 0 | sextet 1 | 0,29 | 0,01 | 48,3 | 47,8 | Fe ³⁺ v tetraedral. pozici magnetitu |
| | | sextet 2 | 0,64 | 0,03 | 45,2 | 52,2 | Fe ²⁺ + Fe ³⁺ v oktaedral. pozici magnetitu |
| <hr/> | | | | | | | |
| magnetožomy | | | | | | | |
| inkubované 1 h při 98 °C | 0 | sextet 1 | 0,31 | 0,01 | 48,8 | 82,2 | |
| | | sextet 2 | 0,55 | 0,02 | 44,7 | 17,8 | |
| <hr/> | | | | | | | |
| magnetožomy | | | | | | | |
| inkubované 1 h při 98 °C | 5 | sextet 1 | 0,29 | 0,01 | 53,3 | 29,5 | Fe ³⁺ v tetraedral. pozici magnetitu |
| | | sextet 2 | 0,64 | 0,03 | 42,0 | 32,2 | Fe ²⁺ + Fe ³⁺ v oktaedral. pozici magnetitu |
| | | sextet 3 | 0,26 | 0,02 | 53,3 | 13,9 | Fe ³⁺ v tetraedral. pozici maghemitu |
| | | sextet 4 | 0,35 | 0,02 | 45,9 | 24,3 | Fe ³⁺ v oktaedral. pozici maghemitu |

B_{ext} je externí magnetické pole paralelní ke směru chodu paprsku, δ je centrální posun, ΔE_Q je kvadrupólové štěpení, B_{hf} je magnetické hyperjemné pole a RA je relativní plocha spektra.

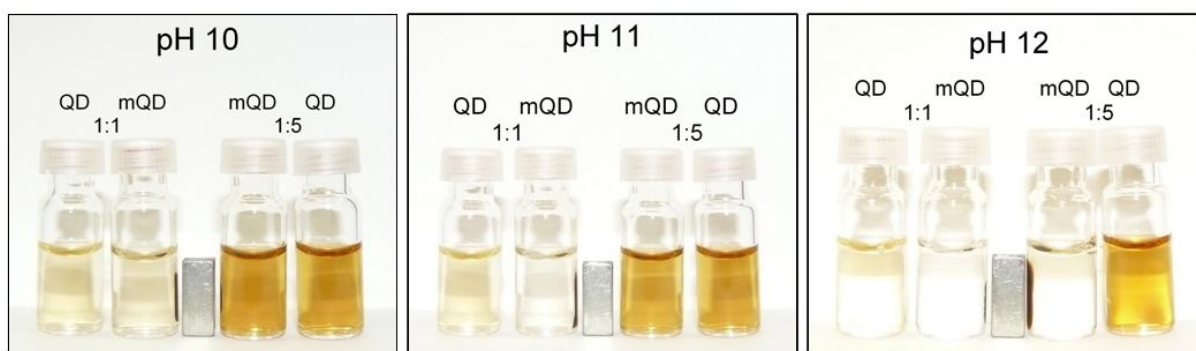
Získaná spektra byla zpracována programem MossWinn proložením Lorenzovou křivkou metodou nejmenších čtverců.

Pro obalení bakteriálního magnetitu byly zvoleny biokompatibilní, biodegradabilní, stabilní a netoxické polymery: přírodní polymery chitosan a dextran, dále pak deriváty chitosanu N-trimethylchitosan a O-carboxymethyl chitosan a Tween 20. Díky svým vlastnostem, možnosti využít jak hydroxylové, tak i aminové skupiny, cenové dostupnosti a jednoduchosti přípravy byl chitosan vybrán pro další aplikace. Hybridní struktura bMNPs–chitosan byla využita jako magnetický nosič pro tvorbu nanokompozitního antimikrobiálního materiálu bMNPs–Ag (kapitola 3.3) a pro imobilizaci enzymu trypsinu (kapitola 3.5)

3.2 Syntéza a vlastnosti core-shell fluorescenčních hybridních nanostruktur na bázi uhlíkových teček

Multifunkční fluorescenční nanostrukturní materiály mohou nalézt uplatnění v řadě bioaplikací. Příprava fluorescenčních nanohybridů byla vyvinuta na imobilizaci hydrofilních uhlíkových kvantových teček (s povrchovou kvartérní amoniiovou skupinou $-N(CH_3)_3$)¹⁷⁹ na povrchu bakteriálních magnetických nanočástic, což usnadnilo jejich charakterizaci díky využití magnetické separace. Metoda imobilizace kvantových teček byla dále rozšířena i na jiné nanočásticové struktury: nanočásticové stříbro (AgNPs) a uhlíkové nanotrubky (CNTs), čímž byla tato metoda zobecněna pro širokou škálu nosičů. Díky faktu, že kvartérní amoniiová skupina nemohla být přímo využita pro kovalentní imobilizaci, bylo využito jejího silného náboje pro elektrostatickou interakci.

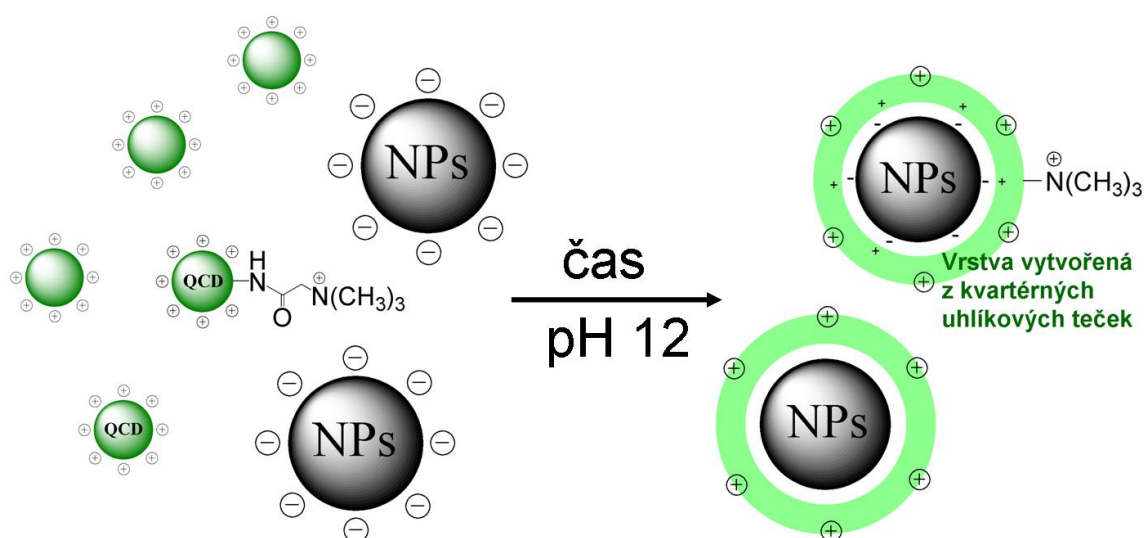
Metoda imobilizace kvartérních uhlíkových teček (QCDs) má dva významné aspekty, které musejí být zachovány pro dosažení jejich adsorpce na povrch nosiče. Prvním je velmi zásadité pH, stanovené řadou experimentů na hodnotu 12. Tato hodnota je nezbytná pro adsorpci i větších množství kvartérních uhlíkových teček (maximální testovaný hmotnostní poměr byl 1:5 bMNPs:QCDs). Při pH 11 dochází též k adsorpci, avšak daleko menších množství. Při pH 10 pak adsorpce nebyla téměř pozorována, jak je patrné z porovnání fotografií vzorků po adsorpci QCDs a magnetické separaci (obr. 17).



Obr. 17: Vliv pH a množství uhlíkových kvantových teček na schopnost adsorpce na povrch bakteriálních magnetických částic. Vzorky QD označují roztok čistých kvantových teček v koncentraci, která byla použita pro imobilizaci na povrch bMNPs. mQD označují vzorky po imobilizaci kvantových teček při daném pH a při použití dvou hmotnostních poměrů bMNPs:QCDs (1:1 vždy vlevo, 1:5 vždy vpravo).

Druhou podmínkou je záporně nabitý povrch nosiče pro snadnější adsorpci QCDs. Tato podmínka platí pro většinu nanočástic bez povrchové modifikace (např. bMNPs, jejich

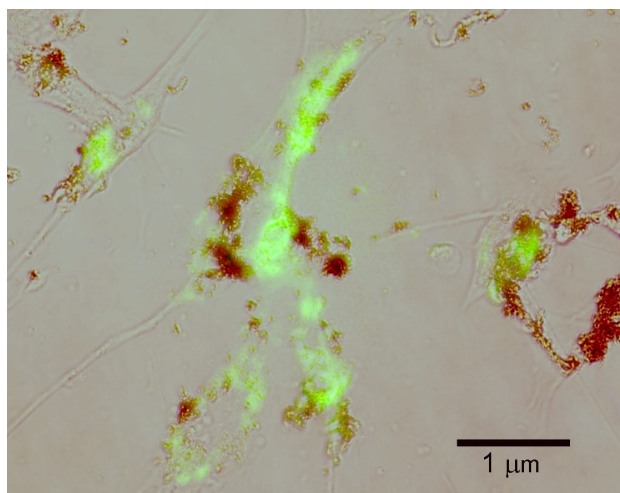
izoelektrický bod je daleko menší než pH 12, tedy při tomto pH má jeho povrch záporný náboj). Pro nanočástice, které vyžadují stabilizaci surfaktantem, aby nedošlo k jejich dalšímu růstu (např. Ag nanočástice), je možné využít záporně nabitých stabilizačních činidel (např. kyselinou citrónovou) nebo zajištění záporného náboje oxidací (vytvoření karboxylové skupiny na povrchu CNT pomocí kys. dusičné). Kvartérní aminová skupina na povrchu kvantových teček, která pochází z betainu, umožňuje jejich imobilizaci na anionický substrát skrz elektrostatické interakce (obr. 18).



Obr. 18: Schéma imobilizace QCDs na anionický substrát skrz elektrostatické interakce při pH 12.

Důležitým poznatkem jsou také morfologické změny ve struktuře kvantových teček při tak zásaditých pH, které zřejmě usnadňují imobilizaci. Při porovnání snímků z transmisní elektronové mikroskopie je patrné, že po imobilizaci si QCDs nezachovávají svou nanočásticovou strukturu, ale vytvářejí na površích substrátů vrstvu, jejíž tloušťka je závislá na použitém hmotnostním poměru substrát:QCDs. TEM a kapilární elektroforéza odhalily, že při $\text{pH} > 10$ dochází k rozpadu nanočásticové struktury, která je zřejmě způsobena alkalickou hydrolyzou vazeb, „rozpuštěním“ původního uspořádání a vzniku oligomerních fragmentů. Při pH 11 dochází k částečnému a při pH 12 pak k úplnému procesu rozpadu původní struktury QCDs. Hybridní nanostruktury dále byly charakterizovány technikami transmisní elektronové mikroskopie s vysokým rozlišením, magnetickým měřením SQUID a byl stanoven zeta potenciál. Tyto techniky potvrdily rovnoměrnou adsorpci QCDs na povrchu substrátu (rovnoměrná distribuce uhlíku, snížení magnetizace, kladný povrchový náboj).

Fluorescenční vlastnosti byly ověřeny a potvrzeny fluorescenční mikroskopií proměřením absorpčních a fluorescenčních spekter. Biokompatibilita bMNPs–QCDs hybridního systému byla ověřena na mezenchymálních kmenových buňkách. Příjem těchto částic buňkami (pozorováno v 24.–72. hodině) nezpůsobil žádný pozorovatelný negativní efekt na buněčný růst a proliferaci buněk (obr. 19), což naznačuje velmi nízkou toxicitu tohoto systému.

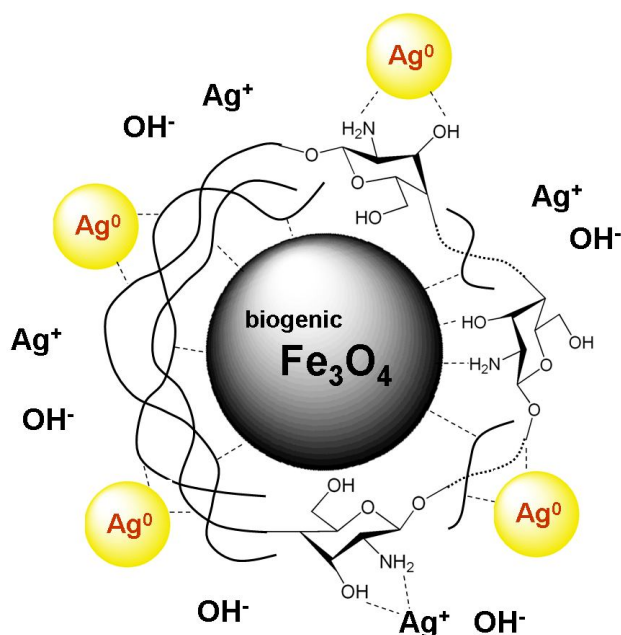


Obr. 19: „*In vitro*“ značení kmenových buněk nanokompozitním materiálem bMNPs–QCDs. Snímek (kombinace fázového kontrastu s fluorescenčním módem) byl pořízen po 72 hodinách inkubace.

3.3 Magnetické antimikrobiální kompozitní materiály založené na chitosanem modifikovaných nanočásticích biogenního magnetitu a nanočásticích stříbra s kontrolovatelnou velikostní distribucí

Chitosan je přírodní biokompatibilní a biodegradabilní polymer mající dvě funkční skupiny: hydroxylovou a aminovou. Tento polymer byl využit k obalení bakteriálních magnetických nanočástic vedoucí k získání magnetického hybridního systému. Pro přípravu hybridu byla zvolena metoda „cross-linking“ využívající rozpustnosti tohoto polymeru v kyselých pH a jeho precipitaci v pH bazických. Chitosan byl tedy rozpuštěn v kyselém pH a nechán adsorbovat na povrch bMNPs. Poté byla suspence vpravena do zásaditého roztoku, kde došlo k precipitaci chitosanu na povrchu nanočástic a vznikla tak rigidní hybridní struktura magnetit-chitosan (mCH). Volné aminové skupiny chitosanu na povrchu tohoto systému pak byly využity k ukotvení stříbrných iontů a jejich redukci na stříbrné nanočástice (obr. 20). Pro charakterizaci připravených kompozitních systémů mCH–Ag byla použita

transmisní elektronová mikroskopie doplněná technikou prvkového mapování, rentgenová difrakce, atomová absorpční spektroskopie a infračervená spektroskopie.



Obr. 20: Schéma uspořádání kompozitního systému mCH-Ag.

Pro přípravu tohoto systému byly optimalizovány podmínky, a to pH a teplota, jejichž správnou volbou může být celý proces urychlen. Pro optimální redukci, která proběhla během 15 min., bylo třeba pH upravit na hodnotu 12 a teplotu reakce na 80 °C. Během těchto podmínek proběhla úplná redukce přítomných stříbrných iontů. Tímto bylo také dosaženo možnosti regulovat velikost částic stříbra a obsah stříbrné složky na povrchu magnetického hybridu, a to počáteční koncentrací stříbrné soli. Při nejnižší testované koncentraci bylo dosaženo průměrné velikosti stříbrných nanočástic 7 nm, při nejvyšší koncentraci 17 nm. Tato regulace velikosti stříbrné složky je stěžejní hlavně pro antimikrobiální aktivitu tohoto připraveného kompozitního materiálu.

Antimikrobiální aktivita (stanovená v laboratoři prof. M. Koláře, Ph.D., Ústav molekulární a translační medicíny) byla testována proti široké škále patogenních organizmů, deseti bakteriálním a čtyřem plísňovým druhům. Pro hybrid mCH nebyla antimikrobiální koncentrace stanovena (maximální testované množství 400 mg/L), ačkoliv i samotný chitosan může takovéto vlastnosti vykazovat. Hodnoty minimálních koncentrací kompozitů způsobující inhibici mikroorganismů byly stanoveny v rozmezí 1,9–125 mg/L (vztaženo na hmotnost kompozitu). Jednotlivé hodnoty se lišily pro jednotlivé druhy bakterií i plísní. Tato

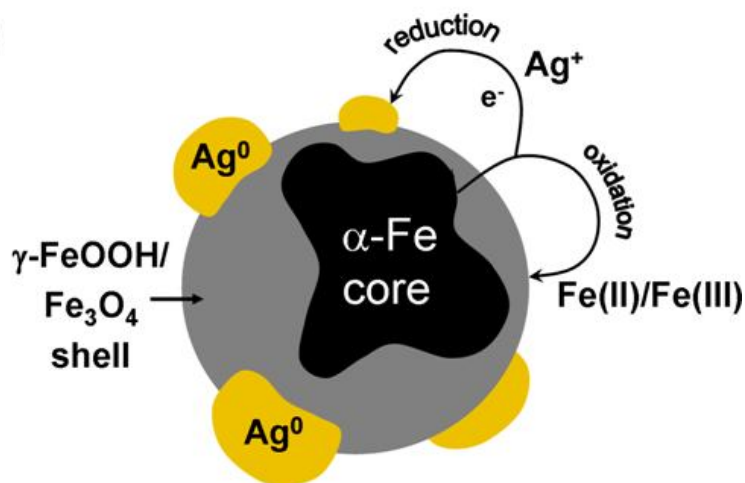
rozmanitost je pravděpodobně dána rozdíly hlavně mezi stavbou membrány jednotlivých druhů. Také hodnoty stanovené pro kompozity s nejnižším a největším obsahem stříbra vykazovaly značné rozdíly. Ty ovlivnily zřejmě koncentrace stříbrné fáze v jednotlivých kompozitech a také velikosti stříbrných nanočástic. Tyto dva faktory spolu s druhem bakterie nebo plísně ovlivnily nejmenší možnou koncentraci kompozitů potřebnou k inhibici růstu zkoumaných patogenních mikroorganismů. Přesto výsledky získané pro odhalení působení těchto nanomateriálů na patogenní organizmy se řadí mezi nejlepší doposud publikované.

Magneticky separovatelný kompozit založený na bakteriálních magnetických nanočásticích, nanočásticích stříbra a chitosanu, prokázal význačné antimikrobiální vlastnosti. Chitosan zde hraje hned několik rolí, které především zjednodušují přípravu materiálu majícím magnetické a antimikrobiální vlastnosti. Chitosan zde kotví a stabilizuje magnetické nanočástice, zachycuje z prostředí stříbrné ionty a redukuje je v zásaditém prostředí na nulamocné stříbro za vytvoření nanočástic. Díky tomuto polymeru probíhá redukce stříbra jen na povrchu magnetického hybridu a neumožňuje jeho uvolnění. Celý kompozit je tedy plně magneticky separovatelný a řiditelný. Bakteriální magnetické nanočástice zde byly použity jako výborný studijní materiál, avšak tato metoda je aplikovatelná i na jiné magnetické substráty, a tedy obdobné nanokompozity mohou být využity i ve větších aplikačních měřících.

3.4 Na vzduchu stabilní bimetalické nanočástice Fe–Ag pro pokročilé antimikrobiální aplikace a odstranění fosfátů

Myšlenka připravit multifunkční kompozitní materiál, vykazující magnetické a antimikrobiální vlastnosti, co nejjednodušší cestou, vedla k vytvoření bimetalických částic Fe–Ag. Magnetický nosič a redukční činidlo (např. nanočástice magnetitu a chitosan, jak bylo uvedeno v předchozí kapitole 3.3) může být v kompozitu dáno jedinou identitou, nanočásticemi nulamocného železa. Nanočástice nulamocného železa jsou feromagnetické a v kyslíkovém vodném prostředí se oxidují na magnetické oxidy železa (magnetit, maghemit). To zaručuje magnetické chování tohoto substrátu a vhodnost jeho využití pro tvorbu magnetických kompozitů. Navíc nanočástice nulamocného železa jsou silným redukčním činidlem a jsou schopné adsorbovat a redukovat ionty těžkých kovů (Pd, Pb, Hg, Cu, atd.). Mezi ionty, které podléhají jak redukci těmito nanočásticemi, tak i adsorpci na

jejich povrch, patří stříbrné ionty. Tím je umožněna příprava bimetalických Fe–Ag nanočástic (obr. 21).



Obr. 21: Schéma tvorby a struktury bimetalických nanočástic Fe-Ag

Během redukce stříbra dochází také k reakcím mezi železem a okolním prostředím (vodou), které mají za následek tvorbu oxidů železa a jeho oxo–hydroxidů. Povrch nanočástic nulamocného železa je tedy tvořen vrstvou tvořenou Fe_3O_4 , $\gamma\text{-FeOOH}$ a nanočásticemi stříbra. Tato vrstva je schopna povrch pasivovat, potlačit další oxidaci jádra na vzduchu a snížit agregační sílu nanočástic nulamocného železa vlivem vysoké reaktivity a velké plochy povrchu. Procentuální zastoupení jednotlivých fází je dáno koncentrací stříbrné soli použité v reakci pro tvorbu bimetalických částic. Na této koncentraci pak závisí nejen množství stříbrné fáze, ale i velikost nanočástic stříbra (v rozmezí 10–30 nm dle počáteční koncentrace Ag^+ soli), obdobně jako tomu bylo u kompozitu mCh-Ag v kap. 3.3. S množstvím stříbrné fáze pak ubývá fází Fe–O. Magnetické Fe–O fáze (např. magnetit) pak přispívají k magnetickým vlastnostem, a ostatní fáze typu $\gamma\text{-FeOOH}$ mohou přispívat k adsorpčním vlastnostem připravených kompozitů. Vlastnosti a složení připravených bimetalických částic bylo zkoumáno řadou technik: transmisní a skenovací elektronovou mikroskopií, Mössbauerovou spektroskopií, atomovou absorpční spektroskopií, magnetickým měřením SQUID, rentgenovou diffrakcí. Test stability bimetalických částic (sonikace až 5 h) neprokázal uvolňování stříbrné složky z komplexu, a tak komplex může být magneticky separován nebo manipulován díky jeho vysoké saturační magnetizaci ($108\text{--}124 \text{ emu. g}^{-1}$, dle složení povrchu).

Díky částečnému zachování nulamocného železa v jádru bimetalických částic (~ 50 %) je možné jejich vpravením do vodného prostředí iniciovat redukční a s nimi spojené

odbourávající procesy. Tato aktivita byla testována na odbourávání fosfátů z vodného prostředí. Všechny testované typy bimetalických částic (lišící se v procentuálním složení jednotlivých fází) prokázaly schopnost odbourávat fosfáty. Rychlost odbourávání je závislá na obsahu stříbra (s rostoucím množstvím stříbra klesá rychlost odbourávání). Stříbrná složka povrch bimetalických částic zřejmě pasivuje a snižuje tím rychlost odbourávání. Naproti tomu přítomnost Fe–O fází na povrchu napomáhá adsorpčním procesům a tím odbourávání fosfátů.

Nanočástice nulamocného železa i stříbra jsou známé svými toxickými účinky na mikroorganismy. Oba typy nanočástic mají antibakteriální vlastnosti (negativně působí jak na Gram-pozitivní, tak na Gram-negativní bakterie). U stříbra navíc byly prokázány antifungální a antivirální vlastnosti. Pro vyšší organismy jejich toxicita klesá a jsou potřebné daleko vyšší koncentrace. Jak již bylo zmíněno dříve, nanočástice nulamocného železa podléhají ve vodném prostředí oxidaci, tedy stárnutí, čímž dochází ke snížení jejich toxických vlastností, které se dají považovat za dočasné. Naproti tomu jsou nanočástice stříbra v čase relativně stabilní, avšak jejich toxicita představuje environmentálně významné riziko. Proto přípravou bimetalických nanočástic Fe–Ag by měl vzniknout materiál požadovaných antimikrobiálních vlastností s možností jejich magnetické manipulovatelnosti. Testy antibakteriální a antifungální aktivity bimetalických Fe–Ag nanočástic potvrdily, že toxicitní vlastnosti prekurzorů byly zachovány. K těmto vlastnostem pravděpodobně z větší části přispívá stříbrná fáze (částečně oxidované nanočástice železa nevykazovaly antimikrobiální aktivitu ani při nejvyšší použité koncentraci 3,5 g/L). Tento fakt je také potvrzen pozorovanou závislostí antimikrobiálních vlastností na velikosti a koncentraci stříbrné složky (obdobně jako u kompozitů mCH–Ag).

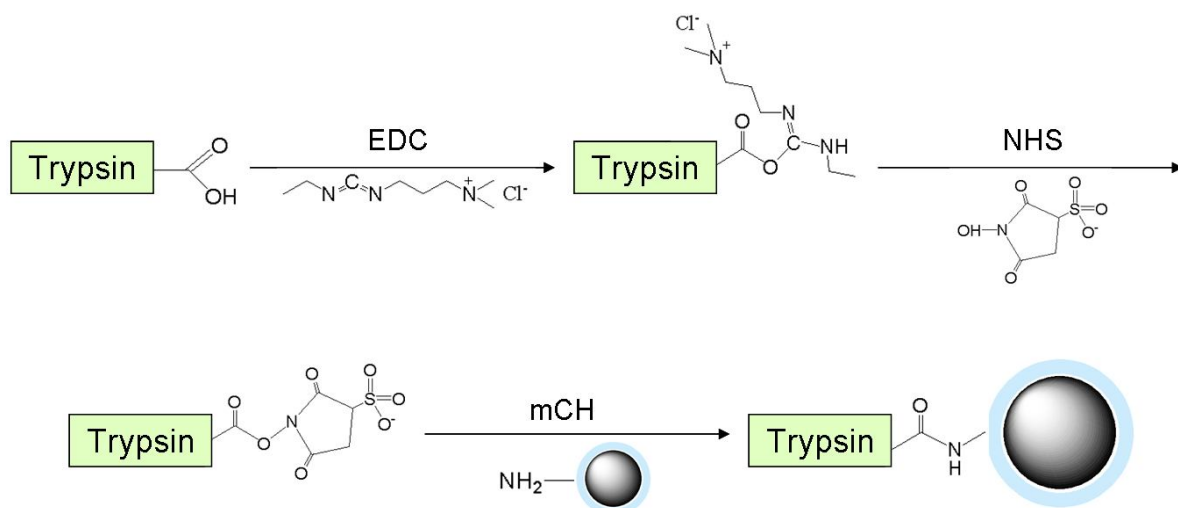
Bimetalické Fe–Ag tak díky svým specifickým vlastnostem umožňují jednoduchou magnetickou manipulaci, vykazují antimikrobiální vlastnosti a schopnost degradace fosfátů ve vodných prostředích a mohou nalézt uplatnění v čistících procesech odpadních a kontaminovaných vod.

3.5 Termostabilní konjugáty trypsinu imobilizované na biogenním magnetitu vykazující vysokou stabilitu a opakovatelné použití pro proteinové štěpení

Magnetický hybridní nanosystém mCH, založený na nanočásticích bakteriálního magnetitu a přírodním polymeru chitosanu, byl také využit pro imobilizaci enzymu trypsinu.

Podstatou této práce bylo připravit magneticky separovatelný enzym trypsin a zlepšit jeho vlastnosti pro proteomické aplikace (zvýšit teplotní stabilitu, odstranit autolytické štěpy, které limitují využití trypsinu v metodě MALDI–TOF, zlepšit dlouhodobou stabilitu a umožnit opakovatelné použití enzymu s možností magnetické separovatelnosti). Jelikož příprava kompozitu mCh byla diskutována již v kapitole 3.3 a proteomická část (včetně imobilizace enzymu, jeho chemických modifikací a charakterizace) byla součástí jiné disertační práce (Mgr. Michaely Pečové), budou zde jednotlivé závěry jen velmi krátce popsány.

Pro přípravu magnetického nosiče byly využity nanočástice bakteriálního magnetitu obalené chitosanem metodou „cross–linking“. Volné aminové skupiny byly využity pro kovalentní imobilizaci hovězího trypsinu. Tato reakce byla provedena aktivací karboxylové skupiny enzymu látkami 1–ethyl–3–(3–dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC) a N–hydroxysulfosuccinimid (NHS) a následnou reakcí s aminovou skupinou chitosanu (obr. 22). Navíc byl trypsin chemicky modifikován cyklodextriny (α –, β –, a γ –). Získaný komplex byl charakterizován: transmisí elektronovou mikroskopií a magnetickým měřením SQUID. Pro porovnání vlastností jednotlivých modifikovaných forem enzymu (původní hovězí trypsin, chemicky modifikovaný a imobilizovaný na magnetický nosič) bylo provedeno několik studií zahrnujících určení teplotní stability, pH optima, dlouhodobé stability a opakovatelnosti užití.



Obr. 22: Schéma imobilizace trypsinu, popř. jeho derivátů na magnetický nosič mCH.

Trypsin a trypsiny chemicky modifikované cyklodextriny, které byly imobilizovány na magnetickém nosiči mCH, vykazovaly vyšší termostabilitu a dlouhodobou stabilitu ve srovnání s jejich volnými formami. Imobilizace navíc neměla vliv na pH optimum tohoto

enzymu. Navíc také došlo k potlačení autolytických procesů při štěpení a enzym i po osmém použití (s uplatněním magnetické separace) vykazoval více než 70% účinnost.

4 SHRNUÍ

Cílem předložené disertační práce byla příprava a charakterizace aplikačně významných nanokompozitů založených na kombinaci magnetického materiálu (bakteriálních nanočástic magnetitu, nanočástic nulamocného železa) a druhé funkční složky (nanočástice nulamocného stříbra, uhlíkové kvantové tečky, trypsinu). Jednotlivé kompozitní materiály byly charakterizovány řadou technik (transmisní a skenovací elektronová mikroskopie, infračervená spektroskopie, Mössbauerova spektroskopie, magnetometrická měření SQUID, rentgenová difrakce, atomová absorpční spektroskopie, elektroforéza) a také byly testovány jejich aplikačně významné vlastnosti (antimikrobiální aktivita, fluorescence, biokompatibilita, odstranění fosfátů).

V rámci práce byla zavedena kultivace magnetotaktických bakterií *Magnetospirilla gryphiswaldense* MSR-1, izolace a purifikace magnetozomů, separace bakteriálního magnetitu (odstraněním magnetozomální membrány). Tyto bakteriální nanočástice představují biokompatibilní, netoxický systém, který vykazuje mimořádně vysokou velikostní, morfologickou, strukturní a magnetickou uniformitu nanočástic, a nabízí tak uplatnění v biologických aplikacích. Povrchovou modifikací byl, mimo jiné, získán hybridní systém bMNPs–chitosan, a to inkorporací magnetických částic do chitosanové matrice metodou „cross-linking“. bMNPs byly také využity pro přípravu „core-shell“ magnetické fluorescenční hybridní nanostruktury založené na kombinaci kvartérních uhlíkových teček (QCDs) a bakteriálního magnetitu (kompozit m–QCDs). Tento hybridní systém je využitelný pro duální MRI/fluorescenční značení v biomedicině, což bylo demonstrováno na příkladu *in vitro* značení králičích kmenových buněk. Metoda přípravy pak byla zobecněna i na jiné systémy: Ag–QCDs a uhlíkové nanotrubky–QCDs.

Hybridní systém bMNPs–chitosan (mCH) byl využit pro přípravu antimikrobiálního kompozitu mCH–Ag. Chitosan je zde bifunkční látkou (obsahuje hydroxylové a aminové funkční skupiny), která slouží pro ukotvení magnetických částic a jako linker mezi nimi a nanočásticemi stříbra. Navíc, díky schopnosti adsorbovat ionty stříbra a za určitých podmínek (pH, teplota) je redukovat, hrál klíčovou úlohu při tvorbě nanokompozitu. Kompozit mCH–Ag vykazoval vynikající antimikrobiální vlastnosti a díky svým magnetickým vlastnostem je použitelný pro antimikrobiální čištění vod s možností následné magnetické separace.

Chitosanem funkcionalizované nanočástice magnetitu (mCH) byly také aplikovány pro imobilizaci proteolytického enzymu trypsinu (kompozit mCH-Trypsin) skrze kovalentní

konjugaci karboxylové (protein) a aminové (chitosan) skupiny. Tato modifikace umožnila magnetickou separaci tohoto enzymu, jeho opakovatelné využití a zlepšila jeho důležité vlastnosti pro aplikace v proteomice (termostabilitu, dlouhodobou stabilitu, eliminovala autolytické štěpení).

Nanočástice nulamocného železa (nZVI) byly použity pro přípravu antimikrobiálních bimetalických částic Fe–Ag. Při přípravě bylo využito redukčních a adsorpčních vlastností nanoželeza (sorpce a redukce stříbrných iontů ve vodném prostředí za tvorby nanočástic stříbra na povrchu nZVI). Bimetalické nanočástice byly komplexně charakterizovány a byly potvrzeny významné antimikrobiální vlastnosti. Navíc částečně zachované jádro tvořené nulamocným železem bylo schopno redukčních procesů, což bylo prokázáno při testech odbourávání fosfátů z vodného prostředí. Kompozit je tak velmi perspektivní v technologiích antimikrobiálního čištění vod s možností odbourání fosforu a postprocesní magnetické separace.

5 SUMMARY

The preparation and characterization of applicable multifunctional nanocomposites based on magnetic nanocarriers (bacterial magnetic nanoparticles and/or nanoscale zero-valent iron) and other functional components (silver nanoparticles - AgNPs, carbon quantum dots - CDs, trypsin) were the aims of the present PhD Thesis. The individual nanocomposites were investigated by several different techniques (transmission and scanning electron microscopies, infrared spectroscopy, Mössbauer spectroscopy, magnetometric measurement SQUID, rentgen diffraction, atomic absorption spectroscopy, electrophoresis) and their potentially applicable properties (antimicrobial activity, fluorescence, biocompatibility, phosphate degradation ability) were determined and tested.

In the frame of this work, the cultivation of magnetotactic bacteria *Magnetospirillum gryphiswaldense*, isolation and purification of magnetosomes, isolation of pure bacterial magnetite nanoparticles (by removing a magnetosomal membrane) were established in our laboratory. The bacterial magnetite nanoparticles represent a biocompatible, non-toxic material with the extraordinarily narrow size distribution, chemical purity, morphological, structural, and magnetic uniformities. They can be thus exploited in various biological applications.

Surface modification of these nanoparticles resulted in, among others, bMNPs–chitosan (mCH) hybrid nanostructures. This hybrid was achieved by an incorporation of bMNPs into chitosan polymer by the „cross-linking” method. bMNPs were also applied for the preparation of „core-shell“ magnetic fluorescent hybrid nanostructures based on the combination of quaternary carbon quantum dots (QCDs) and bMNPs (m–QCDs composite). This hybrid is applicable for a dual MRI/fluorescent imaging in biomedicine as it has been demonstrated by “*in vitro*” imaging of rabbit stem cells for instance. The preparation procedure was subsequently generalized and exploited in the other systems: Ag–QCDs and carbon nanotubes-QCDs.

Furthermore, the hybrid nanostructure mCH (bMNPs–chitosan) was applied for a preparation of the antimicrobial composite mCH–Ag. Chitosan is a bifunctional polymer (possessing hydroxyl and amine groups) which plays an important role for anchoring magnetic nanoparticles, and simultaneously represents a linker between magnetic particles and AgNPs. Moreover, chitosan is able to adsorb silver ions and reduces them to AgNPs provided that particular conditions (pH, temperature) are met. Composite mCH–Ag exhibited excellent antimicrobial properties and due of its magnetic behavior; it is applicable for an

antimicrobial disinfection of water sources with the possibility of a subsequent magnetic separation.

Hybrid system mCH was also used as a magnetic carrier for the immobilization of proteolytic enzyme trypsin (composite mCH–Trypsin). The immobilization of trypsin was achieved via the covalent conjugation of carboxyl (protein) and amine (chitosan) groups. This modification enables a magnetic separation of the enzyme, its reusability, and improves its properties important for proteomics (thermostability, long–time stability, elimination of autolysis)

Nanoscale zero–valent iron (nZVI) was used for a preparation of antimicrobial bimetallic nanoparticles Fe–Ag. In the preparation procedure both, reduction as well as adsorption properties of nZVI, have been employed for the sorption and reduction of silver ions in aqueous environment to silver nanoparticles on nZVI surface. The bimetallic nanoparticles Fe–Ag were thoroughly characterized and their significant antimicrobial properties against a wide range of pathogenic microorganisms were evidenced. Moreover, a somewhat retained magnetic core, which was still partially composed of nZVI, was able to reduce and degrade phosphate in an aqueous environment. Hence, the composite is a very prospective one in phosphate degradation and disinfection technologies of contaminated water clean-up with the possibility of a subsequent magnetic separation.

6 REFERENCE

- (1) Ju-Nam, Y.; Lead, J. R. *Sci. Total Environ.* **2008**, *400*, 396–414.
- (2) Cornell, R. M.; Schwertmann, U. *The iron oxides structure properties reactions occurrence and uses* **2003**, VCH Verlag, Weinheim.
- (3) Hao, R.; Xing, R.; Xu, Z.; Hou, Y.; Gao, S.; Sun, S. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 2729–2742.
- (4) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Elst, L. V.; Muller, R. N. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- (5) Gupta, A. K.; Gupta, M. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021.
- (6) Mohapatra, M.; Anand, S. *Int. J. Eng.. Sci. Technol.* **2010**, *2*, 127–146.
- (7) Frankel, R. B. *Hyperfine Interact.* **2003**, *151/152*, 145–153.
- (8) Gao, J.; Gu, H.; Xu, B. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1097–1107.
- (9) Gijs, M. a M.; Lacharme, F.; Lehmann, U. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1518–1563.
- (10) Yoo, D.; Lee, J.-H.; Shin, T.-H.; Cheon, J. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 863–874.
- (11) Saiyed, Z.; Telang, S.; Ramchand, C. *Biomagn. Res. Technol.* **2003**, *1*, 1–8.
- (12) Yigit, M. V.; Zhu, L.; Ifediba, M. a; Zhang, Y.; Carr, K.; Moore, A.; Medarova, Z. *ACS nano* **2011**, *5*, 1056–1066.
- (13) Kluchova, K.; Zboril, R.; Tucek, J.; Pecova, M.; Zajoncova, L.; Safarik, I.; Mashlan, M.; Markova, I.; Jancik, D.; Sebela, M.; Bartonkova, H.; Bellesi, V.; Novak, P.; Petridis, D. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2855–2863.
- (14) Jun, Y.-W.; Huh, Y.-M.; Choi, J.-S.; Lee, J.-H.; Song, H.-T.; Kim, S.; Yoon, S.; Kim, K.-S.; Shin, J.-S.; Suh, J.-S.; Cheon, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5732–5733.
- (15) Hayashi, K.; Moriya, M.; Sakamoto, W.; Yogo, T. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 1318–1325.
- (16) Fortin, J.-P.; Wilhelm, C.; Servais, J.; Ménager, C.; Bacri, J.-C.; Gazeau, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2628–2635.
- (17) Wilhelm, C.; Gazeau, F. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3161–3174.
- (18) Tartaj, P.; Morales, M. del P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Gonz lez-Carreno, T.; Serna, C. J. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, R182–R197.
- (19) Wu, W.; He, Q.; Jiang, C. *Nanoscale. Res. Lett.* **2008**, *3*, 397–415.

