

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyzikální chemie



Příprava kompozitu $\text{Ag}@\text{SiO}_2$ pro odstraňování mikrobiální kontaminace vod

Bakalářská práce

Autor:

Vojtěch Šarafín

Studijní obor:

Nanomateriálová chemie

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Olomouc 2016

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré informace a podkladové materiály, které jsem při práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval Doc. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za vedení bakalářské práce, rady, trpělivost a ochotu. Dále bych rád poděkoval Mgr. Renatě Večeřové za přípravu bakteriálních bujónů a suspenzí. Děkuji také Mgr. Janu Kolaříkovi za ochotu měřit obsah stříbra na AAS. Moc děkuji mé rodině za podporu, ochotu a trpělivost v průběhu celého studia i mimo něj.

Nakonec děkuji také kamarádům z kapely No Doe Martinovi, Josefovi a Tomovi za čas strávený ve zkušebně i na pódiu, spolužákům za vytvoření spolupracujícího a motivujícího kolektivu a mým spolubydlícím Simonu Hikelovi, Natalii Pikulíkové a Michalovi Kerestúrimu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Vojtěch Šarafin
Název práce:	Příprava Kompozitu Ag@SiO_2 pro Odstraňování Mikrobiální Kontaminace Vod
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Doc. Aleš Panáček, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2016
Abstrakt:	<p>Cílem této bakalářské práce byla příprava kompozitu složeného z křemeliny a nanočástic stříbra pomocí mezivrstvy PDDA (poly(dimethyldiallylamonium chlorid)) pro účely odstranění mikrobiální kontaminace vod. Nanočástice stříbra byly připraveny dnes již klasickým Tollensovým způsobem, kdy je stříbro vyredukováno z diaminstříbrného komplexu maltózou. Takto připravené částice, velké v průměru 28 nm, byly naadsorbovány na křemelinu, jejíž povrchový náboj byl změněn díky PDDA na kladný. Kompozit byl charakterizován pomocí elektronové mikroskopie, obsah stříbra ve všech kompozitech byl měřen pomocí atomové absorpční spektroskopie. Následně byly pomocí dvou metod testovány antimikrobiální účinky kompozitu v závislosti na čase vůči bakterii <i>E. coli</i>, která je nejčastějším původcem bakteriálního znečištění vod. První metoda spočívala ve filtraci bakteriálně znečištěné vody přes kompozit a druhá metoda spočívala ve vytřepávání bakteriální suspenze s kompozitem.</p>
Klíčová slova:	kompozit, křemelina, nanočástice stříbra, mikrobiální kontaminace vod, desinfekce vod, filtrace, PDDA
Počet stran:	62
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Vojtěch Šarafin

Title: Preparation of Ag@SiO₂ Composite for Removing of Microbial Water Contamination

Department: Department of Physical Chemistry

Type of thesis: Bachelor

Supervisor: Doc. Aleš Panáček, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract: The aim of this work was to prepare the Ag@SiO₂ composite containing diatomaceous and silver nanoparticles with PDDA (poly(dimethyldiallylamonium chloride)) as interlayer for removing of microbial water contamination. Silver nanoparticles were prepared by modified Tollens process. These nanoparticles with the average size of 28 nm were adsorbed on surface of diatomite modified by PDDA. The composite was examined through electron microscopy and the amount of silver in the composites was determined by AAS. The antimicrobial effect was tested with respect to time by two methods on *E. coli* bacteria which are the most common source of microbial water contamination. The first method consisted of filtration through the composite and the second method consisted of shaking the bacterial suspension with the composite.

Keywords: composite, silver nanoparticles, diatomite, microbial water contamination, water disinfection, filtration, PDDA

Number of pages: 62

Language: Czech

Obsah

Teoretická část.....	9
Úvod.....	8
1. Koloidní soustavy	10
1.1 Charakteristika koloidních soustav	10
1.2 Kinetické vlastnosti.....	11
1.2.1 Brownův pohyb.....	11
1.2.2 Difuze.....	11
1.2.3 Osmóza	13
1.2.4 Sedimentace	14
1.3 Optické vlastnosti.....	15
1.3.1 Absorpce záření	15
1.3.2 Rozptyl záření	16
1.4 Elektrické vlastnosti koloidních soustav	16
1.5 Stabilita soustav	18
1.5.1 DLVO teorie	18
2. Nanočástice stříbra.....	19
2.1 Příprava nanočástic stříbra	19
2.2 Aplikace nanočástic stříbra	20
3. Křemelina.....	21
4. Nanokompozity.....	23
4.1 Kompozity obsahující nanočástice stříbra a jejich využití.....	24
5. Problematika biologického znečištění vod a možnosti jejího odstraňování	25
5.1 Faktory ovlivňující znečištění vod	25
5.2 Možnosti čištění a odstraňování mikrobiální kontaminace vod.....	26

Experimentální část	28
6. Materiál a metody	29
6.1 Chemikálie	29
6.2 Přístroje	29
6.3 Příprava nanočástic stříbra	29
6.4 Příprava nanokompozitu Ag@SiO ₂	30
6.5 Stanovení antimikrobiální aktivity při průtoku vody přes kompozit	30
6.6 Stanovení antimikrobiální aktivity při protřepávání vody s kompozitem.....	32
6.7 Uvolňování stříbra z kompozitu.....	33
6.8 Odběr přírodních vzorků	33
7. Výsledky a diskuze	35
7.1 Příprava nanočástic stříbra	35
7.2 Příprava nanokompozitu Ag@SiO ₂	35
7.3 Stanovení antimikrobiální aktivity při průtoku vody přes kompozit	37
7.4 Stanovení antimikrobiální aktivity při třepání vody s kompozitem.....	44
7.5 Uvolňování stříbra z kompozitu.....	54
Závěr	55
Summary	56
8. Reference	57

Úvod

Nanokompozity jsou v dnešní době poměrně hojně studovanými materiály, jelikož vykazují vlastnosti, které tradiční materiály nemají. V této práci je předmětem studia nanokompozit tvořený nanočásticemi stříbra a křemeliny.

Antibakteriální účinky stříbra jsou známy již od antických dob, kdy byla pitná voda uchovávaná ve stříbrných nádobách. V dnešní době má stříbro stále své místo v procesech dezinfekce vod, nicméně kvůli jeho toxicitě vůči savcím buňkám není jeho plošné použití možné a nalézá tak uplatnění jako lokální desinfekční prostředek například v čištění pitných vod ve studnách (1). S nástupem moderních zobrazovacích metod a nanotechnologií bylo možno začít studovat účinky nanočástic stříbra. Existuje mnoho prací, které dokazují toxicitu vůči nižším organismům, jako jsou bakterie, viry nebo prvoci a zároveň nevykazují letální účinky vůči vyšším organismům (2). Se zvyšující se rezistencí bakterií vůči tradičním antibiotikům jsou tedy nanočástice stříbra slibnou možností, jak se s bakteriemi vypořádat.

Jako substrát pro adsorpci nanočástic stříbra v této práci sloužila křemelina. Tento lehký, pórovitý, sypký materiál je pozůstatkem schránek jednobuněčných organismů rozsivek. Tyto schránky jsou tvořeny převážně z oxidu křemičitého, který je sám o sobě stabilní a nereaktivní. Křemelina jako taková je známa již dlouho dobu jako filtrační materiál a je stále využívána v tradičních odvětvích potravinářství, jako je pivovarnictví a vinařství. Zde je křemelina používána k filtraci zákalů a mechanických nečistot. Jelikož ale není schopna odstranit mikrobiální kontaminaci, je nutno například pivo tepelně sterilizovat a tak ztrácí chuť.

Cílem této bakalářské práce bylo připravit nanokompozit Ag@SiO_2 jakožto filtrační materiál, který by byl schopen odstranit jak mechanické nečistoty běžně se vyskytující ve vodách, tak mikrobiální kontaminaci, se kterou si čistá křemelina nedokáže poradit.

Teoretická část

1. Koloidní soustavy

1.1 Charakteristika koloidních soustav

Koloidní soustavy jsou jedny ze základních disperzních soustav. Disperzní soustavy jsou tvořeny disperzní fází a disperzním prostředím. Disperzní prostředí tvoří matici, ve které je rozptýlena disperzní fáze. Pokud je disperzní soustava tvořena dvěma fázemi, hovoříme o heterogenní soustavě. Taková soustava má oddělenou disperzní fází a disperzní prostředí hranicí, kterou nazýváme fázové rozhraní. Příkladem je olej ve vodě. Je-li soustava tvořena dvěma složkami, ale obsahuje pouze jednu fází, hovoříme o soustavě homogenní. Taková soustava vznikne například rozpuštěním soli ve vodě, kde nepozorujeme fázové rozhraní a složky opticky nerozpoznáme, ale přesto máme v soustavě dvě odlišné chemické látky.

Disperzní soustavy rozlišujeme na základě několika vlastností například často podle velikosti nebo podle tvaru rozptýlených částic. Částice disperzní fáze bývají jinak velké, a proto se zavádí veličina stupeň disperzity, což je převrácena hodnota lineárního rozměru částice. Pokud jsou částice rozptýleny jemněji, je stupeň disperzity vyšší. Dále dělíme soustavy na monodisperzní a polydisperzní. Monodisperzní soustavy obsahují částice se stejnou velikostí a polydisperzní soustavy obsahují částice, které mají různou velikost. Nebo další dělení na soustavy homodisperzní, které obsahují částice stejného tvaru a naopak soustavy heterodisperzní, které obsahují částice s různým tvarem. Z pohledu velikosti částic rozdělujeme disperzní soustavy na soustavy analytické, koloidní a hrubé. Hranice těchto soustav jsou pouze orientační, nejsou dány zcela přesně. Analytické disperze obsahují částice menší než 10^{-9} m. Koloidní soustavy obsahují částice větší než analytické a menší než disperze hrubé. Hrubé disperze obsahují částice větší než 10^{-6} m.

Koloidní soustavy lze také dělit na několik podkategorií, podle toho v jakém skupenském stavu se nachází disperzní fáze a prostředí. Obecně se označují koloidní soustavy jako soly. Například předpona aero označuje soly s plynným disperzním prostředím anebo předpona lyo označuje soly s kapalným disperzním prostředím. Do tohoto dělení spadají další možné koloidní soustavy, jako jsou emulze, pěny, tuhé soly nebo tuhé pěny. Koloidní soustavy je možno dále dělit na základě vlastností fázového rozhraní a to na lyofobní, lyofilní a asociativní. Lyofobní soustavy se vyznačují ostře vymezeným fázovým rozhraním. Pokud u těchto soustav je disperzním prostředím voda, hovoříme o hydrofobní soustavě. Jsou tvořeny často anorganickými látkami, nevnikají

samovolně a nejsou ani termodynamicky stabilní. Naopak lyofilní soustavy nemají ostré fázové rozhraní, jsou tvořeny vysokomolekulárními látkami, mohou vznikat samovolně a jsou termodynamicky stabilní. Jako hydrofilní soustavy označujeme lyofilní soustavy, u kterých tvoří disperzní prostředí voda. Poslední skupinou z hlediska vlastnosti jsou asociativní soustavy. Tyto soustavy nemají definované fázové rozhraní, jelikož dochází k neustálému pohybu molekul surfaktantů mezi částicemi a prostředím. Speciálním případem koloidních soustav jsou gely, které jsou schopné měnit kapalnou formu na formu pevnou. Tuto vlastnost poskytují částice, které jsou schopné se za určitých podmínek spojovat a vytvářet síťové struktury.

Koloidní soustavy jsou výjimečné hlavně díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem. Vyznačují se velkým specifickým povrchem, to znamená, že mají velkou plochu fázového rozhraní mezi disperzní fází a prostředím v porovnání s objemem soustavy. Platí, že čím je menší velikost částic, tím je větší plocha fázového rozhraní. Navíc roste množství molekul na povrchu. U částic velkých 1nm je asi 30% molekul na povrchu. Zajímavé jsou i optické vlastnosti, protože u takto malých částic jsou energetické hladiny elektronů zcela jinak uspořádány, než u běžných látek (3).

1.2 Kinetické vlastnosti

1.2.1 Brownův pohyb

Částice v koloidních soustavách konají ustavičný neuspořádaný pohyb, vlivem tepelného pohybu částic, který má zcela náhodný směr a sílu. Tento jev poprvé pozoroval skotský botanik Robert Brown (1773-1858) roku 1827 na pylových zrnech pylu ve vodě (4). Intenzita tohoto pohybu roste s teplotou. Na druhou stranu jej zase snižuje zvýšení viskozity prostředí. Hybnou sílu tohoto pohybu zajišťuje vnitřní energie disperzního prostředí a nahodilost pohybu částic pozorujeme díky nahodilým impulsům molekul rozpouštědla (5).

1.2.2 Difuze

Stejně jako Brownův pohyb je i difuze projevem tepelného pohybu částic. Difuze je pohyb v zásadě nahodilý, ale i přesto mají látky tendenci pronikat z prostředí s nižší koncentrací do prostředí s vyšší koncentrací. Hnací silou je tedy rozdíl koncentrací neboli koncentrační gradient v soustavě. Difuzi popisuje tzv. první Fickův zákon:

$$J = -D \left(\frac{dc}{dx} \right) \quad (1.1)$$

Kde D značí difuzní koeficient a dc/dx je směrnice změny látkového množství (6). Difuzní koeficient je konstantou úměrnosti, která vyjadřuje, kolik molů látky projde za čas 1 s průřezem 1 m² při koncentračním gradientu 1 mol/m.

Později byl Einsteinem odvozen vztah mezi třecím koeficientem, teplotou a difuzním koeficientem:

$$D = \frac{kT}{B} \quad (1.2)$$

kde k je Boltzmanova konstanta, T je termodynamická teplota. Pro sféricky symetrické částice o poloměru r je koeficient tření B platí tzv. Stokesův vztah:

$$B = 6\pi\eta r \quad (1.3)$$

kde η značí viskozitu prostředí. Z tohoto vztahu vyplývá, že proti difuznímu toku působí odpor prostředí (3).

Pro pohyb částice vlivem Difuze (což je přímý projev Brownova pohybu) zavedl Einstein spolu s Smoluchovskim veličinu střední posuv částice $\overline{\Delta x}$:

$$\overline{\Delta x} = \sqrt{\left(\frac{kTt}{3\pi\eta r} \right)} \quad (1.4)$$

Rovnice (1.4) potvrzuje pozorování experimentu, kde byla vyvozena závislost Brownova pohybu na teplotě T , viskozitě η a na velikosti částic r . Zároveň průměrná rychlost klesá s časem t (5).

1.2.3 Osmóza

Při osmóze dochází k samovolnému průchodu rozpouštědla přes semipermeabilní membránu do roztoku. Semipermeabilní membrána je propustná pouze pro molekuly rozpouštědla. Nepropouští tedy rozpuštěnou látku a tak bude rozpouštědlo roztok zředovat. Osmotický tlak, který se značí π , je tlak, kterým musí působit rozpuštěná látka proti membráně na rozpouštědlo, aby se tok rozpouštědla zastavil (6). Osmotický tlak π je definován Van't Hoffovou rovnicí:

$$\pi = \frac{n_B RT}{V} = cRT \quad (1.5)$$

kde n_B představuje látkové množství, R univerzální plynovou konstantu a c molární koncentraci. Tato rovnice vyjadřuje souvislost mezi osmotickým tlakem a množstvím rozpuštěné látky a je z ní zřejmé, že osmotický tlak je vlastností koligativní (nezávisí na rozpuštěné látce, ale na její koncentraci resp. látkové koncentraci látky). Osmotický tlak má také zásadní význam v biologických systémech (5).