- (20) Lin, M. M.; Kim, H.-H.; Kim, H.; Muhammed, M.; Kim, D. K. *Nano Rev.* **2010**, *1*, 1–17.
- (21) Harivardhan, R. L.; Arias, J. L.; Nicolas, J.; Couvreur, P. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5818–5878.
- (22) Farrell, D.; Majetich, S. A.; Wilcoxon, J. P. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 11022–11030.
- (23) Revati, K.; Pandey, B. D. *Bull. Mater. Sci.* **2011**, *34*, 191–198.
- (24) Bazyliniski, D. A.; Frankel, R. B.; Konhauser, K. O. *Geomicrobiol. J.* **2007**, *24*, 465–475.
- (25) Roh, Y.; Gao, H.; Vali, H.; Kennedy, D. W.; Yang, Z. K.; Gao, W.; Dohnalkova, A. C.; Stapleton, R. D.; Moon, J.; Phelps, T. J.; Fredrickson, J. K.; Zhou, J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 3236–3244.
- (26) Roh, Y.; Vali, H.; Phelps, T. J.; Moon, J.-W. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 3517–3520.
- (27) Bazyliniski, D. a *Internati. Microbiol.* **1999**, *2*, 71–80.
- (28) Komeili, A. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 351–366.
- (29) Blakemore, R. P. *Small* **1980**, *141*, 1399–1408.
- (30) Frankel, R. B. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* **2009**, *27*, 1–2.
- (31) Bazyliniski, D. A.; Moskowitz, B. M. *Rev. Mineral. Geochem.* **1997**, *35*, 181–223.
- (32) Simmons, S. L.; Bazyliniski, D. A.; Edwards, K. J. *Science* **2006**, *311*, 371–374.
- (33) Xie, J.; Chen, K.; Chen, X. *Nano. Res.* **2009**, *2*, 261–278.
- (34) Schüler, D. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *1*, 79–86.
- (35) Bazyliniski, D. A.; Frankel, R. B. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 217–230.
- (36) Schüler, D.; Frankel, R. B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *52*, 464–473.
- (37) Yan, L.; Zhang, S.; Chen, P.; Liu, H.; Yin, H.; Li, H. *Microbiol. Res.* **2012**, *167*, 507–519.
- (38) Lang, C.; Schüler, D. *J. Phys.: Condens. Matter* **2006**, *18*, S2815–S2828.
- (39) Faivre, D.; Schüler, D. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4875–4898.
- (40) Banerjee, I. A.; Yu, L.; Shima, M.; Yoshino, T.; Takeyama, H.; Matsunaga, T.; Matsui, H. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1128–1131.

- (41) Bäuerlein, E. *Angew. Chem.* **2003**, *42*, 614–641.
- (42) Komeili, A.; Vali, H.; Beveridge, T. J.; Newman, D. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 3839–3844.
- (43) Liu, Y.; Li, G. R.; Guo, F. F.; Jiang, W.; Li, Y.; Li, L. J. *Microb. Cell Fact.* **2010**, *9*, 1–8.
- (44) Sun, J.-B.; Zhao, F.; Tang, T.; Jiang, W.; Tian, J.; Li, Y.; Li, J.-L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79*, 389–397.
- (45) Heyen, U.; Schüler, D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 536–544.
- (46) Schüler, D. *Int. Microbiol.* **2002**, *5*, 209–214.
- (47) Jogler, C.; Schüler, D. *Annu. Rev. Microbiol.* **2009**, *63*, 501–21.
- (48) Arakaki, A.; Nakazawa, H.; Nemoto, M.; Mori, T.; Matsunaga, T. *J. R. Soc., Interface* **2008**, *5*, 977–999.
- (49) Grunberg, K.; Muller, E.; Otto, A.; Reszka, R.; Linder, D.; Kube, M.; Reinhardt, R.; Schuler, D. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 1040–1050.
- (50) Han, L.; Li, S.; Yang, Y.; Zhao, F.; Huang, J.; Chang, J. *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *313*, 236–242.
- (51) Sun, J.; Tang, T.; Duan, J.; Xu, P.-X.; Wang, Z.; Zhang, Y.; Wu, L.; Li, Y. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 271–283.
- (52) Maeda, Y.; Yoshino, T.; Takahashi, M.; Ginya, H.; Asahina, J.; Tajima, H.; Matsunaga, T. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 5139–5145.
- (53) Ceyhan, B.; Alhorn, P.; Lang, C.; Schüler, D.; Niemeyer, C. M. *Small* **2006**, *2*, 1251–1255.
- (54) Tanaka, T.; Takeda, H.; Kokuryu, Y.; Matsunaga, T. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3764–3769.
- (55) Wacker, R.; Ceyhan, B.; Alhorn, P.; Schueler, D.; Lang, C.; Niemeyer, C. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *357*, 391–396.
- (56) Kuhara, M.; Takeyama, H.; Tanaka, T.; Matsunaga, T. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6207–6213.
- (57) Ohuchi, S.; Schüler, D. *Applied and environmental microbiology* **2009**, *75*, 7734–7738.
- (58) Ginet, N.; Pardoux, R.; Adryanczyk, G.; Garcia, D.; Brutesco, C.; Pignol, D. *Plos One* **2011**, *6*, e21442.

- (59) Yoshino, T.; Hirabe, H.; Takahashi, M.; Kuhara, M.; Takeyama, H.; Matsunaga, T. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 470–477.
- (60) Matsunaga, T.; Okamura, Y.; Tanaka, T. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2099–2105.
- (61) Yoza, B. *J. Biotechnol.* **2003**, *101*, 219–228.
- (62) Han, L.; Zhang, A.; Wang, H.; Pu, P.; Kang, C.; Chang, J. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *121*, 3446–3454.
- (63) Amemiya, Y.; Tanaka, T.; Yoza, B.; Matsunaga, T. *J. Biotechnol.* **2005**, *120*, 308–314.
- (64) Goldhawk, D. E.; Rohani, R.; Sengupta, A.; Gelman, N.; Prato, F. S. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2012**, *4*, 378–388.
- (65) Schwarz, S.; Fernandes, F.; Sanroman, L.; Hodenius, M.; Lang, C.; Himmelreich, U.; Schmitz-Rode, T.; Schueler, D.; Hoehn, M.; Zenke, M.; Hieronymus, T. *J. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1533–1538.
- (66) Hartung, A.; Lisy, M. R.; Herrmann, K.-H.; Hilger, I.; Schüler, D.; Lang, C.; Bellemann, M. E.; Kaiser, W. a.; Reichenbach, J. R. *J. Magn. Mater.* **2007**, *311*, 454–459.
- (67) Bahaj, A. S.; Croudace, I. W.; James, P. A. B.; Moeschler, F. D.; Warwick, P. E. *J. Magn. Mater.* **1998**, *184*, 241–244.
- (68) Sun, J.-B.; Duan, J.-H.; Dai, S.-L.; Ren, J.; Guo, L.; Jiang, W.; Li, Y. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 1313–1320.
- (69) Alphande, E.; Faure, S.; Raison, L.; Duguet, E.; Howse, P. A.; Bazylinski, D. A. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 18–22.
- (70) Hwang, Y.-H.; Kim, D.-G.; Shin, H.-S. *Appl. Catal., B* **2011**, *105*, 144–150.
- (71) Zhang, W. *J. Nanopart. Res.* **2003**, *5*, 323–332.
- (72) Zhuang, Y.; Ahn, S.; Luthy, R. G. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 8236–8242.
- (73) Filip, J.; Zboril, R.; Schneeweiss, O.; Zeman, J.; Cernik, M.; Kvapil, P.; Otyepka, M. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 4367–4374.
- (74) Sun, Y.-P.; Li, X.; Cao, J.; Zhang, W.; Wang, H. P. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *120*, 47–56.
- (75) Kustov, L. M.; Finashina, E. D.; Shuvalova, E. V.; Tkachenko, O. P.; Kirichenko, O. a. *Environ. Int.* **2011**, *37*, 1044–1052.
- (76) Phenrat, T.; Cihan, A.; Kim, H.-J.; Mital, M.; Illangasekare, T.; Lowry, G. V. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 9086–9093.

- (77) Phenrat, T.; Kim, H.-J.; Fagerlund, F.; Illangasekare, T.; Tilton, R. D.; Lowry, G. V. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 5079–5085.
- (78) Sirk, K. M.; Saleh, N. B.; Phenrat, T.; Kim, H.-J.; Dufour, B.; Jeongbin, O.; Golas, P. L.; Matyjaszewski, K.; Lowry, G. V.; Tilton, R. D. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 3803–3808.
- (79) Kim, H.-J.; Phenrat, T.; Tilton, R. D.; Lowry, G. V. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 3824–3830.
- (80) Chen, K.-F.; Li, S.; Zhang, W. *Chem. Eng. J.* **2011**, *170*, 562–567.
- (81) Mossa Hosseini, S.; Ataie-Ashtiani, B.; Kholghi, M. *Desalination* **2011**, *276*, 214–221.
- (82) Zhuang, Y.; Ahn, S.; Seyfferth, A. L.; Masue-Slowey, Y.; Fendorf, S.; Luthy, R. G. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 4896–4903.
- (83) Yan, W.; Herzing, A. a; Li, X.; Kiely, C. J.; Zhang, W. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 4288–4294.
- (84) Lee, C.; Sedlak, D. L. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 8528–8533.
- (85) Zhu, B.-W.; Lim, T.-T. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 7523–7529.
- (86) Bokare, A. D.; Chikate, R. C.; Rode, C. V.; Paknikar, K. M. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 7437–7443.
- (87) Choe, S.; Chang, Y.; Hwang, K.; Khim, J. *Chemosphere* **2000**, *41*, 1307–1311.
- (88) Yang, G. C. C.; Lee, H.-L. *Water Res.* **2005**, *39*, 884–894.
- (89) Kanel, S. R.; Manning, B.; Charlet, L.; Choi, H. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1291–1298.
- (90) Li, X.; Zhang, W. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 6939–6946.
- (91) Kanel, S. R.; Greneche, J.-M.; Choi, H. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 2045–2050.
- (92) Xu, Y.; Zhao, D. *Water Res.* **2007**, *41*, 2101–2108.
- (93) Liang, F.; Fan, J.; Guo, Y.; Fan, M.; Wang, J.; Yang, H. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, 8550–8554.
- (94) Karabelli, D.; Shahwan, T.; Erog, A. E.; Scott, T. B.; Hallam, K. R.; Lieberwirth, I. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, *47*, 4758–4764.
- (95) Wang, Q.; Snyder, S.; Kim, J.; Choi, H. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 3292–3299.
- (96) Liu, Q.; Bei, Y.; Zhou, F. *Cent. Eur. J. Chem.* **2008**, *7*, 79–82.

- (97) Tanboonchuy, V.; Hsu, J.-C.; Grisdanurak, N.; Liao, C.-H. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2011**, *18*, 857–864.
- (98) Hwang, Y.-H.; Kim, D.-G.; Shin, H.-S. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *185*, 1513–1521.
- (99) Liu, Y.; Majetich, S. A.; Tilton, R. D.; Sholl, D. S.; Lowry, G. V. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1338–1345.
- (100) Song, H.; Carraway, E. R. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 6237–6245.
- (101) Liu, Y.; Lowry, G. V. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 6085–6090.
- (102) Kim, J.-H.; Tratnyek, P. G.; Chang, Y.-S. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 4106–4112.
- (103) Ghauch, A.; Tuqan, A.; Assi, H. A. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 1626–1635.
- (104) Zhang, X.; Lin, Y.; Shan, X.; Chen, Z. *Chem. Eng. J.* **2010**, *158*, 566–570.
- (105) Fang, Z.; Chen, J.; Qiu, X.; Qiu, X.; Cheng, W.; Zhu, L. *Desalination* **2011**, *268*, 60–67.
- (106) Feitz, A. J.; Joo, S. H.; Guan, J.; Sun, Q.; Sedlak, D. L.; David Waite, T. *Colloids Surf., A* **2005**, *265*, 88–94.
- (107) Ramos, M. A. V.; Yan, W.; Li, X.; Koel, B. E.; Zhang, W. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 14591–14594.
- (108) Pang, S.-Y.; Jiang, J.; Ma, J. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 307–312.
- (109) Lee, C.; Kim, J. Y.; Lee, W. I.; Nelson, K. L.; Yoon, J.; Sedlak, D. L. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 4927–4933.
- (110) Auffan, M.; Achouak, W.; Rose, J.; Roncato, M.-A.; Chanéac, C.; Waite, D. T.; Masion, A.; Woicik, J. C.; Wiesner, M. R.; Bottero, J.-Y. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 6730–6735.
- (111) Diao, M.; Yao, M. *Water Res.* **2009**, *43*, 5243–5251.
- (112) Li, Z.; Greden, K.; Alvarez, P. J. J.; Gregory, K. B.; Lowry, G. V. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 3462–3467.
- (113) Chen, J.; Xiu, Z.; Lowry, G. V.; Alvarez, P. J. J. *Water Res.* **2011**, *45*, 1995–2001.
- (114) Marsalek, B.; Jancula, D.; Marsalkova, E.; Mashlan, M.; Safarova, K.; Tucek, J.; Zboril, R. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 2316–2323.
- (115) Phenrat, T.; Long, T. C.; Lowry, G. V.; Veronesi, B. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 195–200.
- (116) Kuila, B. K.; Garai, A.; Nandi, A. K. *Chem. M* **2007**, *19*, 5443–5452.

- (117) Haw, M. *Nature* **2003**, *422*, 556–558.
- (118) Jin, R. C.; Cao, Y. C.; Hao, E. C.; Metraux, G. S.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A. *Nature* **2003**, *425*, 487–490.
- (119) Solanki, J. N.; Murthy, Z. V. P. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *50*, 12311–12323.
- (120) Roucoux, A.; Schulz, J.; Patin, H. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3757–3778.
- (121) Stefan, M.; Marius, S.; Hritcu, L.; Lucian, H.; Mihasan, M.; Marius, M.; Pricop, D.; Daniela, P.; Gostin, I.; Irina, G.; Olariu, R.-I.; Romeo-Iulian, O.; Dunca, S.; Simona, D.; Melnig, V.; Viorel, M. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2011**, *22*, 789–796.
- (122) Banerjee, M.; Mallick, S.; Paul, A.; Chattopadhyay, A.; Ghosh, S. S. *Langmuir* **2010**, *26*, 5901–5908.
- (123) Dallas, P.; Zboril, R.; Bourlinos, A. B.; Jancik, D.; Niarchos, D.; Panacek, A.; Petridis, D. *Macromol. Mater. Eng.* **2010**, *295*, 108–114.
- (124) Panacek, A.; Kvítek, L.; Pucek, R.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pizúrova, N.; Sharma, V. K.; Nevecna, T.; Zboril, R. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16248–16253.
- (125) Searle, A. *The Use of Colloids in Health and Disease*; Constable & Co: London, 1920; pp. 67–111.
- (126) Dallas, P.; Sharma, V. K.; Zboril, R. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *166*, 119–135.
- (127) Tripathi, S.; Mehrotra, G. K.; Dutta, P. K. *Bull. Mater. Sci.* **2011**, *34*, 29–35.
- (128) Chudasama, B.; Vala, A. K.; Andhariya, N.; Upadhyay, R. V.; Mehta, R. V. *J. Magn. Mater.* **2011**, *323*, 1233–1237.
- (129) Panacek, A.; Kolár, M.; Vecerová, R.; Pucek, R.; Soukupová, J.; Krystof, V.; Hamal, P.; Zboril, R.; Kvítek, L. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6333–6340.
- (130) Panacek, A.; Pucek, R.; Safarova, D.; Dittrich, M.; Richtrova, J.; Benickova, K.; Zboril, R.; Kvitek, L. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 4974–4979.
- (131) Chen, D.; Qiao, X.; Qiu, X.; Chen, J. *J. Mater. Sci.* **2009**, *44*, 1076–1081.
- (132) Van Dong, P.; Ha, C.; Binh, L.; Kasbohm, J. *Int. Nano Lett.* **2012**, *2*, 1–9.
- (133) Esumi, K.; Ishizuki, N.; Torigoe, K.; Nakamura, H.; Meguro, K. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *44*, 1003–1007.
- (134) Sharma, V. K.; Yngard, R. a; Lin, Y. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *145*, 83–96.
- (135) Tejamaya, M.; Römer, I.; Merrifield, R. C.; Lead, J. R. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 7011–7017.

- (136) Liu, F.-K.; Hsu, Y.-C.; Tsai, M.-H.; Chu, T.-C. *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 2402–2405.
- (137) Yin, B.; Ma, H.; Wang, S.; Chen, S. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 8898–8904.
- (138) Pal, A.; Shah, S.; Devi, S. *Mater. Chem. Phys.* **2009**, *114*, 530–532.
- (139) Jin, R.; Cao, Y.; Mirkin, C. a; Kelly, K. L.; Schatz, G. C.; Zheng, J. G. *Science* **2001**, *294*, 1901–1903.
- (140) Jeevanandam, P.; Srikanth, C. K.; Dixit, S. *Mater. Chem. Phys.* **2010**, *122*, 402–407.
- (141) Ledwith, M. D.; Aherne, D.; Kelly, J. M. In *Nanotechnologies for the Life Sciences*; 2010; pp. 99–147.
- (142) Castro, T.; Reifenberger, R. *Phys. Rew. B* **1990**, *42*, 8548–8557.
- (143) Pothukuchi, S.; Li, Y.; Wong, C. P. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *93*, 1531–1538.
- (144) Mohanty, S.; Mishra, S.; Jena, P.; Jacob, B.; Sarkar, B.; Sonawane, A. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* **2012**, *8*, 916–924.
- (145) Guzman, M.; Dille, J.; Godet, S. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* **2012**, *8*, 37–45.
- (146) Kim, J. S.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J.-H.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C.-Y.; Kim, Y.-K.; Lee, Y.-S.; Jeong, D. H.; Cho, M.-H. *Nanomed. Nanobiotech. Biol. Med.* **2007**, *3*, 95–101.
- (147) Panacek, A.; Kvítek, L.; Prucek, R.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pizúrova, N.; Sharma, V. K.; Nevecna, T.; Zboril, R. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16248–16253.
- (148) Percival, S. L.; Bowler, P. G.; Dolman, J. *International wound journal* **2007**, *4*, 186–191.
- (149) Rai, M. K.; Deshmukh, S. D.; Ingle, a P.; Gade, a K. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *112*, 841–852.
- (150) Lara, H. H.; Garza-Treviño, E. N.; Ixtepan-Turrent, L.; Singh, D. K. *J. Nanobiotechnol.* **2011**, *9*, 1–8.
- (151) You, C.; Han, C.; Wang, X.; Zheng, Y.; Li, Q.; Hu, X.; Sun, H. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 9193–9201.
- (152) Su, H.-L.; Chou, C.-C.; Hung, D.-J.; Lin, S.-H.; Pao, I.-C.; Lin, J.-H.; Huang, F.-L.; Dong, R.-X.; Lin, J.-J. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5979–5987.
- (153) Gordon, O.; Vig Slenters, T.; Brunetto, P. S.; Villaruz, A. E.; Sturdevant, D. E.; Otto, M.; Landmann, R.; Fromm, K. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4208–4218.

- (154) Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramirez, J. T.; Yacaman, M. J. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346–2353.
- (155) Ahamed, M.; Alsalhi, M. S.; Siddiqui, M. K. *J. Clin. Chim. Acta* **2010**, *411*, 1841–1848.
- (156) Boonstra, J.; Post, J. A. *Gene* **2004**, *337*, 1–13.
- (157) Hussain, S. M.; Hess, K. L.; Gearhart, J. M.; Geiss, K. T.; Schlager, J. J. *Toxicol. In Vitro* **2005**, *19*, 975–983.
- (158) Arakawa, H.; Neault, J. F.; Tajmir-Riahi, H. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1580–1587.
- (159) Asharani, P. V.; Hande, M. P.; Valiyaveetil, S. *BMC Cell Biol.* **2009**, *10*, 1–14.
- (160) Pucek, R.; Tuček, J.; Kilianová, M.; Panáček, A.; Kvítek, L.; Filip, J.; Kolář, M.; Tománková, K.; Zbořil, R. *Biomaterials* **2011**, *32*, 4704–4713.
- (161) Wright, J. B.; Lam, K.; Buret, A. G.; Olson, M. E.; Burrell, R. E. *Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing.*; 2002; Vol. 10, pp. 141–151.
- (162) Ip, M.; Lui, S. L.; Poon, V. K. M.; Lung, I.; Burd, A. *J. Med. Microbiol.* **2006**, *55*, 59–63.
- (163) Bhol, K. C.; Schechter, P. J. *Br. J. Dermatol.* **2005**, *152*, 1235–1242.
- (164) Gurunathan, S.; Lee, K.-J.; Kalishwaralal, K.; Sheikpranbabu, S.; Vaidyanathan, R.; Eom, S. H. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6341–6350.
- (165) Frasco, M. F.; Chaniotakis, N. **2009**, 7266–7286.
- (166) Bruchez, M. *Science* **2013**, *2013*, 2013–2016.
- (167) Algar, W. R.; Susumu, K.; Delehanty, J. B.; Medintz, I. L.; Gates, R. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8826–8837.
- (168) Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. *Small* **2008**, *4*, 26–49.
- (169) Gao, J.; Xu, B. *Nano Today* **2009**, *4*, 37–51.
- (170) Deerinck, T. J. *Toxicol. Pathol.* **2008**, *36*, 112–116.
- (171) Baker, S. N.; Baker, G. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 6726–6744.
- (172) Xu, X.; Ray, R.; Gu, Y.; Ploehn, H. J.; Gearheart, L.; Raker, K.; Scrivens, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12736–12737.

- (173) Sun, Y.; Zhou, B.; Lin, Y.; Wang, W.; Fernando, K. A. S.; Pathak, P.; Meziani, M. J.; Harruff, B. A.; Wang, X.; Wang, H.; Luo, P. G.; Yang, H.; Kose, M. E.; Chen, B.; Veca, L. M.; Xie, S.; Carolina, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7756–7757.
- (174) Zhao, Q.; Zhang, Z.; Huang, B.; Peng, J.; Zhang, M.; Pang, D. *Chem. Commun.* **2008**, 5116–5118.
- (175) Zheng, L.; Chi, Y.; Dong, Y.; Lin, J.; Wang, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4564–4565.
- (176) Bottini, M.; Balasubramanian, C.; Dawson, M. I.; Bergamaschi, A.; Bellucci, S.; Mustelin, T. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 831–836.
- (177) Wang, F.; Pang, S.; Wang, L.; Li, Q.; Kreiter, M.; Liu, C. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 4528–4530.
- (178) Zhang, B.; Liu, C.; Liu, Y. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *2010*, 4411–4414.
- (179) Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Karakassides, M.; Giannelis, E. P. *Small* **2008**, 455–458.
- (180) Liu, J.; Zhang, Y.; Yang, T.; Ge, Y.; Zhang, S.; Chen, Z.; Gu, N. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *113*, 4042–4051.
- (181) H., Z.; X., W.; Y., L.; Z., W.; F., Y.; X., Y. *Chem. Commun.* **2009**, 5118–5120.
- (182) Tian, L.; Ghosh, D.; Chen, W.; Pradhan, S.; Chang, X.; Chen, S. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 2803–2809.
- (183) Wilson, W. L.; Szajowski, P. F.; Brus, L. E. *Science (New York, N.Y.)* **1993**, *262*, 1242–4.
- (184) Hu, S.; Niu, K.; Sun, J.; Yang, J.; Zhao, N.; Du, X. *J. Mater. Chem.* **2009**, 484–488.
- (185) Sun, Y.-P.; Wang, X.; Lu, F.; Cao, L.; Meziani, M. J.; Luo, P. G.; Gu, L.; Veca, L. M. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces* **2008**, *112*, 18295–18298.
- (186) Liu, H.; Ye, T.; Mao, C. *Angewandte Chemie* **2007**, *119*, 6593–6595.
- (187) Zhou, J.; Booker, C.; Li, R.; Zhou, X.; Sham, T.-K.; Sun, X.; Ding, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 744–745.
- (188) Sun, Y.; Zhou, B.; Lin, Y.; Wang, W.; Fernando, K. A. S.; Pathak, P.; Meziani, M. J.; Harruff, B. A.; Wang, X.; Wang, H.; Luo, P. G.; Yang, H.; Kose, M. E.; Chen, B.; Veca, L. M.; Xie, S.; Carolina, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7756–7757.
- (189) Ray, S. C.; Saha, A.; Jana, N. R.; Sarkar, R. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 18546–18551.

- (190) Yang, S.-T.; Cao, L.; Luo, P. G.; Lu, F.; Wang, X.; Wang, H.; Mezziani, M. J.; Liu, Y.; Qi, G.; Sun, Y.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11308–13089.
- (191) Yang, S.-T.; Wang, X.; Wang, H.; Lu, F.; Luo, P. G.; Cao, L.; Mezziani, M. J.; Liu, J.-H.; Liu, Y.; Chen, M.; Huang, Y.; Sun, Y.-P. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 18110–18114.
- (192) Li, Q.; Ohulchanskyy, T. Y.; Liu, R.; Koynov, K.; Wu, D.; Best, A.; Kumar, R.; Bonoiu, A.; Prasad, P. N. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 12062–12068.
- (193) Cao, L.; Wang, X.; Mezziani, M. J.; Lu, F.; Wang, H.; Luo, P. G.; Lin, Y.; Harruff, B. A.; Veca, L. M.; Murray, D.; Xie, S.; Sun, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 11318–11319.
- (194) Li, H.; He, X.; Kang, Z.; Huang, Hui, Liu, Y.; Liu, Y.; Liu, J.; Lian, S.; Tsan, C. H. A.; Yang, X.; Lee, S.-T. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 4430–4434.
- (195) Gonçalves, H.; Jorge, P. a. S.; Fernandes, J. R. a.; Esteves da Silva, J. C. G. *Sens. Actuators, B* **2010**, *145*, 702–707.
- (196) Wang, X.; Cao, L.; Lu, F.; Mezziani, M. J.; Li, H.; Qi, G.; Zhou, B.; Harruff, B. A.; Kermarrec, F.; Sun, Y. *Chem. Commun.* **2009**, 3774–3776.
- (197) Arcidiacono, S.; Kaplan, D. L. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*, 281–286.
- (198) Kumirska, J.; Weinhold, M. X.; Thöming, J.; Stepnowski, P. *Polymers* **2011**, *3*, 1875–1901.
- (199) Mima, S.; Miya, M.; Iwamoto, R.; Yoshikawa, S. *J. Appl. Polym. Sci.* **1983**, *28*, 1909–1917.
- (200) Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 981–1014.
- (201) Dmitriev, B. A.; Knirel, Y. A.; Kochetkov, N. K. *Carbohydr. Res.* **1975**, *40*, 365–372.
- (202) Yi, H.; Wu, L.; Bentley, W. E.; Ghodssi, R.; Rubloff, G. W.; Culver, J. N.; Payne, G. F. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2881–2894.
- (203) Jumaa, M.; Furkert, F. H.; Müller, B. W. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *53*, 115–123.
- (204) Guo, Z.; Chen, R.; Xing, R.; Liu, S.; Yu, H.; Wang, P.; Li, C.; Li, P. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 351–354.
- (205) Zhang, C.; Qu, G.; Sun, Y.; Wu, X.; Yao, Z.; Guo, Q.; Ding, Q.; Yuan, S.; Shen, Z.; Ping, Q.; Zhou, H. *Biomaterials* **2008**, *29*, 1233–1241.
- (206) Rao, S. B.; Sharma, C. P. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *34*, 21–28.
- (207) Kean, T.; Thanou, M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 3–11.

- (208) Zeng, H.; Sun, S. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 391–400.
- (209) López-Lorente, a I.; Simonet, B. M.; Valcárcel, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 43–54.
- (210) Kim, H.; Achermann, M.; Balet, L. P.; Hollingsworth, J. a; Klimov, V. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 544–546.
- (211) Jonker, B. T.; Park, Y. D.; Bennett, B. R. *Phys. Rev. B* **2000**, *62*, 8180–8183.
- (212) Xu, Z.; Hou, Y.; Sun, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8698–8699.
- (213) Yu, H.; Chen, M.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; White, R. L.; Sun, S. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 379–382.
- (214) Kim, J.; Lee, J. E.; Lee, S. H.; Yu, J. H.; Lee, J. H.; Park, T. G.; Hyeon, T. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 478–483.
- (215) Yoza, B.; Arakaki, A.; Maruyama, K.; Takeyama, H.; Matsunaga, T. *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, *95*, 21–26.
- (216) Li, Y.; Xu, X.; Deng, C.; Yang, P.; Zhang, X. *J. Proteome. Res.* **2007**, *6*, 3849–3855.
- (217) Kim, K.; Choi, J.-Y.; Lee, H. B.; Shin, K. S. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 1872–1878.
- (218) Jiang, C.; Chen, M.; Xuan, S.; Jiang, W.; Gong, X. *Can. J. Chem.* **2009**, *87*, 502–506.
- (219) Chen, M.; Kim, Y. N.; Lee, H. M.; Li, C.; Cho, S. O. *Society* **2008**, 8870–8874.

7 PŘÍLOHY

7.1 Příloha 1

Z. Marková, M. Pečová, L. Zajoncová, J. Zbořil, R. Zbořil:

Surface engineering of iron oxide nanoparticles isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense* for biochemical and biomedical applications.

NANOCON 2009, *Conference Proceedings*, 311–317 (2009)

SURFACE ENGINEERING OF IRON OXIDE NANOPARTICLES ISOLATED FROM *MAGNETOSPIRILLUM GRYPHISWALDENSE* FOR BIOCHEMICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS

Zdenka Marková¹, Michaela Pečová², Ludmila Zajoncová², Jiří Zbořil¹, Radek Zbořil¹

¹Centre for Nanomaterial Research, Palacký University, Šlechtitelů 11,
783 71 Olomouc, Czech Republic

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11,
783 71 Olomouc, Czech Republic

Abstract:

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles with appropriate surface modification can be widely used in various applications including magnetic resonance imaging (MRI) diagnostic contrast agents, anticancer therapy using hyperthermia, magnetic drug targeting, protein and enzyme immobilization, cell labeling and separation or RNA and DNA purification. All these biochemical and biomedical applications require nanoparticles exhibiting a high magnetization and narrow size distribution and possessing non-toxicity and biocompatibility.

As a result of biologically controlled preparation, biogenic magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles have properties that make them intrinsically distinct from their synthetic counterparts. Magnetotactic bacteria are microorganisms that are able to biomineralize the membrane-enveloped crystals of magnetite called magnetosomes. *Magnetospirillum gryphiswaldense*, well laboratory cultured organism, produces cubooctahedral magnetite crystals ranging in size between 20 and 50 nm. The fermentor cultivation under microaerobic conditions, commonly performed in our lab, leads to the sufficiently high cell yield ($\text{OD}_{565\text{nm}} \sim 1.5$) and to the suitable values of the parameter describing the cell magnetism ($c_{\text{mag}} \sim 1$). Magnetosomes are consequently isolated from bacteria by method using a neodymium boron (Nd-B) magnet. In the present work, we coated biogenic magnetite with substances that make them biocompatible, biodegradable, stable, non-toxic and accessible for binding with various active biocomponents depending on particular bioapplication. The natural polymers such as chitosan, N-trimethylchitosan, carboxymethylchitosan or dextran have been used in a coating procedure and the properties of the core-shell systems have been analyzed by TEM, SEM and SQUID magnetic measurements. The magnetite nanoparticles modified by chitosan exhibit the most perfect and complete surface stabilization as evidenced by the narrow and well defined shell. These nanoparticles were successfully tested in the trypsin immobilization for applications in proteomics, where they revealed the superior properties compared to the synthetic counterparts.

1. INTRODUCTION

Techniques based on using magnetisable solid-phase support have found application in numerous biological fields viz. diagnostics, drug targeting, molecular biology, cell isolation and purification, radio immuno assay, immobilization of proteins and enzymes, hyperthermia causing agents for cancer therapy, nucleic acid purification etc [1-3]. While a number of suitable methods have been developed for the synthesis of the magnetic particles of various compositions, for example nano-sizes magnetite particles have been synthesized by coprecipitation of Fe(II) and Fe(III) in alkaline solution, some magnetic bacteria could synthesize more uniform magnetic particles, which consist of magnetite (Fe_3O_4) or greigite (Fe_3S_4) in size and shape compared with artificial magnetite particles.

The increasing effort in this research is reflecting the need for new biomarkers facing the requirements of today's fast growing biotechnological and pharmaceutical industry [4, 5].

1.1 Magnetotactic bacteria

Magnetotactic bacteria, a special kind of bacteria, were discovered by Blakemore in 1975 [6]. Thus magnetotactic bacteria do not represent a single, defined, taxonomic group. Morphotypes include coccoid to ovoid cells; rods, vibrios, and spirilla of various dimensions; and even multicellular forms. All that have been examined are members of the domain *Bacteria* and possess cell walls that are characteristic of gram-negative bacteria. [7] These bacteria synthesize intracellular magnetic nano-particles (also called magnetosomes or bacterial magnetic particles (BMPs)), which are enveloped by cytoplasmic membrane and made of Fe_3O_4 , Fe_3S_4 , Fe_2O_3 or FeS , etc [8-10]. Several strains of magnetotactic bacteria, including *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, *M. magnetotacticum* MS-1 and *M. magneticum* AMB-1, have been isolated and identified so far [11-13]. A magnetotactic spirillum (strain MSR-1) was isolated from the mud of the entropic river Ryck near Greifswald by Schleifer in 1991. The research of phylogenetic taxonomy demonstrated that MSR-1 is related and belongs to alpha subclass of proteobacteria [14].

1.2 Bacterial magnetic particles; magnetosomes

Single domain bacterial magnetic particles, known as magnetosomes occur in rows 10-20 particles with a defined size of 35-120 nm and are surrounded by a phospholipids' membrane approximately 2-4 nm in thickness [15]. Each BMP has a single domain of magnetite and are well-dispersed in aqueous solutions because of the enclosing membrane [16]. The magnetite particles are aligned in chains parallel to the cell axis. Each particle possesses a magnetic dipole moment and magnetic interactions between magnetic particles in a chain are oriented parallel to each other along the Earth's geomagnetic fieldlines and to maintain its position within the boundary of oxic-anoxic zone [17]. This is used by bacteria for navigation, known as magnetotaxis. While magnetotaxis is clearly an important function for magnetosomes, it may not be their only function. Bazylinski and Frankel suggest that the magnetosomes also have unknown physiological function [18].

The molecular mechanism of magnetite biomineralization in bacteria is poorly understood although this process occurs widely in many other organism such as insect [19], birds [20] or migratory fishes [21]. One of the models of the crystallization process have been proposed where ferric iron is reduced on the cell surface, taken into the cytoplasm, transferred into vesicles (magnetosome) and finally oxidized to produce magnetite [22].

The morphology of BMP is varied and species-dependent. Three general morphologies of magnetite have been observed in magnetotactic bacteria using TEM. They include: roughly cuboidal [23]; parallelepipedal [24,25] and tooth-, bullet- or arrowhead-shaped [26, 27]. *M. gryphiswaldense* produces a chain of cubo-octahedral magnetosome particles. The strain has been used as a model organism in a number of studies addressing the physiology and molecular genetics of magnetosome biomineralization and for the development of applications of magnetosomes [13].

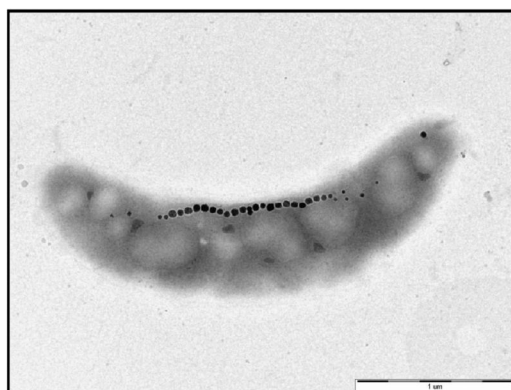


Fig. 1. Cell of *Magnetospirillum gryphiswaldense* obtain a chain of magnetosome

2. MAGNETOSOME PRODUCTION

2.1 Culture

Pure cultivation of magnetotactic bacteria is one of the most important biotechnological processes in the application of BMPs. A magnetic bacterium, *Magnetospirillum gryphiswaldense*, capable of growing aerobically has been successfully isolated [14]. In our initial work, laboratory scale cultivation of these bacteria in 10 l fermentor has been done for the production of BMPs from which approximately 1.5 OD_{565nm} or 0.35 g dry weights of BMPs was yielded per litre of culture. MSR-14 was cultured for 35-40 h in the reported medium [13] using 10 l auto-fermentor under low oxygen concentration conditions.

2.2 Collection of cells and purification of magnetosomes

Bacterial magnetite particles are easily separated and purified from disrupted magnetic bacteria by magnetic separation using a magnet. MSR-1 cell cultures were pelleted by centrifugation and disrupted by several passes through a French pressure cell. Bacterial magnetite from disrupted cells was collected magnetically using a neodymium boron (Nd-B) magnet. Collected bacterial magnetite was washed and used for additional modification.

3. SURFACE MODIFICATION OF BMPs

Generally, naked nano-sized particles tend to form agglomerates to reduce the energy associated with the high surface area to volume ratio. For many applications it is crucial to develop protection strategies to chemically stabilize the naked nanoparticles against degradation and agglomeration. These strategies comprise grafting of or coating with organic species, including surfactants or polymers, or coating with an inorganic layer, such as silica or polysaccharides. In many cases the protecting shells not only stabilize the nanoparticles, but can also be used for further functionalization depending on the desired application. We have modified several methods [28-30] to assemble these functional molecules over the BMPs surface using chemical techniques. Coating experiments in our laboratory were carried out with biogenic nanoparticles of magnetite. As biocompatible coating materials chitosan, O-carboxymethyl chitosan (CMC), dextrans, N-substituted trimethyl chitosan chloride (TMC) and Tween 20 were used. Before all experiments the

membrane of BMPs was removed and substituted by positive detergent agents Cetyltrimethylammonium chloride (CTAC).

3.2. Examination of purified and modified magnetosomes by TEM

The purified and modified magnetosomes were observed by transmission electron microscopy (TEM, JEOL, Japan).

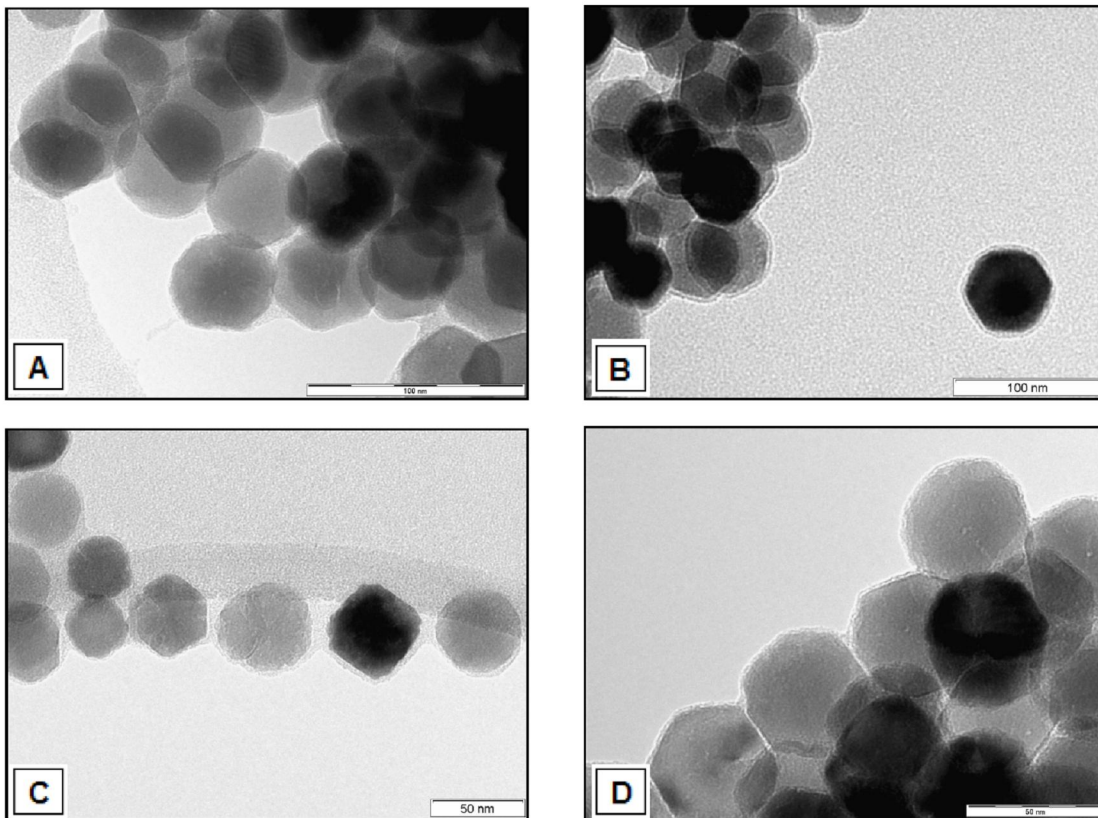


Fig. 2 Determination of surface modification of biogenic nanoparticles of magnetite by TEM (magnetite was modified by chitosan (A), dextran (B), N-substituted trimethyl chitosan (C) and TWEEN 20 (D)).

4. USE OF MODIFIED BMPs AS ENZYME CARRIERS

The use of functional magnetic particles in bioassays facilitates the separation of bound and free analytes by the application of a magnetic field. Magnetic iron oxide nanoparticles are widely used in the development of medical and diagnostic applications such as magnetic resonance imaging (MRI) [33], cell separation [34], drug delivery [35] and hyperthermia [36]. To use these particles for the biotechnological applications, it is important to consider surface modification of magnetic particles with functional molecules such as proteins, antibodies, peptides and DNA. Because of their unique characteristics (narrow-size distribution, a large surface area for reaction, the single magnetic domain size range, etc.) [37] compared to synthetic particles, isolated resp. also modified magnetosome crystals are superior for applications that rely on small amounts of highly functionalized magnetic material with extraordinary magnetic and biochemical characteristics.

The use of BMPs as stable platform for immobilization of proteins resp. enzymes was tried with trypsin. Trypsin (EC 3.4.21.4) is a serine protease found in the digestive system of many vertebrates, where it hydrolyses proteins [38]. Trypsin predominantly cleaves peptide chains at the carboxyl side of the amino acids lysine or arginine, except when either is followed by proline. This enzyme has been used widely in various biotechnological processes and it is commonly used in biological research during proteomics experiments to digest proteins into peptides for mass spectrometry analysis, e.g. in-gel digestion.

In our experiments bovine trypsin (BT) was chemically modified with α -cyclodextrine (ACD-BT) and β -cyclodextrine (BCD-BT) and all were activated by EDC.HCl (*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride). Then enzymes were covalently immobilized on surface of biogenic magnetite modified by chitosan. For comparison the activities of free and immobilized enzyme were measured under different conditions. The activity of trypsin was determined with artificial substrate BAPNA (*N* α -benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide) spectroscopically ($\lambda = 405$ nm) (Fig. 3).

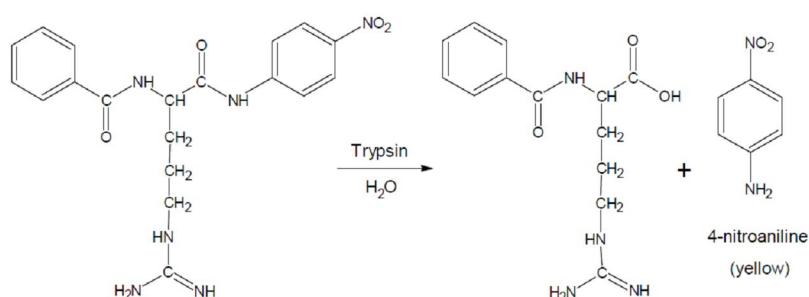


Fig. 3 The schema of trypsin hydrolysis of artificial substrate *N* α -benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide.

All enzymes (free and immobilized forms) were characterized in activities, Michaelis's constants, temperature stabilities T_{50} [°C] (temperature, in which the enzyme had loose half of activity in comparison whit room temperature) and time-degradation stabilities (time, after which the enzyme had loose half of its activity) (tab.1).

Tab. 1 Comparison the activities of free and immobilized enzyme

| Enzyme | Free | | | Immobilized | | |
|---------------|------|--------|--------|-------------|--------|--------|
| | BT | ACD-BT | BCD-BT | BT | ACD-BT | BCD-BT |
| K_m [mM] | 2,5 | 1,7 | 1,2 | 1,7 | 1,3 | 1,1 |
| T_{50} [°C] | 41 | 55 | 56 | 46 | 60 | 64 |
| t_{50} [h] | 0,8 | 21 | >24 | 3,9 | >24 | >24 |

(BT – bovine trypsin, ACD-BT - trypsin modified with α -cyclodextrine and BCD-BT - trypsin modified with β - cyclodextrine) in Michaelis's constants K_m [mM], temperature stabilities T_{50} [°C] and time-degradation stabilities t_{50} [h]. All characteristics were measured with artificial substrate BAPNA (*N* α -benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide) spectroscopically ($\lambda = 405$ nm).

The positive improve of characteristic by immobilization of trypsin on bacterial nanoparticles of magnetite was determined in all experiments. Additionally we will focus on usage of immobilized enzyme in MALDI-TOF peptide mass fingerprinting.

LITERATURE

- [1] RAMCHAND, C.N. et al. Application of magnetic fluids in medicine and biotechnology. *Indian J. Pure Appl. Phys.*, 2001, 39, 683-686.
- [2] SAFARIKOVA, M., SAFARIK, I. The application of magnetic techniques in bioscience, *Magn. Electr.*, Sep 2001, 10, 223-252.
- [3] SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M. Overview of magnetic separations used for biochemical and biotechnological applications. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers* edited by Hafeli. U et al., 1997, 323-340.
- [4] ZOLG, J.W., LANGEN, H. How industry is approaching the research for new diagnostic markers and biomarkers. *Mol. Cell. Proteomics*, 3, 2004, 345-354.
- [5] AUSTIN, M.J.F., BABISS, L. Commentary: where and how could biomarkers be used in 2016, *AAPS J.*, 8, 2006.
- [6] BLAKEMORE, R.P. Magnetotactic bacteria. *Science*, 1975, 190, 377-379.
- [7] FRANKEL, R.B., BAZYLINSKI, D.A. Magnetosome Mysteries. *ASM News*, 2004, 70, 4, 174-183.
- [8] BERNER, R.A. Thermodynamic stability of sedimentary iron sulfide. *Am. J. Sci.*, 1967, 265, 773-785.
- [9] BAZYLINSKI, D.A. et al. Copper association with iron sulfide magnetosomes in a magnetotactic bacterium. *Arch. Microbiol.*, 1993, 160, 35-42.
- [10] BAZYLINSKI, D.A. et al. Fe₃O₄ and Fe₃S₄ in a bacterium. *Nature*, 1993, 366, 218-219.
- [11] BLAKEMORE, R.P. MARATEA, D., WOLFE, R.S. Isolation and pure culture of freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *J. Bacteriol.*, 1979, 140, 720-729.
- [12] YANG, C.D. Effect of growth medium composition, iron sources and atmospheric oxygen concentration on production of luciferase-bacterial magnetic particle complex by a recombinant Magnetospirillum magneticum AMB-1. *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, 29, 13-19.
- [13] HEYEN, U., SCHULER, D. Growth and magnetosome formation by microaerophilic Magnetospirillum strains in an oxygen-controlled fermentor, 2003, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 536-544.
- [14] SCHLEIFER, K.H. et al. The genus Magnetospirillum gen. nov. description of Magnetospirillum gryphiswaldense sp. nov. and transfer of Aguaspirillum magnetotacticum to Magnetospirillum magnetotacticum comb. nov. syst. *Appl. Microbiol.*, 1991, 14, 379-385.
- [15] MATSUNAGA, T. Application of bacterial magnets. *Trends Biotech.*, 1991, 9, 91-95.
- [16] NAKAMURA, N., MATSUNAGA, T. Highly sensitive detection of allergen using bacterial magnetic particles. *Anal. Chim. Acta*, 1993, 281, 585-589.
- [17] SAIYED, Z.M. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. *Biomagn. Res. Technol.*, 2003, 1, 2.
- [18] BAZYLINSKI, D.A., FRANKEL, R.B. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, 2, 217-230.
- [19] GOULD, J.L., KIRSCHVINK, J.L., DEFFEYES, S.K. Bees have magnetic remanence. *Science*, 1978, 201, 1026-1028.
- [20] WALCOTT, C., GREEN, R.P. Orientation of homing pigeons altered by a change in the direction of an applied magnetic field. *Science*, 1974, 184, 180-182.
- [21] WALKER, M.M. et al. A candidate magnetic sense organ in the yellowfin tuna, thunnus albacares. *Science*, 1984, 224, 751-753.
- [22] MANN, S., SPARKS, N.H.C., BOARD, R.G. Magnetotactic bacteria: microbiology, biomineralization, paleomagnetism and biotechnology. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 1990, 31, 125-181.

- [23] BALKWILL, D.L., MARATEA, D., BLAKEMORE, R.P. Ultrastructure of a magnetic spirillum. *J. Bacteriol.*, 1980, 141, 1399-1408.
- [24] BAZYLINSKI, D.A., FRANKEL, R.B., JANNASCH, H.W. Anaerobic production of magnetite by a marine magnetotactic bacterium. *Nature*, 1988, 334, 518-519.
- [25] TOWE, K.M., MOENCH, T.T. Electron-optical characterization of bacterial magnetite. *Earth Planet. Sci. Lett.*, 1981, 52, 213-220.
- [26] MANN, S., SPARKS, N.H.C., BLAKEMORE, R.P. Ultrastructure and characterization of anisotropic inclusions in magnetotactic bacteria. *Proc. R. Soc London, Ser. B*, 1987, 231, 469-476.
- [27] MANN, S., SPARKS, N.H.C., BLAKEMORE, R.P. Structure, morphology and crystal growth of anisotropic magnetite crystals in magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Proc. R. Soc London, Ser. B*, 1987, 231, 477-487.
- [28] MANN, S., FRANKEL, R.B., BLAKEMORE, R.P. Structure, morphology and crystal growth of bacteria magnetite. *Nature*, 1984, 310, 405.
- [29] MATSUDA, T. et al. Morphology and structure of biogenic magnetite particles. *Nature*, 1983, 302, 411.
- [30] DUTZ, S. et al. Influence of dextran coating on magnetic behaviour of iron oxide nanoparticles. *J. Magn Magn. Mater.*, 2007, 311, 51-54.
- [31] HONDA, H. et al. Development of chitosan-conjugated magnetite for magnetic cell separation. *J. Ferment. Bioeng.*, 1998, 86, 191-196.
- [32] BELESSI, V. et al. Ferrofluids from magnetic-chitosan hybrids. *Chem. Mater.*, 2008, 20, 3298-3305.
- [33] GLEICH, B., WEIZENECKER, R. Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature*, 2005, 435, 1214-1217.
- [34] MILTENYI, S. et al. High-gradient magnetic cell-separation with mags. *Cytometry*, 1990, 11, 231-238.
- [35] PLANK, C. et al. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol. Chem.*, 2003, 384, 737-747.
- [36] PARDOE, H. et al. A magnetic resonance imaging based method for measurement of tissue iron concentration in liver arterially embolized with ferrimagnetic particles designed for magnetic hyperthermia treatment of tumors. *Mag. Resonan. Imag.*, 2003, 21, 483-488.
- [37] BUTLER, R.F., BANERJEE, S. Theoretical single-domain size range in magnetite and titanomagnetite. *J. Geophys. res.*, 1975, 50, 4049.
- [38] RAWLINGS, N.D., BARRETT, A.J. Families of serine peptidases. *Meth. Enzymol.*, 1994, 244, 19-61.

7.2 Příloha 2

Z. Markova, A. B. Bourlinos, K. Safarova, K. Polakova, J. Tucek, I. Medrik, K. Siskova, J.

Petr, M. Krysmann, E. P. Giannelis, R. Zboril:

Synthesis and properties of core-shell fluorescent hybrids with distinct
morphologies based on carbon dots.

J. Mater. Chem., 22(32), 16219–16223 (2012)

Synthesis and properties of core–shell fluorescent hybrids with distinct morphologies based on carbon dots†

Zdenka Markova,^a Athanasios B. Bourlinos,^b Klara Safarova,^a Katerina Polakova,^a Jiri Tucek,^a Ivo Medrik,^a Karolina Siskova,^a Jan Petr,^a Marta Krysmann,^c Emmanuel P. Giannelis^{*cd} and Radek Zboril^{†aa}

Received 28th May 2012, Accepted 25th June 2012

DOI: 10.1039/c2jm33414c

Fluorescent core–shell nanohybrids with the shells derived from carbon dots and cores differing in the chemical nature and morphology were synthesized. Hybrid nanoparticles combine fluorescence with other functionalities such as magnetic response on a single platform. These hybrids can be used in various bioapplications as demonstrated with labeling of stem cells.

Carbon dots define a new class of functional nanocarbons combining unique photoluminescent properties with low toxicity.^{1–3} As such, carbon dots hold great promise as fluorescent imaging agents in biomedical and other applications in place of traditional metal-containing quantum dots. More recently, efforts have focused on the preparation of novel hybrids comprised of carbon dots and inorganic nanoparticle cores (e.g., iron oxide, zinc oxide, silica, titania). The resulting hybrids combine the fluorescence properties of the carbon dots with the magnetic, optical or mechanical properties of the oxide cores.⁴ Such hybrids hold great promise as magneto-optical biomarkers or efficient photocatalysts. In all cases, discrete carbon dots were used to decorate the oxide cores leading to a raspberry-type morphology. Here we demonstrate for the first time a series of

core–shell hybrid morphologies including raspberry-type using C-dots as precursors and exploiting their stability/dissolution at different pHs. Using this approach we have been able to synthesize core–shell nanoparticles with shells comprised of a uniform carbonaceous layer, distinct carbon dots or mixtures of the two. The thickness of the shell is readily controllable and a range of nanoparticle cores (biogenic magnetite, silver and carbon nanotubes) has been demonstrated. In addition to its simplicity, the approach presented here is quite general and can be easily adapted to a variety of nanoparticle systems.

Magnetic iron oxide nanoparticles have attracted widespread attention in biomedical applications. Of particular interest are cell labeling and magnetic separation, drug delivery *via* magnetic targeting, catabolism of tumors by hyperthermia or MRI contrast agents.⁵ In this context, magnetofluorescent nanoparticles based on a magnetic iron oxide core and a fluorescent shell are particularly attractive since they combine magnetic and optical responses on a single platform.⁶ Thanks to their dual character, these hybrid systems are very attractive as biomarkers for magnetic targeting and direct optical imaging of stem cells. On the other hand, silver nanoparticles are considered an important antimicrobial or plasmonic agent⁷ whereas CNTs show a growing interest in biomedical applications.⁸

Biogenic magnetite nanoparticles (40–50 nm) called magnetosomes were obtained by cultivation of magnetotactic bacteria (*Magneto-spirillum gryphiswaldense* MSR-1) as described previously.⁹ The magnetosomes were isolated according to the protocol previously described by Grunberg *et al.*¹⁰ The magnetosome phospholipid membrane and associated organic debris from the magnetic cores were removed with NaOH (see Experimental details in the ESI†). Citrate-stabilized silver nanoparticles were prepared by an established method based on the borohydride reduction of silver nitrate in the presence of sodium citrate.¹¹ Commercial multiwall CNTs were oxidized with HNO₃ in order to create surface –COOH groups.¹² Quaternary carbon dots (QCDs) were used as a feedstock material.¹³ QCDs were prepared by thermal treatment of a molecular precursor made from tris(hydroxymethyl)aminomethane and betaine hydrochloride, with the former providing the carbon source and the latter the surface modifier.¹³ The modifier is attached on the carbon surface through amide bonds.‡ These water-dispersible dots are decorated with pending quaternary ammonium groups [*i.e.*, –N(CH₃)₃⁺] from the betaine ligand, which enables their immobilization on anionic substrates *via* electrostatic interactions (see Scheme 1). In addition,

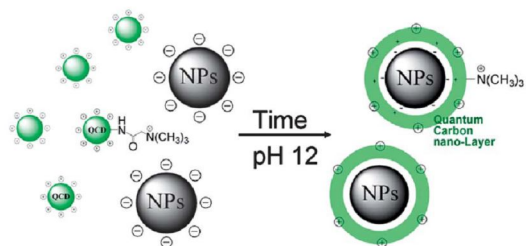
^aRegional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science Departments of Physical Chemistry and Analytical Chemistry, Palacky University, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic. E-mail: zboril@prfmw.upol.cz; Fax: +420585634761; Tel: +420585634947

^bPhysics Department, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

^cMaterials Science and Engineering, Cornell University, Ithaca, NY 14853, U.S.A. E-mail: epg2@cornell.edu; Fax: +16072552365; Tel: +16072559680

^dCenter for Refining & Petrochemicals, KFUPM, Dhahran-31261, Saudi Arabia

† Electronic supplementary information (ESI) available: Details on purification of the biogenic magnetite nanoparticles, instrument details (capillary electrophoresis, transmission electron microscopy, magnetic characterization, high-resolution transmission electron microscopy and electron diffraction spectroscopy), details on stem cell cultures and their labeling, pristine QCDs under a fluorescence microscope, photographs of MagQCD systems, TEM images of MagQCDs prepared at pH = 11, TEM images of MagQCDs prepared at pH = 12 with different QCDs loading, HRTEM images combined with EDX chemical mapping of the MagQCD hybrid nanoparticles prepared at pH = 12, absorption and wavelength-dependent emission spectra, *in vitro* stem cell labeling and ion exchange properties of MagQCDs. See DOI: 10.1039/c2jm33414c



Scheme 1 Illustrative synthesis scheme of the core-shell fluorescent hybrids starting from QCDs and spherical nanoparticles (NPs).

they show a uniform size/surface charge distribution with an average particle size of 6 nm and a spherical morphology, as well as, bright photoluminescence (see Fig. S1 in the ESI†). For the preparation of all samples, the substrates (biogenic magnetite, silver nanoparticles or CNTs) were reacted with QCDs at pHs between 8 and 12 for 1 hour using mass ratios of QCDs/substrate = 1 or 5. The hybrid materials were separated by centrifugation, washed with deionized water and re-suspended in water. The samples are thereafter denoted as MagQCDs, AgQCDs, and CNTQCDs, respectively. Below, we discuss in detail the case of the MagQCDs system and in parallel those of AgQCDs and CNTQCDs to demonstrate the wider applicability of the method.

Comparative transmission electron microscopy (TEM) analysis of the biogenic magnetite nanoparticles before and after purification shows that the outer organic membrane is removed after exposure to NaOH resulting in monodisperse, crystalline, and highly magnetic nanoparticles (see Fig. 1a and b). Since the synthesis of MagQCDs proceeds under alkaline conditions, we have investigated the effect of pH on the morphology of QCDs. The size and morphology of the pristine QCDs are seriously affected at pH > 10 possibly due to hydrolysis and dissolution (see Fig. 1c and d). Since QCDs contain

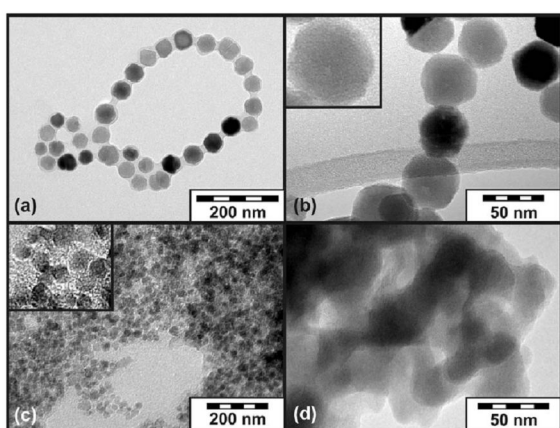


Fig. 1 TEM images of (a) magnetosomes isolated from magnetotactic bacteria showing the phospholipid membrane on the surface of biogenic magnetite, (b) biogenic magnetite after the phospholipid membrane removal, (c) pristine QCDs, and (d) QCDs after treatment at pH = 12 showing the formation of a fused particle network. The insets show higher magnification images of biogenic magnetite nanoparticles after the membrane removal and pristine QCDs.

considerable amounts of amide and ester bonds, alkaline hydrolysis is expected to cause bond-breaking leading to particle dissolution and degradation into complex oligomeric fragments. Based on TEM analysis, the changes on freshly prepared samples are mild at pH < 10, moderate at pH = 10–11 and severe at pH = 12 resulting in severe necking and deformation of the nanoparticles caused by dissolution from concave into convex nanoparticle surfaces. The effect of pH on QCDs was also studied by means of capillary electrophoresis (CE) with laser-induced fluorescence detection, which is a powerful tool for monitoring changes in overall charge, size, and dispersion of nanoparticles¹⁴ (see Experimental details in the ESI†). Two electrolytes with the same ionic strength and pH of 7 and 12 were used. At pH 7 the nanoparticles migrate in a relatively tight zone (see Fig. 2b). In contrast, a sharp peak followed by a much broader band can be seen for the particles at pH = 12 (see Fig. 2a). Importantly the eluent time for the particles at pH 12 is much shorter. Both of these observations suggest that there is a severe dissolution/degradation of QCDs at pH = 12 into carbonaceous oligomeric fragments. These findings are crucial in explaining the formation of uniform fluorescent shells over the underlying magnetite cores at pH = 12 (*vide infra*).

The pH also affects the mechanism of interaction of magnetite with QCDs. At pH < 10, poorly interacting systems are formed because of the low surface charge density of the magnetite particles at these pH values.¹⁵ In contrast, strongly interacting systems are obtained at higher pH values (11 and 12). The hybrid nanoparticles can be magnetically separated from the aqueous phase and re-dispersed in water at pH suitable for bioapplications (pH = 7) (see Fig. S2 in the ESI†). In this case, the magnetic separation results in complete discoloration of the aqueous phase suggesting the formation of strongly interacting hybrids.

Mixing a suspension of QCDs with biogenic magnetite nanoparticles at high pHs leads to hybrid (core-shell) nanoparticles with a varying morphology. At pH = 11, MagQCDs adopt a raspberry-like morphology with the shell being composed of tiny dots embedded in a continuous organic layer (see Fig. S3 in the ESI†). The observed organic layer is the result of partial alkaline hydrolysis of the dots into complex organic fragments. As mentioned earlier, the degradation of QCDs is moderate at pH of 10–11. Thus, some dots can be still observed on the outer shell in addition to the carbonaceous layer. At pH = 12, however, MagQCDs display uniform core-shell morphologies with quite homogeneous organic shells (see Fig. 3). In this instance, the organic shell is void of any dots. The shell thickness can be further controlled at pH = 12 by adjusting the QCDs/Mag ratio: the higher the amount of QCDs, the thicker the shell (see Fig. S4 in the ESI†). High-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) images combined with EDX (energy-dispersive

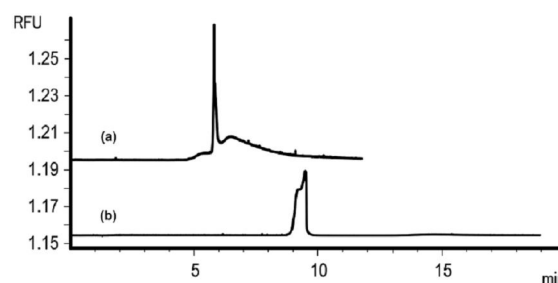


Fig. 2 CE characterization of QCDs (a) at pH = 12 and (b) pH = 7.

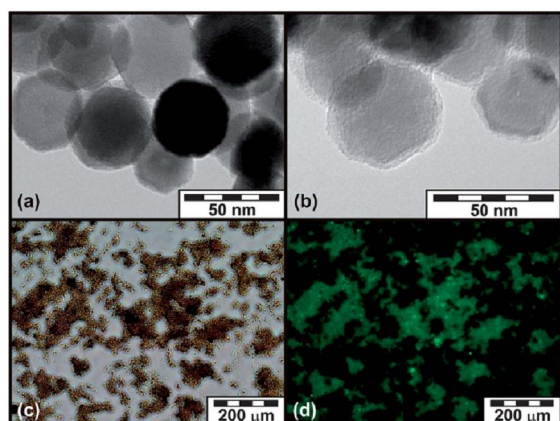


Fig. 3 TEM images of magnetite (a) before and (b) after exposure to QCDs at pH 12 (QCDs/Mag = 1). MagQCDs in a fluorescence microscope: phase contrast (c) combined with fluorescence mode (d).

X-ray spectroscopy) chemical mapping of the MagQCD hybrid nanoparticles prepared at pH = 12 (see Experimental details in the ESI†) demonstrates the presence of carbon-based coverage on the surface of magnetite (red image in Fig. S5 in the ESI†).

The MagQCD hybrid nanoparticles combine fluorescent and magnetic properties in one simple platform. The MagQCDs are easily seen in a fluorescence microscope thanks to their bright photoluminescence (see Fig. 3). The absorption and fluorescence spectra of MagQCDs and QCDs before and after alkaline treatment are shown in Fig. S6 in the ESI†. The absorption spectra show no distinct peaks characteristic of any specific chromophore. The fluorescence spectra show an excitation dependent emission with a peak centered near 450 nm for excitations between 375 and 400 nm characteristic of carbon-based nanoparticles (C-dots). Additionally, the magnetic response can be fine-tuned by controlling the QCDs/Mag ratio (see Fig. 4). For QCDs/Mag = 1, the saturation magnetization ($\approx 6.7 \text{ A m}^2 \text{ kg}^{-1}$) is three times higher compared to that for QCDs/Mag = 5 ($\approx 2.2 \text{ A m}^2 \text{ kg}^{-1}$). These results correspond well with the approximately three times higher weight content of the magnetic phase in the former sample (50% vs. 17%). The same figure shows also the hysteresis loop of the pristine biogenic magnetite, which reveals lower saturation magnetization compared to common magnetite, evidently due to the alkaline treatment used to remove the cell membrane. In spite of this reduction, the saturation magnetizations of both hybrids are still sufficiently high evidenced by the strong attraction of the core-shell particles to a simple hand magnet (see Fig. S2 in the ESI†). Moreover, both magnetic systems reach a maximum magnetization at very low external fields of 0.3 T (see inset in Fig. 4), which is advantageous for various applications. The small decrease in magnetization at higher applied magnetic fields is attributed to a diamagnetic response due to the organic shell.

The bioapplicability of MagQCDs was tested in labeling of rat mesenchymal stem cells (MSCs), which were isolated from a bone marrow of femurs and cultured as described by Gallo *et al.*^{16a} (see Experimental details in the ESI†). The MagQCD nanoparticles did not reveal any negative effect on the growth of the MSCs. In a few hours, the particles adhered on the cell surface. After 24 h, they started to be internalized gradually into the body cell mainly *via* nonspecific endocytosis. A large uptake of MagQCDs by MSCs can

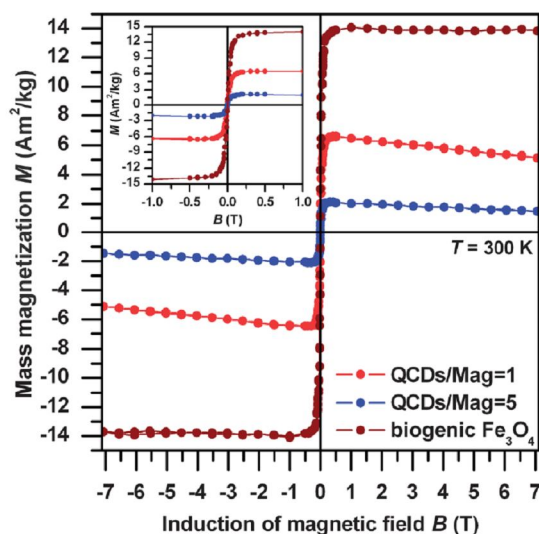


Fig. 4 300 K hysteresis loops recorded for biogenic magnetite and MagQCDs (QCDs/Mag = 1 and 5) prepared at pH = 12. The inset shows the profile of samples' hysteresis loops under small applied magnetic fields.

be seen after 72 h as evidenced by a clear intracellular fluorescence signal (see Fig. S7 in the ESI†). Importantly, the labeled stem cells still show the same morphology and keep their viability and proliferation profile as the non-labeled ones. In recent years, several quantum-dot-based systems have been developed for stem cell labeling, although some of them were found to be cytotoxic.¹⁶ In our case, the carbon-based QCDs are non-toxic and provide the necessary biocompatibility for possible applications in MRI and optical imaging.

We believe that the hybrid nanoparticles are formed by electrostatic interactions between the positively charged QCDs and the negatively charged magnetite nanoparticles. The point of zero charge (PZC) for magnetite is at pH = 8; below this value, magnetite has a positive while above it a negative surface charge.¹⁵ In addition, the surface charge density increases as we move from PZC. At high pH (11 or 12), the hydroxyl groups on the magnetite surface are fully hydrolyzed (*i.e.*, $\text{Fe-OH} \rightarrow \text{Fe-O}^- + \text{H}^+$). When mixed with the positively charged carbonaceous oligomeric fragments produced after dissolution of the QCDs at high pH (*vide supra*), core-shell nanoparticles are formed *via* electrostatic interactions: $\text{Fe-O}^- + ^+\text{N}(\text{CH}_3)_3 \rightarrow \text{Fe-O}^- ^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$. It is worth noting that the magnetic nanoparticles are negatively charged after treatment with 5 M NaOH at 98 °C to remove the cell membrane as evidenced by their negative zeta potential value of -22 mV . The hybrid MagQCD nanoparticles exhibit a positive zeta potential ($+33.5 \text{ mV}$) and can undergo ion-exchange reactions with negatively charged compounds (dyes, drugs or biopolymers) (see Fig. S8 in the ESI† for the case of a porphyrin dye), further supporting that the outer layer is composed of a carbonaceous layer composed of positively charged oligomeric fragments produced after exposure to alkaline pH.

The process is general and the principles demonstrated for the MagQCDs system can be easily extended to other nanomaterials. Thus, the solution-processable fluorescent species (carbonaceous fragments) formed by the alkaline treatment of the QCDs can be used to synthesize core-shell fluorescent hybrids based on citrate-stabilized

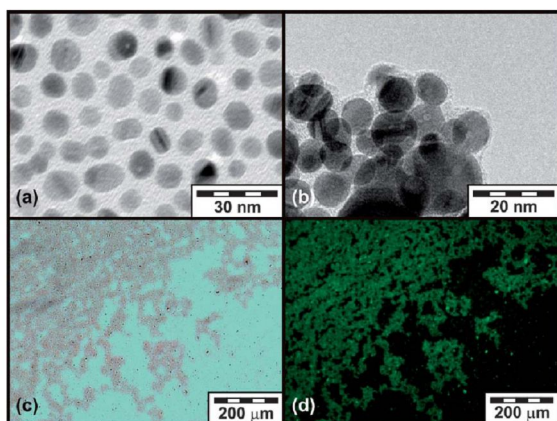


Fig. 5 (a and b) TEM images of citrate stabilized silver nanoparticles and AgQCDs (QCDs/silver = 1) prepared at pH = 12 and (c and d) AgQCDs under the fluorescence microscope.

silver nanoparticles and oxidized CNTs (see Fig. 5 and 6). In both cases, the surface carboxylate groups ($-\text{COO}^-$) from the citrate ligands present on the silver nanoparticles or from the oxidized CNTs serve as the binding sites for the electrostatic immobilization of the carbon dot-derived fluorescent species at pH = 12 [e.g., $-\text{COO}^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$]. Before coating, the citrate-stabilized silver nanoparticles and oxidized CNTs show zeta potential values of -33 mV and -26 mV, respectively. After coating, the corresponding values become $+27.1$ mV for silver nanoparticles and $+13.4$ mV for CNTs, respectively. These dramatic changes in zeta potential values are consistent with the presence of positively charged carbonaceous species in the shell. In line with MagQCDs, AgQCDs and CNTQCDs also display a bright photoluminescence under the fluorescence microscope (see Fig. 5 and 6).

In summary, we presented a new approach for core-shell hybrid morphologies using C-dots. Using this approach we have been able to synthesize core-shell fluorescent nanoparticles with shells comprised of uniform carbonaceous layer, distinct carbon dots or

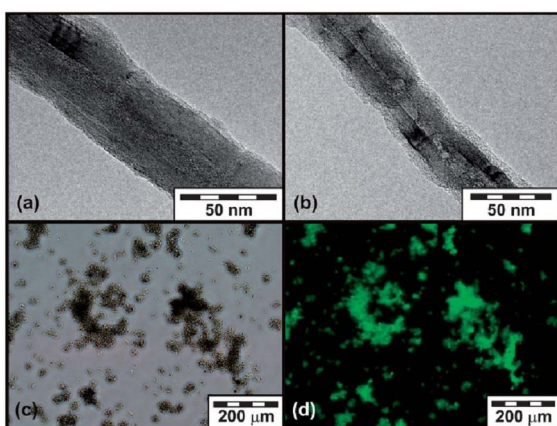


Fig. 6 (a and b) TEM images of uncoated CNTs and CNTQCDs (QCDs/CNTs = 1) prepared at pH = 12 and (c and d) CNTQCDs under the fluorescence microscope.

mixtures of the two. A range of nanoparticle cores (biogenic magnetite, silver and carbon nanotubes) has been demonstrated. Compared to other labeling procedures exploiting organic compounds, the thickness of the shell is readily controllable. Due to their core-shell nature the hybrid nanoparticles combine fluorescence with other functionalities, for example, magnetic response on a single platform. Compared to labeling techniques employing inorganic quantum dots (e.g., CdSe), the developed hybrid nanoparticles are biocompatible, show low toxicity and can be used for labeling of stem cells.

Acknowledgements

The work was supported by the Operational Program Research and Development for Innovations – European Regional Development Fund (CZ.1.05/2.1.00/03.0058). The projects of the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (KAN115600801 and KAN200380801), the project of the Operational Program Research and Development for Innovations – KONTAKT II (LH12085) and the student project no. PrF_2012_028 of the Palacký University in Olomouc are gratefully acknowledged. This publication was based on work supported in part by Award no. KUS-C1-018-02, made by King Abdullah University of Science and Technology (KAUST). We thank MSc. Josef Skopalik (Masaryk University, Brno, Czech Republic) for the technical support regarding the isolation of stem cells. The authors thank FEI Company in Eindhoven for HRTEM images and EDX analysis.

Notes and references

‡ Experimental data: *Magnetite hybrids*: to synthesize magnetic nanoparticles surface functionalized with QCDs (MagQCDs, with QCDs/Mag = 1), 100 μL of an aqueous dispersion of magnetite nanoparticles (1 mg mL^{-1}) was washed twice with buffer (deionized water adjusted to a particular pH by addition of NaOH) and then diluted in 0.5 mL of this buffer (pH = 8, 9, 10, 11 or 12). 100 μL of QCDs (diluted to concentration of 1 mg mL^{-1} by the same buffer) were added to the above suspension and mixed using a probe sonicator (30 W). The reaction mixture was shaken using a mini-rotator for 1 h at 10 rpm at room temperature. The hybrid nanoparticles were magnetically separated and diluted in 1 mL of deionized water. MagQCDs with different carbonaceous loadings (up to QCDs/Mag = 5) were obtained in a similar manner and pH range using 100 μL of higher concentration QCDs dispersion (5 mg mL^{-1}). *Silver hybrids*: citrate-stabilized silver nanoparticles were prepared according to an established protocol.¹¹ Specifically, 3.4 mg of NaBH_4 was dissolved in 75 mL of deionized water which had been previously purged with N_2 and cooled in an ice bath to 4°C . During the whole procedure, the solution was magnetically stirred at 700 rpm. Then, 1 mL of 1% solution of trisodium citrate was added. Finally, 9 mL of 0.0022 M AgNO_3 was slowly (within 5 min) injected into the cooled solution. The reduction to colloidal silver was performed at 4°C under constant stirring at 700 rpm for 45 min. The colloidal silver was used for the preparation of the silver hybrids with QCDs (AgQCDs) as described above for the MagQCDs under alkaline pH. *Carbon nanotube hybrids*: 200 mg of CNTs (multiwall, Aldrich 99%) were suspended in 50 mL of HNO_3 (67%) and the mixture was refluxed for 24 h. The oxidized CNTs were isolated by centrifugation and washing with deionized water prior to drying. The oxidized CNTs were mixed with QCDs at alkaline pH as above to form the CNTQCD hybrids.