Van't Hoffova rovnice popisuje osmotický tlak pouze v pravých roztocích. Pro osmotický tlak v koloidních soustavách se používá obdobných rovnic:

$$\pi = v \frac{RT}{N_A} \quad (1.6)$$

$$\pi = \frac{w}{M} RT \quad (1.7)$$

kde molární koncentrace je nahrazena počtem částic v objemové jednotce (rovnice (1.6)) nebo hmotnostním koncentrací w (hmotnost disperzní fáze v objemové jednotce) v rovnici (1.7) a N_A je Avogadrova konstanta (3).

1.2.4 Sedimentace

Sedimentace je jev, kdy dochází k pohybu částic ve směru působení silového pole. Typicky pro gravitační pole se těžší částice pohybují směrem dolů a lehčí částice směrem nahoru. Často se pro separaci částic používá také centrifugace. Zde dochází k pohybu těžších částic směrem od osy otáčení k obvodu. Rychlost sedimentace závisí na velikosti, tvaru částic a na hustotě prostředí, kde se částice pohybují. Proti každé částici působí další síly jako je síla vztlaková (F_{vztlk}) a viskózní odpor (F_{vis}). Tento fakt lze popsat Stokesovým vztahem (3):

$$F_g = F_{vis} + F_{vztlk} \quad (1.8)$$

Ze sedimentační rychlosti lze určit hmotnost částic (5):

$$ma \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho} \right) = B \frac{dx}{dt} \quad (1.9)$$

kde m je hmotnost částice, a zrychlení, ρ hustota částice, ρ_0 hustota prostředí a koeficient B je úměrný difuznímu koeficientu:

$$B = \frac{D}{k_B T} \quad (1.10)$$

Pro sedimentační rychlost platí:

$$v = \frac{2r^2(\rho - \rho_0)}{9\eta} \quad (1.11)$$

z této rovnice je patrné, že rychlost sedimentace roste kvadraticky s poloměrem částic, zároveň závisí na rozdílu hustot prostředí a s rostoucí viskozitou prostředí klesá.

Koloidní soustavy jsou kineticky stálé (částice pod 100 nm). Po čase se částice rovnovážně uspořádají a největší částice se koncentrují u dna, ale na druhou stranu nejmenší částice zůstávají rozptýlené po celém objemu nádoby vlivem Brownova pohybu. Proces sedimentace se v praxi urychluje pomocí odstředivky nebo ultracentrifugou, kde působí síla řádově silnější než je síla gravitační a sedimentují i nejmenší částice (3).

1.3 Optické vlastnosti

Optické vlastnosti koloidních soustav závisí na chemickém složení disperzní fáze a velikosti částic. V závislosti na těchto vlastnostech převládá při dopadu světla na soustavu buď pravá absorpce, nebo rozptyl světla, jevy, které jsou pro koloidní soustavy typické.

1.3.1 Absorpce záření

Při průchodu elektromagnetického záření látkou dochází k absorpci energetického kvanta, změny energetických stavů elektronů, při kterém se zvyšuje vnitřní energie molekul a ta se zase mění na energii tepelnou. Závislost intenzity původního záření I_0 a intenzity prošlého záření I popsal H. Lambert:

$$T_\lambda = \left(\frac{I}{I_0}\right)_\lambda = e^{-\chi_\lambda l} \quad (1.12)$$

kde T_λ je transmitance, χ_λ je koeficient charakteristický pro daný roztok a l je délka vrstvy, jímž dané světlo prochází.

Později odvodil A. Beer rovnice pro intenzitu záření závislého na koncentraci roztok (7):

$$T_\lambda = \left(\frac{I}{I_0}\right)_\lambda = e^{-\chi_\lambda c_M l} \quad (1.13)$$

kde c_M je molární koncentrace a tento absorpční koeficient χ_λ je závislý na délce vrstvy, jíž světlo prochází. Spojením těchto dvou zákonů vzniká tzv. Lamber – Beeruv zákon, který dnes běžně používáme:

$$A_\lambda = -\log T_\lambda = -\log \left(\frac{I}{I_0}\right)_\lambda = \varepsilon_\lambda c_M l \quad (1.14)$$

kde se běžněji používá A – absorbance místo transmitance. Zde ε_λ značí molární absorpční koeficient (6). U koloidních soustav je ovšem absorpce komplikovaná, jelikož ji ovlivňuje velikost částic, hlavně u vodivých částic jak jsou částice kovů.

1.3.2 Rozptyl záření

Rozptyl záření pozoroval a popsal Rayleigh. Rozdíl oproti absorpci spočívá v nezměněných elektronických stavech molekul a atomů. Kvantum energie není tak pohlceno, ale je vyzářeno beze změny frekvence dále (6). Jde o elastický odraz fotonu. Poprvé byl však rozptyl světla pozorován Tyndallem, po němž nese název jev, kdy se paprsky dopadajícího světla v roztoku rozšiřují a vytvářejí kužel – tzv. Tyndallův jev. Podíl rozptylu světla na zeslabení intenzity dopadajícího záření ve směru pozorování lze kvantitativně popsat rovnicí 1.15 :

$$-\log \frac{I}{I_0} = \tau d \quad (1.15)$$

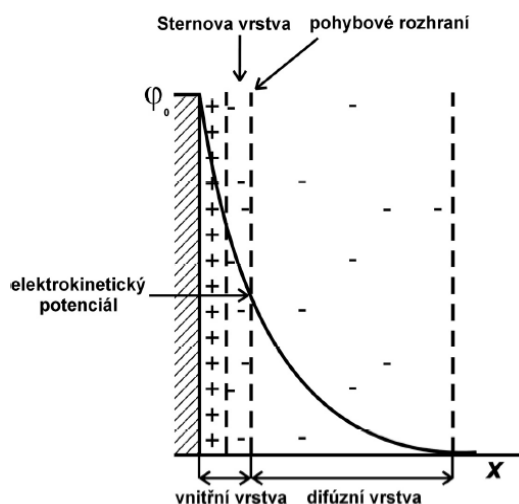
kde τ značí turbiditu (zákal) roztoku. Turbidita značí celkovou energii, která se rozptýlí na všechny strany při průchodu vrstvou suspenze o určité délce (3).

Rozptyl záření se běžně používá pro zjištění velikosti částic při použití přístrojů na principu dynamického rozptylu světla nebo-li tzv. DLS (Dynamic Light Scattering). Použijeme-li namísto běžných světelných zdrojů laser tj. koherentní zdroj záření, budeme pozorovat zesílení intenzity rozptýleného záření v důsledku interference rozptýleného záření.