- (a) Y. P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K. A. S. Fernando, P. Pathak, M. J. Mezziani, B. A. Harruff, X. Wang, H. Wang, P. G. Luo, H. Yang, M. E. Kose, B. Chen, L. M. Vaca and S. Y. Xie, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7756–7757; (b) S. T. Yang, L. Cao, P. G. J. Luo, F. S. Lu, X. Wang, H. F. Wang, M. J. Mezziani, Y. F. Liu, G. Qi and Y. P. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 11308; (c) S. T. Yang, X. Wang, H. F. Wang, F. S. Lu, P. J. G. Luo, L. Cao, M. J. Mezziani,

- J. H. Liu, Y. F. Liu, M. Chen, Y. P. Huang and Y. P. Sun, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 18110–18114.
- 2 (a) S. N. Baker and G. A. Baker, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 6726–6744; (b) H. Shengliang, B. Peikang, S. Jing and C. Shirui, *Progr. Chem.*, 2010, **22**, 345–351; (c) J. C. G. E. Da Silva and H. M. R. Goncalves, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2011, **30**, 1327–1336.
- 3 (a) M. J. Krysmann, A. Kellarakis, P. Dallas and E. P. Giannelis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 747–750; (b) S. Hu, Y. Guo, W. Liu, P. Bai, J. Sun and S. Cao, *J. Phys. Chem. Solids*, 2011, **72**, 749–754; (c) X. J. Mao, H. Z. Zheng, Y. J. Long, J. Du, J. Y. Hao, L. L. Wang and D. B. Zhou, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2010, **75**, 553–557; (d) W. Sun, Y. Du and Y. Wang, *J. Lumin.*, 2010, **130**, 1463–1469; (e) A. B. Bourlinos, V. Georgakilas, R. Zboril, A. Bakandritsos, A. Stassinopoulos, D. Anglos and E. P. Giannelis, *Carbon*, 2009, **47**, 519–526; (f) A. B. Bourlinos, A. Stassinopoulos, D. Anglos, R. Zboril, V. Georgakilas and E. P. Giannelis, *Chem. Mater.*, 2008, **20**, 4539–4541; (g) A. B. Bourlinos, A. Stassinopoulos, D. Anglos, R. Zboril, M. A. Karakassides and E. P. Giannelis, *Small*, 2008, **4**, 455–458; (h) D. G. Levine, R. H. Schlosberg and B. G. Silbernagel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1982, **79**, 3365–3370.
- 4 (a) G. Ruan, D. Thakur, S. Deng, S. Hawkins and J. O. Winter, *Proc. Inst. Mech. Eng., Part N: J. Nanoeng. Nanosyst.*, 2009, **223**, 81–86; (b) H. Li, X. He, Z. Kang, H. Huang, Y. Liu, J. Liu, S. Lian, C. H. A. Tsang, X. Yang and S. T. Lee, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 4430–4434; (c) H. C. Zhang, H. Ming, S. Y. Lian, H. Huang, H. T. Li, L. L. Zhang, Y. Liu, Z. H. Kang and S. T. Lee, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 10822–10825; (d) H. Yu, H. Zhang, H. Huang, Y. Liu, H. Li, H. Ming and Z. Kang, *New J. Chem.*, 2012, **36**, 1031–1035; (e) Z. Xie, F. Wang and C. Y. Liu, *Adv. Mater.*, 2012, **24**, 1716–1721; (f) P. Mirtchev, E. J. Henderson, N. Soheilnia, C. M. Yip and G. A. Ozin, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 1265–1269.
- 5 (a) A. K. Gupta and M. Gupta, *Biomaterials*, 2005, **26**, 3995–4021; (b) A. H. Lu, E. L. Salabas and F. Schuth, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 1222–1244; (c) Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones and J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2003, **36**, R167–R181; (d) S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. V. Elst and R. N. Muller, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2064–2110.
- 6 (a) A. Singh, P. Sharma, S. Brown and B. Moudgil, *KONA*, 2010, **28**, 20–37; (b) R. Stevenson, A. J. Hueber, A. Hutton, I. B. McInnes and D. Graham, *TheScientificWorldJournal*, 2011, **11**, 1300–1312; (c) G. N. Wang and X. G. Su, *Analyst*, 2011, **136**, 1783–1798.
- 7 (a) A. Panacek, L. Kvitek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, V. K. Sharma, T. Nevecna and R. Zboril, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 16248–16253; (b) V. K. Sharma, R. A. Yngard and Y. Lin, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2009, **145**, 83–96; (c) P. Dallas, V. K. Sharma and R. Zboril, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2011, **166**, 119–135; (d) J. Li, B. Zhang, F. Wang and C. Liu, *New J. Chem.*, 2011, **35**, 554–557; (e) Y. Zhang, H. Goncalves, J. C. G. E. Da Silva and C. D. Geddes, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 5313–5315.
- 8 (a) A. Bianco, K. Kostarelos, C. D. Partidos and M. Prato, *Chem. Commun.*, 2005, 571–577; (b) E. Bekyarova, Y. Ni, E. B. Malarkey, V. Montana, J. L. McWilliams, R. C. Haddon and V. Pargura, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2005, **1**, 3–17; (c) W. R. Yang, P. Thordarson, J. J. Gooding, S. P. Ringer and F. Braet, *Nanotechnology*, 2007, **18**, 412001.
- 9 U. Heyen and D. Schüler, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **61**, 536–544.
- 10 K. Grunberg, E. C. Muller, A. Otto, R. Reszka, D. Linder, M. Kube, R. Reinhardt and D. Schüler, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 1040–1050.
- 11 H. Felix-Rivera, R. Gonzalez, G. D. M. Rodriguez, O. M. Primera-Pedrozo, C. Rios-Velazquez and S. P. Hernandez-Rivera, *Int. J. Spectrosc.*, 2011, 989504.
- 12 V. Datsyuk, M. Kalyva, K. Papagelis, J. Parthenios, D. Tasis, A. Siokou, I. Kallitsis and C. Galiotis, *Carbon*, 2008, **46**, 833–840.
- 13 A. B. Bourlinos, R. Zboril, J. Petr, A. Bakandritsos, M. Krysmann and E. P. Giannelis, *Chem. Mater.*, 2012, **24**, 6–8.
- 14 S. P. Radko and A. Chrambach, *Electrophoresis*, 2002, **23**, 1957–1972.
- 15 (a) Z. X. Sun, F. W. Su, W. Forsling and P. O. Samskog, *J. Colloid Interface Sci.*, 1998, **197**, 151–159; (b) E. Illes and E. Tombacz, *J. Colloid Interface Sci.*, 2006, **295**, 115–123.
- 16 (a) M. P. Gallo, R. Ramella, G. Alloatti, C. Penna, P. Pagliaro, A. Marcantoni, F. Bonafe, G. Losano and R. Levi, *J. Cell. Biochem.*, 2007, **100**, 86–89; (b) C. Wang, X. Gao and X. G. Su, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 1397–1415; (c) Y. Higuchi, C. Wu, K. L. Chang, K. Irie, S. Kawakami, F. Yamashita and M. Hashida, *Biomaterials*, 2011, **32**, 6676–6682; (d) S. Ranjbarvaziri, S. Kiani, A. Akhlaghi, A. Vosough, H. Baharvand and N. Aghdami, *Biomaterials*, 2011, **32**, 5195–5205; (e) M. Vibin, R. Vinayakan, A. John, C. S. Rejiya, V. Raji and A. Abraham, *J. Colloid Interface Sci.*, 2011, **357**, 366–371.

Supporting Information

to

**Synthesis and properties of core-shell fluorescent hybrids with distinct morphologies
based on carbon dots**

Zdenka Markova,^a Athanasios B. Bourlinos,^b Klara Safarova,^a Katerina Polakova,^a Jiri Tucek,^a Ivo Medrik,^a Karolina Siskova,^a Jan Petr,^a Marta Krysmann,^c Emmanuel P. Giannelis^{*,c,d} and Radek Zboril^{*,a}

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science Departments of Physical Chemistry and Analytical Chemistry, Palacky University, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic. Tel.: +420585634947; Fax: +420585634761; E-mail: zboril@prfnw.upol.cz (Prof. R. Zboril).

^b Physics Department, University of Ioannina, Ioannina 45110, Greece

^c Materials Science and Engineering, Cornell University, Ithaca NY 14853, USA. Fax: +16072552365; Tel: +16072559680; E-mail: epg2@cornell.edu (Prof. E. P. Giannelis)

^d Center for Refining and Petrochemicals, KFUPM, Dhahran, KSA

Purification of the biogenic magnetite nanoparticles: The magnetosome phospholipid membrane and associated organic debris from the magnetic cores was removed with NaOH. More specifically, magnetosomes dispersed in water (approximately 1 mg mL⁻¹) were magnetically collected, re-dispersed in the same volume of 5M NaOH and incubated at 98 °C for 30 minutes. Then, the magnetic fraction was collected with an external magnet and washed three times with deionized water.

Capillary electrophoresis (CE): All of the measurements were performed on the capillary electrophoresis system Agilent HP 3DCE with diode array detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and laser-induced fluorescence detector (Picometrics, Toulouse,

France) operating at an excitation wavelength of 488 nm. Uncoated fused silica capillaries (MicroSolv Technology, Eatontown, NJ, USA) with 50 μm i.d., total capillary length of 75 cm, and effective length of 60 cm were used in these experiments. The capillary cassette was thermostated at 25 °C. The capillary was rinsed with 0.5 M NaOH (2 min), deionized water (3 min), and buffer (5 min) before each analysis by a pressure drop of 925 mbar. Applied voltage was + 20 kV. All of the measurements were performed in triplicates. Electrolytes were prepared as follows: appropriate amount of 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) were dissolved in deionized water (18 M Ω cm, Millipore, Billerica, MA, USA) and the pH was adjusted using sodium hydroxide. Ionic strength of both buffers was 10 mM.

TEM: TEM images were obtained using a JEM2010 microscope operated at 200 kV with a point-to-point resolution of 1.9 Å. Before measurements, samples were dispersed in ethanol and the suspension was treated in ultrasound for 10 minutes. A drop of a very dilute suspension was placed on a carbon-coated grid and allowed to dry by evaporation at room temperature.

Magnetic characterization: A superconducting quantum interference device (SQUID, MPMS XL-7 type Quantum Design) was used for magnetic measurements. The hysteresis loops of all samples were collected at a temperature of 300 K in external magnetic fields ranging from – 70 to + 70 kOe.

HRTEM (EDS): HRTEM images were recorded on a Titan G2 80–200 transmission electron microscope with a ChemiSTEM Technology (X-FEG, accelerating voltage of 200 kV). A drop of the sample, dispersed in deionized water, was placed onto the copper grid with holey carbon film and air-dried at room temperature. EDX chemical maps were recorded at 200 kV for 180 s with 0.6 nA beam current, 50 dwell time and M = 910 k.

Stem cell cultures and their labeling: Rat mesenchymal stem cells were isolated from a bone marrow of femurs. The cell suspension was filtered through a 40- μm nylon filter (Falcon) and plated in plastic chambers. Cells were grown in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Invitrogen) with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2% penicillin/streptomycin (PS) at 37 °C under 5% CO₂. After 24 hours, the medium was replaced to remove non-adhered cells. The cells were grown to obtain 80 % of confluence. Cells were incubated with 100 μL of MagQCDs suspension containing 400 μg of MagQCDs per mL. After 72 hours of incubation, the cells were imaged by optical and fluorescence microscopy. All animal experiments were performed in accordance with the Czech Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Committee for the Use of Experimental Animals at the Masaryk University in Brno in the Czech Republic.

Supporting Figures

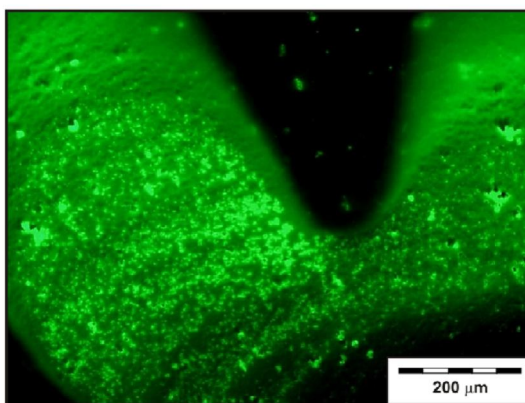


Fig. S1. Pristine QCDs under the fluorescence microscope.

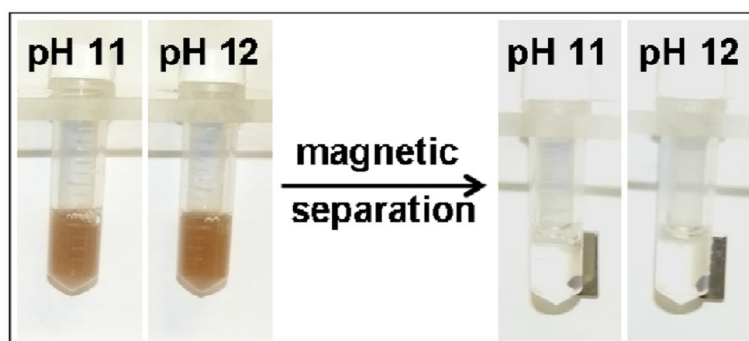


Fig. S2. The MagQCDs (QCDs/Mag = 1) prepared at pH of 11 and 12 in the absence (left) and presence (right) of an external magnet. The complete discoloration of the aqueous phase on the right suggests a strong magnetic response.

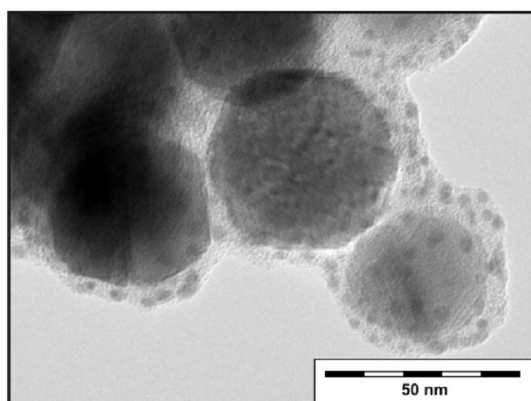


Fig. S3. TEM image of MagQCDs (QCDs/Mag = 1) prepared at pH = 11.

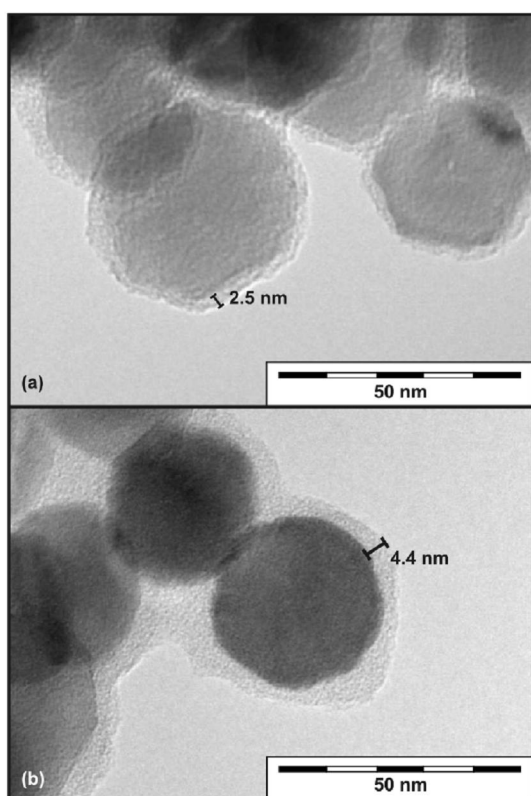


Fig. S4. TEM images of MagQCDs prepared at pH = 12 with different QCDs loading, which is reflected in different shell thicknesses: (a) QCDs/Mag = 1 and (b) QCDs/Mag = 5.

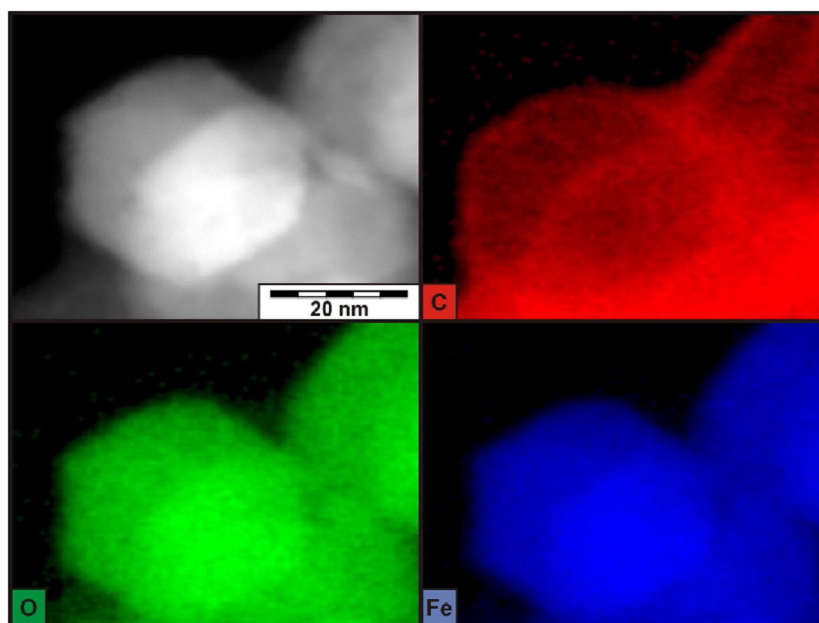


Fig. S5. HRTEM images combined with EDX chemical mapping of the MagQCDs hybrid nanoparticles prepared at pH = 12 demonstrating the presence of carbon-based species coverage on the surface of magnetite (red image).

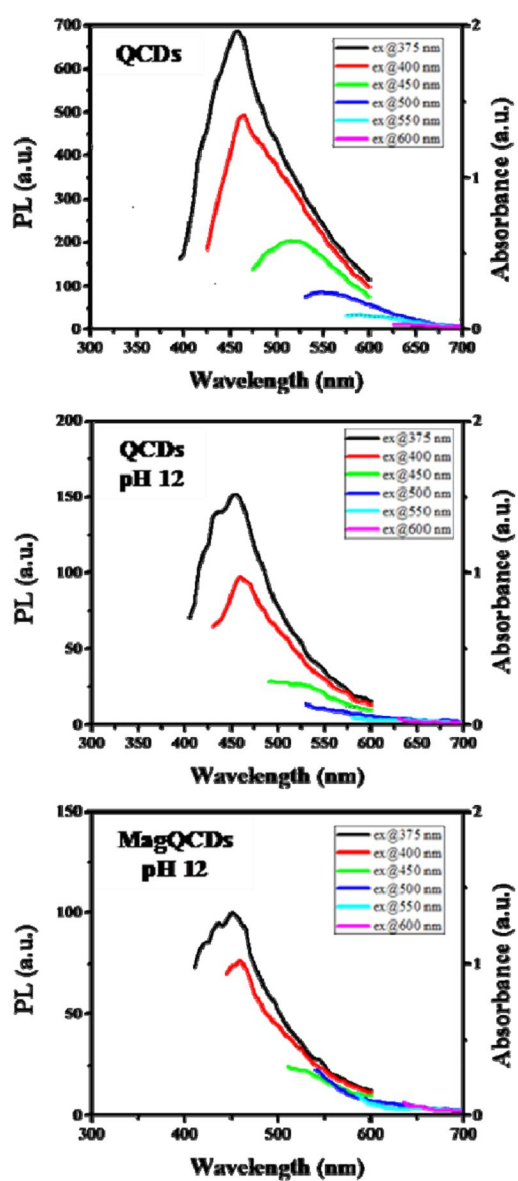


Fig. S6. Absorption and wavelength-dependent emission spectra of pristine QCDs (top), QCDs treated at pH = 12 (middle) and MagQCDs (QCDs/Mag = 1) synthesized at pH = 12 and re-dispersed in water at pH = 7 (bottom).

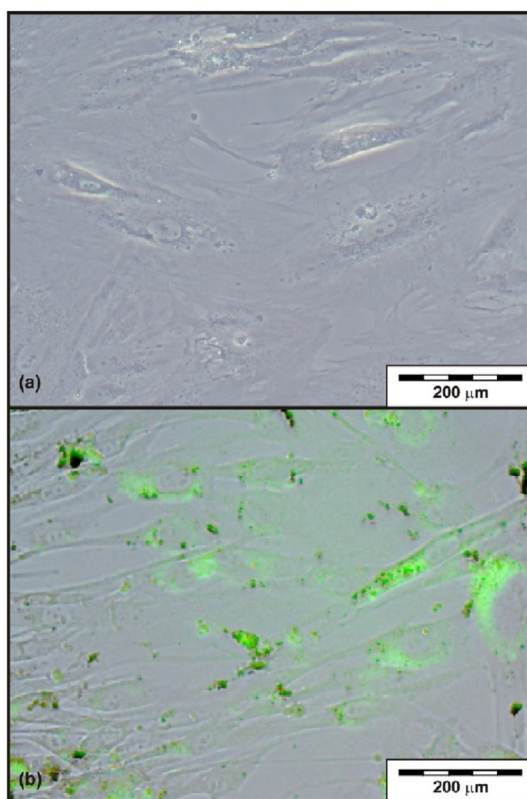


Fig. S7. In-vitro stem cell labeling (original magnification $\times 400$): (a) unlabeled MSCs and (b) MSCs labeled with MagQCDs. QCDs/Mag = 1; time of incubation 72 hours (phase contrast combined with fluorescence mode).

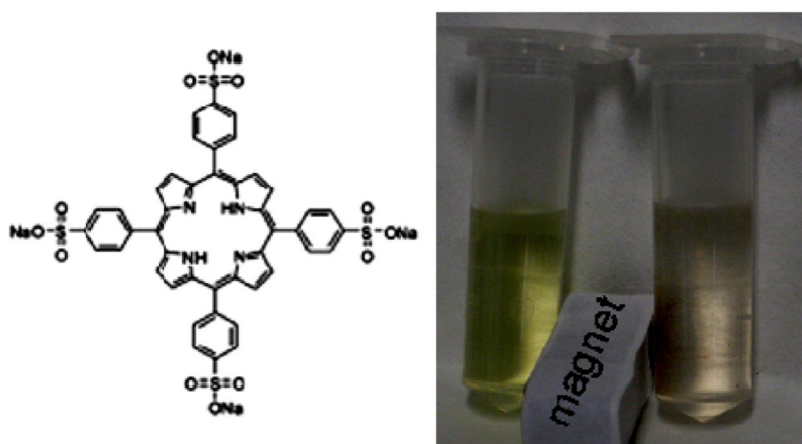


Fig. S8. Ion exchange properties of MagQCDs. The Eppendorf tube on the left-side of the photo shows a yellow aqueous solution of the anionic porphyrin (10^{-5} M). The Eppendorf tube on the right-side of the photo shows the same solution in the presence of MagQCDs after applying an external magnetic field.

7.3 Příloha 3

Z. Markova, K. Siskova, J. Filip, K. Safarova, R. Prucek, A. Panacek, M. Kolar, R. Zboril:

Chitosan-based synthesis of magnetically-driven nanocomposites with biogenic magnetite core, controlled silver size, and high antimicrobial activity.

Green Chem., 14(9), 2550–2558 (2012)

Cite this: *Green Chem.*, 2012, **14**, 2550

www.rsc.org/greenchem

PAPER

Chitosan-based synthesis of magnetically-driven nanocomposites with biogenic magnetite core, controlled silver size, and high antimicrobial activity

Zdenka Marková,^a Karolína Šišková,^{*a} Jan Filip,^a Klára Šafařová,^a Robert Pucek,^a Aleš Panáček,^a Milan Kolář^b and Radek Zbořil^{*a}

Received 12th April 2012, Accepted 28th June 2012

DOI: 10.1039/c2gc35545k

We report a new procedure, exploiting “green” chemistry, resulting in biocompatible magnetically-driven nanocomposites with high antibacterial and antifungal activities against ten tested bacterial strains and four *Candida* species. The nanocomposites consist of silver nanoparticles (NPs), biogenic magnetite NPs isolated from magnetotactic bacteria, and an environmentally friendly polymer – chitosan. These hybrids were prepared using an acidified chitosan suspension to cover biogenic magnetite NPs by a cross-linking method, followed by employing the NH₂ groups of chitosan for the reduction of silver salt in an alkaline medium. Thus, in the procedure, chitosan acts as (i) a biocompatible matrix surrounding the magnetite NPs, (ii) a reducing agent for the silver ions, and (iii) a linker between magnetic and silver NPs. The size of the resulting silver NPs and the total amount of silver involved in the nanocomposites can be simply controlled by the initial concentration of the silver salt used in the reaction mixture. The as-prepared nanocomposites reveal increased bactericidal and antifungal activity when compared to previously reported magnetic silver NPs systems which were not prepared by green synthetic routes. The use of biogenic magnetite with a uniform shape and size, the absence of any other reducing agent during synthesis, the simple control of silver NPs size and loading, the biocompatible character of chitosan matrix, and a high antimicrobial effect predetermine the developed nanocomposites for targeted applications in biomedicine.

Introduction

Exploitation of nanoparticles (NPs) in various biotechnological, biochemical, and medical applications represents one of the most extensively investigated areas of current materials science. Nowadays, multicomponent hybrid nanostructures that contain two or more nanometer-scale components constitute a new and very attractive direction of material research. Among the nanoparticles of interest, magnetic iron oxides and silver ones are ranked among the most frequently used inorganic NPs thanks to their unique properties.

Magnetic NPs of an iron oxide nature (maghemite and/or magnetite) are at the forefront of current research owing to their application-convenient magnetic and biochemical (e.g., non-toxicity, biocompatibility, and biodegradability) properties.^{1–3} When exposed to an external magnetic field of various values of magnetic induction and gradient, the magnetic nanocomposites can

be intentionally transported to a certain location in the human body, representing thus a suitable vehicle for the efficient delivery of drugs. Other biomedical applications include MRI contrast enhancement,^{4–6} anticancer-therapy based on magnetic hyperthermia,^{7,8} cell labelling,⁹ and separation or magnetic immobilization of enzymes and other biosubstances.^{10,11}

Silver nanoparticles (AgNPs) represent another important branch of nanotechnologists' interest. The enormous attractiveness of AgNPs is caused by their extraordinary electric,^{12,13} optical,¹⁴ catalytic,^{15,16} and antibacterial^{17–20} properties. Nowadays, antimicrobial effects of newly prepared compounds are intensively studied because of an increasing bacterial resistance against excessively and repeatedly used classical antibiotics. Elemental silver and silver salts have been used as antimicrobial agents for centuries,²¹ long before the invention of synthetically manufactured organic antibiotics. Recent studies have brought new findings concerning (i) the effect of AgNPs size and surface modification on the antibacterial action,^{17,22,23} (ii) the evaluation of AgNPs antifungal activity,^{24,25} and (iii) their toxicity against higher organisms.²⁶ Silver-based materials effectively eliminate bacteria at relatively low concentrations which are not toxic for human cells.²⁷ In addition, bacterial resistance against AgNPs has not been documented so far.

The combination of the above mentioned magnetic iron oxide and silver NPs in nanocomposites can be expected to possess

^aRegional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic. E-mail: karolina.siskova@upol.cz, zboril@prfnw.upol.cz; Fax: +420585634761; Tel: +420585634955, +420585634947

^bInstitute of Molecular and Translational Medicine, Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc, Hněvotínská 5, 775 15 Olomouc, Czech Republic

unique properties. Magnetic silver-based composites have been already prepared by different methods such as (i) the reduction of silver salts by an extra reducing agent like glucose,^{28,29} (ii) laser-based fabrication,³⁰ (iii) photoreduction in the presence of magnetic NPs,³¹ or (iv) the immobilization of AgNPs by an activated polymer which can stabilize the magnetic nanoparticles.^{32–34} These binary systems, combining the characteristics of both kinds of NPs, have been found to be applicable in surface-enhanced Raman scattering,^{35,36} in catalytic degradation of Rhodamine B,³⁷ as electrochemical sensors,³³ or as inducers of apoptosis in cancer cells.³⁸ Moreover, antibacterial and antifungal properties of this type of composite has been demonstrated.^{19,27}

Practical applications of both, iron oxides and silver NPs, typically require NP stabilization in various substrates which should hinder their aggregation induced by magnetic and/or electrostatic interactions, respectively. Several kinds of matrices have been used for the stabilization of NPs so far, *i.e.*, inorganic materials (*e.g.*, silica, gold), monomeric stabilizers (*e.g.*, surfactants, carboxylates), dendrimers or polymers (*e.g.*, dextran, alginate, polysaccharides, polyethylenimines).^{2,39} From the above mentioned matrices, polymers are of a particular interest because of many available functional groups in their structure, thus providing the platform for the immobilization of active compounds. In this regard, the potential of chitosan for developing biocompatible carriers of conventional anticancer drugs, DNA, and other therapeutically important molecules has been already well established.⁴⁰ Chitosan is a biopolymer resulting from the deacetylation of chitin, which is the second (after cellulose) most abundant natural polymer in the world. Moreover, chitosan is an environmentally friendly polyelectrolyte, which shows biocompatibility and antibacterial properties which make it appealing for several applications.^{41–44} In addition, this polymer not only serves as a stabilizer of NPs, but can also act as a reducing agent for silver ions.^{45–47}

Here, we report a green synthesis of magnetite@chitosan–silver (mCH–Ag) nanocomposites under relatively mild conditions. Special attention is given to green synthetic routes exploiting the biopolymeric matrix and the methods allowing the preparation of magnetically controllable antimicrobial polymer for targeting to an active place. As a magnetic unit of the nanocomposite, biogenic magnetite nanoparticles (bMNPs) produced by magnetotactic bacteria of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 strain were chosen due to their well defined crystallography, morphology, and narrow particle size distribution.⁴⁸ The bMNPs are produced by these bacteria as intracellular structures enveloped by an organic membrane called magnetosomes. Magnetosome membranes contain several proteins which can act as antigens and pyrogens. However, recent studies have revealed relatively high biocompatibility of this material by the determination of their acute toxicity, immunotoxicity, and cytotoxicity.⁴⁹ The bMNPs synthesis is achieved under carefully-controlled conditions over the whole process of biomineralization, ensuring the uniform shape and narrow particle size distribution of magnetite crystals.^{48,50} The resulting bMNPs have a single magnetic domain of magnetite exhibiting a strong ferrimagnetism.^{48,51} In the next step of our synthesis, chitosan (an environmentally friendly polymer) was used as a bMNPs stabilizer and, simultaneously, its presence was exploited for the reduction of silver cations towards AgNPs.

The as-prepared NPs and nanocomposites were characterized by several techniques including X-ray powder diffraction (XRD), atomic absorption spectroscopy (AAS), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), and Fourier-transform infrared absorption spectroscopy (FT-IR). Finally, we also demonstrate the antimicrobial and antifungal activity of this new mCH–Ag nanocomposite against ten different bacterial strains and four *Candida* species.

Experimental section

Materials

All chemicals including silver nitrate (Sigma-Aldrich in p.a. quality), chitosan of low molecular weight (chitosan LW, Sigma-Aldrich in p.a. quality), sodium hydroxide (p-Lab), and acetic acid (p-Lab) were used without further purification. All solutions were prepared with deionized water. *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (DSM 6361) was purchased from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Brunswick, Germany).

Preparation of biogenic magnetite nanoparticles (bMNPs)

Biogenic magnetite was obtained by an isolation of magnetosomes from *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (DSM 6361) strain and subsequent removal of natural phospholipids magnetosome membrane. The strain was cultivated under micro-aerobic conditions in a 10-L oxystat laboratory fermentor (R'Alf Plus System, Bioengineering AG, Switzerland) as described previously by Heyen and Schüler.⁵² The isolation of magnetosomes was performed according to the protocol previously described by Grunberg *et al.*⁵³ with minor modifications. The removal of magnetosome membrane and associated organic debris from magnetic cores was achieved using a treatment with NaOH. Magnetosomes kept in water dispersion (approximately 1 mg mL⁻¹) were magnetically collected, resuspended in the same volume of 5 M NaOH solution and incubated at 98 °C for 30 min. Then, the magnetic part was magnetically collected and three times washed with deionized water. The concentration of the solution was adjusted to 1 mg of magnetite per mL.

Synthesis of magnetite@chitosan hybrid (mCH hybrid)

20 mL of the solution of bMNPs were magnetically collected and subsequently resuspended in 19 mL of 1% acetic acid solution. Then, 1 mL of 1% solution of chitosan LW in 1% acetic acid was added and the suspension was sonicated by a probe sonicator (Sonopuls HD3200, sonotrode MS 73, 30W, 10× 5s pulses). The reaction mixture was shaken for additional 1 hour at 300 rpm at room temperature (Minishaker MS3, IKA) in order to allow the adsorption of polymer on the bMNPs surface. Subsequently, the suspension was dropwise added into a well-stirred 50 mL solution of 1 M NaOH. Finally, the as-prepared mCH hybrid was magnetically collected and resuspended in 15 mL of deionized water.

Synthesis of magnetic@chitosan–silver nanocomposites (mCH–Ag nanocomposites)

The pH value of a 5 mL solution of mCH hybrid (0.75 mg of magnetite per mL) was adjusted to 12 by 10 M NaOH. A freshly prepared 5 mL solution of AgNO₃ (0.25 mg mL⁻¹) was then added. The reaction mixture was sonicated by a probe sonicator (Sonopuls HD3200, sonotrode MS 73, 30W, 5 × 5s pulses) and placed in a vial to a water bath tempered at 80 °C. The reduction of silver ions was performed for additional 15 min. The vial was then taken out from the water bath and cooled down to room temperature. Finally, the nanocomposite was magnetically collected and washed with deionized water five times. In order to prepare mCH–Ag composites with different amounts of Ag, the concentration of AgNO₃ was appropriately varied, e.g., AgNO₃ solutions of 0.25, 0.5, 1 and 2 mg mL⁻¹ were used for the preparation of samples labeled as mCH–Ag1 to mCH–Ag4, respectively, keeping all the other conditions identical.

Characterization techniques

Transmission electron microscopy (TEM) images were obtained using a transmission electron microscope (JEOL JEM-2010) operating at 160 kV with a point-to-point resolution of 1.9 Å. Scanning electron microscopic (SEM) images were acquired using a Hitachi SU 6600 FEG microscope equipped with the Schottky cathode (maximum accelerating voltage of 30 kV; point-to-point resolution in secondary electrons mode (SE) 1.3 nm) and working at accelerating voltage of 15 kV. Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) measurements were performed on NORAN System 7 X-ray Microanalysis system (Thermo Scientific), where for X-ray elemental mapping images, accelerating voltage of 15 kV, working distance of 15 mm and life time 4000 s were used. For all microscopic techniques, the samples dispersed in deionized water were sonicated for ≈1 min. Then, a drop of very diluted dispersion was placed on a holey carbon-coated copper grid and allowed to dry at ambient temperature.

Fourier transform infrared (FT-IR) absorption spectra were measured on an FT-IR spectrometer iS5 Thermo Nicolet employing attenuated total reflection (ATR) on a ZnSe crystal, using 64 scans with the resolution of 2 cm⁻¹. Air-dried samples were placed directly on a ZnSe crystal and slightly pressed in order to remove any residual air containing humidity and CO₂. The IR absorption spectra are presented in transmittance after the calculation from ATR to absorbance and baseline correction. X-ray powder diffraction (XRD) patterns of all solid samples were recorded on X'Pert PRO (PANalytical, The Netherlands) instrument in Bragg–Brentano geometry with iron-filtered CoK_α radiation (40 kV, 30 mA) equipped with an X'Celerator detector, programmable divergence and diffracted beam anti-scatter slits. Magnetically pre-concentrated suspensions were dropped on a zero-background single-crystal Si slides, allowed to dry by evaporation at ambient temperature and scanned in the 2θ range of 20–105° under ambient conditions. The SRM640 (Si) and SRM660 (LaB₆) commercial standards from NIST were used for the evaluation of line positions and instrumental line broadening, respectively. The acquired patterns were processed (i.e., phase analysis and Rietveld refinement) using X'Pert HighScore Plus

software (PANalytical, The Netherlands), PDF-4+ and ICSD databases. Iron and silver concentrations were determined by the AAS technique with flame ionization using a ContrAA 300 (Analytik Jena AG, Germany) equipped with a high-resolution Echelle double monochromator (spectral band width of 2 pm at 200 nm) and with a continuum radiation source (xenon lamp). The absorption lines used for these analyses were 248.327 nm for iron and 328.068 nm for silver. The calibration standards were prepared using an Iron Standard for AAS (1001 mg L⁻¹, Fluka) and using AgNO₃ (Sigma-Aldrich, 99.8%). For AAS measurements, an aliquot of 10 μL of each sample dispersed in deionized water was added to the concentrated nitric acid in a ratio of 1 : 9, boiled for 1 hour and appropriately diluted in deionized water.

Antibacterial and antifungal assays

Antibacterial and antifungal activities of mCH hybrid and mCH–Ag composites were assessed using a standard microdilution method having been previously described in detail elsewhere.^{20,25} This method enables the determination of the minimum inhibitory concentrations (MICs) of magnetic silver nanocomposites inhibiting the growth of tested microorganisms. For the tests of the ability of nanocomposites to inhibit bacterial and yeast growth, concentrated aqueous dispersions of nanocomposites at concentrations of 400 mg L⁻¹ for mCH and mCH–Ag1, and 900 mg L⁻¹ for mCH–Ag4 were prepared. For the determination of the MIC values, the concentrations of nanocomposites were adjusted by 2 to 128 times dilution using geometrical progression. The testing of our nanocomposites and determination of MIC values were independently repeated at least twice. Since the MIC values revealed exactly the same values based on the aforementioned microdilution method, we present the results, clearly summarized in graphs, without error bars. Bacterial strains, obtained from the Czech Collection of Microorganisms (Masaryk University in Brno, Czech Republic), were used as standards: *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Escherichia coli* CCM 3954, and *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. For testing purposes, we also used bacterial strains isolated from the clinical material of patients of the University Hospital in Olomouc, Czech Republic. These strains included *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE), and ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae*. Antimycotic activity was tested using *Candida albicans* (I and II), *Candida tropicalis*, and *Candida parapsilosis* strains isolated from the blood of patients of the University Hospital in Olomouc, Czech Republic.

Results and discussion

Preparation and characterization of bMNPs and mCH hybrid

Highly uniform magnetite NPs, used as nanocarriers of chitosan, were obtained by the isolation of magnetosomes from magnetotactic bacterium of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 strain. In a nutshell, this bacterial strain is able to produce nanocrystals of magnetite arranged into chain-like structures.⁵⁴ It is

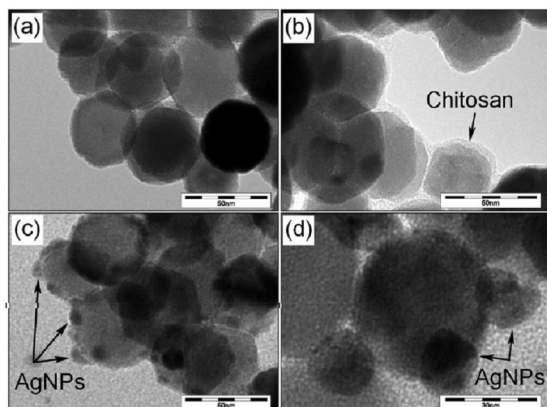


Fig. 1 TEM images of (a) bMNPs after the removal of the phospholipid membrane, (b) bMNPs covered by the chitosan-mCH hybrid, (c) nanocomposites mCH-Ag1, and (d) mCH-Ag4.

generally known that the crystals of magnetosomes have cubooctahedral shapes with an average diameter around 40 nm^{55,56} covered with a phospholipid membrane. In our procedure, this phospholipid and protein containing membrane was removed by treatment with NaOH. The efficiency of membrane removal was checked by TEM (see Fig. 1a), evidencing that no organic layer and no chain-like structure is observed after alkaline hydrolysis. These isolated biogenic magnetite particles are very uniform with sizes around 35–40 nm.

The magnetite@chitosan hybrid, mCH hybrid, was prepared by modified cross-linking methods.^{57,58} Chitosan is a biocompatible and biodegradable polymer with the presence of free amino groups which ensure its solubility. Chitosan-conjugated magnetite was obtained by the neutralization of an acidified magnetite-chitosan suspension which induced the precipitation of polymer on the NPs surface. TEM images confirmed an organic layer covering the bMNPs surface (see Fig. 1b). Chitosan thus served as a biocompatible matrix and, simultaneously, as a stabilizer of bMNPs. It can be envisaged that any kind of magnetic nanoparticle can be used instead of bMNPs due to a universal approach of the cross-linking method based on chitosan. However, we focused on the nanocomposites employing bMNPs in order to stay in green synthetic approach.

Immobilization of AgNPs by mCH hybrid, characterization of magnetic nanosilver (mCH-Ag) composites

Environmentally friendly biodegradable mCH hybrid was used for the formation and immobilization of AgNPs. Similarly, as described above in the procedure of mCH hybrid preparation, free amino groups played a key role in the reduction and immobilization of AgNPs. The alkaline medium, presence of the free amino groups of chitosan, and a temperature of 80 °C were found to be necessary for the AgNPs formation. The reduction of silver ions to AgNPs was performed by chitosan directly on the magnetite surface. It is assumed that AgNPs were immediately immobilized on the surface of the mCH hybrid because there was no significant release of AgNPs into the reaction

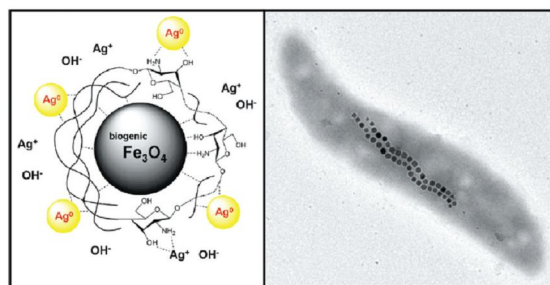


Fig. 2 The schematic representation of the synthetic procedure resulting in magnetite/chitosan/nanoAg (mCH-Ag) composite (left) and a TEM image of magnetotactic bacterium used for isolation of biogenic magnetite (right).

solution, nor during washing of the products by magnetic separation (*i.e.*, supernatants were colorless). Therefore, chitosan acted not only as a reducing agent, but also as an efficient stabilizer and linker between AgNPs and bMNPs. The schematic representation of the synthetic procedure resulting in the final biocompatible magnetite-chitosan-nanoAg (mCH-Ag) composite is depicted in Fig. 2 together with a TEM image of magnetotactic bacterium used for isolation of biogenic magnetite.

The superior aspect of the present green synthetic procedure is the possibility to control the size of silver nanoparticles simply by the concentration of AgNO₃. Four nanocomposites, labeled as mCH-Ag1 – mCH-Ag4, were prepared by varying the initial concentration of silver salt (0.25, 0.5, 1, and 2 mg mL⁻¹, respectively). TEM images of composites showed the dependence of AgNPs size on the concentration of silver salt in the reaction mixture with the average size increasing from 6 nm for mCH-Ag1 (see Fig. 1c) to 20 nm for mCH-Ag4 (see Fig. 1d).

This AgNPs size control was also confirmed by XRD data. In the XRD pattern of the as-prepared bMNPs, we have identified exclusively a crystalline magnetite, represented by narrow and symmetric diffraction peaks (see Fig. 3). The mean X-ray diffraction coherence lengths (MCL) calculated from the Rietveld refinement is equal to 32 nm. Compared to the average particle size derived from TEM images (~40 nm), it indicates that the magnetite NPs are formed by twinned crystals; *i.e.*, as previously reported by Devouard *et al.*⁵⁹ The control AgNPs prepared by the reduction of AgNO₃, exploiting chitosan, manifested themselves by having extremely broad and asymmetric diffractions in the XRD pattern (see Fig. 3). The calculated MCL value is lower than 5 nm. However, the non-Gaussian shape of the diffraction peaks indicates a rather polydisperse character of particle size distribution with some particles >10 nm. Accordingly, the diffractions of magnetite and metallic silver were also identified in the XRD patterns of all studied magnetic nanocomposites (mCH-Ag1, mCH-Ag2, mCH-Ag3, and mCH-Ag4 in Fig. 3). The four nanocomposites differ mainly in the proportion of both phases. The increasing weight content of Ag nanoparticles, varying from 18 wt% for mCH-Ag1 to 60 wt% for mCH-Ag4, is consistent with the increased amount of AgNO₃ used for nanocomposite synthesis. This is also in full accordance with the result of AAS (see Table 1). The MCL values calculated for AgNPs were found to be equal to 7, 10, 14, and 17 nm for

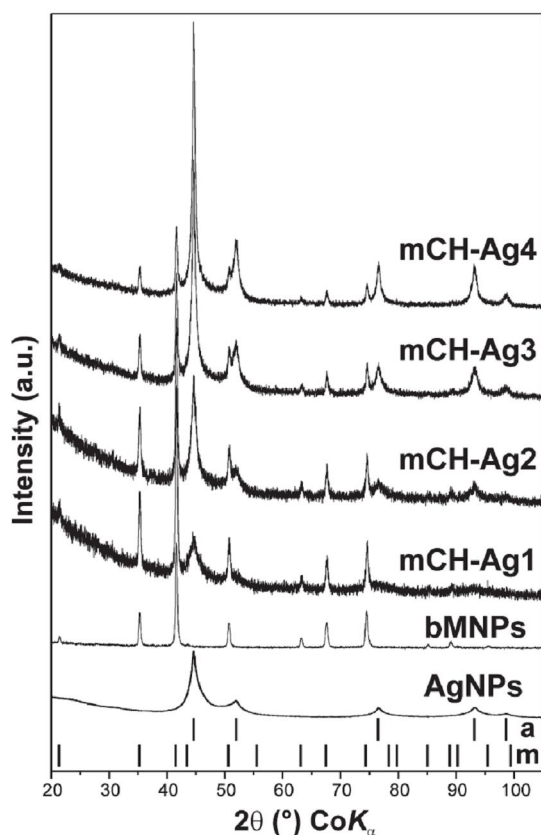


Fig. 3 X-ray powder diffraction patterns of all studied magnetite@chitosan-silver nanocomposites (mCH-Ag1, mCH-Ag2, mCH-Ag3, and mCH-Ag4) compared with reference samples of pure biogenic magnetite (bMNPs) and nanocrystalline metallic Ag (AgNPs). Theoretical positions of diffraction lines of magnetite (m) and metallic Ag (a) are also shown (PDF cards no. 01-088-0315 and 01-089-3722, respectively).

Table 1 Mutual contents of magnetite and Ag in the nanocomposites determined by AAS

| Sample | Silver content (wt%) | Magnetite content (wt%) |
|---------|----------------------|-------------------------|
| mCH-Ag1 | 18 | 82 |
| mCH-Ag2 | 29 | 71 |
| mCH-Ag3 | 45 | 55 |
| mCH-Ag4 | 60 | 40 |

samples mCH-Ag1, mCH-Ag2, mCH-Ag3, and mCH-Ag4, respectively.

The IR absorption spectra of pure chitosan, mCH hybrid and mCH-Ag4 hybrid have been measured and are shown in Fig. 4. The assignment of particular bands in the spectrum of chitosan can be performed on the basis of the literature data.^{60,61} There are only slight differences in the spectrum of chitosan presented in this work and that in the work by Shameli *et al.*⁶⁰ It should be noted that all our IR absorption spectra have been recorded on a spectrometer enabling attenuated total reflection mode and, thus,

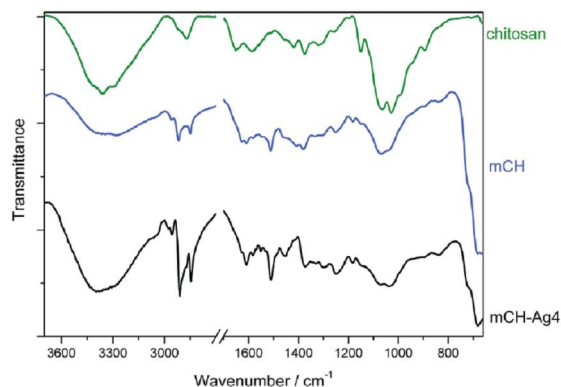


Fig. 4 FT-IR absorption spectra of chitosan, magnetite@chitosan hybrid (mCH), and magnetite@chitosan-silver nanocomposite with the highest Ag concentration (mCH-Ag4).

we can avoid any additional bands stemming from a possible interaction of chitosan with KBr and/or water molecules being absorbed by KBr during the preparation of pressed pellets. Obviously, the presence of any contaminants is also excluded by this approach. The IR absorption spectrum of mCH hybrid (see Fig. 4, mCH spectrum) reveals characteristic bands of both species, *i.e.*, magnetite ($\sim 670\text{ cm}^{-1}$),^{62,63} as well as chitosan (CH, CO, CN, NH, and OH stretching and deformation vibrations).⁶⁰ In comparison to the spectrum of pure chitosan, the relative intensities of the CH stretching vibrations ($2900\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$) is increased in the spectrum of the mCH hybrid. On the contrary, the OH and/or NH ($3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) and C-O ($1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$) stretching vibrations relatively decreased in intensity. This can be related to the fact that chitosan preferentially interacts with the bMNP surface *via* its OH and/or NH groups. Upon the adsorption on bMNPs, several chitosan bands shift to lower wavenumbers as is seen in the spectrum of the mCH hybrid. Moreover, a new band occurs at $\sim 1520\text{ cm}^{-1}$. This can be attributed to a shifted deformation vibration either of OH, or NH groups upon adsorption on the surface of bMNPs. A very similar shift has been observed by Shameli *et al.*⁶⁰ when they adsorbed chitosan on montmorillonite, which they assigned it to the NH deformation band. The last band, which deserves our attention even if it is rather weak, is positioned at 1730 cm^{-1} in the spectrum of mCH hybrid (see Fig. 4, mCH spectrum). This band is completely missing in the spectrum of pure chitosan (see Fig. 4, chitosan spectrum). Usually, the IR absorption in this region is related to the presence of a C=O vibration.⁶⁴ Therefore, it can be assumed that at least some of the ends of chitosan polymeric chains have opened their hemi-acetal structure upon adsorption on magnetite bMNP surface (possibly for energy gain reasons). The results derived from the IR absorption spectrum of mCH hybrid thus confirms the fact that chitosan serves as a matrix covering bMNPs.

The IR absorption spectrum of the final mCH-Ag4 nanocomposite (see Fig. 4, spectrum mCH-Ag4) reveals a very similar spectral pattern to that of the mCH hybrid (see Fig. 4, spectrum mCH) at first glance. However, there are at least three distinct differences which will be further discussed in details. First, the

relative intensity of the magnetite band in the spectrum of mCH–Ag4 is lower than that observed in the spectrum of the mCH hybrid; the other vibrations stemming from chitosan molecules adsorbed on the surface of bMNPs are increased in relative intensities in mCH–Ag4. This can be explained by the presence of AgNPs in mCH–Ag4, as AgNPs are known to be responsible for enhanced optical processes, such as absorption and scattering.⁶⁵ Taking into account that chitosan molecules, acting as reducing agents and consequently as linkers between AgNPs and bMNPs, are in close contact with the AgNPs, their vibrations will be more enhanced than those of magnetite.

The second distinct difference between the mCH–Ag4 composite and mCH hybrid IR absorption spectra includes the appearance of two new bands, positioned at 1610 and 1450 cm^{-1} and increased absorption in the regions of 1550–1500 and 1400–1200 cm^{-1} for mCH–Ag4. The former could be attributed to carboxyl asymmetric and symmetric stretching vibrations, respectively,⁶⁶ while the latter may correspond to asymmetric and symmetric stretching vibrations of $-\text{NO}_2$ group on aliphatic chains.⁶⁴ Considering the results of TEM and XRD, which provides evidence that silver ions are reduced by chitosan resulting in the formation of AgNPs, it can be assumed that the reduction of silver cations leads to a simultaneous partial oxidation of the available amino and carbonyl groups of chitosan adsorbed on the surface of the bMNPs. Therefore, nitro and carboxyl groups are detected in the IR absorption spectrum of mCH–Ag4. Interestingly, the oxidation of carbonyls to carboxyl groups of adsorbed chitosan is, to a certain extent, similar to that of glucose in the course of Ag nanoparticles preparation as spectroscopically evidenced in the electronic supplementary information (ESI) of Siskova *et al.*⁶⁷ The last significant difference in the IR absorption spectrum of mCH–Ag4 when compared to that of mCH hybrid (see Fig. 4) mainly lies in the splitting of CH stretching vibrations. The splitting is most probably induced by the cancellation of CH vibrational state degeneration, which implicitly corroborates the vicinity of another species interacting with chitosan, *i.e.*, AgNPs.

In order to check the uniformity of the AgNP distribution in the mCH–Ag composites, and on special request of a referee, we have performed elemental mapping for Fe, O, Ag together with SEM imaging. The resulting distribution of elements is shown for the mCH–Ag4 sample as an example in Fig. 5.

In summary, the above-mentioned TEM, SEM, EDS, XRD, AAS, and FT-IR data show that the developed green synthetic procedure leads to well defined magnetic silver nanocomposite with a superior possibility to control the size and content of silver nanoparticles through the concentration of AgNO_3 . The strong magnetic response of all nanocomposites is demonstrated on photographs in Fig. 6.

Antibacterial and antifungal testing of mCH hybrid and mCH–Ag nanocomposites

Antibacterial and antifungal activities of the synthesized mCH hybrid, mCH–Ag1 and mCH–Ag4 nanocomposites were investigated by using the standard microdilution method, determining minimum inhibitory concentrations (MIC) of the magnetic silver nanocomposites leading to a growth inhibition of tested bacterial

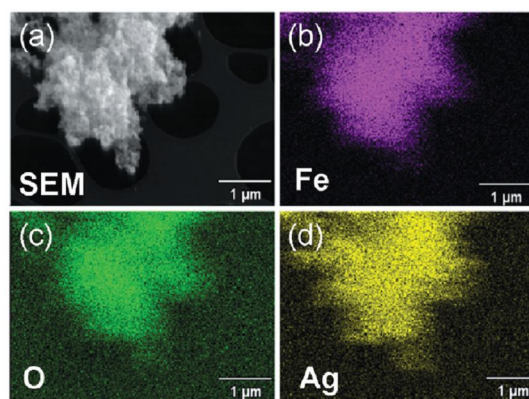


Fig. 5 SEM image and X-ray elemental mapping of mCH–Ag4 nano-composite; (a) SEM image and elemental mapping of (b) iron (Fe), (c) oxygen (O), and (d) silver (Ag).

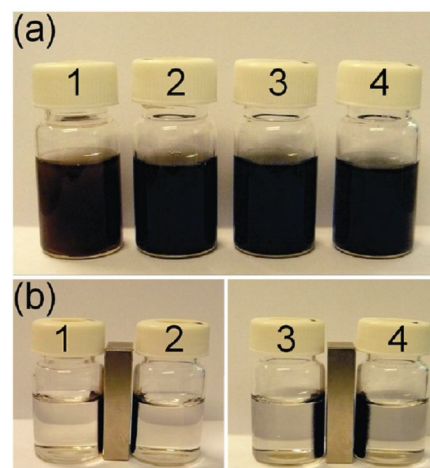


Fig. 6 Demonstration of magnetic response of mCH–Ag nanocomposites on an external magnetic field: mCH–Ag1, mCH–Ag2, mCH–Ag3, and mCH–Ag4 nanocomposites (labeled as 1 to 4, respectively) (a) without applied external magnetic field and (b) in the presence of an external magnet.

strains and *Candida* species. The ability of the nanocomposites to inhibit the growth of the tested strains is shown in Fig. 7. From the MIC values, it is evident that both nanocomposites (mCH–Ag1 as well as mCH–Ag4) significantly inhibited the growth of the tested microorganisms. On the contrary, the mCH hybrid does not show any antibacterial and antifungal activity for any microorganisms at the highest tested concentration (400 mg L^{-1}).

The low values of MIC (see Fig. 7a) which corresponds to the total mass of nanocomposites, range between 7.0 and 50 mg L^{-1} depending on the bacterial strain, and manifests a high antimicrobial effect against the selected strains. The mutual comparison of both nanocomposites revealed that the slightly lower values of MIC for mCHAg-4 could be caused by a higher concentration of silver in the composite. However, the MIC value was

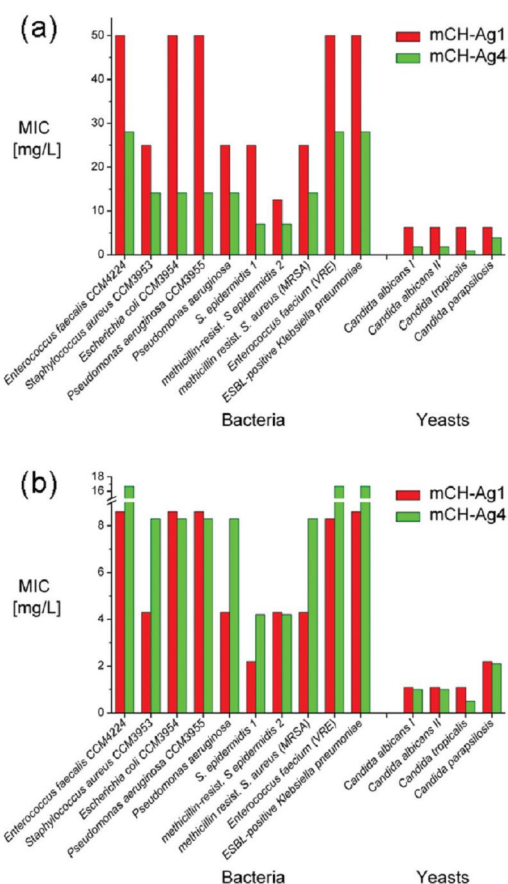


Fig. 7 (a) Minimum inhibitory concentrations (MIC) and (b) Ag-related MIC values of magnetite@chitosan-silver nanocomposites (mCH-Ag1 and mCH-Ag4) determined against selected bacteria and yeasts.

recalculated exclusively to the Ag content in the respective nanocomposite (see Fig. 7b), and was found to be twice as low as that observed for mCH-Ag1 compared to mCH-Ag4. It is evidently due to the smaller AgNP sizes in this composite (7 nm) in comparison with mCH-Ag4 (17 nm). Thus, it turns out that the antibacterial activity of AgNPs in the nanocomposites can be dependent on their size, which is similar to what has been observed previously,^{27,68,69} while the total MIC values of composites are dependent both on the silver size and loading. The MIC values of the two nanocomposites determined for yeast fall into the range from 0.9 mg L⁻¹ to 12.6 mg L⁻¹ (see Fig. 7a). The higher antifungal activity of mCH-Ag4 in comparison with mCH-Ag1 was also observed and could be caused by a higher concentration of silver in this sample, as explained in the case of the antibacterial activity. Regarding Ag-related MIC values of these two nanocomposites (see Fig. 7b), their antifungal activities were comparable and no differences, which were dependent on the size of the particles, were observed. This observation is in direct contrast to the antibacterial activity of nanocomposites considering Ag-related MIC values. The discrepancy in the trends of Ag-

related MIC values in tests of antibacterial and antifungal activities can be caused by (i) the differences in cell membranes of bacteria and yeasts, and (ii) the mode of action of AgNPs as described earlier.¹⁷

The above discussed data reflects the high antimicrobial and antifungal effects of both nanocomposites. It should be emphasized that the antimicrobial effects of our nanocomposites are even comparable to those of colloidal silver dispersions.²⁰ Only a few magnetic nanocomposites with such a high antibacterial activity have been reported in the literature so far.^{19,27} However, it should be remembered that Prucek *et al.*²⁷ described a synthetic procedure for magnetic nanocomposites based on AgNPs prepared from silver salt by the reduction with maltose in the presence of magnetic NPs, namely γ -Fe₂O₃ and Fe₃O₄. The MIC values acquired for both nanocomposites fall into the range between 15.6–125 mg L⁻¹ in the case of bacteria and 1.9–31.3 mg L⁻¹ in the case of yeasts, which are higher than the MIC values of the nanocomposites prepared by the totally green synthesis as presented in this work. Furthermore, Dallas *et al.*¹⁹ described the preparation, antibacterial and antifungal activity of nanocomposites consisting of maghemite NPs (γ -Fe₂O₃) and AgNPs incorporated into a multifunctional phosphotriazine matrix (which also acts as a reduction agent). The range of MIC values of this nanocomposite is between 78–150 mg L⁻¹, depending on the strain.¹⁹ Also in this case, the magnetic composite prepared using non-biocompatible linker,¹⁹ gave MIC values several times higher than those found for the mCH-Ag nanocomposites prepared by the procedure described in the present work.

To sum up this section, our mCH-Ag nanocomposites are the first magnetically-driven chitosan-based silver nanocomposites which are prepared by a green synthesis with controllable silver NPs size and content and, at the same time, were highly active against bacteria and yeasts.

Conclusions

The simple and well-controllable method exploiting green synthesis has been developed for the formation of bifunctional antimicrobial nanocomposites consisting of biogenic magnetite, silver NPs, and a chitosan-based biopolymeric matrix. The main advantages of the new preparation procedure are as follows: (i) the use of biogenic magnetite with uniform shape and size; (ii) absence of any additional agents required for Ag reduction; (iii) relatively mild conditions of the reduction; and (iv) targeted synthesis of silver nanoparticles that results in their size and content control realized simply by adjusting the initial concentration of silver salt in the reaction mixture. Chitosan plays a triple role in the developed green synthesis of the nanocomposites, *i.e.*, it creates a biocompatible matrix around the biogenic magnetite NPs, acts as an *in situ* reducing agent and a template for anchoring both, magnetite and silver NPs. As a result, the prepared nanocomposites reveal very high efficiencies (even comparable with dispersions of AgNPs) against a wide range of bacterial strains and *Candida* species, thus representing that the materials are applicable for magnetically-driven targeted antimicrobial treatment in biomedicine.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support by the Operational Program Research and Development for Innovations – European Regional Development Fund (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058 and CZ.1.05/2.1.00/01.0030 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic), Operational Program Education for Competitiveness – European Social Fund (project CZ.1.07/2.3.00/20.0017 and CZ.1.07/2.3.00/20.0056 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic), the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (KAN115600801) and Czech Science Foundation (project no. GAP304/10/55). K. Šišková thanks the Grant Agency of the Czech Republic (project P108/11/P657) for financial support. The work was further supported by the Student Project no. PrF_2012_028 and no. LF_2012_006 of Palacký University in Olomouc.

Notes and references

- 1 R. Hao, R. Xing, Z. Xu, Y. Hou, S. Gao and S. Sun, *Adv. Mater.*, 2010, **22**, 2729.
- 2 S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2064.
- 3 A. K. Gupta and M. Gupta, *Biomaterials*, 2005, **26**, 3995.
- 4 M. V. Yigit, L. Zhu, M. A. Ifediba, Y. Zhang, K. Carr, A. Moore and Z. Medarova, *ACS Nano*, 2011, **5**, 1056.
- 5 K. Kluchová, R. Zbořil, J. Tuček, M. Pečová, L. Zajoncová, I. Šafařík, M. Mashlan, I. Marková, D. Jančík, M. Šebela, H. Bartoňková, V. Bellesi, P. Novák and D. Petridis, *Biomaterials*, 2009, **30**, 2855.
- 6 Y. W. Jun, Y. M. Huh, J. S. Choi, J. H. Lee, H. T. Song, S. Kim, S. Yoon, K. S. Kim, J. S. Shin, J. S. Suh and J. Cheon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 5732.
- 7 K. Hayashi, M. Moriya, W. Sakamoto and T. Yogo, *Chem. Mater.*, 2009, **21**, 1318.
- 8 J. P. Fortin, C. Wilhelm, J. Servais, C. Ménager, J. C. Bacri and F. Gazeau, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 2628.
- 9 C. Wilhelm and F. Gazeau, *Biomaterials*, 2008, **29**, 3161.
- 10 M. M. Gijs, F. Lacharme and U. Lehmann, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 1518.
- 11 Z. Saiyed, S. Telang and C. Ramchand, *BioMagn. Res. Technol.*, 2003, **1**, 2.
- 12 B. K. Kuila, A. Garai and A. K. Nandi, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 5443.
- 13 M. Haw, *Nature*, 2003, **422**, 556.
- 14 R. C. Jin, Y. C. Cao, E. C. Hao, G. S. Metraux, G. C. Schatz and C. A. Mirkin, *Nature*, 2003, **425**, 487.
- 15 J. N. Solanki and Z. V. P. Murthy, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2011, **50**, 12311.
- 16 A. Roucoux, J. Schulz and H. Patin, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 3757.
- 17 M. Stefan, S. Marius, L. Hritcu, H. Lucian, M. Mihasan, M. Marius, D. Pricop, P. Daniela, I. Gostin, G. Irina, R. I. Olariu, O. Romeo-Iulian, S. Dunca, D. Simona, V. Melnig and M. Viorel, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2011, **22**, 789.
- 18 M. Banerjee, S. Mallick, A. Paul, A. Chattopadhyay and S. S. Ghosh, *Langmuir*, 2010, **26**, 5901.
- 19 P. Dallas, R. Zbořil, A. B. Bourlinos, D. Jančík, D. Niarchos, A. Panáček and D. Petridis, *Macromol. Mater. Eng.*, 2010, **295**, 108.
- 20 A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolář, R. Večerová, N. Pizúrová, V. K. Sharma, T. Nevečná and R. Zbořil, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 16248.
- 21 A. Searle, *The Use of Colloids in Health and Disease*, Constable & Co., London, UK, 1920, p. 67.
- 22 P. Dallas, V. K. Sharma and R. Zbořil, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2011, **166**, 119.
- 23 S. Tripathi, G. K. Mehrotra and P. K. Dutta, *Bull. Mater. Sci.*, 2011, **34**, 29.
- 24 B. Chudasama, A. K. Vala, N. Andhariya, R. V. Upadhyay and R. V. Mehta, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2011, **323**, 1233.
- 25 A. Panáček, M. Kolář, R. Večerová, R. Prucek, J. Soukupová, V. Kryštof, P. Hamal, R. Zbořil and L. Kvítek, *Biomaterials*, 2009, **30**, 6333.
- 26 A. Panáček, R. Prucek, D. Šafařová, M. Dittrich, J. Richtrova, K. Beničková, R. Zbořil and L. Kvítek, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, **45**, 4974.
- 27 R. Prucek, J. Tuček, M. Kilianová, A. Panáček, L. Kvítek, J. Filip, M. Kolář, K. Tománková and R. Zbořil, *Biomaterials*, 2011, **32**, 4704.
- 28 E. Iglesiassilva, J. Rivas, L. Leonisidro and M. Lopezquintela, *J. Non-Cryst. Solids*, 2007, **353**, 829.
- 29 M. Mandal, S. Kundu, S. K. Ghosh, S. Panigrahi, T. K. Sau, S. M. Yusuf and T. Pal, *J. Colloid Interface Sci.*, 2005, **286**, 187.
- 30 R. Zamiri, B. Z. Azmi, M. G. Naseri, H. A. Ahangar, M. Darroudi and F. K. Nazarpour, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.*, 2011, **105**, 255.
- 31 D. Cheng, X. Zhou, H. Xia, H. Sze and O. Chan, *Chem. Mater.*, 2005, **17**, 3578.
- 32 M. Garza-Navarro, A. Torres-Castro, V. González, U. Ortiz and E. de la Rosa, *J. Solid State Chem.*, 2010, **183**, 99.
- 33 Z. Liu, B. Zhao, Y. Shi, C. Guo, H. Yang and Z. Li, *Talanta*, 2010, **81**, 1650.
- 34 A. M. Signori, K. D. O. Santos, R. Eising, B. L. Albuquerque, F. C. Giacomelli and J. B. Domingos, *Langmuir*, 2010, **26**, 17772.
- 35 H. Hu, Z. Wang, L. Pan, S. Zhao and S. Zhu, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**, 7738.
- 36 K. Kim, J. Y. Choi, H. B. Lee and K. S. Shin, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2010, **2**, 1872.
- 37 C. Jiang, M. Chen, S. Xuan, W. Jiang and X. Gong, *Can. J. Chem.*, 2009, **87**, 502.
- 38 P. Sanpui, A. Chattopadhyay and S. S. Ghosh, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2011, **3**, 218.
- 39 L. Kvítek, J. Soukupová, R. Večerová, R. Prucek, M. Holecová and R. Zbořil, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 5825.
- 40 M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite and E. Chiellini, *Prog. Polym. Sci.*, 2011, **36**, 981.
- 41 J. Gao, H. Gu and B. Xu, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 1097.
- 42 Q. Gan and T. Wang, *Colloids Surf., B*, 2007, **59**, 24.
- 43 D. H. Kim, I. B. Shim, M. H. Lee and Y. Lee, *Curr. Appl. Phys.*, 2006, **1**, 242.
- 44 H. Yi, L. Q. Wu, W. E. Bentley, R. Ghodssi, G. C. Rubloff, J. N. Culver and G. F. Payne, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 2881.
- 45 A. Murugadoss and A. Chattopadhyay, *Nanotechnology*, 2008, **19**, 015603.
- 46 Y. K. Twu, Y. W. Chen and C. M. Shih, *Powder Technol.*, 2008, **185**, 251.
- 47 H. Gu, Z. Yang, J. Gao, C. K. Chang and B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 34.
- 48 D. Faivre and D. Schüler, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 4875.
- 49 J. Sun, T. Tang, J. Duan, P. X. Xu, Z. Wang, Y. Zhang, L. Wu and Y. Li, *Nanotoxicology*, 2010, **4**, 271.
- 50 C. Lang, D. Schüler and D. Faivre, *Macromol. Biosci.*, 2007, **7**, 144.
- 51 I. A. Banerjee, L. Yu, M. Shima, T. Yoshino, H. Takeyama, T. Matsunaga and H. Matsui, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2005, **17**, 1128.
- 52 U. Heyen and D. Schüler, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **61**, 536.
- 53 K. Grünberg, E. C. Müller, A. Otto, R. Reszka, D. Linder, M. Kube, R. Reinhardt and D. Schuler, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 1040.
- 54 D. Schüler, *Int. Microbiol.*, 2002, **5**, 209.
- 55 A. Fischer, M. Schmitz, B. Aichmayer, P. Fratzi and D. Faivre, *J. R. Soc. Interface*, 2011, **8**, 1011.
- 56 M. Pósfai and R. E. Dunin-Borkowski, in *Microbiology Monographs*, ed. D. Schüler, Springer, Berlin, Germany, 2006, Vol. 3, p. 198.
- 57 V. Belessi, R. Zbořil, J. Tuček, M. Mashlan, V. Tzitzios and D. Petridis, *Chem. Mater.*, 2008, **20**, 3298.
- 58 H. Honda, A. Kawabe, A. Shinkai and T. Kobayashi, *J. Ferment. Bioeng.*, 1998, **86**, 191.
- 59 B. Devouard, M. Postfai, X. Hua, D. A. Bazylinski, R. B. Frankel and P. R. Buseck, *Am. Mineral.*, 1998, **83**, 1387.
- 60 K. Shameili, M. Bin Ahmad, M. Zargar, W. M. Z. W. Yunus, N. A. Ibrahim, P. Shabanzadeh and M. G. Moghaddam, *Int. J. Nanomed.*, 2011, **6**, 271.
- 61 E. Günster, D. Pestreli, C. H. Ünlü, O. Atici and N. Güngör, *Carbohydr. Polym.*, 2007, **67**, 358.
- 62 M. H. Sousa, F. A. Tourinho and J. C. Rubim, *J. Raman Spectrosc.*, 2000, **31**, 185.
- 63 P. Cambier, *Clay Miner.*, 1986, **21**, 191.
- 64 *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, ed. J. Lindon, G. E. Tranter and D. Koppelaar, Academic Press, Cambridge, UK, 2000, p. 1037.

-
- 65 E. Le Ru and P. Etchegoin, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1st edn, 2008, p. 121.
- 66 K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, Wiley Inc., Hoboken, New Jersey, U.S.A., 2009, p. 64.
- 67 K. Šišková, O. Bečička, V. Mašek, K. Šafářová and R. Zbořil, *J. Raman Spectrosc.*, 2012, **43**, 689.
- 68 C. Baker, A. Pradhan, L. Pakstis, D. J. Pochan and S. I. Shah, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2005, **5**, 244.
- 69 J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez and M. J. Yacaman, *Nanotechnology*, 2005, **16**, 2346.

7.4 Příloha 4

Z. Marková, K. Šišková, J. Filip, J. Čuda, M. Kolář, K. Šafářová, I. Medřík, R. Zbořil:

Air stable magnetic bimetallic Fe-Ag nanoparticles for advanced antimicrobial treatment and phosphorus removal.

Environ. Sci. Technol., 47, 5285–5293 (2013)

Air Stable Magnetic Bimetallic Fe–Ag Nanoparticles for Advanced Antimicrobial Treatment and Phosphorus Removal

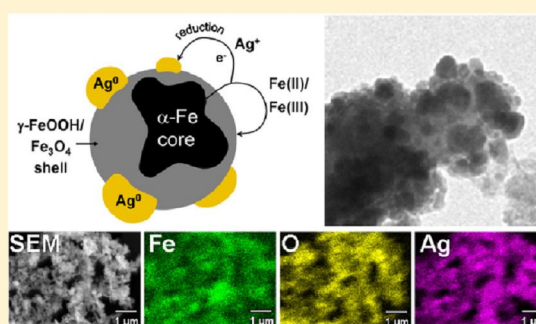
Zdenka Marková,[†] Karolína Machalová Šišková,^{*,†} Jan Filip,[†] Jan Čuda,[†] Milan Kolář,[‡] Klára Šafářová,[†] Ivo Medřík,[†] and Radek Zbořil^{*,†}

[†]Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Departments of Physical Chemistry and Experimental Physics, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

[‡]Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Hněvotínská 3, 771 46 Olomouc, Czech Republic

S Supporting Information

ABSTRACT: We report on new magnetic bimetallic Fe–Ag nanoparticles (NPs) which exhibit significant antibacterial and antifungal activities against a variety of microorganisms including disease causing pathogens, as well as prolonged action and high efficiency of phosphorus removal. The preparation of these multifunctional hybrids, based on direct reduction of silver ions by commercially available zerovalent iron nanoparticles (nZVI) is fast, simple, feasible in a large scale with a controllable silver NP content and size. The microscopic observations (transmission electron microscopy, scanning electron microscopy/electron diffraction spectroscopy) and phase analyses (X-ray diffraction, Mössbauer spectroscopy) reveal the formation of Fe₃O₄/γ-FeOOH double shell on a “redox” active nZVI surface. This shell is probably responsible for high stability of magnetic bimetallic Fe–Ag NPs during storage in air. Silver NPs, ranging between 10 and 30 nm depending on the initial concentration of AgNO₃, are firmly bound to Fe NPs, which prevents their release even during a long-term sonication. Taking into account the possibility of easy magnetic separation of the novel bimetallic Fe–Ag NPs, they represent a highly promising material for advanced antimicrobial and reductive water treatment technologies.



INTRODUCTION

Contamination of the environment is one of the most threatening problems afflicting people.¹ Besides the pollutants such as heavy metals, halogenated organics, and pesticides which are not biodegradable and exhibit toxicological and carcinogenic effects, a large variety of microorganisms including disease causing pathogens as, for example, bacteria (*Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*), protozoa (*Giardia lamblia*), fungi (*Candida* spp.), and viruses (hepatitis A virus) pose a great threat.² Over the past ten years, numerous studies have been undertaken to investigate methods and techniques for inactivation and removal of hazardous compounds. New materials containing active metal nanoparticles (NPs) (e.g., Fe, Ni, Pd, and Ag) exhibiting special properties have been employed as well.^{1,3}

Zero-valent iron nanoparticles (nZVI) belong to the most extensively studied nanomaterials concerning pollutant removal because they serve as cost-effective and environmentally friendly active agents.^{1,4–7} Several studies have shown that nZVI particles enable reduction, sorption, and/or both processes simultaneously when applied against a broad range of common environmental contaminants.^{5,6} However, with respect to an extremely high reactivity and large specific surface area, nZVI particles tend to react with surrounding media and

spontaneously aggregate, resulting thus in a significant loss of their reactivity.⁸ One of the strategies on how to eliminate these processes and preserve high reactivity of nZVI has been based on the preparation of bimetallic NPs. Particularly, a partial coverage of nZVI by metals like Pd, Pt, Ni, Cu, or Ag (hence metals often used for catalysis) can lead to an increase of nZVI efficiency in various applications, such as removal of inorganic pollutants and/or anthropogenic organics.^{9–23} However, to date, only a very few papers have focused on bactericidal and fungicidal activities of bimetallic NPs.^{24,25} Moreover, the NPs investigated in recent studies^{24,25} do not possess magnetic properties. Therefore, we have dealt with this topic of research and here present our results for Fe–Ag bimetallic NPs. Intentionally, we have chosen the bimetallic NPs containing Ag and nZVI because each of them, however separately, is known for its antimicrobial activity at least to some extent. We hypothesize that the conjunction of Ag and nZVI particles in bimetallic ones could induce similar or even better antibacterial and antifungal properties than each of them when used

Received: November 16, 2012

Revised: March 12, 2013

Accepted: April 16, 2013

Published: April 16, 2013

separately. Moreover, due to the presence of nZVI which has been proven to possess high magnetization values,²⁶ bimetallic NPs can be easily targeted and afterward separated by a simple magnet, i.e., they can be removed from the place of their action against bacteria and fungi. Namely, this property of magnetic bimetallic NPs enables us to better control or to completely minimize their possible side effects on the environment.