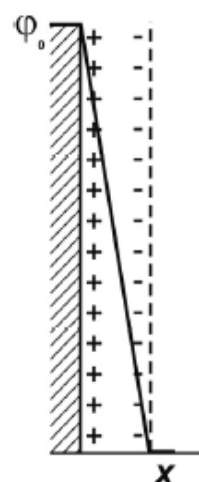
1.4 Elektrické vlastnosti koloidních soustav

Koloidní částice nesou určitý elektrický náboj a to buď disociací povrchových molekul disperzní fáze, nebo adsorpcí iontů z disperzního prostředí. Vznikají tzv. elektrické dvojvrstvy, kdy se uspořádávají náboje na povrchu částice do dvou opačně nabitých vrstev v důsledku styku s roztokem elektrolytu. Vyvinuly se různé teorie modelů elektrických dvojvrstev. Základní rozvinul Helmholtz. Jde o rozložení náboje na fázovém rozhraní látek. Jedna vrstva se skládá z iontů určitého znaménka a druhá ze stejného množství protiiontů. Lze uplatnit představu dvou nabitých desek kondenzátoru oddělených vrstvou

δ . V důsledku opačných nábojů na deskách vzniká rozdíl potenciálů $\Delta\varphi$ (8). Protože nebyl Helmholtzův model vyhovující, přišel Stern se svým vlastním modelem elektrické dvojvrstvy. Ten rozlišuje nejen vnitřní a vnější vrstvu, ale zároveň rozlišuje Sternovu a difuzní, kde difúzní splývá s vnější vrstvou. Sternova vrstva přilehá na vnitřní vrstvu a je tvořena protiionty. Difuzní vrstva je tvořena protiionty a ionty difuzního prostředí. Takže pokud je povrch částice kladně nabitý, Sternova vrstva je nabitá záporně a difuzní vrstva obsahuje anionty a kationy prostředí. Se zvětšující se vzdáleností od Sternovy vrstvy klesá koncentrace aniontů, která je nejvyšší v blízkosti Sternovy vrstvy a koncentrace aniontů a kationtů v difuzním prostředí se vyrovnávají. Tento potenciál mezi Sternovou vrstvou a difuzním prostředím se nazývá zeta potenciál a značí se řeckým písmenem ζ (zéta) (9).



Obr. 2 - Schéma Sternova modelu elektrické dvojvrstvy (3)



Obr. 1 - Schéma Helmholtzova modelu elektrické dvojvrstvy (3)

Existence zeta potenciálu je zodpovědná za elektrokinetické jevy jako je elektroosmóza, potenciální proudění, elektroforéza nebo sedimentační potenciál. Elektroosmóza je přenos kapaliny vyvolaný vnějším napětím působícím na kapilárním systému. Potenciál proudění vzniká při průchodu elektrolytu skrze porézní materiál. Jestliže se koloidní nebo jemné částice pohybují vlivem elektrického pole, hovoříme o elektroforéze. Sedimentační potenciál vzniká vlivem rozdílných potenciálů na koncích sloupce kapaliny se sedimentujícími částicemi suspenze (5).

1.5 Stabilita soustav

Jako stabilita se obecně rozumí schopnost soustavy odolávat vnějším vlivům, které by mohly vést ke změně soustavy. Můžeme rozlišit agregační a sedimentační stabilitu. Sedimentační stabilitu rozumíme stavem, kdy se částice rozprostírají v celém objemu roztoku v gravitačním poli. Agregační stabilita zase zachovává stále stejný stupeň disperzity (8). Rozlišujeme navíc agregáty vratné a nevratné. Nevratné agregáty vznikají, jsou-li přitažlivé síly mezi částicemi velmi silné a takovéto agregáty nelze rozbít mletím či ultrazvukem. Někdy se tato nevratná agregace nazývá koagulace. Flokulaci zase rozumíme vznik vratných agregátů, kde jsou přitažlivé síly slabší (10).

Stabilita koloidních soustav souvisí s povrchovou energií. Vlivem velkého povrchu koloidních částic se v soustavě vyskytuje přebytek povrchové energie, zvláště pokud jsou interakce mezi disperzní fází a disperzním prostředím slabé, a soustava se tak nachází v metastabilním stavu. Aby se dostaly do stavu s nižší energií, musejí snížit svou povrchovou energii a překonat určitou energetickou bariéru. Takovouto bariéru označujeme jako aktivační energii. Pokud tuto bariéru zvýšíme, můžeme dosáhnout vyšší stability koloidní soustavy (3).

Toho můžeme dosáhnout např. stérickou stabilizací. Při takovéto stabilizaci využíváme chemisorpce nebo fyzikální adsorpce polymerních látek na povrch částic. Polymerní látky obsahují lyofobní část, která je silně vázaná na povrch částice, a lyofilní část, která je volně v prostředí. Při kontaktu takovýchto částic dochází k pronikání nebo stlačování vrstev, a pokud je disperzní prostředí dobrým rozpouštědlem pro lyofilní část polymeru, dochází k odpuzování částic (9). Dalším způsobem stabilizace soustavy je elektrostatická stabilizace. Při té dochází k odpuzování částic vlivem stejného náboje na povrchu částic disperzní fáze. Dochází tedy k oddalování částic a nevznikají agregáty (11).

1.5.1 DLVO teorie

Tuto teorii vypracovali Derjagin a Landau a nezávisle na nich Verwey a Overbeek. Elektricky nabitě částice se tedy odpuzují, pokud mají stejný náboj a neagregují. Pokud přidáme do soustavy elektrolyt, můžeme snížit zeta potenciál či zcela odstranit povrchový náboj a destabilizovat tak soustavu. Elektrická dvojvrstva tvoří energetickou bariéru a je ji třeba překonat a to znamená, že koncentrace elektrolytu musí být dostatečná. Takovéto

koncentraci říkáme koagulační práh, který značíme γ . Je to tedy koncentrace elektrolytu, která je nutná pro to, aby začaly částice agregovat a destabilizovali jsme tak celou soustavu. Teorie popisuje dva typy koagulace: neutralizační a koncentrační. Neutralizační koagulace závisí na adsorpčních jevech. Množství iontu adsorbovaných na povrchu určuje náboj částice. Pokud se na povrch začnou adsorbovat protiionty, začne se snižovat elektrický potenciál a to vede ke shlukování částic. Kritická hodnota elektrického potenciálu φ_{krit} , při které zmizí energetická bariéra lze spočítat takto:

$$\varphi_{krit} = \sqrt{\frac{CA}{4\pi\epsilon}} h \quad (1.16)$$

kde C je konstanta, A je konstanta přitažlivosti částic, ϵ je permitivita roztoku a h je tloušťka difuzní vrstvy elektrické dvojvrstvy.

Při koncentrační koagulaci dochází ke snížení zeta potenciálu stlačením elektrické dvojvrstvy přidávkem elektrolytu. K tomu je třeba dosáhnout koagulačního prahu. Pro ten je odvozený vztah:

$$\gamma = C \frac{4\pi\epsilon(kT)^5}{A^2 e^6 z^6} \quad (1.17)$$

kde C je konstanta závislá na poměru počtu nábojů aniontu a kationtů, e značí elementární náboj a z nábojové číslo protiiontu. Další veličiny mají stejný význam jako v rovnici výše (1.16). Koagulační práh tedy nezávisí jen koncentraci elektrolytu, ale jak je vidno z rovnice, závisí i na poloměru a náboji protiiontu (3).

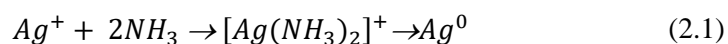
2. Nanočástice stříbra

2.1 Příprava nanočástic stříbra

Obecně při přípravě nanomateriálu rozlišujeme dva přístupy: top-down a bottom-up. Metody top-down neboli metody dispergační, u kterých se začíná s makroskopickým materiálem a daným postupem se dostáváme k nanomateriálům. Mezi tyto metody patří např. laserová ablace, mletí nebo elektrické rozprašování (8). U metod bottom-up neboli metody kondenzačních můžeme rozlišovat fyzikální a chemické postupy. U fyzikálních

postupů se dosahuje nanomateriálů např. změnou tlaku nebo teploty. U chemického přístupu se vychází z velkého množství chemických rovnic. Často se využívá redukce nanočástic kovů z jejich solí. Jako redukční činidla se užívají redukující cukry, borohydrid sodný, citronan anebo méně používaný vodík, EDTA, anilín a kyselina askorbová (3) (12).

Nanočástice stříbra se často připravují pomocí redukujících monosacharidů, jako jsou glukóza nebo galaktóza, a také pomocí disacharidů jako jsou maltóza nebo laktóza (2). Jsou to tedy častěji metody kondenzační. Známým postupem je tzv. Tollensův modifikovaný způsob. Jde o redukci stříbra sacharidem z komplexu $[Ag(NH_3)_2]^+$ v alkalickém prostředí. Příprava probíhá za laboratorní teploty a za stálého míchání. Redukce trvá asi 5 minut a výsledná velikost částic je od 25 nm do 450nm (13). Velikost částic závisí na reakčním prostředí a na použitém redukujícím cukru. Bylo dokázáno, že s rostoucí koncentrací amoniaku roste velikost částic (2).



Jako redukční činilo je používán i borohydrid sodný, který poprvé použili Creighton, Blatchford a Albrecht pro redukci $AgNO_3$ ve vodném prostředí. Při rychlém smíchání 1ml $AgNO_3$ s 3ml „ice-cold., 2mM $Na[BH_4]$ za intenzivního míchání vznikají velmi malé částice o velikosti 5-20 nm. Změnou poměru dusičnanu a borohydridu můžeme částečně korigovat vlastnosti vznikajících částic (14).

Z důvodu adsorpce borátového aniontu na povrch částic nejsou vždy tyto disperze vhodné k další aplikaci. Proto se užívá metoda Lee a Meisela, která využívá slabší redukční činidlo a to citrátový anion. Při této metodě se rozpustí $AgNO_3$ ve vodě a roztok se přivede k varu. Poté se přidá 1% roztok citrátu sodného a nechá se hodinu vařit (15). Takto připravené částice jsou větší a mají větší polydisperzitu. Velikosti těchto částic se pohybuje v rozmezí 30-120 nm. Při použití laseru, kterým redispergujeme citrátový sol, můžeme dosáhnout velikosti 5-10 nm a tak zvýšit i jejich stabilitu (16).

2.2 Aplikace nanočástic stříbra

Použití nanočástic stříbra je široké. Jedním z nejznámějších je pravděpodobně využití antibakteriálních účinků. Již staří Řekové uchovávali vodu ve stříbrných nádobách a v např. v 19. století lékaři používali na infekci očí 1% roztok $AgNO_3$. Dnes, z důvodu

zvyšující se rezistence bakterií na antibiotika (17), se znovu uvažuje o použití antibakteriálních účinku stříbra. Je známo několik mechanismů, jak stříbro zabíjí bakterie. První hovoří o navázání nanočástic na buněčnou stěnu a zde narušují dýchání a propustnost. Druhý popisuje průnik nanočástic do buňky a zde interagují s prvky jako je síra nebo fosfor, které se vyskytují v DNA a inhibují činnost některých enzymů. Zatřetí působí i jako klasické iontové stříbro Ag^+ , které je uvolňováno z nanočástic (18). V současnosti se používá stříbro i v mnoha běžných aplikacích, např. ve sportovních oblečeních nebo kosmetice (19).

Další použití uplatňují nanočástice stříbra v metodě povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS). Tento jev poprvé pozoroval Fleischmann v roce 1974, kdy pozorovali zesílený signál adsorbovaných organických molekul na stříbrných elektrodách (20). Tyto signály jsou až o 10^6 vyšší než u klasických ramanovských spekter. Je to dáno vlivem existence povrchového plasmonu na kovových nanočásticích. Takto mohou být analyzovány různé biomolekuly a následně různé nemoci (21) (22).

Nanočástice mohou být i vhodnými látkami pro katalýzu díky jejich velkému povrchu a vysoké povrchové energii. Mohou např. katalyzovat 4-nitrofenol, methyloranž nebo methylmodř ve vodním prostředí v přítomnosti NaBH_4 a za pokojové teploty (23).

3. Křemelina

Křemelina, nebo-li diatomit, je sypká hornina tvořena fosilními pozůstatky jednobuněčných řas rozsivek. Po chemické stránce je křemelina tvořena oxidem křemičitým a jeho hydráty nebo-li opály. Díky chemické inertnosti SiO_2 se tyto schránky nerozkládají, ale sedimentují na dně jezer a moří a vznikají tak ložiska tohoto materiálu. Je to materiál, který má nízkou hustotu, velkou plochu povrchu, je tvarově rozmanitý a má obrovskou pórovitost. Podle některých zdrojů až 90% (24).

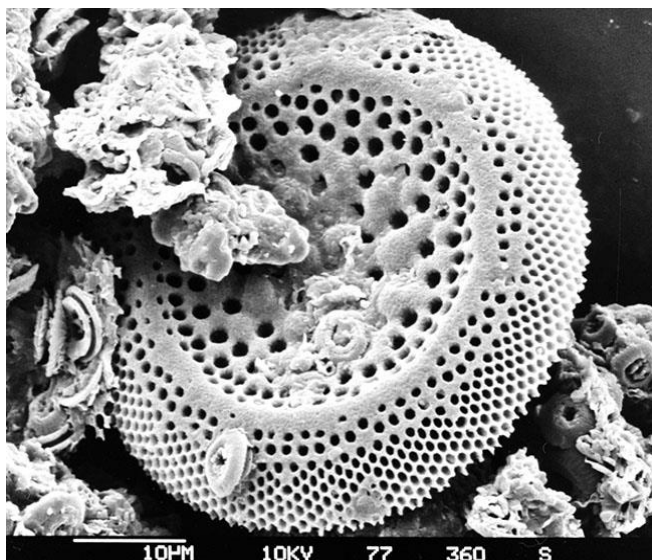


Obr. 3 Vzorek křemeliny v pevném stavu (24)

Historicky se křemelina využívala už ve starém Řecku, kde se křemelina přidávala do cihel, aby byly lehčí. V roce 535 byly použity takovéto cihly pro stavbu 30 metru vysokého kostelu svaté Sofie v tureckém Istanbulu. Širší komerční použití našel v roce 1860 pro křemelinu Alfred Nobel jako adsorbent a stabilizátor pro nitroglycerin a tak dal vzniknout dynamitu. Okolo roku 1880 dominovala trhu velice čistá křemelina ze Santa Barbary. Dnes je křemelina používána běžně jako filtrační materiál (25). V česku se hojně využívá jako filtrační materiál pro pivo a víno ve svíčkových filtrech, kde se odstraňují mechanické nečistoty (26). Během druhé světové války se křemelina začala používat k filtraci vody, aby se zbavila nejen mechanických nečistot, ale i améboidních parazitů. Prováděly se testy na měňavce (*Entamoeba histolytica*) a později se ukázaly pozitivní testy i na další prvoky a to za použití malé vrstvy křemeliny. Později se tento způsob převedl do běžného života např. k filtraci vody v bazénech. Křemelinou bohužel projdou organismy, které jsou menší než póry křemeliny jako jsou bakterie (*E. Coli* – velikost: 2-3 μ m), a tak je třeba používat po filtraci desinfekční činidlo (27).

Dále se křemelina může použít pro odstranění těžkých kovů z vody jako levnější varianta k aktivnímu uhlí. Takto použita byla například pro odstranění těžkých kovů z průmyslu, kde se hojně používalo olovo, zinek nebo kadmium. Po úpravě křemeliny pomocí oxidů manganu se efektivita filtrace vůči těžkým kovům ještě zvýší a je možno filtrovat i uranové vody při pH=4 (28).

Křemelina našla využití i ve výživě, kde působí jako očišťující prostředek a jako prostředek na doplnění pestré stravy. Podle výrobců při průchodu střevem čistí a nabaluje na sebe cizorodé zárodky, plísně, drobné parazity a těžké kovy. Zároveň doplňuje minerální látky potřebné pro náš organismus a lidé tak mají menší potřebu spánku a cítí se celkově lépe (29).