Silver nanoparticles (AgNPs) belonging to the most popular antibacterial and antifungal agents are currently employed in cosmetics, fabrics, or medical uses (e.g., coating of medical tools such as catheters, infusion systems, or medical textiles).^{27,28} There are serious concerns about their release into the environment.^{3,29–31} Although the precise bactericidal and fungicidal mode of their action is still not fully understood, several possible mechanisms have been suggested so far as reviewed by Rai et al.³² According to those mechanisms, AgNPs (i) are adsorbed onto the cell membrane surface leading thus to its permeability and respiration malfunctions,³³ (ii) induce the formation of free radicals which cause membrane damage,³⁴ or (iii) can penetrate inside the bacteria and subsequently release silver ions.^{33,35} If silver ions are released, they can inactivate proteins and/or intercalate between the purine and pyrimidine bases of DNA.³⁶

In comparison to a rather vast amount of literature concerning bactericidal and fungicidal activities of AgNPs, only a few papers have reported on antibacterial activity and toxicity of nZVI particles. Up to the current date, a strong bactericidal effect and toxicity of nZVI against both Gram-positive (*Bacillus subtilis*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*) bacteria have been proven.^{37–42} Recent studies concerning nZVI action on cyanobacteria (Gram-negative species), which pose a serious threat to water resources over the world, have revealed that nZVI particles are highly selective agents against bacteria with minimal toxicity effects on algae, daphnia, water plants, and fishes.⁴³ Similarly, no inactivation of fungi (*Aspergillus versicolor*) by nZVI has been reported by Diao et al.⁴⁰ The toxicity of nZVI is supposed to be based on both physical disruption of cell membranes and oxidative stress caused by reactive oxygen species which are the products of reaction of Fe(II) with oxygen and/or hydrogen peroxide.⁴² Freshly synthesized bare nZVI is of bactericidal character at low mg/L concentrations, but surface modifiers and aging (i.e., namely, partial surface oxidation) crucially influence (decrease) this nZVI property as has been evidenced many times in the literature.^{39,42,44}

In our effort to prepare magnetic bimetallic Fe–Ag NPs, we exploited the ability of nZVI to reduce Ag⁺ ions from solution which are then deposited in the form of Ag⁰ on the surface of nZVI.⁴⁵ In the present work, we tested various ratios of Fe:Ag and compared characteristics and properties of the prepared bimetallic NPs. The as-prepared magnetic bimetallic Fe–Ag NPs were thoroughly characterized by means of transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), atomic absorption spectroscopy (AAS), Mössbauer spectroscopy, and magnetization measurements. Aging of the magnetic bimetallic NPs stored under dry conditions and/or in aqueous dispersions was evaluated as well. Moreover, their stability and possible release of Ag under sonication were determined. Presumed antibacterial and antifungal properties of bimetallic NPs were tested on ten different bacterial strains and four *Candida* species. Finally, the ability and efficiency of bimetallic Fe–Ag NPs in removal of phosphates, which are one of nutrient sources for

growth and occurrence of cyanobacteria,⁴³ were investigated. It turns out that these novel large-scale accessible and air-stable bimetallic NPs act simultaneously as highly efficient antibacterial and antifungal agents as well as phosphate sorbents. Taking into account the possibility of their magnetic separation, these bimetallic Fe–Ag NPs are highly promising in advanced technologies of antimicrobial water treatment including waste and drinking waters.

■ MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Silver nitrate (p.a. quality) was purchased from Sigma-Aldrich, nanoscale zerovalent iron (nZVI) particles were obtained from NANOIRON, Ltd. (available as nanopowder NANOFER 25N stored under nitrogen atmosphere). All of the used suspensions were prepared with ultrapure deionized water (0.05 $\mu\text{S cm}^{-1}$, AquaOsmotic). All chemicals were used without any further purification.

For the preparation of magnetic bimetallic NPs, we have intentionally chosen the commercially available nZVI which can be prepared in a large scale. The starting nZVI particles (stored under nitrogen as delivered by the producer) were characterized by Mössbauer spectroscopy (measured under inert atmosphere in a glovebox; see the Supporting Information). The average size of nZVI particles is ~ 70 nm (based on TEM images), their specific surface area is ~ 18 m²/g (calculated from the nitrogen adsorption/desorption curve employing Brunauer–Emmett–Teller method), and the content of metallic iron is higher than 90 wt % (from the phase analysis based on the combination of X-ray powder diffraction (XRD) technique and Mössbauer spectroscopy).

Preparation of Magnetic Bimetallic NPs. Magnetic bimetallic NPs of four different Fe:Ag ratios were prepared by the following procedure: 12.5, 25, 50, or 100 mg of AgNO₃ was dissolved in 50 mL deionized water and injected into 60 mL vials covered with septum and containing 100 mg nZVI which was stored under nitrogen atmosphere before the addition of AgNO₃ solutions. The reaction mixtures were immediately sonicated by a probe sonicator (HD3200, sonotrode MS 73, 50 W, 5 \times 2 s pulses), followed by shaking at 150 rpm for 15 min. The reaction between nZVI and AgNO₃ was terminated by magnetic separation and subsequent washing (5 times) by deionized water. The samples were labeled as Fe–Ag1, Fe–Ag2, Fe–Ag3, and Fe–Ag4 according to the increasing AgNO₃ concentration in reaction mixtures. For the sake of a direct comparison, the reaction of nZVI in deionized water was also performed, i.e., without the presence of AgNO₃, under otherwise the same experimental conditions; this sample served as a reference.

Characterization Techniques. TEM images were obtained using an electron microscope of JEOL JEM-2010 type, SEM images were obtained on a Hitachi SU6600 FEG, XRD patterns of all magnetic bimetallic NPs were recorded on a PANalytical X'Pert PRO diffractometer, and iron and silver concentrations were determined by AAS technique with flame ionization using a ContraAA 300 instrument (Analytik Jena AG, Germany) equipped with a high-resolution Echelle double monochromator (see the Supporting Information for more details). A superconducting quantum interference device (SQUID, MPMS XL-7, Quantum Design) has been used for the magnetic measurements. The hysteresis loops were collected at a temperature of 300 K in external magnetic fields from -5 to $+5$ T. ⁵⁷Fe Mössbauer spectra were measured with

⁵⁷Co(Rh) source at RT. Isomer shift values are referred to the metallic iron at room temperature.

Aging of Magnetic Bimetallic NPs When Stored as Powders and/or in Aqueous Dispersions. All prepared Fe–Ag NPs were stored as both air-dried powders and aqueous dispersions under ambient atmosphere in order to determine their corrosion (oxidation) and aging. The changes of phase composition of Fe–Ag NPs induced by corrosion and aging were observed by a direct comparison of XRD results of the samples measured before and after storage for 20 days.

Stability of Magnetic Bimetallic NPs When Exposed to Sonication. The stability of the Fe–Ag NPs treated by sonication was determined by the comparison of their phase composition (namely the content of silver was checked) prior to and after the exposure to sonication for different time intervals (10–300 min). Temperature of the sample bath was not adjusted during the sonication process; thus, heating up to 80 °C was observed in the samples which were sonicated for prolonged times (above 30 min). For the sake of a direct comparison, initial ratios of Ag/Fe of all four Fe–Ag NPs are expressed in the graph as values for the sonication time equal to 0 min.

Antibacterial and Antifungal Activity. Antimicrobial activities of Fe–Ag NPs were assessed using a standard microdilution method.⁴⁶ The microdilution method enables to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the NPs inhibiting growth of tested microorganisms under aerobic conditions. For the tests of the ability of the synthesized bimetallic NPs to inhibit bacterial and yeasts growth, aqueous dispersions of Fe–Ag NPs at concentrations of 4 g/L were prepared. For the determination of MIC values, magnetic bimetallic NPs concentrations were adjusted by 2 to 128 times dilution using geometrical progression in disposable microtitration plates. The microtitration plates were then inoculated with the tested bacteria and/or yeasts at concentrations ranging from 10⁵ to 10⁶ CFU/mL. The MIC values were determined after 24 h of incubation at 37 °C. Bacterial strains obtained from the Czech Collection of Microorganisms (Masaryk University in Brno, Czech Republic) were used as standards: *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Escherichia coli* CCM 3954, and *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. For testing purposes, we also used bacterial strains isolated from the clinical material of patients of the University Hospital in Olomouc, Czech Republic. These strains included *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE), and ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae*. Antimycotic activity was tested using *Candida albicans* (I and II), *Candida tropicalis*, and *Candida parapsilosis* strains isolated from the blood of patients of the University Hospital in Olomouc, Czech Republic.

Phosphate Removal Using Magnetic Bimetallic NPs. For the determination of phosphate removal, batch experiments were carried out with 10 mg of magnetic bimetallic NPs or reference mixed with 25 mL phosphate solution (10 mg PO₄³⁻/L) in 60 mL vials. The samples were then sonicated for 1 min, immediately followed by thermostat shaking at 80 rpm and 25 °C for up to 5 days. Two milliliter aliquots were collected from each sample at the beginning of the batch experiments and also in the following intervals counted from the moment of mixing: 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 24, 48, 72, 96, and 120 h. In each particular time interval, solid phases were magnetically removed and only

supernatant solutions were used to determine phosphate concentrations exploiting the spectrophotometric method at $\lambda = 880$ nm (UV–vis spectrophotometer Lightwave II), which is based on ascorbic acid reaction.⁴⁷ Deionized water served as a blank sample in UV–vis absorption measurements in 1 cm cuvettes.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of Fe–Ag NPs. It is well-known that nZVI particles represent a strong reductant with a very high removal efficiency (>99%) of metal ions (e.g., Cu, Ag, and Hg) possessing standard electrode potentials E^0 substantially higher than that of iron (–0.41 V).⁴⁵ In our case, we reduced silver ions dissolved in aqueous solution by commercially available nZVI particles. As a reference sample, we used nZVI particles dispersed simply in water (i.e., in the absence of silver ions) under otherwise the same conditions. During the reduction of Ag⁺ ions in aqueous solution, nZVI is at least partially oxidized and iron oxides and/or oxyhydroxides are produced.^{5,45}

For the sake of clarity, in Figure 1, we show cake-graphs (based on XRD measurements) together with morphologies (visualized by TEM) of the as-prepared samples. In XRD patterns (Figure S1 in the Supporting Information), we have identified four crystalline phases in the prepared bimetallic Fe–Ag samples as summarized in Table S1 in the Supporting Information: metallic silver (Ag⁰), zerovalent iron (α -Fe), lepidocrocite (γ -FeOOH), and maghemite or magnetite (Fe₂O₃/Fe₃O₄). The last mentioned phase is difficult to be distinguished using XRD alone. Therefore, Mössbauer spectroscopy has been used to confirm the presence of α -Fe, γ -FeOOH, and magnetite in selected Fe–Ag samples as well as in the reference (Figure S2, Table S2, and Table S3 in the Supporting Information). Interestingly, comparing the results based on XRD analysis (Figure S1 and Table S1 in the Supporting Information) with those obtained by Mössbauer spectroscopy (Figure S2, Table S2, and Table S3 in the Supporting Information), there is a distinct difference in the absence and/or presence of FeOOH, respectively. It is certainly caused by nearly amorphous character of this iron-bearing phase, which is detectable by XRD with difficulties.⁴⁸ The occurrence of an amorphous (in the reference) and/or crystalline (in the Fe–Ag samples) FeOOH may be induced by changes in ionic strength and pH value when AgNO₃ (employed as silver ions source) is present in the aqueous solution into which nZVI particles are introduced from an inert atmosphere. According to the quantitative XRD analysis, the content of Ag⁰ rises with the increasing concentration of AgNO₃. Simultaneously, with an increasing content of silver (going from Fe–Ag1 to Fe–Ag4), the contents of iron-bearing phases decrease as it can be clearly seen in Figure 1a and results from XRD and AAS analyses. The values of mean XRD coherence lengths (MCL) calculated from the Rietveld refinement for Ag⁰ in particular samples are given in Table S4 in the Supporting Information. Obviously, the size of AgNPs increases with an increasing concentration of silver ion source in the reaction mixture (Table S4 in the Supporting Information). The same result is corroborated by a direct observation of AgNPs by TEM (Figure 1b). Moreover, TEM images (Figure 1b) reveal different morphologies and spatial arrangements of iron- and silver-bearing phases in the Fe–Ag samples in comparison to the reference. While the morphology of the reference manifests itself by a thin iron oxide shell (formed by nZVI oxidation in water) on metallic Fe⁰ core; a

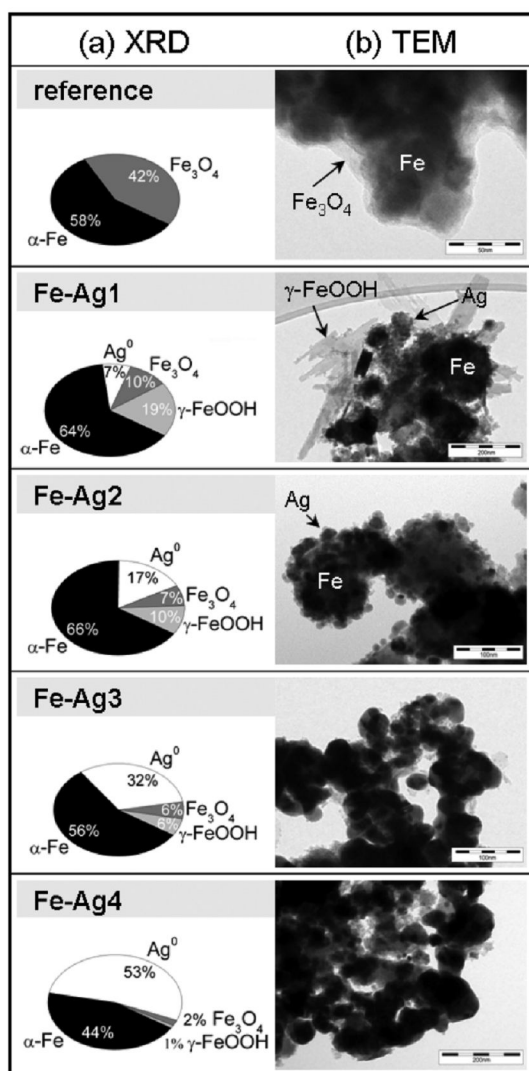


Figure 1. (a) Cake-graphs illustrating the phase composition based on XRD analysis: metallic silver (Ag^0), zerovalent iron (α -Fe), lepidocrocite (γ -FeOOH), and magnetite (Fe_3O_4); and (b) TEM images of reference (partially oxidized nZVI) and Fe–Ag bimetallic NPs.

needle-shaped ferric oxy-hydroxides and almost spherical metallic AgNPs can be clearly distinguished on the surface of nZVI of Fe–Ag samples (Figure 1b). Schematic illustration of the bimetallic NPs structure based on the above-mentioned results is shown in Figure 2a. The uniformity of AgNPs distribution on Fe surface was confirmed by elemental mapping for Fe, O, and Ag. The resulting distribution of elements was found to be uniform as shown in Figure 2b.

Last, but not least, we have measured macroscopic magnetic properties of the as-prepared Fe–Ag NPs. At this place, it should be pointed out that saturation magnetization of the nZVI particles is typically reached at a magnetic field of ~ 1 T, exhibiting a strong magnetic response at low applied magnetic fields (Figure S3 and Table S5 in the Supporting Information). Indeed, saturation magnetization of nZVI particles is three times higher than that of magnetite of a comparable particle

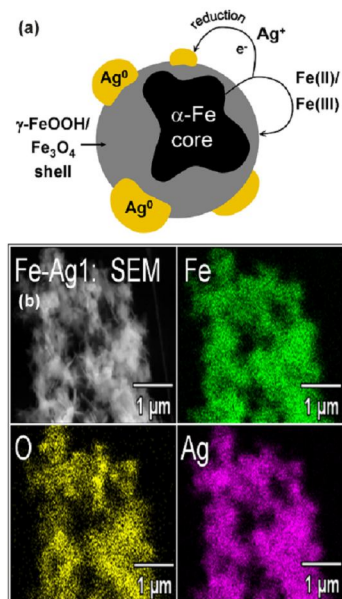


Figure 2. (a) Schematic illustration of bimetallic Fe–Ag NPs and (b) SEM image and X-ray elemental mapping (iron (Fe), oxygen (O), and silver (Ag)) of Fe–Ag1.

size. Thus, a simple hand magnet can be employed in order to magnetically separate nZVI particles from a solution. Since the as-prepared Fe–Ag NPs contain diamagnetic parts (AgNPs), the saturation magnetization is expected to be of a lower value than that of starting nZVI particles. This assumption has been confirmed (Figure S3 in the Supporting Information) and saturation magnetization of Fe–Ag1 and Fe–Ag4 revealed the values of 123.5 and 107.6 $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. The reference has also been measured and its saturation magnetization reached a value of 142.9 $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$, which is slightly lower than that of starting nZVI particles. The lowering of saturation magnetization in the reference can be induced by the presence of (super)paramagnetic shell formed by ferric oxyhydroxide (as detected by Mössbauer spectroscopy).

Aging of Fe–Ag NPs Stored as Dry Powders and/or Aqueous Dispersions. In order to quantify the changes of phase composition of all studied magnetic bimetallic NPs upon storage under two different conditions, i.e., (i) kept in a dry state in air or (ii) dispersed in deionized water, we have characterized the series of aged samples by XRD technique (Figure S1 and Table S1 in the Supporting Information).

The phase composition of the Fe–Ag NPs as well as the reference stored as dry powders in air for 21 days remained unchanged when compared to the freshly prepared ones (Table S1 in the Supporting Information). It indicates that the oxide/oxyhydroxide ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma$ -FeOOH) shell and AgNPs generated on Fe^0 core cause its effective passivation and protection against a further oxidation when stored in air. Interestingly, no oxidation of AgNPs has been observed since the mean particle size determined from the Rietveld refinement is maintained on the same value (Table S4 in the Supporting Information).

On the other hand, the samples stored in water for the same period of time were significantly oxidized (Table S1 in the Supporting Information); the content of metallic iron decreased with a simultaneous increase of the iron oxides

content. The content of Ag^0 also slightly lowered, particularly for the Fe–Ag3 and Fe–Ag4 samples (Table S1 in the Supporting Information); however, this is most probably caused by an increase in the total mass of bimetallic NPs due to oxidation. The mean particle size (based on the Rietveld refinement) of metallic silver remained constant (Table S4 in the Supporting Information).

It can be thus summed up that the magnetic bimetallic NPs are stable when stored as dry powders in air; however, they remain reactive in water environment. This fact is of a paramount importance for water treatment applications of bimetallic NPs.

Stability of Fe–Ag NPs when Exposed to Sonication.

Presumably, the reaction of silver ions with nZVI in water involves two processes: reduction and adsorption.⁴⁵ To determine a possible silver release from magnetic bimetallic NPs, we have exposed the samples to intensive sonication. The time-dependence of mutual Ag:Fe ratio for Fe–Ag NPs is shown in Figure 3a. From a direct comparison of untreated and

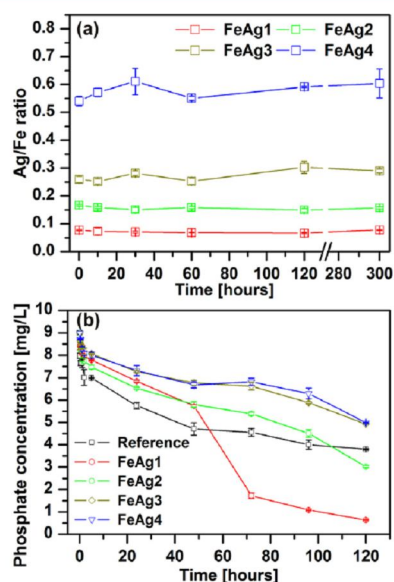


Figure 3. (a) Determination of Ag release from Fe–Ag NPs exposed to sonication expressed as dependence of Ag/Fe ratio on sonication time and (b) phosphate removing by bimetallic Fe–Ag NPs and/or reference sample (partially oxidized nZVI) from solutions with the initial phosphate concentration of 10 mg/L determined as residual PO_4^{3-} concentrations in time.

sonication-treated variants of the same sample (Figure 3a), the strong adsorption of silver onto nZVI surface and almost no release of Ag are evidenced for all four samples. Even in the case of Fe–Ag4 where the silver content is extremely high (53% of dry weight), the changes of mutual Ag:Fe ratio expressed as a function of sonication time are within the experimental error (Figure 3a). Moreover, it should be emphasized that a spontaneous heating of the samples during the sonication procedure had no effect on a possible Ag release. These results confirm a rather strong sorption capacity of nZVI for silver and, in other words, a high stability of magnetic bimetallic Fe–Ag NPs against sonication. This indicates a suppressed release of silver from Fe–Ag NPs during their

application and consequent magnetic separation, which is very important from an environmental viewpoint.

Phosphate Removal Using Magnetic Bimetallic NPs.

The ability of bimetallic Fe–Ag NPs to eliminate phosphorus from the aquatic environment was investigated for all magnetic bimetallic NPs under study in comparison to the reference (partially oxidized nZVI) (Figure 3b). Phosphorus is necessary for the growth of organisms and plants, but its extensive presence in natural waters is known to cause eutrophication which results in the depletion of oxygen and adverse effects toward aquatic life of higher forms of organisms.⁴⁹ The nZVI is able to remove more than 95% of available phosphate in 30 min when a particular protocol is employed.⁵⁰ Using the same protocol, our bimetallic Fe–Ag NPs revealed a long-time ability to remove phosphate as spectrophotometrically determined and shown in Figure 3b. According to our results, a prolonged action of bimetallic NPs as well as of the reference sample was confirmed. Moreover, the efficiency of phosphorus removal was considerably higher for Fe–Ag1 sample compared to the reference. Generally, there may be three processes contributing to the phosphate removal: (i) direct adsorption of phosphate on the large NPs surface; (ii) aging of bimetallic Fe–Ag NPs in water leading to increased phosphate removal as a consequence of a partial oxidation of Fe^0 cores; (iii) precipitation of iron phosphates due to the production of iron ions during reaction of nZVI with water. Removal ability of bimetallic NPs for phosphates decreases with the increase of silver content on their surface. This is caused by the presence of silver NPs on the iron surface which induced its passivation because silver itself does not play a significant role in phosphate removal. Reactivity of iron core is thus suppressed in Fe–Ag3 and Fe–Ag4 bimetallic NPs, which consist of more than 30% Ag phase. Moreover, Fe–Ag1 NPs represent the most effective bimetallic NPs also when compared with the reference. This is caused by a presence (up to 19%) of ferric oxyhydroxides on Fe–Ag1 surface which represent here a strong adsorbent, while the surface of the reference is formed mostly by a magnetite layer (Figure 1a). We believe that the prolonged action of Fe–Ag1 bimetallic NPs and their higher efficiency of phosphorus removal compared to the reference nZVI sample is just due to the combination of all three above-mentioned processes. In summary, nZVI phase plays a key role in the phosphate degradation process which is further enhanced by the presence of ferric oxyhydroxides on the nanoparticle surfaces. On the contrary, silver and magnetite phases form passivation layers on nanoparticle surfaces and thus negatively influence phosphorus removal.

Antibacterial and Antifungal Activities of Magnetic Bimetallic NPs.

It has been demonstrated already that both nZVI and AgNPs are effective antimicrobial agents.^{38,40–42,46,51} It can be thus expected that bimetallic Fe–Ag NPs, synthesized by a reductive deposition of Ag^0 on nZVI surface, could show at least a similar toxicity as the single stand-alone NPs. To determine these properties, antibacterial and antifungal activities of the Fe–Ag samples and reference have been tested under aerobic conditions. The standard dilution method was used in order to determine the minimum inhibition concentrations (MIC values) of the as-prepared samples leading to a growth inhibition of tested bacterial strains and *Candida* species. These tests (whose detailed description is presented in Supporting Information) enabled us to determine a broad spectrum of microbial toxicity of the as-prepared Fe–Ag NPs as shown in Figure 4.

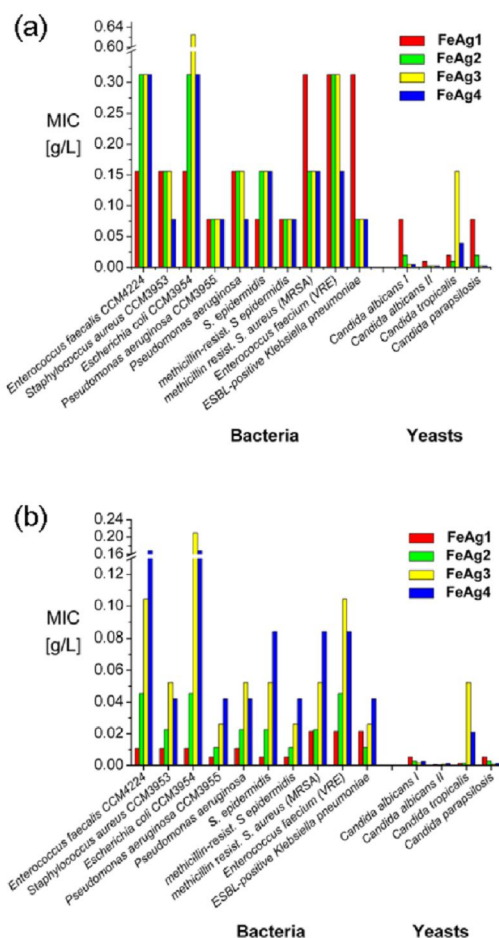


Figure 4. Antibacterial and antifungal activities of Fe–Ag NPs against tested bacteria and yeast: (a) MIC and (b) Ag-related MIC values. The reference MIC values were also tested; however, even at the highest concentration employed (i.e., 3.5 g/L), there was no antibacterial or antifungal activity against all microorganisms included in the study.

The antimicrobial activity of the reference (nZVI particles dispersed in water, i.e., in the absence of silver ions) was also tested, however, even at the highest concentration employed (i.e., 3.5 g/L), the test did not show any antibacterial or antifungal activity against all microorganisms under study (data not shown). This is most probably caused by the formation of a passivation layer consisting of iron oxides on Fe⁰ core (see well-defined magnetite layer on the surface of the reference sample in Figure 1b). Correspondingly, Lee and co-workers⁴² described a dramatic decrease in nZVI efficiency on the inactivation of *Escherichia coli* due to corrosion and surface oxidation. They also confirmed that the antimicrobial effect was the unique property of Fe⁰ and was not observed for any other types of iron oxide compounds.⁴²

From the MIC values related to the total mass of magnetic bimetallic NPs (Figure 4a), ranging between 100 and 540 mg/L, it is evidenced that all Fe–Ag NPs significantly inhibited the growth of the tested bacteria. From the direct comparison of reference (partially oxidized nZVI) and bimetallic nanoparticles Fe–Ag, where both have a similar content of α -Fe phase (~60%), it can be concluded that bimetallic nanoparticles

inhibit microorganisms mainly due to the presence and antimicrobial action of silver NPs. Although the MIC values of the reference (partially oxidized nZVI) were not determined even at the highest concentration (i.e., 3.5 g/L), the MIC values of bimetallic NPs were one order of magnitude lower. Thus, the lowering of MIC values was most probably induced by the presence of silver NPs. Silver nanoparticles are well-known for their antibacterial and antifungal properties.^{27–36} It is thus reasonable to relate the increased antimicrobial properties of magnetic bimetallic NPs to the presence and antimicrobial action of silver NPs.

Furthermore, from Figure 4a, it is obvious that MIC values of the magnetic bimetallic NPs slightly varied depending on both the particular bimetallic sample and microbial strain. In fact, for some bacterial strains, namely, *Pseudomonas aeruginosa* CCM3955 and *Staphylococcus epidermidis*, there is no significant difference in MIC values for the Fe–Ag NPs (i.e., FeAg1 to FeAg4; Figure 4a) although their quantitative phase compositions differ significantly (Table S1 in the Supporting Information). This observation may be explained by the fact that there is up to 19% of lepidocrocite (γ -FeOOH) in FeAg1, while its content decreases for the other Fe–Ag NPs with a simultaneous increase in the AgNPs content (Table S1 in the Supporting Information). It is known from the literature⁵² that ferric oxyhydroxides can play an important role (due to electrostatic attraction) in surface inactivation of viruses. Therefore, we believe that not only silver NPs, but also lepidocrocite nanostructures contribute to the antibacterial and antifungal activity of the magnetic bimetallic NPs.

As mentioned above, the Fe–Ag NPs differ mainly in the Ag content (FeAg1 < FeAg2 < FeAg3 < FeAg4) (Figure 1a) and AgNPs size (Table S4 in the Supporting Information). Therefore, to separate these two factors and to eliminate the contribution of weight of magnetic parts, we have recalculated microbial toxicity of our magnetic bimetallic NPs for the Ag content and express the Ag-related MIC values (Figure 4b). The comparison in Figure 4b gives evidence that FeAg1 is the most effective antibacterial agent in our study. This is in a good accordance with the literature since the smaller the AgNPs, the higher bactericidal impact.^{33,53,54} In addition, a large amount of needle-shaped lepidocrocite nanostructures on the NP surface of Fe–Ag1 (19%) has probably improved the interaction of microbial cells with the magnetic bimetallic NP surface leading thus to an increased effect of small AgNPs on the cells.

The MIC values of the Fe–Ag NPs determined for yeasts fall into the range from 3.3 mg/L to 270 mg/L (Figure 4a). They are several times lower than those determined for bacteria in the present work. A very similar phenomenon has been observed and published recently.⁵³ Our reference sample has manifested itself by no antifungal activity at all. This is in a full accordance with the literature where the inactivity of nZVI against yeasts has been reported.⁴⁰ The antifungal activity of the prepared magnetic bimetallic NPs increases with increasing content of AgNPs (Figure 4a); hence, Fe–Ag4 reveals the lowest MIC values (between 4.2 mg/L and 67 mg/L) for almost all *Candida* species under study. These results clearly evidence the importance of the AgNP amount on magnetic bimetallic NP surfaces. Similarly as in the case of the results of antibacterial testing in the present work, we have recalculated the antifungal MIC values for Ag content and demonstrate the Ag-related antifungal MIC values (Figure 4b). After this recalculation, Fe–Ag1 and Fe–Ag2 bimetallic NPs reveal very high antifungal activities against all four tested yeasts.

Considering the dual (i.e., magnetic and antimicrobial) character of our magnetic bimetallic NPs and taking into account the presence of iron oxides/oxyhydroxides (although less than ~30%; Table S1 in the Supporting Information), the results of antibacterial and antifungal testing can be, in principle, compared with magnetic nanocomposites where AgNPs are reduced either using an additional reducing agent⁵³ or employing one part of a particular nanocomposite as a reductant.^{55,56} For instance, the MIC values acquired for the magnetic nanocomposites prepared according to Pucek et al.⁵³ fall into the range 15.6–125 mg/L in the case of bacteria and 1.9–31.3 mg/L in the case of yeasts. Furthermore, the antibacterial and antifungal activity testing of the magnetic nanocomposites described by Dallas et al.⁵⁵ revealed the MIC values between 78 and 150 mg/L, depending on the strain. Obviously, the published MIC values of the magnetic nanocomposites are 1.3 to 4 times lower than those obtained for our magnetic bimetallic NPs. The reason for it may lie in at least two factors. First, there can be a great influence of the iron oxyhydroxide content, which enables the interaction between microbial cells and nanocomposite and/or NP surface, as has been stated above. Second, the ferromagnetic character of the Fe⁰ core in the magnetic bimetallic NPs can induce rather strong interactions among individual Fe–Ag NPs resulting in a rapid decrease of NP active surface area, which could be otherwise exposed to solution containing microbial cells. In several studies reporting on magnetic nanocomposites,^{53,55,56} NPs of maghemite or magnetite decorated by AgNPs (providing strong antimicrobial properties) were exploited as magnetic carriers.

Hence, we present the preparation and testing of a multifunctional material which can be exploited for advanced antimicrobial and reductive water treatment. Besides a feasible, controllable, large-scalable and relatively cheap synthesis, the other advantages of this material include (i) antimicrobial action against a wide variety of bacteria and yeasts (mainly due to the presence and antimicrobial properties of silver nanoparticles the size of which can be adjusted very simply by the initial silver ions concentration), (ii) effective phosphorus removal in a long time scale (induced mainly by Fe⁰ and FeOOH), (iii) stability in air (maintained due to the passivation of nZVI surface by Ag nanoparticles and ferric oxide/oxyhydroxides), together with (iv) the possibility of magnetic separation which provides a control over its action in the environment and thus a safer application of this material in advanced antimicrobial and reductive water treatment technologies. According to our best knowledge, there is no system in the literature and/or on the market available which shows all the above-mentioned properties at once.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

Details concerning characterization techniques, XRD patterns of all studied Fe–Ag bimetallic nanoparticles and reference samples, room-temperature Mössbauer spectra of nZVI, reference, and bimetallic NPs, room-temperature hysteresis loops of reference and bimetallic NPs, results of quantitative phase analysis of Fe–Ag bimetallic NPs from Rietveld refinement analysis of XRD patterns, values of mean XRD coherence lengths (MCL) of AgNPs in Fe–Ag bimetallic NPs, values of Mössbauer hyperfine parameters derived from the measured room-temperature Mössbauer spectra, values of hysteresis parameters derived from the measured room-

temperature hysteresis loops, and example of MIC value determination based on absorption values for nine concentrations of the same nanoparticle solution when repeated four times. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone +420 585634762, Fax +420 585634761, E-mail address radek.zboril@upol.cz (Radek Zbořil); Phone +420 585634955, Fax +420 585634761, E-mail address karolina.siskova@upol.cz (Karolína Machalová Šišková).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Aleš Panáček for his assistance with the antimicrobial testing, Robert Pucek with AAS analysis and Claudia Aparicio with XRD analysis. The work was further supported by Operational Program Research and Development for Innovations – European Regional Development Fund (Project No. CZ.1.05/2.1.00/03.0058 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic), Technology Agency of the Czech Republic “Competence Centers” (Project No. TE01010218), Operational Programs Education for Competitiveness – European Social Fund (Project No. CZ.1.07/2.3.00/20.0056 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic), and Unconventional Experimental Techniques in Material and Optical Research (Project No. CZ.1.07/2.3.00/20.0155), the Student Project No. LF_2012_006 and No. PrF_2012_008 of Palacký University in Olomouc, the project of the Academy of Sciences of the Czech Republic (Project No. KAN115600801), and the project of the Grant Agency of the Czech Republic (Project No. P108/11/P657).

■ REFERENCES

- (1) Karn, B.; Kuiken, T.; Otto, M. Nanotechnology and in situ remediation: A review of the benefits and potential risks. *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117*, 1813–1831.
- (2) Li, X.; Brown, D. G.; Zhang, W. Stabilization of biosolids with nanoscale zero-valent iron (nZVI). *J. Nanopart. Res.* **2007**, *9*, 233–243.
- (3) Ju-Nam, Y.; Lead, J. R. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci. Total Environ.* **2008**, *400*, 396–414.
- (4) Grieger, K. D.; Fjordbøge, A.; Hartmann, N. B.; Eriksson, E.; Bjerg, P. L.; Baum, A. Environmental benefits and risks of zero-valent iron nanoparticles (nZVI) for in situ remediation: Risk mitigation or trade-off? *J. Contam. Hydrol.* **2010**, *118*, 165–183.
- (5) Noubactep, C.; Caré, S.; Crane, R. Nanoscale metallic iron for environmental remediation: Prospects and limitations. *Water Air Soil Pollut.* **2012**, *223*, 1363–1382.
- (6) Zhang, L.; Fang, M. Nanomaterials in pollution trace detection and environmental improvement. *Nano Today* **2010**, *5*, 128–142.
- (7) Zhang, W. Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *J. Nanopart. Res.* **2003**, *5*, 323–332.
- (8) Phenrat, T.; Saleh, N.; Sirk, K.; Tilton, R. D.; Lowry, G. V. Aggregation and sedimentation of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 284–290.
- (9) Kustov, L. M.; Finashina, E. D.; Shuvalova, E. V.; Tkachenko, O. P.; Kirichenko, O. A Pd-Fe nanoparticles stabilized by chitosan derivatives for perchloroethene dechlorination. *Environ. Int.* **2011**, *37*, 1044–1052.

- (10) Chen, K. F.; Li, S.; Zhang, W. Renewable hydrogen generation by bimetallic zero valent iron nanoparticles. *Chem. Eng. J.* **2011**, *170*, 562–567.
- (11) Mossa Hosseini, S.; Ataie-Ashtiani, B.; Kholghi, M. Nitrate reduction by nano-Fe/Cu particles in packed column. *Desalination* **2011**, *276*, 214–221.
- (12) Zhuang, Y.; Ahn, S.; Seyfferth, A. L.; Masue-Slowey, Y.; Fendorf, S.; Luthy, R. G. Dehalogenation of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyl by bimetallic, impregnated, and nanoscale zerovalent iron. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 4896–4903.
- (13) Ambashta, R. D.; Repo, E.; Sillanp, M. Degradation of tributyl phosphate using nanopowders of iron and iron-nickel under the influence of a static magnetic field. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *21*, 11771–11777.
- (14) Zhu, N.; Luan, H.; Yuan, S.; Chen, J.; Wu, X.; Wang, L. Effective dechlorination of HCB by nanoscale Cu/Fe particles. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *176*, 1101–1105.
- (15) Yan, W.; Herzog, A. A.; Li, X.; Kiely, C. J.; Zhang, W. Structural evolution of Pd-doped nanoscale zero-valent iron (nZVI) in aqueous media and implications for particle aging and reactivity. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 4288–4294.
- (16) Lee, C.; Sedlak, D. L. Enhanced formation of oxidants from bimetallic nickel-iron nanoparticles in the presence of oxygen. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 8528–8533.
- (17) Zhu, B. W.; Lim, T. T. Catalytic reduction of chlorobenzenes with Pd/Fe nanoparticles: reactive sites, catalyst stability, particle aging, and regeneration. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 7523–7229.
- (18) Bokare, A. D.; Chikate, R. C.; Rode, C. V.; Paknikar, K. M. Effect of surface chemistry of Fe-Ni nanoparticles on mechanistic pathways of azo dye degradation. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 7437–7443.
- (19) Schrick, B.; Blough, J. L.; Jones, A. D.; Mallouk, T. E. Hydrodechlorination of trichloroethylene to hydrocarbons using bimetallic nickel-iron nanoparticles. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 5140–5147.
- (20) Xu, Y.; Zhang, W. Subcolloidal Fe/Ag particles for reductive dehalogenation of chlorinated benzenes. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, *7*, 2238–2244.
- (21) Zhang, W.; Wang, C.; Lien, H. Treatment of chlorinated organic contaminants with nanoscale bimetallic particles. *Catal. Today* **1998**, *40*, 387–395.
- (22) Xu, J.; Bhattacharyya, D. Modeling of Fe/Pd nanoparticle-based functionalized membrane reactor for PCB dechlorination at room temperature. *J. Phys. Chem.* **2008**, *112*, 9133–9144.
- (23) Smuleac, V.; Varma, R.; Sikdar, S. Green synthesis of Fe and Fe/Pd bimetallic nanoparticles in membranes for reductive degradation of chlorinated organics. *J. Membr. Sci.* **2011**, *379*, 131–137.
- (24) Valodkar, M.; Modi, S.; Pal, A.; Thakore, S. Synthesis and antibacterial activity of Cu, Ag and Cu–Ag alloy nanoparticles: A green approach. *Mater. Res. Bull.* **2011**, *46*, 384–389.
- (25) Banerjee, M.; Sharma, S.; Chattopadhyay, A.; Ghosh, S. S. Enhanced antibacterial activity of bimetallic gold-silver core-shell nanoparticles at low silver concentration. *Nanoscale* **2011**, *3*, 5120–5125.
- (26) Siskova, K.; Tucek, J.; Machala, L.; Otyepkova, E.; Filip, J.; Safarova, K.; Pechousek, J.; Zboril, R. Air-stable nZVI formation mediated by glutamic acid: solid-state storable material exhibiting 2D chain morphology and high reactivity in aqueous environment. *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14*, 805.
- (27) Bosetti, M.; Masse, A.; Tobin, E.; Cannas, M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials* **2002**, *23*, 887–892.
- (28) Dallas, P.; Sharma, V. K.; Zboril, R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, applications, and perspectives. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *166*, 119–35.
- (29) Levard, C.; Hotze, E. M.; Lowry, G. V.; Brown, G. E. Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 6900–6914.
- (30) Rico, C. M.; Majumdar, S.; Duarte-Gardea, M.; Peralta-Videa, J. R.; Gardea-Torresdey, J. L. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3485–3498.
- (31) Peralta-Videa, J. R.; Zhao, L.; Lopez-Moreno, M. L.; de la Rosa, G.; Hong, J.; Gardea-Torresdey, J. L. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *186*, 1–15.
- (32) Rai, M. K.; Deshmukh, S. D.; Ingle, A. P.; Gade, A. K. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *112*, 841–852.
- (33) Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramirez, J. T.; Yacaman, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346–2353.
- (34) Kim, J. S.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J. H.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C. Y.; Kim, Y. K.; Lee, Y. S.; Jeong, D. H.; Cho, M. H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed. Nanobiotech. Biol. Med.* **2007**, *3*, 95–101.
- (35) Kumar, R.; Howdle, S.; Müntstedt, H. Polyamide/silver antimicrobials: Effect of filler types on the silver ion release. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* **2005**, *75*, 311–319.
- (36) Klueh, U.; Wagner, V.; Kelly, S.; Johnson, A. B. J. Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *53*, 621–631.
- (37) Chen, Q.; Gao, M.; Li, J.; Shen, F.; Wu, Y.; Xu, Z.; Yao, M. Inactivation and magnetic separation of bacteria from liquid suspensions using electrospayed and nonelectrospayed nZVI particles: observations and mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 2360–2367.
- (38) Chen, J.; Xiu, Z.; Lowry, G. V.; Alvarez, P. J. J. Effect of natural organic matter on toxicity and reactivity of nano-scale zero-valent iron. *Water Res.* **2011**, *45*, 1995–2001.
- (39) Li, Z.; Greden, K.; Alvarez, P. J. J.; Gregory, K. B.; Lowry, G. V. Adsorbed polymer and NOM limits adhesion and toxicity of nano scale zerovalent iron to *E. coli*. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 3462–3467.
- (40) Diao, M.; Yao, M. Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes. *Water Res.* **2009**, *43*, 5243–5251.
- (41) Auffan, M.; Achouak, W.; Rose, J.; Roncato, M. A.; Chanéac, C.; Waite, D. T.; Masion, A.; Woicik, J. C.; Wiesner, M. R.; Bottero, J. Y. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 6730–6735.
- (42) Lee, C.; Kim, J. Y.; Lee, W. I.; Nelson, K. L.; Yoon, J.; Sedlak, D. L. Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 4927–4933.
- (43) Marsalek, B.; Jancula, D.; Marsalkova, E.; Mashlan, M.; Safarova, K.; Tucek, J.; Zboril, R. Multimodal action and selective toxicity of zerovalent iron nanoparticles against cyanobacteria. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 2316–2323.
- (44) Phenrat, T.; Long, T. C.; Lowry, G. V.; Veronesi, B. Partial oxidation (“aging”) and surface modification decrease the toxicity of nanosized zerovalent iron. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 195–200.
- (45) Li, X.; Zhang, W. Sequestration of metal cations with zerovalent iron nanoparticles: A study with high resolution X-ray photoelectron spectroscopy (HR-XPS). *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 6939–6946.
- (46) Panacek, A.; Kvitek, L.; Prucek, R.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pizurova, N.; Sharma, V. K.; Nevecna, T.; Zboril, R. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16248–16253.
- (47) Varvel, G. E.; Peterson, G. A.; Anderson, F. N. A Revised Method for Determining Phosphate-Phosphorus Levels in Sugar Beet Leaf Petioles. *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* **1976**, *19*, 138–142.
- (48) Machala, L.; Zboril, R.; Gedanken, A. Amorphous iron(III) oxide - A review. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 4003–4018.
- (49) Christensen, D. L.; Pace, M. L.; Post, D. M. Biological control of eutrophication in lakes. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, No. 29, 784–786.

(50) Almeelbi, T.; Bezbaruah, A. Aqueous phosphate removal using nanoscale zero-valent iron. *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14*, 900.

(51) Stefan, M.; Marius, S.; Hritcu, L.; Lucian, H.; Mihasan, M.; Marius, M.; Pricop, D.; Daniela, P.; Gostin, I.; Irina, G.; Olariu, R. I.; Romeo-Iulian, O.; Dunca, S.; Simona, D.; Melnig, V.; Viorel, M. Enhanced antibacterial effect of silver nanoparticles obtained by electrochemical synthesis in poly(amide-hydroxyurethane) media. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2011**, *22*, 789–796.

(52) Ryan, J. N.; Harvey, R. W.; Metge, D.; Elimelech, M.; Navigato, T.; Pieper, A. P. Field and laboratory investigations of inactivation of viruses (PRD1 and MS2) attached to iron oxide-coated quartz sand. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 2403–2413.

(53) Pucek, R.; Tuček, J.; Kílianová, M.; Panáček, A.; Kvítek, L.; Filip, J.; Kolář, M.; Tománková, K.; Zbořil, R. The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32*, 4704–4713.

(54) Baker, C.; Pradhan, A.; Pakstis, L.; Pochan, D. J.; Shah, S. I. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2005**, *5*, 244–249.

(55) Dallas, P.; Tuček, J.; Jancik, D.; Kolar, M.; Panacek, A.; Zboril, R. Magnetically controllable silver nanocomposite with multifunctional phosphotriazine matrix and high antimicrobial activity. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 2347–2354.

(56) Markova, Z.; Siskova, K.; Filip, J.; Safarova, K.; Pucek, R.; Panacek, A.; Kolar, M.; Zboril, R. Chitosan-based green synthesis of magnetically-driven nanocomposites with biogenic magnetite core, controlled silver size and high antimicrobial activity. *Green Chem.* **2012**, *14*, 2550–2558.

Supporting Information

to

Air Stable Magnetic Bimetallic Fe-Ag Nanoparticles for Advanced Antimicrobial Treatment and Phosphorus Removal

Zdenka Marková,¹ Karolína Machalová Šišková,^{*1} Jan Filip,¹ Jan Čuda,¹ Milan Kolář,² Klára Šafářová,¹ Ivo Medřík,¹ and Radek Zbořil^{*1}

¹ Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Departments of Physical Chemistry and Experimental Physics, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic.

² Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Hněvotínská 3, 77146 Olomouc, Czech Republic

* Corresponding authors: Phone: +420 585634762, Fax: +420 585634761, E-mail address: radek.zboril@upol.cz (Radek Zbořil); Phone: +420 585634955, Fax: +420 585634761, E-mail address: karolina.siskova@upol.cz (Karolína Machalová Šišková).

Number of pages: 10

Number of figures: 3

Number of tables: 6

Supporting Text

Characterization of bimetallic Fe-Ag NPs was achieved by several analytical methods. Mutual contents of silver- and iron-bearing phases and values of mean X-ray diffraction coherence lengths (MCL) of AgNPs are quantitatively evaluated by means of XRD (Figure S1, Table S1, Table S2). Iron-containing phases are unambiguously determined by Mössbauer spectroscopy (Figure S2, Table S3, and Table S4). Moreover, the macroscopic magnetic properties of the samples were determined by a superconducting quantum interference device (SQUID) (Figure S3, Table S5).

Characterization techniques. Electron Microscopy. Transmission electron microscope (TEM) images were obtained using electron microscope JEOL JEM-2010 operating at 160 kV with a point-to-point resolution of 1.9 Å. Scanning electron microscope (SEM) images were obtained on a Hitachi SU6600 FEG (with the resolution in SE mode of 1.3 nm at 30 kV). The micrographs were collected with the accelerating voltage of 15 kV at a working distance of 6.8 mm. Energy dispersive X-ray spectrometry (EDS) measurements were employed on NORAN System 7 X-ray Microanalysis system (Thermo Scientific), where for X-ray elemental mapping images, accelerating voltage of 15 kV, working distance of 15 mm and life time 4000 s were used. For all microscopic techniques, the aqueous dispersions of the samples were sonicated for approximately 1 min, and then a drop of a very dilute dispersion was placed on the copper grid with holey carbon film and subsequently allowed to dry at room temperature.

X-ray powder diffraction (XRD). XRD patterns of all magnetic bimetallic NPs were recorded on PANalytical X'Pert PRO diffractometer (iron-filtered CoK_α radiation: $\lambda = 0.178901$ nm, 40 kV and 30 mA) in Bragg-Brentano geometry, equipped with an X'Celerator detector, programmable divergence and diffracted beam anti-scatter slits. Magnetically pre-concentrated suspensions were dropped on a zero-background single-crystal Si slides, allowed to dry by evaporation at RT and scanned in continuous mode (resolution of 0.017° 2 Theta, scan speed of 0.008° 2 Theta per second, 2 Theta range of 20 - 105°) under ambient conditions. The SRM640 (Si) and SRM660 (LaB_6) commercial standards from NIST were used for the evaluation of line positions and instrumental line broadening, respectively. The acquired patterns were processed (i.e., phase analysis and Rietveld refinement) using X'Pert HighScore Plus software (PANalytical, The Netherlands), in combination with PDF-4+ and ICSD databases (ICSD collection codes are: α -Fe - 631729, Ag - 044387, Fe_3O_4 - 084611, γ -FeOOH - 093948).

Atomic absorption spectroscopy (AAS). Iron and silver concentrations were determined by AAS technique with flame ionization using a ContrAA 300 instrument (Analytik Jena AG, Germany)

equipped with a high-resolution Echelle double monochromator (the spectral band width of 2 pm at 200 nm) and with a continuum radiation source (xenon lamp). The absorption lines used for these analyses were 248.327 nm for iron and 328.068 nm for silver. The calibration standards were prepared using an Iron Standard for AAS (1001 mg/L, Fluka) and AgNO₃ (Sigma-Aldrich, 99.8%). For measurements, an aliquot of the sample dispersed in deionized water was added to concentrated nitric acid in a ratio of 1:9, boiled for 1 hour and appropriately diluted in deionized water.

Antibacterial and Antifungal Activity Testing. Bacteria are cultivated with nanoparticles (NPs) in a 96-well plate overnight (16 hours). As a reference sample, bacteria without nanoparticles in the cultivation medium are used. The viability of bacterial cells is then measured spectrophotometrically. As an example, Table S6 summarizes resulting absorption values for nine concentrations of the same nanoparticle solution when repeated four times. Each test has its own reference sample as it can be clearly seen from Table S6. The MIC value for a particular nanoparticle solution is then determined from Table S6 as the NPs concentration where the lowest repeatable absorption value observed. Considering the absorption value corresponding to the MIC of particular NPs (approx. 0.10 in Table S6) and taking into account the reference sample absorption value (approx. 1.43 in Table S6), it can be calculated that less than 7% of bacterial cells survived at MIC value of NPs ($= 100\% * 0.10 / 1.43$). In other words, the inactivation rate of more than 93% was observed when MIC value of magnetic bimetallic NPs used.

Supporting Figures

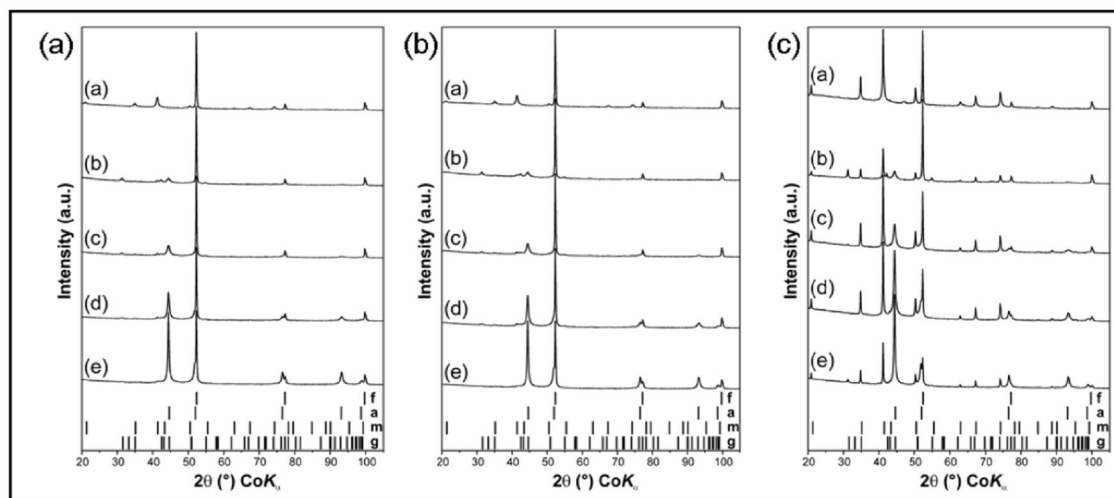


Figure S1. XRD patterns of all studied Fe-Ag bimetallic nanoparticles and reference samples: (a) reference (partially oxidized nZVI), (b) Fe-Ag1, (c) Fe-Ag2, (d) Fe-Ag3, and (e) Fe-Ag4. Samples measured before (A) and after storage for 20 days: (B) kept in a dry state in air or (C) dispersed in deionized water. Theoretical positions of diffraction lines of zero-valent iron (f), metallic silver (a), magnetite (m) and lepidocrocite (g) are also shown (PDF cards No. 01-088-0315 and 01-089-3722, respectively).

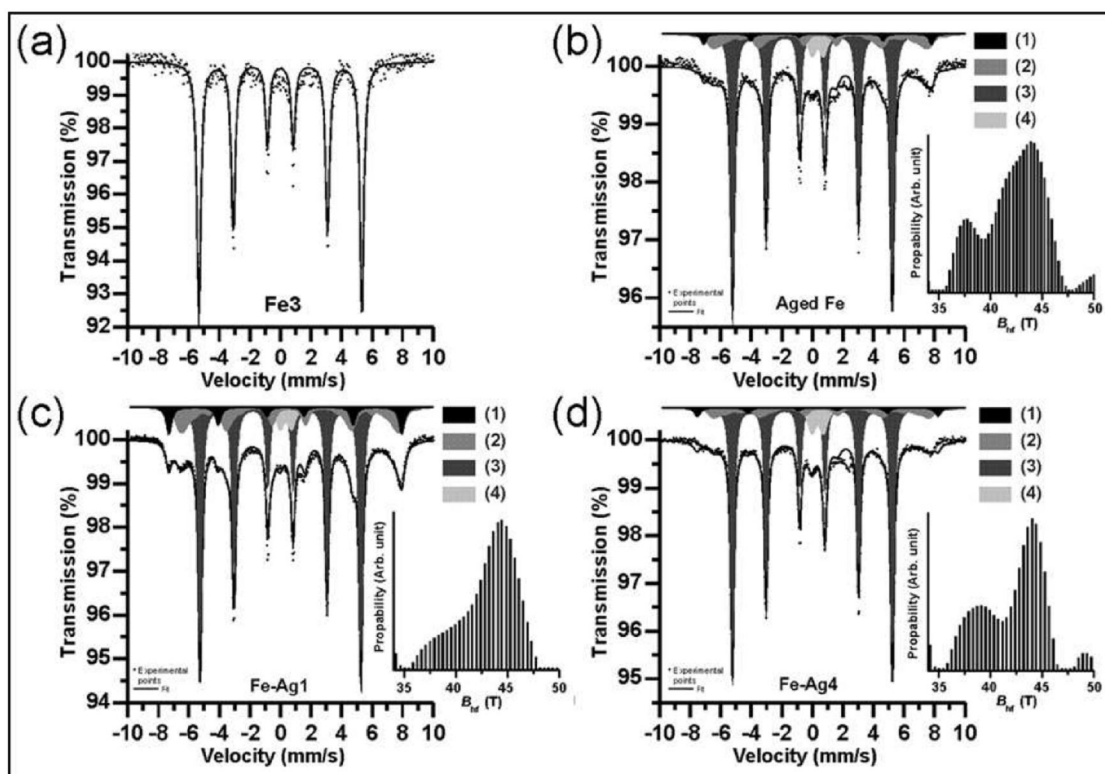


Figure S2. Zero-field Mössbauer spectra recorded at room temperature of (a) nZVI, (b) reference (partially oxidized nZVI), and (c) Fe-Ag1 and (d) Fe-Ag4 bimetallic NPs. Where sub-spectrum (1) corresponds to iron in tetragonal and (2) octahedral coordination in the magnetite (inserted figures show fitting sextet of octahedral coordination by means of distribution of hyperfine magnetic field (B_{hf})), (3) referred to nano zero-valent Iron (nZVI), and (4) is high-spin ferric oxides or hydroxide phase.

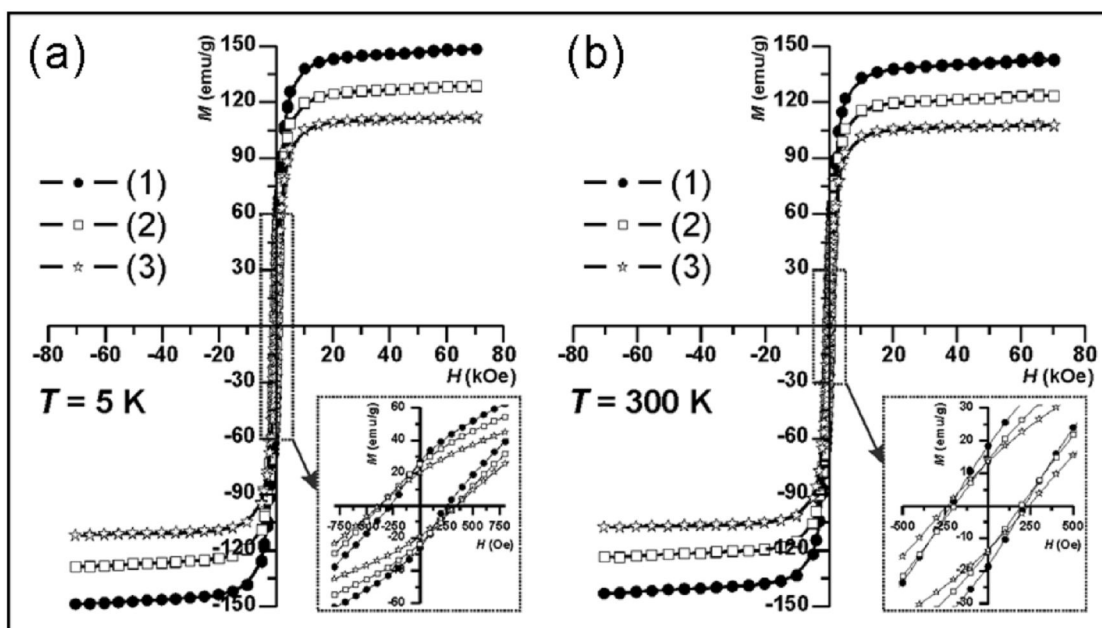


Figure S3. Hysteresis loops at (a) 5 K and (b) room temperature of (1) reference (partially oxidized nZVI) and (2) Fe-Ag1 and (3) Fe-Ag4 bimetallic NPs.

Supporting Tables

Table S1. Results of quantitative phase analysis of reference (partially oxidized nZVI) and Fe-Ag bimetallic NPs from Rietveld refinement analysis of XRD patterns: metallic silver (Ag^0), zero-valent iron ($\alpha\text{-Fe}$), lepidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$), and magnetite (Fe_3O_4). The values with stars are for the samples stored as dry powders* and as aqueous dispersions**.

| Sample | Composition [wt.%] | | | |
|------------------|--------------------|---------------|-------------------------|-----------------------|
| | $\alpha\text{-Fe}$ | Ag^0 | Fe_3O_4 | $\gamma\text{-FeOOH}$ |
| Reference | 58 | | 42 | |
| | /58* | | /42* | |
| | /26** | - | /74** | - |
| Fe-Ag1 | 64 | 7 | 10 | 19 |
| | /64* | /7* | /10* | /19* |
| | /38** | /7** | /37** | /18** |
| Fe-Ag2 | 66 | 17 | 7 | 10 |
| | /66* | /18* | /7* | /9* |
| | /20** | /15** | /64** | /1** |
| Fe-Ag3 | 56 | 32 | 6 | 6 |
| | /56* | /33* | /5* | /6* |
| | /13** | /28** | /56** | /3** |
| Fe-Ag4 | 44 | 53 | 2 | 1 |
| | /43* | /54* | /2* | /1* |
| | /11** | /48** | /38** | /3** |

Table S2. Hyperfine parameters of zero-field Mössbauer spectra of our studied samples at room temperature, where T is the temperature of measurement, δ is the center shift, ΔE_Q is the quadrupole splitting, B_{hf} is the magnetic hyperfine field, and Γ is the linewidth.

| Sample | Component | $\delta \pm 0.01$ (mm/s) | $\Delta E_Q \pm 0.01$ (mm/s) | $B_{\text{hf}} \pm 0.3$ (T) | $\Gamma \pm 0.01$ (mm/s) |
|------------------|-----------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| nZVI | - | 0.00 | 0.00 | 33.18 | 0.32 |
| Reference | 1 | 0.33 | 0.03 | 46.4 | 0.38 |
| | 2 | 0.52 | 0.02 | 41.6 | 0.45 |
| | 3 | 0.00 | 0.00 | 32.5 | 0.28 |
| | 4 | 0.35 | 0.75 | ----- | 0.58 |
| Fe-Ag1 | 1 | 0.33 | -0.02 | 47.4 | 0.41 |
| | 2 | 0.59 | 0.08 | 42.4 | 0.44 |
| | 3 | 0.00 | -0.02 | 32.7 | 0.41 |
| | 4 | 0.35 | 0.75 | ----- | 0.58 |
| Fe-Ag4 | 1 | 0.35 | 0.00 | 49.0 | 0.47 |
| | 2 | 0.59 | 0.00 | 41.7 | 0.52 |
| | 3 | 0.00 | 0.00 | 32.6 | 0.26 |
| | 4 | 0.35 | 0.75 | ----- | 0.58 |

Table S3. Iron-bearing phases of the reference (partially oxidized nZVI), Fe-Ag1 and Fe-Ag4 NPs determined by Mössbauer analysis.

| Sample | Composition [wt.%] | | |
|------------------|--------------------|--------------------------------|-------|
| | α -Fe | Fe ₃ O ₄ | FeOOH |
| Reference | 92.3 | 2.5 | 5.2 |
| Fe-Ag1 | 90.9 | 4.1 | 5.0 |
| Fe-Ag4 | 91.4 | 2.1 | 6.5 |

Table S4. Values of mean X-ray diffraction coherence lengths (MCL) of AgNPs in Fe-Ag bimetallic NPs obtained from Rietveld refinement analysis of X-ray powder diffraction patterns.

| Sample | Ag ⁰ size [nm] | | |
|--------|---------------------------|------------|------------|
| | not-aged | “dry” aged | “wet” aged |
| Fe-Ag1 | 11 | 11 | 11 |
| Fe-Ag2 | 13 | 13 | 14 |
| Fe-Ag3 | 20 | 21 | 21 |
| Fe-Ag4 | 29 | 29 | 29 |

Table S5. Derived hysteresis parameters at 5 K and room temperature of reference (partially oxidized nZVI), Fe-Ag1, and Fe-Ag4 sample, where $M_{\max+}$ (7 T) is the maximum magnetization at 7 T, $M_{\max-}$ (− 7 T) is the maximum magnetization at − 7 T, B_{C+} is the positive coercivity, B_{C-} the negative coercivity, M_{R+} is the positive remanent magnetization, and M_{R-} is the negative remanent magnetization.

| Sample | T (K) | $M_{\max+} \pm 0.01$ (emu/g) | $M_{\max-} \pm 0.01$ (emu/g) | $H_{C+} \pm 1$ (Oe) | $H_{C-} \pm 1$ (Oe) | $M_{R+} \pm 0.01$ (emu/g) | $M_{R-} \pm 0.01$ (emu/g) |
|-----------|---------|------------------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| Reference | 5 | 148.48 | − 148.61 | 258 | − 280 | 27.35 | − 26.18 |
| | 300 | 142.86 | − 142.84 | 214 | − 216 | 18.45 | − 18.53 |
| Fe-Ag1 | 5 | 128.89 | − 128.87 | 339 | − 370 | 25.12 | − 23.56 |
| | 300 | 123.57 | − 123.52 | 195 | − 195 | 14.06 | − 14.09 |
| Fe-Ag4 | 5 | 111.84 | − 111.90 | 345 | − 382 | 20.31 | − 18.96 |
| | 300 | 107.62 | − 107.61 | 239 | − 239 | 13.53 | − 13.53 |

Table S6. Example of MIC value determination based on absorption values for nine concentrations of the same nanoparticle solution when repeated four times.

| Concentration of NPs | | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Test 4 |
|-----------------------------|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| mg/L | | Absorption | Absorption | Absorption | Absorption |
| MIC Value | 540.00 | 0.113 | 0.114 | 0.120 | 0.125 |
| | 270.00 | 0.103 | 0.104 | 0.103 | 0.107 |
| | 135.00 | 0.078 | 0.554 | 0.078 | 0.768 |
| | 67.50 | 0.841 | 0.051 | 0.581 | 0.947 |
| | 33.75 | 1.024 | 1.147 | 1.005 | 1.132 |
| | 16.88 | 1.174 | 1.321 | 1.284 | 1.226 |
| | 8.44 | 1.308 | 1.323 | 1.258 | 1.321 |
| | 4.22 | 1.322 | 1.365 | 1.307 | 1.428 |
| | 2.11 | 1.292 | 1.344 | 1.314 | 1.369 |
| Bacteria + medium (no NPs) | | | | | |
| reference sample | | 1.427 | 1.394 | 1.492 | 1.462 |

7.5 Příloha 5

M. Pečová, M. Šebela, Z. Marková, K. Poláková, J. Čuda, K. Šafářová, R. Zbořil:

Thermostable trypsin conjugates immobilized to biogenic magnetite show a high operational stability and remarkable reusability for protein digestion.

Nanotechnology, 24 (12), 125102 (11 pp) (2013)

Thermostable trypsin conjugates immobilized to biogenic magnetite show a high operational stability and remarkable reusability for protein digestion

M Pečová¹, M Šebela¹, Z Marková², K Poláková², J Čuda², K Šafářová²
and R Zbořil²

¹ Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic

² Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Departments of Physical Chemistry and Experimental Physics, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic

E-mail: marek.sebela@upol.cz and radek.zboril@upol.cz

Received 24 September 2012, in final form 12 December 2012

Published 6 March 2013

Online at stacks.iop.org/Nano/24/125102

Abstract

In this work, magnetosomes produced by microorganisms were chosen as a suitable magnetic carrier for covalent immobilization of thermostable trypsin conjugates with an expected applicability for efficient and rapid digestion of proteins at elevated temperatures. First, a biogenic magnetite was isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense* and its free surface was coated with the natural polysaccharide chitosan containing free amino and hydroxy groups. Prior to covalent immobilization, bovine trypsin was modified by conjugating with α -, β - and γ -cyclodextrin. Modified trypsin was bound to the magnetic carriers via amino groups using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and *N*-hydroxysulfosuccinimide as coupling reagents. The magnetic biomaterial was characterized by magnetometric analysis and electron microscopy. With regard to their biochemical properties, the immobilized trypsin conjugates showed an increased resistance to elevated temperatures, eliminated autolysis, had an unchanged pH optimum and a significant storage stability and reusability. Considering these parameters, the presented enzymatic system exhibits properties that are superior to those of trypsin forms obtained by other frequently used approaches. The proteolytic performance was demonstrated during in-solution digestion of model proteins (horseradish peroxidase, bovine serum albumin and hen egg white lysozyme) followed by mass spectrometry. It is shown that both magnetic immobilization and chemical modification enhance the characteristics of trypsin making it a promising tool for protein digestion.

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

1. Introduction

Iron oxides nanoparticles, especially of magnetite (Fe₃O₄) or maghemite (γ -Fe₂O₃) type, and magnetic ferrofluids are widely studied for potential applications in science, medicine

and technology [1, 2]. When suitably surface modified, iron-containing nanoparticles may find various applications as carriers for the immobilization of biomolecules as well as mediators in therapy and diagnostics [3–7]. For such purposes, they are usually coated with appropriate

for 15 min. The biogenic MNPs were finally resuspended in deionized water.

2.3. Coating of biogenic magnetite with chitosan

The biogenic magnetite was surface-coated following an adopted protocol proposed by Belessi *et al* [27]. Biogenic MNPs were magnetically collected from 20 ml of their suspension in water and resuspended in 19 ml of 1% (v/v) acetic acid. Then, 1 ml of 1% (w/v) solution of chitosan LMW in 1% (v/v) acetic acid was added and the suspension was sonicated for 15 min. It was then subjected to shaking (300 rpm) at room temperature for 1 h (Minishaker MS3, IKA) to achieve adsorption of the polymer at the surface of the MNPs. Finally, the suspension was slowly dripped into 1 M NaOH under stirring. The coated MNPs were magnetically separated and resuspended in 20 ml of deionized water. The chemical structure of the same magnetite–chitosan system was studied by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy where electrostatic interactions of biogenic MNPs and chitosan via its hydroxyl and/or amino groups were confirmed [28].

2.4. Experimental techniques employed for the characterization of MNPs

The size and morphology of the biogenic magnetite prior to and after functionalization by chitosan and trypsin were determined by transmission electron microscopy (TEM). The microscope used was a JEM-2010 (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) model operated at 200 kV with a point to point resolution of 1.9 Å. Before measurements, the samples were dispersed in water. Then, a drop of the suspension was placed on a carbon-coated grid and dried by evaporation at 85 °C. Scanning electron microscopy (SEM) was performed on a Hitachi SU-6600 microscope (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) with an image resolution of 1.2 nm and an accelerating voltage of 30 kV. The magnetic properties of the nanosystem were measured using a superconducting quantum interference device (SQUID) magnetometer, model MPMS XL-7 (Quantum Design, USA). Hysteresis loops were recorded at a temperature of 5 and 300 K in external magnetic fields ranging from -7 to $+7$ T.

2.5. Chemical modification of trypsin by cyclodextrins

Bovine trypsin conjugates with periodate-oxidized α -, β - and γ -cyclodextrins (ACD-BT, BCD-BT and GCD-BT, respectively) were prepared following a previous protocol for α -amylase [29]. Both the conjugating reaction and subsequent cyanoborohydride reduction (figure 1(a)) proceeded in 0.25 M potassium phosphate buffer, pH 7.8, containing 10 mM benzamidine (an inhibitor of trypsin activity). The conjugates were finally dialyzed against 0.1% (v/v) formic acid, concentrated by ultrafiltration through a 10 kDa cut-off filter, lyophilized and stored at -80 °C [19].

2.6. Protein electrophoresis

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed using 4% stacking and 12% running polyacrylamide gels according to a standard procedure [30]. The separated proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250, molecular mass markers ranged from 14.4 to 97.0 kDa.

2.7. Immobilization of trypsin on the chitosan magnetic nanoparticles

BT and its conjugates were immobilized on the chitosan-coated biogenic MNPs using EDC and sulfo-NHS as coupling agents (figure 1(b)). EDC hydrochloride (2.5 mg) and sulfo-NHS (3 mg) were dissolved in 1.5 ml of 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0. Then 10 mg of the MNPs coated with chitosan were added followed by 2.5 mg of trypsin. The resulting mixture was gently shaken at 4 °C for 12 h. After immobilization, the nanoparticles were collected by a magnetic separator (NdFeB) and washed five times with the coupling buffer. Finally, the immobilized trypsin was resuspended in 0.1% formic acid and stored at 4 °C. Protein concentration was assayed using Bradford's method [31].

2.8. Trypsin assays

Trypsin activity was assayed spectrophotometrically using the artificial chromogenic substrate BAPNA [19]. In the case of the immobilized enzyme, an aliquot (20 μ l) of the suspension in diluted formic acid was used as a sample. The reaction was carried out at 37 °C for 5 min. In 1 min cycles, trypsin immobilized on the MNPs was collected magnetically at the bottom of the cuvette and the absorbance at 405 nm of the reaction mixture was read. Thermostability was evaluated by activity assays after incubating enzyme aliquots in 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.25, at temperatures from 20 to 75 °C for 30 min followed by rapid cooling in a water–ice bath. To determine pH optimum, the activity of free and immobilized trypsin was assayed in the pH range of 4.5–10.4 (Britton–Robinson buffers). For testing storage stability, both trypsin forms were kept in 0.1% formic acid at 4 °C. Then residual activity was determined once a week. For checking stability in the assay buffer (0.15 M Tris-HCl, pH 8.5), free and immobilized trypsin were incubated at 23 °C for different times (0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6 and 24 h). Then residual activity was determined. The immobilized trypsin was also tested for the possibility of repeated use. After each activity measurement, it was separated using a magnet (NdFeB) and washed three times with 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0. The measurement was performed in eight cycles.

2.9. Protein digestion using trypsin immobilized on the biogenic magnetite

At first, trypsin immobilized on the MNPs (10 mg) was suspended in 4 ml of 0.05 M NH_4HCO_3 . Individual standard proteins were dissolved in 1 ml of the same

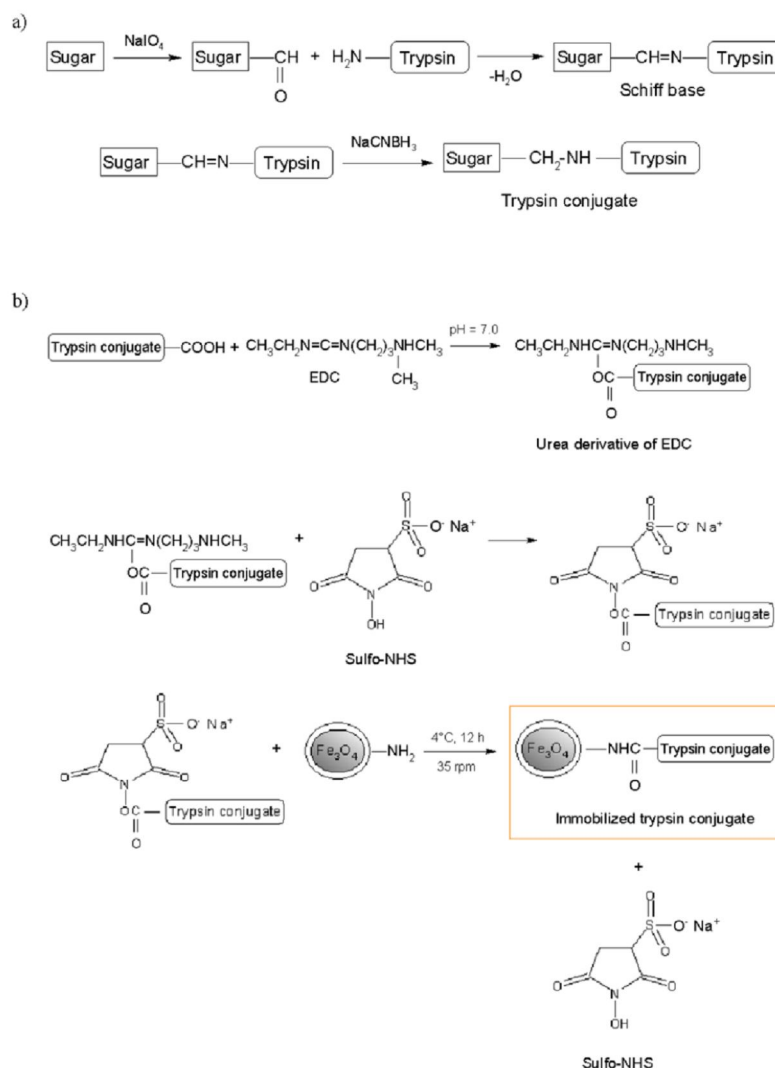


Figure 1. Scheme showing the reaction of trypsin with polyaldehydes derived from cyclodextrins by periodate oxidation in the first step. (a) By a reductive amination in the presence of sodium cyanoborohydride, the oxidized oligosaccharide moieties are bound covalently to trypsin via its primary amino groups. (b) The resulting trypsin conjugate is attached to primary amino groups in chitosan-coated magnetite nanoparticles via its carboxylate residues using the carbodiimide reaction with EDC and sulfo-NHS as coupling agents.

buffer: lysozyme (LYS; 1.4 mg ml^{-1}), horseradish peroxidase (HRP; 4 mg ml^{-1}) and bovine serum albumin (BSA; 6.6 mg ml^{-1}). In-solution digestion of protein samples was performed using a common protocol. For reduction of disulfides, $20 \mu\text{l}$ of 100 mM 2-mercaptoethanol was pipetted and the protein solution was kept at 70°C for 10 min. Then, after cooling down, $20 \mu\text{l}$ of 200 mM iodoacetamide was added for alkylation. The mixture was incubated in the dark at ambient temperature for 30 min. Then $30 \mu\text{l}$ of 100 mM 2-mercaptoethanol was added for scavenging the unreacted iodoacetamide followed by a 10 min incubation. Later on, an aliquot ($100 \mu\text{l}$) of the working suspension of immobilized trypsin ($\sim 100 \text{ pmol}$ of the enzyme) was added to 1 ml of 0.05 M NH_4HCO_3 containing the standard protein (1000 pmol). The reaction mixture was incubated in a water

bath at 50°C for 1–2 h. After digestion, the immobilized trypsin was separated by an external permanent magnet and the obtained supernatant was transferred to another tube. The digests were finally analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

2.10. MALDI-TOF MS

Both peptide mass fingerprinting and intact protein mass determination were performed on a Microflex MALDI-TOF LRF20 mass spectrometer (Bruker Daltonik) essentially as described previously [32]. Intact BT and its conjugates in 0.1% formic acid were used at a concentration of 10 mg ml^{-1} .