Obr. 4 Křemelina pod mikroskopem (30)

4. Nanokompozity

Jako nanokompozit označujeme materiál, který se skládá z alespoň dvou složek, přičemž jedna z těchto složek má rozměr do 100nm. Tyto materiály jsou unikátní vlastnostmi, kterých není možno dosáhnout u makroskopických materiálů. Rozlišujeme matici a adsorbovanou látku. Jako matrice může sloužit rozličné množství látek jako např. jíl, křemelina, uhlíkové vrstvy, celuloza, oxid zinečnatý, polykarbonát nebo oxid titaničitý (31) (32) (33) (34) (35). Použití těchto materiálů je široké. Od použití v ekologii k čištění vody (35), přes elektrotechniku při výrobě OLED displejů, kde se uplatňují polyuretanové pryskyřice a bakteriální celulózy díky své pružnosti, průsvitnosti a propustnosti světla (36). Nanokompozity na bázi křemeliny a montmorillonitu s obsahem magnetických oxidů železa, byly použity pro adsorbování nebezpečného karcinogenního šestimocného chromu (37). Dnes se objevují i materiály na bázi grafénu s použitím nanočástic polyanilínu pro využití v superkondenzátorech. Takovéto kondenzátory mají obrovskou kapacitu okolo 250 F na gram materiálů, což je o několik řádů více než běžné kondenzátory (38). Nebo již zmiňované kompozity s maticí oxidu titaničitého spolu s kadmiumselenovými nanokrystaly nalézají použití ve fotovoltaice (39).

Hojně využívaná metoda pro přípravu nanokompozitů je metoda layer-by-layer. Je to metoda, kde se využívá povrchového náboje látek. Jestliže mají dvě látky záporný povrchový náboj, nanese se na matrici jiná látka mající kladný náboj, ta se poté propláchne, aby se odstranil přebytečný materiál, a poté se přidá adsorbent, který chceme nanést na naši matrici. Takto spojíme dvě látky mající opačný náboj. Nebo se tento postup může opakovat vícekrát a to tak, že se na vrstvu nanese látka s opačným nábojem, propláchne se, přidá se sorbent a na něj se nanese opět látka s opačným nábojem. Takto se celý postup opakuje, dokud se nedosáhne požadovaného počtu vrstev (40). Pro změnu povrchového náboje se často používají polymerní elektrolyty. Konkrétně se užívá např. polyakrylová kyselina (PAA), poly(dimethyldiallylamonium chlorid) (PDDA), polyethylenimin (PEI), poly(metakrylová kyselina) (PMA) (41). Z přírodních materiálů to mohou být např. DNA, polysacharidy nebo proteiny. Jako substráty se dají použít různé textilie, sklička, slídy ale i kovy (42).

4.1 Kompozity obsahující nanočástice stříbra a jejich využití

Tyto kompozity spojují vlastnosti matrice kompozitu a často antimikrobních vlastností nanočástic stříbra. Vzhledem k tomu nacházejí hojné využití v lékařství, kde se nanočásticemi stříbra pokrývají materiály, které by mohly potenciálně způsobovat záněty. Jedním z příkladů takového využití jsou kolagenové nitě na zašívání ran, které usnadňují hojení a zároveň jsou odolné vůči zánětům (43). Vlákna s částicemi stříbra nacházejí využití nejen v lékařství, ale i v textilním průmyslu, kde se dají využít na výrobu bavlněných látek s antimikrobními účinky (44). Dalším využitím jsou materiály k filtraci vody. Například polysulfonové membrány smíchané s vlákny oxidu měďného pokryté částicemi stříbra. Takovéto membrány mají při 0,5 hm% Ag-Cu₂O vláken značné antimikrobní účinky proti bakteriím *E. coli* a *S. aureus* s minimálním množstvím uvolněného stříbra (45). Nanočástice stříbra nalézají uplatnění i v podobě papíru modifikovaném Ag/TiO₂-SiO₂, který se dá využít pro uložení bílého chleba a prodloužení jeho trvanlivosti (46). Dalším důležitým využitím nanočástic stříbra je katalýza. Bauxit funkcionalizovaný částicemi stříbra našel uplatnění při výrobě bionafty z metanolu a slunečnicového oleje. Takovýto katalyzátor byl připraven redukcí roztoku dusičnanu stříbrného v bauxitové matrici. Při poměru 9:1 metanolu a oleje bylo použito 0,3 hm% tohoto katalyzátoru a za optimálních podmínek při 3 hodinové reakci bylo dosaženo 94% výtěžnosti. Katalyzátor byl použit několikrát za sebou bez jakékoliv změny na výtěžnosti (47). Kompozity

obsahující stříbro nalézají využití i v aplikacích, kde se využívá zesíleného signálu v ramanově spektroskopii. Například ve spojení grafenu s částicemi Fe_3O_4 pokrytými stříbrem. Takovýto kompozit poskytuje substrát pro stanovení aromatických molekul s detekčním limitem až 10^{-11} mol (48). Dalším využitím jsou elektrochemické biosenzory. V práci Wu H. vytvořili kompozit složený z nanočástic, které byly zafixovány do polyethyleniminu, kterým byl zase funkcionalizován grafen oxid v kombinaci se surfaktantem didodecyldimethylamonium bromidem. Tento kompozit byl využit pro zachycení hemoglobinu na uhlíkovou elektrodu a počítá se s ním jakožto možným materiálem pro výrobu elektrochemického biosenzoru s velkou citlivostí, odezvou a stabilitou (49).

5. Problematika biologického znečišťování vod a možnosti jejího odstraňování

5.1 Faktory ovlivňující znečištění vod

Problém znečištění vody není záležitostí jen rozvojových zemí, nýbrž celého světa. Nejčastějšími faktory, které znečišťují vodu, jsou fyzikální, chemické a biologické.

Co se týče fyzikálních faktorů, jde často o mechanické nečistoty, vznikajících zcela přirozeně např. erozí hornin nebo rozkladem rostlin ve vodě. Do této kategorie spadá také tepelné znečištění. Jde o odpadní teplo z chladících zařízení v hutnickém či energetickém průmyslu. Méně častým znečištěním je znečištění radiací, které vzniká při těžbě uranu či ukládání jaderného odpadu na dně moří.

Chemické znečištění vod vzniká často v důsledku lidských aktivit. Ve stojatých vodách jde často o znečištění hnojivy a pesticidy, které se dostávají kvůli nadměrného používání do vod blízko zemědělských ploch. To má za následek eutrofizaci vody, vznik sinic a následný úhyn organismů v těchto vodách. Dalšími látkami znečišťujícími vody, jsou ropa a její produkty. Ty se dostávají do prostředí buď jako odpady průmyslu nebo při haváriích ropných tankerů, což jsou jedny z nejtěžších ekologických zátěží. Dalšími látkami jsou soli jedovatých kovů. Těžké kovy působí jako katalytické jedy, čímž zastavují činnosti enzymů. Další nebezpečí tkví v jejich kumulaci v přírodě a náročném odstraňování z prostředí. Dostávají se vod nejen z průmyslů, ale také díky kyselých dešťů. Jinými látkami, které znečišťují vody, mohou být polychlorované bifenyly, látky organické povahy (tuky, sacharidy, bílkoviny) nebo detergenty (50) (51).

Biologické znečištění souvisí s mikrobiální kontaminací. Tu způsobují bakterie, viry, prvoci, plísně, kvasinky nebo i některé druhy řas. Příčinou biologické kontaminace bývají fekálie, které jsou zdrojem patogenních nebo potenciálně patogenních střevních organismů, které jsou vylučovány stolicí nebo močí. Z bakterií bývají v kontaminovaných vodách nejčastěji *Escherichia coli*, *salmonela typhi* nebo *vibrio cholerae*. Z virů to bývají rotaviry, enteroviry, viry hepatitidy nebo adenoviry a co se týče prvků a parazitů ve znečištěných vodách, jde o měňavky, bičíkovce, červy a hlísty (52).