3. Results and discussion

3.1. Chemical modification of trypsin by cyclodextrins

Prior to immobilization experiments, BT was modified by conjugating amino groups with polyaldehyde chains derived from α -, β - and γ -cyclodextrin via periodate oxidation. The molecular mass of BT and its conjugates was estimated by SDS-PAGE [30] (figure 2) and more accurately determined by MALDI-TOF MS. Considering the total number of lysine residues in its sequence plus the N terminus, BT comprises 15 primary amino groups [19]. As a result of the conjugation, the molecular mass of unmodified BT (23.2 kDa) was increased to final values of 29.9, 30.1 and 31.1 kDa for ACD-BT, BCD-BT and GCD-BT, respectively. Calculations of mass differences revealed that the conjugates contained six or seven sites of glycation.

3.2. Characterization of MNPs

The bacterial strain *M. gryphiswaldense* MSR-1 is able to produce magnetite nanocrystals with sizes of around 45 nm and covered by a phospholipidic membrane [33] as demonstrated by TEM (see figure 3(a)). Both size and morphological properties of all MNP variants with or without the phospholipidic membrane coated by chitosan only or with immobilized trypsin were characterized by TEM. The efficiency of the membrane removal was checked by TEM imaging (see figure 3(b)). While the native biogenic

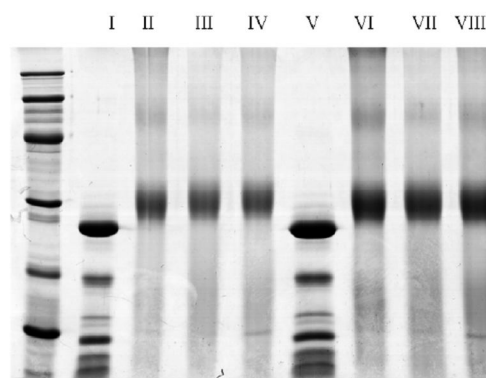


Figure 2. SDS-PAGE of BT and its conjugates with α -, β - and γ -cyclodextrin. From the left: protein marker (\downarrow 97, 66, 45, 30, 20.1 and 14.4 kDa), I—BT (10 μ g), II—ACD-BT (3 μ g), III—BCD-BT (3 μ g), IV—GCD-BT (3 μ g), V—BT (15 μ g), VI—ACD-BT (5 μ g), VII—BCD-BT (5 μ g), VIII—GCD-BT (5 μ g). The BT sample appears heterogeneous because of the presence of autolytic fragments.

MNPs are surrounded by an organic layer and arranged predominantly in a chain-like structure (see figure 3(a)), no organic layer was determined for bare MNPs while their aggregation was observed (see figure 3(b)). Synthesis of the magnetite–chitosan composite was performed by a modified cross-linking method [27, 34]. Chitosan-conjugated MNPs were obtained by the neutralization of an acidified suspension

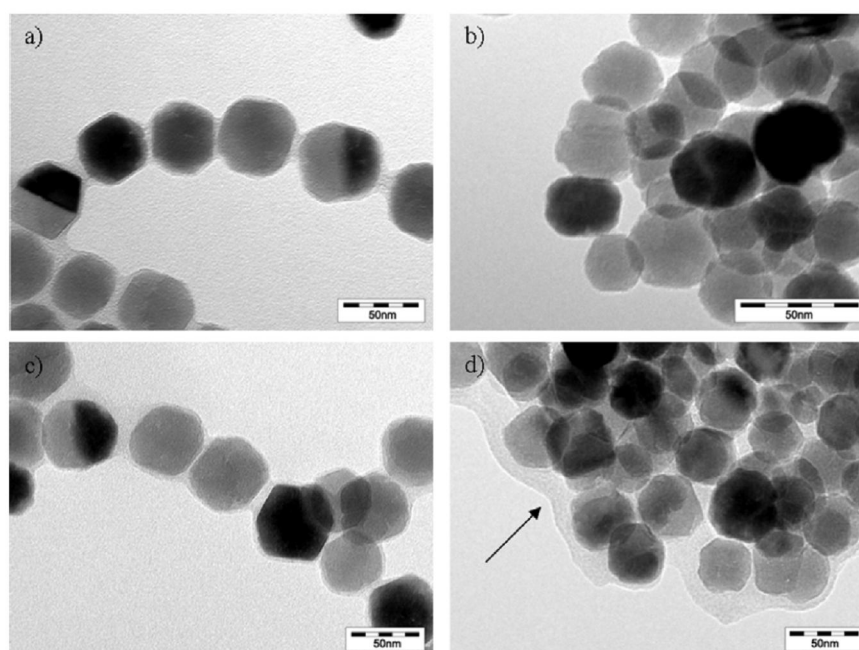


Figure 3. TEM images of (a) biogenic magnetite isolated from *M. gryphiswaldense* MSR-1 with their phospholipidic membrane; (b) biogenic magnetite after removal of the phospholipidic membrane; (c) biogenic MNPs modified with chitosan; (d) biogenic MNPs coated with chitosan and carrying modified trypsin. The black arrow shows the surface layer containing immobilized trypsin.

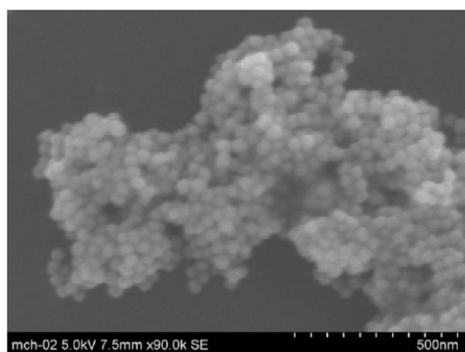


Figure 4. SEM image of magnetic nanoparticles isolated from *M. gryphiswaldense* MSR-1 after their coating with the biopolymer chitosan.

of magnetite and chitosan, which induced precipitation of the polysaccharide at the surface of magnetite nanoparticles. TEM images confirmed the presence of a surface chitosan layer (see figure 3(c)). The identical structure of such magnetite@chitosan hybrid was studied before by FT-IR spectroscopy where electrostatic interactions of biogenic MNPs and chitosan via its OH and/or NH groups were confirmed [28]. After attachment of modified trypsin, the functionalized MNPs displayed a thicker organic surface layer than those covered only by chitosan (see figure 3(d)). Trypsin binding was also confirmed using other methods (magnetization measurements, activity assay). The surface morphology of MNPs with and without the biopolymer chitosan was further evaluated using SEM (see figure 4).

Results of magnetometric studies performed on the functionalized biogenic magnetite coated either by chitosan or a chitosan shell with the immobilized trypsin (ACD-BT,

BCD-BT and GCD-BT) are shown in figure 5. Parameters of the respective hysteresis loops measured at 5 and 300 K are summarized in table 1. When measuring a system of MNPs carrying immobilized trypsin, a decrease in saturation magnetization (M_S) was observed in comparison with magnetite modified only by chitosan (Fe_3O_4 -chitosan, table 1). This could be considered as an indirect proof of trypsin binding to the chitosan shell of the magnetic carrier. Interestingly, the M_S value for Fe_3O_4 -chitosan-ACD-BT was reduced more than that for Fe_3O_4 -chitosan-BCD-BT but was higher than for Fe_3O_4 -chitosan-GCD-BT. This may reflect the difference in molecular mass and/or better magnetic shielding of ACD-BT over BCD-BT. The Fe_3O_4 -chitosan-GCD-BT magnetic system showed the highest decrease in the value of saturation magnetization in comparison with Fe_3O_4 -chitosan. The studied systems showed superparamagnetic behavior at 300 K and a blocking state at 5 K in the time-measuring window of the SQUID magnetometer. Magro *et al* [35] recently immobilized glucose oxidase to rhodamine-maghemite nanoparticles. The resulting system showed a decreased saturation magnetization in comparison with bare maghemite nanoparticles. The same effect was commonly observed after immobilization of other enzymes [36, 37].

3.3. Activity assays with soluble and immobilized trypsin

The thermostability of free and immobilized trypsin was compared by assaying activity towards the artificial substrate BAPNA, which was performed after a 30 min incubation at selected temperatures from the range of 20–75 °C. During incubation, the enzymes were kept in 20 mM sodium acetate buffer, pH = 5.25, to prevent analysis. The thermal stability of enzymes represents an important criterion to be considered

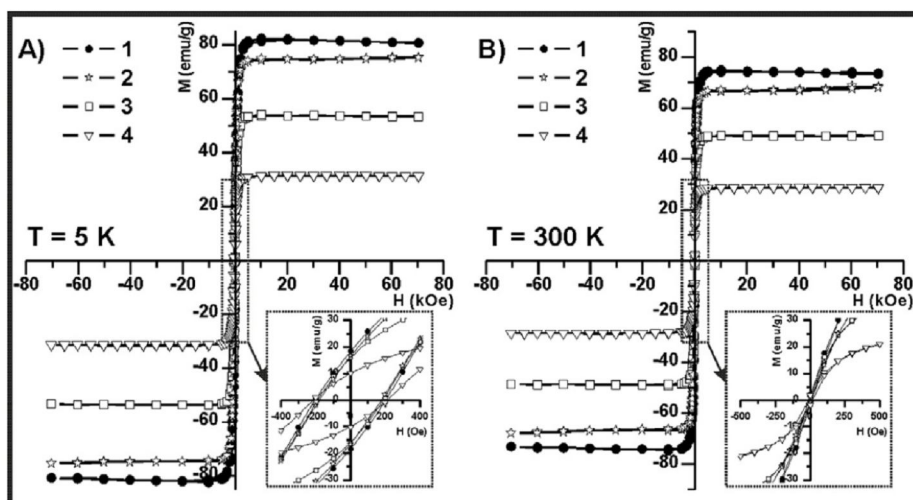


Figure 5. (A) Comparison of hysteresis loops measured at 5 K for magnetic systems: (1) Fe_3O_4 -chitosan, (2) Fe_3O_4 -chitosan-BCD-BT, (3) Fe_3O_4 -chitosan-ACD-BT and (4) Fe_3O_4 -chitosan-GCD-BT. (B) Comparison of hysteresis loops measured at 300 K for magnetic systems: (1) Fe_3O_4 -chitosan, (2) Fe_3O_4 -chitosan-BCD-BT, (3) Fe_3O_4 -chitosan-ACD-BT and (4) Fe_3O_4 -chitosan-GCD-BT.

Table 1. Parameters of the hysteresis loops of Fe₃O₄-chitosan, Fe₃O₄-chitosan-ACD-BT, Fe₃O₄-chitosan-BCD-BT and Fe₃O₄-chitosan-GCD-BT at 5 and 300 K. (Note: M_{S+} (+7 T) is the saturation magnetization at +7 T, M_{S-} (-7 T) is the saturation magnetization at -7 T, H_{C+} is the positive coercivity field, H_{C-} is the negative coercivity field, M_{R+} is the positive remanent magnetization and M_{R-} is the negative remanent magnetization.)

| Sample | <i>T</i> (K) | M_{S+} (+7 T) ± 0.01 (emu g ⁻¹) | M_{S-} (-7 T) ±0.01 (emu g ⁻¹) | H_{C+} ± 20 (Oe) | H_{C-} ± 20 (Oe) | M_{R+} ± 0.01 (emu g ⁻¹) | M_{R-} ± 0.01 (emu g ⁻¹) |
|---|-----------------|---|--|-----------------------|-----------------------|---|---|
| Fe ₃ O ₄ -chitosan | 5 | 80.84 | -80.77 | 206 | -207 | 18.45 | -18.48 |
| | 300 | 73.58 | -73.18 | 8 | -9 | 1.49 | -1.44 |
| Fe ₃ O ₄ -chitosan-ACD-BT | 5 | 53.45 | -53.40 | 190 | -191 | 16.13 | -16.12 |
| | 300 | 48.92 | -48.75 | 11 | -12 | 1.97 | -1.87 |
| Fe ₃ O ₄ -chitosan-BCD-BT | 5 | 75.43 | -75.43 | 179 | -180 | 16.59 | -16.56 |
| | 300 | 67.99 | -68.01 | 7 | -7 | 0.97 | -1.02 |
| Fe ₃ O ₄ -chitosan-GCD-BT | 5 | 31.39 | -31.40 | 214 | -215 | 10.08 | -10.09 |
| | 300 | 28.60 | -28.60 | -9 | 16 | 1.92 | -1.78 |

for evaluation of their applicability. Generally, chemically stabilized and immobilized enzymes have better resistance to higher temperatures than their soluble counterparts [38]. We determined a T_{50} constant, which is defined here as a temperature at which 50% of trypsin activity is retained upon 30 min incubation. The value of T_{50} for soluble BT was 41 °C, which increased to 44 °C after immobilization. All soluble trypsin conjugates (ACD-BT, BCD-BT, GCD-BT) showed higher T_{50} values (60–70 °C) than unmodified BT (table 2) as illustrated in figure 6, which has already been described [19]. In accordance with expectations, the thermostability of the conjugates was further increased up to 67 °C (T_{50} estimates) after their immobilization to biogenic MNPs (table 2). The thermostability curves for the immobilized trypsin conjugates are rather hyperbolic than sigmoid. When there is a sigmoid curve, the measured protein existed initially as a compact, well-folded structure and it is subjected to a cooperative unfolding reaction at higher temperatures. The non-cooperative melting reaction observed for the immobilized conjugates (which is to some extent also observable for the free conjugates in solution, where the sigmoid shape of the curve is less pronounced than that of the unmodified trypsin) indicates that the protein existed initially as a very flexible, partially unfolded structure or as a heterogeneous population of folded structures [39]. In this case, we suspect the latter is true. It has been shown by intact protein MALDI-TOF MS that the trypsin conjugates with oligosaccharides are heterogeneous by the nature of the glycation reaction (reductive amination) with a statistical distribution of molecular masses reflecting the number of modified amino groups [19]. The observed enhancement in thermostability (see figure 6) was found promising for the use of the functionalized MNPs in a rapid and effective proteolysis at high temperatures. Previous reports describing trypsin modification have usually demonstrated increased thermostability of the modified enzyme [38, 40], which is further improved by its immobilization [3].

The effect of pH on the activity of free and immobilized trypsin was investigated in buffers covering the pH range of 4.5–10.4. Covalent immobilizations may alter pH optima

Table 2. Comparison of the values of T_{50} , t_{50} , pH optimum and storage stability for free and immobilized trypsin.

| Trypsin form | T_{50} (°C) | pH optimum | t_{50} (h) | Residual activity after 6 weeks' storage (%) |
|---------------------|------------------|------------|-----------------|--|
| BT ^a | 41 | 8.5 | 0.5 | 48.0 |
| ACD-BT ^a | 54 | 8.5 | 21 | 59.0 |
| BCD-BT ^a | 56 | 8.0 | >24 | 57.5 |
| GCD-BT ^a | 59 | 9.0 | 24 | 59.0 |
| BT ^b | 44 | 8.0 | 4 | 80.0 |
| ACD-BT ^b | 60 | 8.5 | >24 | 87.5 |
| BCD-BT ^b | 66 | 8.5 | >24 | 88.5 |
| GCD-BT ^b | 66 | 9.0 | >24 | 90.0 |

^a Free trypsin.

^b Immobilized trypsin.

of enzymes [41]. However, in this study, there was no significant change observed. In general, the determined pH optimum values of the immobilized enzymes were found to be the same or shifted by 0.5 pH unit (table 2). Neither chemical modification of trypsin by glycation at surface lysine residues nor the subsequent immobilization of the conjugates to chitosan-covered MNPs significantly influenced the pH optimum. This is a big advantage as it may happen that the pH optimum is significantly altered upon immobilization, for example in the case of glucose oxidase immobilized to ultrafiltration membranes [42]. As has been shown in the original work describing trypsin glycation by activated oligosaccharides [19], this modification brings about a large change not only in the molecular mass but also in the isoelectric point of the enzyme, which is decreased from a basic value (10.5) to slightly acidic or neutral values of 6–7. Conversely, substrate binding at the active site is not affected: the K_m value for the artificial substrate BAPNA remains unchanged upon the modification [19]. This is consistent with the small change in the pH optimum which has been observed in this study. Presumably, alterations in the charge distribution arising from the modification concern only the surface of the trypsin molecule.

Both free and immobilized trypsin were stored in 0.1% v/v formic acid at 4 °C. After a 6-week-long storage under

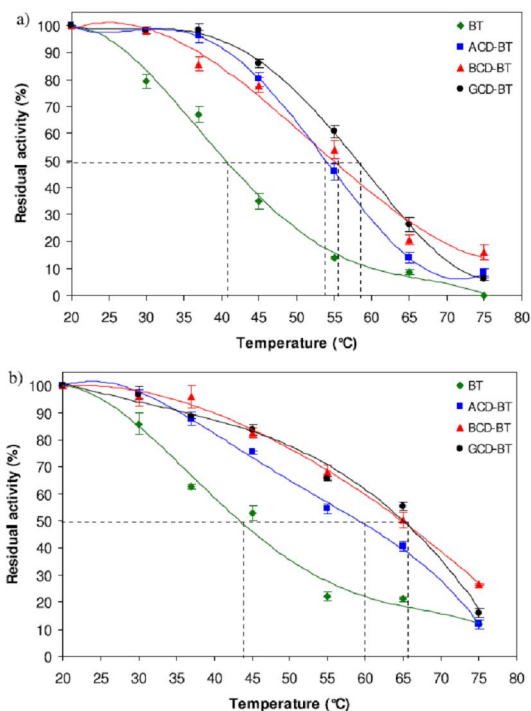


Figure 6. Thermal stability of (a) free and (b) immobilized trypsin. Trypsin aliquots were incubated in sodium acetate buffer (20 mM, pH 5.25) on a water bath at temperatures from the range of 20–75 °C for 30 min. Then the residual activity was assayed (explanation of the symbols is provided in the inset). The corresponding T_{50} values are summarized in table 2. Microsoft Excel 2007 was used for data processing and polynomial functions (with degree values of 3–5 depending on the particular case) were introduced to show trend lines. Intersection points of the trend lines with a horizontal line denoting 50% residual activity were drawn to get T_{50} estimates (see dashed representation).

these conditions, free BT retained 48% of its original activity, whereas ACD-BT, BCD-BT and GCD-BT kept almost 60% of their original activity (table 2). After covalent immobilization of trypsin and its conjugates, their storage stability was improved. The immobilized BT kept 80% of its activity. For ACD-BT, BCD-BT and GCD-BT, residual activity values of around 90% were found (table 2). In accordance with previous findings [20, 43], both acidic conditions and low temperature guarantee higher stability of trypsin during its storage. Chemical modification and immobilization then provide an additional positive effect [44]. High storage stability has been reported for trypsin immobilized via simple adsorption [20]. Similar positive results with respect to storage stability have been found for other immobilized enzymes (lipase, glucose oxidase) and magnetic nanoparticles as a carrier [45, 46].

Trypsin undergoes autolysis under basic pH, which is accompanied by the loss of its activity [19, 38]. Stability against autolysis was studied by incubating the enzyme in the assay buffer for a time period of 24 h. In defined time intervals within this time period, the hydrolytic activity of free and immobilized trypsin was determined. Free BT was

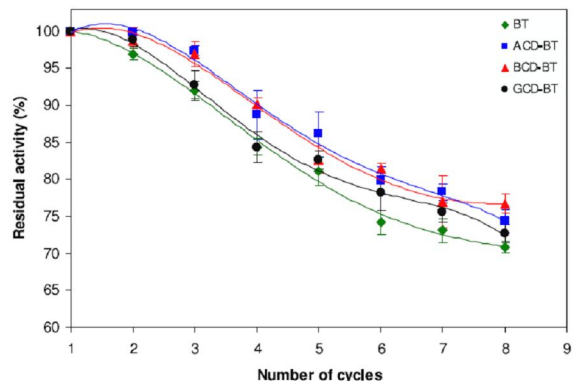


Figure 7. Reusability of the immobilized trypsin measured during repeated hydrolysis of BAPNA. The residual activity was assayed after each cycle; an explanation of the symbols is provided in the inset.

already inactive after 4 h of incubation. In contrast, the immobilized enzyme retained 50% of its original activity after 4 h of incubation at ambient temperature. The studied trypsin conjugates were more stable than BT itself. After 24 h of incubation, they retained about 45% (ACD-BT), 52% (BCD-BT) and 50% (GCD-BT) of the original activity. After immobilization, these values were increased. The immobilized conjugates retained on average 75% of their residual activity. All trypsin forms were evaluated by determining their t_{50} constant (table 2), which is defined here as a time of incubation at a basic pH after which 50% of the original activity is retained.

The most important advantage of enzyme immobilization from the point of view of a potential application is the resulting possibility of repeatable use [47]. The residual activity of immobilized BT and its conjugates with oxidized cyclodextrins after repeated reactions with BAPNA in the assay buffer is illustrated in figure 7. After eight cycles, the immobilized BT, ACD-BT, BCD-BT and GCD-BT retained 71, 74, 77 and 73% of the original activity, respectively. In this way, reusability was confirmed. Maciel *et al* [9] immobilized trypsin on magnetic levan particles, and the enzyme lost about 10% of its original activity after 10 cyclic reactions. In another study, immobilized trypsin retained only 43% of its activity after seven cycles [48].

3.4. Digestion of protein samples with the immobilized trypsin

Trypsin is frequently used in proteomic research as the first-choice protease. However, this application is limited by its low thermostability and rapid autolysis under typical digestion conditions (pH 8.0, 37 °C) [19]. The presence of autolytic peptides can be useful for internal calibration [49]. On the other hand, the autolyzate may decrease the quality of results with low-concentration protein digests and obscure protein identification by database searching. It is shown here that this drawback can be reduced or totally eliminated by a chemical modification and/or immobilization to the

Table 3. Comparison of present results with data from previous studies. ND stands for 'no data available'.

| Enzyme | Residual activity (6 weeks of storage at acidic pH); in % | Residual activity after repeated use (eight cycles); in % | Typical digestion conditions: temperature (°C)/time |
|---|---|---|---|
| Free trypsin ^a | 48 | — | 37/16 h |
| Immobilized conjugate (BCD-BT) ^a | 88.5 | 77 | 50/1 h |
| Immobilized trypsin 1 ^a | 80 | 71 | 37/12 h |
| Immobilized trypsin 2 ^b | 70 | ND ^c | 25/2 h |
| Immobilized trypsin 3 ^d | ND ^c | 50 | ND ^c |
| Immobilized trypsin 4 ^e | ND ^c | 70 | 37/5 min |
| Immobilized trypsin 5 ^f | 79 ^g | 61 ^h | ND ^c |
| Immobilized trypsin 6 ⁱ | 81 ^j | 87 ^h | ND ^c |
| Immobilized trypsin 7 ^k | 50 ^l | ND ^c | ND ^c |
| Immobilized trypsin 8 ^m | 80; 78 ⁿ | 61; 74 ^o | 37/15 min |

^a This work.

^b Nanofibrous polymer grafted magnetic poly (GMA-MMA)-g-MAA beads [20].

^c ND stands for 'no data available'.

^d Magnetite particles [9].

^e Detonation nanodiamond [52].

^f Beads of cross-linking chitosan-coated silica gel (activated with glutaraldehyde) [53].

^g After 30 days in 50 mM tris-HCl, pH 8.5.

^h After four cycles only.

ⁱ Carboxylate-functionalized cation exchanger prepared from nanocellulose [54].

^j After 3 weeks in 50 mM phosphate buffer, pH 7.5.

^k Crosslinked thermosensitive carriers (type TH8) [55].

^l After 30 days in 1 mM HCl.

^m Carboxymethyl chitosan nanoparticles treated with Cu (II) and Zn (II) ions [56].

ⁿ After 1 week, storage condition not shown.

^o After six cycles only.

biogenic magnetite. Parallel increases in thermostability and resistance against autolysis were previously achieved by chemical modification of BT with periodate-oxidized cyclodextrins [19]. Such conjugates were in the present study attached covalently to chitosan-modified MNPs using EDC hydrochloride and sulfo-NHS as coupling agents. Then three model proteins were chosen covering a typical mass range of protein separation in 12% polyacrylamide gels, which is commonly used in SDS-PAGE: LYS, HRP and BSA. Their corresponding molecular masses are 14, 40 and 67 kDa, respectively. All model proteins were digested at 50 °C for 1 h (HRP, a glycoprotein, also additionally for 2 h) to test the performance and effectiveness of the immobilized BT conjugates. After digestion, the immobilized enzyme was magnetically separated from the reaction mixture. The resulting tryptic digests were analyzed by MALDI-TOF MS (an illustrative spectrum is shown in figure 8). As there were many peptide fragments generated by digestion, the model proteins were identified unambiguously. The sequence coverage values of 86.8, 45.1 and 32.0% were obtained for LYS, HRP and BSA, respectively, using the immobilized BCD-BT. The probability-based score values in protein database search using the program Mascot were 228 (LYS), 141 (BSA) and 116 (HRP). All data were comparable with the results of a common overnight digestion. Interestingly, but not unexpectedly, the two major peaks of BT autolytic peptides (m/z 2163.06 and 2273.18) were not observed at all. A previous study describes covalent immobilization of native trypsin to carboxyl- and amine-functionalized magnetic

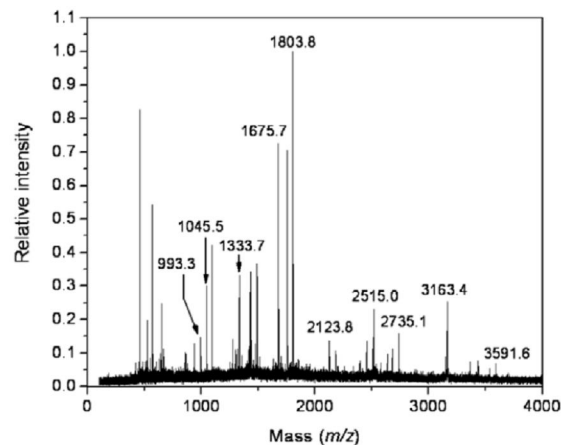


Figure 8. MALDI-TOF peptide mass fingerprinting of lysozyme from egg hen white. A lysozyme sample was subjected to in-solution digestion by the immobilized BCD-BT at 50 °C for 1 h. The measurement was performed in the reflectron mode for positive ions using CHCA as a matrix with the following database search outputs: sequence coverage = 86.8%; probability-based score = 228.

microspheres using EDC, NHS and glutaraldehyde as coupling reagents [50]. The immobilized enzyme was applied for fast and efficient proteolysis. Digestion of BSA was performed for 1 min at ambient temperature. When compared

with a conventional digestion protocol (incubation at 37 °C for 12 h), the improved digestion resulted in a higher number of peptides providing higher sequence coverage values for protein identification. Similarly, trypsin immobilized onto magnetic carbonaceous microspheres allowed us to obtain a protein digestion efficacy comparable to that using the traditional overnight method [51].

4. Conclusions

In this work, magnetite nanoparticles were isolated from the magnetotactic bacterium *M. gryphiswaldense* MSR-1. The natural phospholipidic membrane was removed by SDS and the surface of the biogenic magnetite was covered with the natural biopolymer chitosan. The obtained magnetite nanoparticles showed a unique magnetic responsiveness, cubo-octahedral shape and almost uniform size of 30–50 nm, thus being suitable for immobilization of trypsin using EDC and sulfo-NHS as coupling reagents. Native BT is characterized by drawbacks emerging from its autolysis. For that reason, it was modified by conjugation with cyclodextrins prior to a covalent immobilization to chitosan-coated MNPs. The immobilized trypsin conjugates exhibited largely improved thermostability and storage stability when compared with the soluble enzyme. After immobilization, the optimal pH value was not altered, which is advantageous for keeping traditional in-solution digestion protocols. The described enzymatic system has proven itself applicable for a fast and efficient protein digestion with economic reusability. Considering these parameters, the presented enzymatic system exhibits properties that are superior to those of trypsin forms obtained by other frequently used approaches (table 3). When used, the immobilized trypsin is separated magnetically for a few seconds and the acquired digests are free of autolytic peptides, which reduces autolysis-related background in mass spectrometry of peptides for protein identification. All the improvements in performance make the described trypsin nanoparticles a promising tool for protein digestion.

Acknowledgments

This work was supported by OP RD&I grant no. ED0007/01/01 (Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research), the Operational Program Research and Development for Innovations—European Regional Development Fund (project no. CZ.1.05/2.1.00/03.0058) of the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic, the Operational Program Research and Development for Innovations—KONTAKT II (project no. LH12085) of the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic, the Operational Program Research and Development for Innovations—European Social Fund (project no. CZ.1.07/2.3.00/20.0155) of the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic, and by the Academy of Sciences of the Czech Republic (project no. KAN115600801). The authors also thank the support of the Internal Grant of Palacky University in Olomouc (grants no. PrF_2012_013 and no. PrF_2012_028).

References

- [1] Pankhurst Q A, Connolly J, Jones S K and Dobson J 2003 Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36** R167–81
- [2] Safarik I and Safarikova M 2009 Magnetic nano- and microparticles in biotechnology *Chem. Pap.* **63** 497–505
- [3] Kluchova K et al 2009 Superparamagnetic maghemite nanoparticles from solid-state synthesis—their functionalization towards peroral MRI contrast agent and magnetic carrier for trypsin immobilization *Biomaterials* **30** 2855–63
- [4] Lin J, Lin Y S, Kuo S T, Jiang C M and Wu M C 2009 Purification of soybean amylase by superparamagnetic particles *Food Chem.* **117** 94–8
- [5] Ma M, Zhang Y, Yu W, Shen H Y, Zhang H Q and Gu N 2003 Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane *Colloids Surf. A* **212** 219–26
- [6] Pan B F, Gao F and Gu H C 2005 Dendrimer modified magnetite nanoparticles for protein immobilization *J. Colloid Interface Sci.* **284** 1–6
- [7] Wilhelm C and Gazeau F 2008 Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles *Biomaterials* **29** 3161–74
- [8] Ansari S A and Husain Q 2012 Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review *Biotechnol. Adv.* **30** 512–23
- [9] Maciel J C, Andrad P L, Neri D F M Jr, Carvalho L B, Cardoso C A, Calazans G M T, Aguiar Albino J and Silva M P C 2012 Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization *J. Magn. Magn. Mater.* **324** 1312–6
- [10] Kamruzzaman Selim M K, Ha Y S, Kim S J, Chang Y, Kim T J, Lee G H and Kang I K 2007 Surface modification of magnetite nanoparticles using lactobionic acid and their interaction with hepatocytes *Biomaterials* **28** 710–6
- [11] Luo X L, Xu J J, Zhang Q, Yang G J and Chen H Y 2005 Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly *Biosens. Bioelectron.* **21** 190–6
- [12] Verheul R J, Amidi M, van Steenberg M J, van Riet E, Jiskoot W and Hennink W E 2009 Influence of the degree of acetylation on the enzymatic degradation and *in vitro* biological properties of trimethylated chitosans *Biomaterials* **30** 3129–35
- [13] Kalkan N A, Aksoy S, Aksoy E A and Hasirci N 2012 Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase *J. Appl. Polym. Sci.* **123** 707–16
- [14] Heyen U and Schüler D 2003 Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61** 536–44
- [15] Faivre D and Schüler D 2008 Magnetotactic bacteria and magnetosomes *Chem. Rev.* **108** 4875–98
- [16] Han L, Li S, Yang Y, Zhao F, Huang J and Chang J 2007 Comparison of magnetite nanocrystal formed by biomineralization and chemosynthesis *J. Magn. Magn. Mater.* **313** 236–42
- [17] Xie J, Chen K and Chen X 2009 Production, modification and bio-applications of magnetic nanoparticles gestated by magnetotactic bacteria *Nano Res.* **2** 261–78
- [18] Olsen J V, Ong S E and Mann M 2004 Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues *Mol. Cell. Proteomics* **3** 608–14
- [19] Šebela M, Štosová T, Havliš J, Wielsch N, Thomas H, Zdráhal Z and Shevchenko A 2006 Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation *Proteomics* **6** 2959–63

- [20] Bayramoğlu G, Yilmaz M, Senel A Ü and Arica M Y 2008 Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly (GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption *Biochem. Eng. J.* **40** 262–74
- [21] Peng Z G, Hidajat K and Uddin M S 2004 Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles *J. Colloid Interface Sci.* **271** 277–83
- [22] Jeng J, Lin M F, Cheng F Y, Yeh C S and Shiea J 2007 Using high-concentration trypsin-immobilized magnetic nanoparticles for rapid *in situ* protein digestion at elevated temperature *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21** 3060–8
- [23] Li Y, Xu X, Deng C, Yang P and Zhang X 2007 Immobilization of trypsin on superparamagnetic nanoparticles for rapid and effective proteolysis *J. Proteome Res.* **6** 3849–55
- [24] Kim M H, An S, Won K, Kim H J and Lee S H 2012 Entrapment of enzymes into cellulose–biopolymer composite hydrogel beads using biocompatible ionic liquid *J. Mol. Catal. B* **75** 68–72
- [25] Moreno-Garido I 2008 Microalgae immobilization: current techniques and uses *Bioresour. Technol.* **99** 3949–64
- [26] Grünberg K, Müller E C, Otto A, Reszka R, Linder D, Kube M, Reinhardt R and Schüler D 2004 Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense* *Appl. Environ. Microbiol.* **70** 1040–50
- [27] Belessi V, Zboril R, Tucek J, Mashlan M, Tzitzios V and Petridis D 2008 Ferrofluids from magnetic–chitosan hybrids *Chem. Mater.* **20** 3298–305
- [28] Marková Z, Šišková K, Filip J, Šafářová K, Prucek R, Panáček A, Kolář M and Zbořil R 2012 Chitosan-based synthesis of magnetically-driven nanocomposites with biogenic magnetite core, controlled silver size, and high antimicrobial activity *Green Chem.* **14** 2550–8
- [29] Morand P and Biellmann J F 1991 Modification of α -amylase from *Bacillus licheniformis* by the polyaldehyde derived from β -cyclodextrine and α -amylase thermostability *FEBS* **289** 148–50
- [30] Laemmli U K 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4 *Nature* **227** 680–5
- [31] Bradford M M 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.* **72** 248–54
- [32] Huličiak M, Vacek J, Šebela M, Orolinová E, Znaleziowa J, Havlíková M and Kubala M 2012 Covalent binding of cisplatin impairs the function of Na⁺/K⁺-ATPase by binding to its cytoplasmic part *Biochem. Pharmacol.* **83** 1507–13
- [33] Schüler D 2002 The biomineralization of magnetosomes in *Magnetospirillum gryphiswaldense* *Int. Microbiol.* **5** 209–14
- [34] Honda H, Kawabe A, Shinkai A and Kobayashi T 1998 Development of chitosan-conjugated magnetite for magnetic cell separation *J. Ferment. Bioeng.* **86** 191–6
- [35] Magro M et al 2012 Charge binding of rhodamine derivate to OH⁻ stabilized nanomaghemite: universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors *Acta Biomater.* **8** 2068–76
- [36] Jin X, Li J F, Huang P Y, Dong X Y, Guo L L, Yang L, Cao Y C, Wei F, Zhao Y D and Chen H 2010 Immobilized protease on the magnetic nanoparticles used for the hydrolysis of rapeseed meals *J. Magn. Magn. Mater.* **322** 2031–7
- [37] Shaw S Y, Chen Y J, Ou J J and Ho L 2006 Preparation and characterization of *Pseudomonas putida* esterase immobilized on magnetic nanoparticles *Enzyme Microb. Technol.* **39** 1089–95
- [38] Murphy A and ÓFágáin C 1996 Stability characteristics of chemically-modified soluble trypsin *J. Biotechnol.* **49** 163–71
- [39] Jha S K and Udgaonkar J B 2007 Exploring the cooperativity of the fast folding reaction of a small protein using pulsed thiol labeling and mass spectrometry *J. Biol. Chem.* **282** 37479–91
- [40] Hernández K, Fernández L, Gómez L and Villalonga R 2006 Glycosidation of trypsin with end-group activated dextran *Process Biochem.* **41** 1155–9
- [41] Yang Y M, Wang J W and Tan R X 2004 Immobilization of glucose oxidase on chitosan-SiO₂ gel *Enzyme Microb. Technol.* **34** 126–31
- [42] Godjevargova T, Konsulov V, Dimov A and Vasileva N 2000 Behavior of glucose oxidase immobilized on ultrafiltration membranes obtained by copolymerizing acrylonitrile and *N*-vinylimidazol *J. Membr. Sci.* **172** 279–85
- [43] Goradia D, Cooney J, Hodnett B K and Magner E 2005 The adsorption characteristics, activity and stability of trypsin onto mesoporous silicates *J. Mol. Catal. B* **32** 231–9
- [44] Nikolic T, Kostic M, Praskalo J, Pejic B, Petronijevic Z and Skundric P 2010 Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin *Carbohydr. Polym.* **82** 976–81
- [45] Tang Z X, Quian J Q and Shi L E 2007 Characterization of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles *Mater. Lett.* **61** 37–40
- [46] Kouassi G K, Irudayaraj J and McCarty G 2005 Activity of glucose oxidase functionalized onto magnetic nanoparticles *Biomagn. Res. Technol.* **3** 1–10
- [47] Lei L, Bai Y, Li Y, Yi L, Yang Y and Xia C 2009 Study of immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups *J. Magn. Magn. Mater.* **321** 252–8
- [48] Zhu X, Zhou T, Wu X, Cai Y, Yao D, Xie C and Liu D 2011 Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media *J. Mol. Catal. B* **72** 145–9
- [49] Luo Y, Li T, Yu F, Kramer T and Cristea I M 2010 Resolving the composition of protein complexes using a MALDI LTQ orbitrap *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21** 34–46
- [50] Sun L, Li Y, Yang P, Zhu G and Dovichi N J 2012 High efficiency and quantitatively reproducible protein digestion by trypsin-immobilized magnetic microspheres *J. Chromatogr. A* **1220** 68–74
- [51] Yao G, Qi D, Deng C and Zhang X 2008 Functionalized magnetic carbonaceous microspheres for trypsin immobilization and the applications to fast proteolysis *J. Chromatogr. A* **1215** 82–91
- [52] Wei L, Zhang W, Lu H and Yang P 2010 Immobilization of enzyme on detonation nanodiamond for highly efficient proteolysis *Talanta* **80** 1298–304
- [53] Xi F, Wu J, Jia Z and Lin X 2005 Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead *Process Biochem.* **40** 2833–40
- [54] Anirudhan T S and Rejeena S R 2012 Adsorption and hydrolytic activity of trypsin on a carboxylate-functionalized cation exchanger prepared from nanocellulose *J. Colloid Interface Sci.* **381** 125–36
- [55] Hamerska-Dudra A, Bryjak J and Trochimczuk A W 2007 Immobilization of glucoamylase and trypsin on crosslinked thermosensitive carriers *Enzyme Microb. Technol.* **41** 197–204
- [56] Sun J, Ma H, Liu Y, Su Y, Xia W and Yang Y 2012 Improved preparation of immobilized trypsin on superparamagnetic nanoparticles decorated with metal ions *Colloids Surf. A* **414** 190–7