5.2 Možnosti čištění a odstraňování mikrobiální kontaminace vod

V přírodě probíhají samočistící procesy, které se vyvinuly přirozeně. Mezi samočistící procesy se zahrnuje sedimentace, přenosy a biochemické děje. Typy samočistících procesů lze dělit na aerobní a anaerobní. Aerobní procesy probíhají za přítomnosti kyslíku (jezy, peřeje, mělčiny) a jsou energeticky výhodné, proto je produkce biomasy u těchto procesů velká. Anaerobní procesy probíhají v oblastech bez přístupu kyslíku, jako jsou bahna a neprovzdušňované oblasti vod (hlubiny jezer či oceánů).

Jelikož není příroda schopna vyrovnávat se s nárůstem odpadu, který člověk produkuje, bylo nutné vyvinout umělé čištění vod. Ty zahrnují fyzikální a biologické procesy. Fyzikální procesy zajišťují odstranění mechanických nečistot pomocí sít, lapačů, usazováků. Zajišťují také oddělení nerozpustných kapalin, jako jsou oleje nebo ropné produkty. Biologické procesy využívají schopnosti mikroorganismu oxidovat odpadní sloučeniny. V první fázi je voda provzdušňována v bioreaktoru za účasti aktivovaného kalu, což jsou kalové vločky, na kterých jsou uchyceny živé rozličné mikroorganismy. V druhé fázi se převádí energetický bohatý kal na energetický chudý kal vyhníváním kalu v bioreaktoru, při kterém se vytváří CO₂ a metan – neboli bioplyn. Vyhníly kal se snadno odvodňuje a usazuje. Následně je využíván buď jako hnojivo, anebo je spalován z důvodu vysokého obsahu těžkých kovů (53).

I když je voda takto upravena, může obsahovat choroboplodné zárodky a nemůže tak být považována za pitnou. Odstranění biologického znečištění (dezinfekce) může být provedeno pomocí látek se silně oxidačními účinky, látek s oligodynamickými účinky nebo pomocí fyzikálně chemických metod. Většina dezinfekčních látek jsou silné oxidační činidla, které mají i další účinky, jako je odstranění železa, manganu nebo sirovodíku. Nejčastějšími oxidačními činidly jsou chlorované aminy, chlor, ClO₂ nebo ozon, který je

nejméně stabilní ze všech uvedených. Například chlor, který se přidává do vody i mimo přídavek jiných desinfekčních látek, neboť má konzervační účinky ve vodovodním potrubí, hydrolyzuje ve vodě podle rovnice:



kde jsou produkty hydrolýzy silná kyselina chlorovodíková a slabá kyselina chlorná. Chlor kromě bakterií a virů také oxiduje anorganické a organické sloučeniny, má chlorační účinek a chloračně oxidační účinek. Další chemickou metodou je použití ozonu. Což je alotropická modifikace kyslíku, která v přírodě vzniká v atmosféře účinkem UV záření nebo elektrických výbojů. V technických zařízeních se využívá ozonizátoru. Ozon je namodralý plyn se silnými oxidačními účinky, který se samovolně rozkládá ve vodě v závislosti na teplotě a pH vody. Co se týče desinfekčních účinků, je ozon účinnější než chlór. Např. virus dětské obrny při dávce 0,45 mg/l je usmrcen ozonem za 2 minuty, zatímco chlor jej usmrtí při dávce 1 mg/l za 5 hodin. Při úpravě vod se užívá dávka 0,4 mg/l po dobu 4 minut a jeho zvýšené koncentrace se odstraňují aktivním uhlím.

Oligodynamické účinky spočívají ve využití iontů kovů Ag^+ nebo Cu^{2+} , které blokují enzymy mikroorganismů. Doba kontaktu s vodou musí být poměrně dlouhá, obvykle okolo 3-6 hodin. Tato metoda je vhodná pro desinfekci málo kontaminovaných míst, jako jsou studny. Nejčastěji se používá práškové stříbro s ochrannými organickými látkami. Pro odstranění řas byly používány soli mědi, ale bohužel při této metodě měď nesplňuje imisní limit na pitnou vodu.

Fyzikální metody dezinfekce spočívají v použití UV světla. Použita vlnová délka je v rozmezí 100 – 400 nm přičemž nejsilnější účinek se nachází v rozmezí 200 – 300 nm s maximálním účinkem při 260 nm. UV záření působí na protoplazmy organismů, mění jejich struktury, a to vede k jejich usmrcení. Zdrojem ultrafialové záření jsou křemenné lampy. Ty jsou umístěny do uzavřených trubic nebo do otevřených žlabů tak, aby bylo dosaženo maximálního účinku. Voda cirkuluje kolem lamp ve vrstvě okolo 15 cm s dobou ozařování řádově několik minut (1).

Experimentální část

6. Materiál a metody

6.1 Chemikálie

Na přípravu koloidního stříbra byl použit dusičnan stříbrný (99,9%, Sigma-Aldrich), hydroxid sodný (p.a., Lach-ner), amoniak(p.a., 25-29%, Penta) a D(+)-maltóza(p.a., Sigma-Aldrich). K přípravě kompozitu byly následně použity dva typy křemeliny. Diacelite 4500 (Celite Corp.) a DIF BO (CECA, Arkema group). Jako mezivrstva pro změnu povrchového náboje křemeliny a umožnění adsorpce nanočásti stříbra byl použit roztok PDDA (poly(diallyldimethylammonium) chlorid) (p.a., 20% vodný roztok, Sigma-Aldrich). Na stanovení množství stříbra ve vzorcích byla použita na mineralizaci kyselina dusičná (p.a., 65%, Sigma-Aldrich). Filtrační aparatury byly desinfikovány ethanolem (95%).

Antibakteriální aktivita byla zkoumána na sbírkovém referenčním kmenu *Escherichia coli* CCM 3954. Pro účely filtrace byly bakterie suspendovány v koncentraci 10^6 CFU/ml v Mueller- Hinton bujónu (Difco Bedston Dickinson, Francie) naředěném 500x, který sloužil jako zdroj živin pro přežití bakterií. Stejný bujón, avšak neředěný, byl použit pro kultivaci bakterií po filtraci. Bakteriální suspenze v MH bujónu a MH bujón byly připravovány na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty UP v Olomouci.

6.2 Přístroje

K prvotní charakterizaci a zaznamenání spekter nanočástic stříbra a absorbance bakteriálních bujónů byl použit UV/VIS spektrometr Specord S 600 (Analytik Jena, Germany). K určení velikosti těchto částic byl použit 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instr. Co.) pracující na principu dynamického rozptylu světla (DLS). Množství stříbra v kompozitu i ve vodě po filtraci přes kompozit bylo stanoveno na atomovém absorpčním spektrometru (AAS) ContrAA 300 (Analytiky Jena, Germany). Pro třepání erlenmeyerových baněk byla použita třepačka Promax 1020 (Heidolph, Germany).

6.3 Příprava nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra byly připraveny modifikovaným Tollensovým způsobem, přičemž jako redukční činidlo byla použita maltosa v reakčním prostředí o pH=11,5. Finální koncentrace jednotlivých reakčních složek byly následující: dusičnan stříbrný $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l (216 mg/l Ag),

amoniak 10^{-2} mol/l, hydroxid sodný 10^{-2} mol/l a maltosa $2 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Všechny látky byly smíchány v pořadí: dusičnan stříbrný, voda, amoniak, hydroxid sodný a nakonec redukční činidlo maltosa. Reakce probíhala ve dvoulitrové kádince a množství vody bylo použito k doplnění celkového objemu roztoku na 1 litr. Celá reakce probíhala 5 minut za laboratorní teploty okolo 25°C .

6.4 Příprava nanokompozitu Ag@SiO₂

Kompozit byl připraven metodou layer by layer, tudíž byla použita látka PDDA, která má kladný náboj, ke změně povrchového náboje, jelikož nanočástice stříbra i křemelina mají záporný povrchový náboj. Nejprve bylo adsorbováno PDDA na povrch částic křemeliny třepáním 5 g křemeliny v 1,5 l vodném 0,01% roztoku PDDA po dobu dvou hodin. Následně byla křemelina přefiltrována a poté 1 hodinu promývána destilovanou vodou. Po promytí byla křemelina s PDDA opět zfiltrována přes fritu. Následně byla takto modifikovaná křemelina přidána do 1,5 l připraveného koloidu stříbra za intenzivního míchání hřídelového míchadla k adsorpci nanočástic Ag na povrch částic křemeliny přes vrstvu PDDA. Tato adsorpce trvala dvě hodiny. Poté byla křemelina se stříbrem zfiltrována přes fritu a propláchnuta destilovanou vodou a následně vysušena.

6.5 Stanovení antimikrobiální aktivity při průtoku vody přes kompozit

První metodou stanovení antimikrobiální aktivity kompozitu byla průtoková metoda, kdy byla vytvořena filtrační aparatura, do které se umístilo určité množství kompozitu: 2,2 g (jemnější DIF-BO) a 2,5g (hrubší Diacelit). Pro filtraci reálných vzorků byl následně použit kompozit připravený z Diacelitu, neboť přes něj voda lépe protékala. Aby kompozit neunikal z filtrační aparatury, byl konec trubice ucpán kouskem houbičky a ta byla navíc přetažena třemi vrstvami filtračního papíru (Obr. 5 a Obr. 6). Houbička byla použita hlavně z důvodu častého promočení filtračního papíru, který hrál hlavní roli v nepronikání kompozitu do filtrátu. Trubice byla nejdříve vydesinfikována lihem a následně promyta převařenou destilovanou vodou. Teprve poté bylo přes filtr filtrováno 150 ml bakteriálně kontaminované vody s obsahem MH bujónu. Přefiltrovaná voda byla odebírána v objemu 0,3 ml v 5 minutových intervalech do sterilních zkumavek s kultivačním bujónem. V prvních fázích testování (testování připravených koncentrovaných bakteriálních suspenzí *E. coli*) bylo odebíráno 10 vzorků. Později u reálných přírodních vzorků bylo odebíráno 6 vzorků v 5 minutových intervalech. Pro srovnání byla použita stejná metoda s čistou

křemelinou bez stříbra. Průtok nebyl nijak externě regulován, voda tedy protékala trubicí jen na základě gravitační síly. Při každém testování se sledovalo množství celkové přefiltrované vody za daný čas. Všechny odebrané vzorky po filtraci byly kultivovány 24 hodin při 36 °C v termostatu. Růst bakterií byl hodnocen na základě tvorby zákalu v kultivačním mediu a proměřením optické hustoty zákalu na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Jako pozitivní kontrola byla použita nefiltrovaná bakteriálně znečištěná voda přidána do kultivačního bujónu a jako negativní kontrola pak pouze čistý kultivační bujón.



Obr. 6 - filtrační aparatura



Obr. 5 – detail filtrační aparatury

6.6 Stanovení antimikrobiální aktivity při protřepávání vody s kompozitem

Dalším způsobem testování antimikrobiální aktivity kompozitu bylo třepání bakteriálních suspenzí s kompozitem. Tato metoda má praktičtější význam, neboť není třeba řešit, kolik vody proteče za danou dobu trubicí. Zde bylo třeba stanovit za jak dlouho a při jaké koncentraci bude dané množství bakteriálně znečištěné vody zbaveno bakterií. Pro tuto metodu byl použit kompozit připravený z jemnější křemeliny DIF-BO, protože na něj bylo možné navázat větší množství stříbra a použít tak menší množství kompozitu, než tomu bylo u Diacelitu. Nejdříve bylo vždy 50 ml bakteriálně kontaminované vody s obsahem MH bujónu třepáno s křemelinou DIF-BO/nanoAg (35mg Ag/g) o navážkách 43, 85, 130, 170, 220 mg křemeliny s obsahem nanočástic Ag, které po přepočtu odpovídají koncentracím stříbra 30, 60, 90, 120, 150 mg Ag/l. Poté byla pro další experiment zvolena nejvyšší koncentrace křemeliny DIF-BO/nanoAg 220 mg/50 ml a stejný objem 50 ml bakteriální suspenze byl třepán po kratší časové intervaly 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 minut. Třepání probíhalo na třepačce při takové rychlosti, aby se kompozit rozptýlil v celém objemu bakteriálně kontaminované vody. V pravidelných časových intervalech 10 (pouze u dvou nejvyšších koncentrací), 20, 40, 60, 80, 100, 120 minut byly v průběhu třepání odebrány 4ml vzorku sterilní stříkačkou, následně byl vzorek přefiltrován přes sterilní stříkačkový filtr s velikostí pórů 3 μm tak, aby se zachytila na filtru pouze křemelina s navázaným stříbrem a nikoli přeživší bakterie *E. coli*, které vzhledem ke své velikosti (1 – 2 μm) prochází póry filtru. Odebraná voda byla opět přidána do kultivačního bujónu k určení, zda ve vzorku bakterie přežily. Veškeré laboratorní sklo bylo opět nejdříve vydesinfikováno lihem a následně promyto převařenou destilovanou vodou. K odběru byly použity sterilní stříkačky a jehly, které mají sterilitu deklarovanou dodavatelem. Všechny vzorky byly vždy kultivovány při 36 °C po dobu 24 hodin. Následně byl hodnocen růst bakterií na základě tvorby zákalu v kultivačním mediu a proměřením optické hustoty zákalu na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Jako pozitivní kontrola byla přímo použita bakteriálně znečištěná voda přidána do kultivačního bujónu a jako negativní kontrola pak pouze čistý kultivační bujón.

6.7 Uvolňování stříbra z kompozitu

Množství stříbra, které se uvolnilo v průběhu filtrace či protřepávání do vody, bylo stanoveno pomocí AAS po odběru všech vzorků. Jako referenční vzorek byla použita voda nefiltrovaná a neprotřepávaná přes, resp. s kompozitem. Vzorky byly před analýzou mineralizovány pomocí 2% HNO₃.

6.8 Odběr přírodních vzorků

V první fázi práce bylo třeba otestovat, zda bude mít kompozit antibakteriální účinky proti referenčnímu sbírkovému kmenu bakterií *E. coli* suspendovanému v kultivačním mediu. Jakmile byla tato fáze hotova, bylo třeba otestovat antibakteriální aktivitu kompozitu vůči reálným přírodním vzorkům vody. Jako reprezentativní vzorky, které by mohly být předmětem budoucí běžné filtrace, byly použity vody odebrané z řeky Moravy (Obr. 8) a z jezírka poblíž městské části Neředín v Olomouci (Obr. 7). Všechny odběrné nádoby byly před odběrem reálných vzorků vody vždy desinfikovány lihem.

Pro porovnání množství bakterií v bakteriální suspenzi *E. coli* o známé koncentraci 10⁶ CFU/ml pocházející z Ústavu mikrobiologie LF s množstvím bakterií o neznámé koncentraci v reálném vzorku vody říční a z jezírka bylo rozetřeno 0,1 ml příslušného vzorku vody s obsahem bakterií na krevní agar a kultivováno 24h po při teplotě 37 °C. Po kultivaci a nárůstu bakterií byl určen počet CFU na agaru a přepočten na objem 1 ml.



Obr. 7 – Jezírko v Neředíně

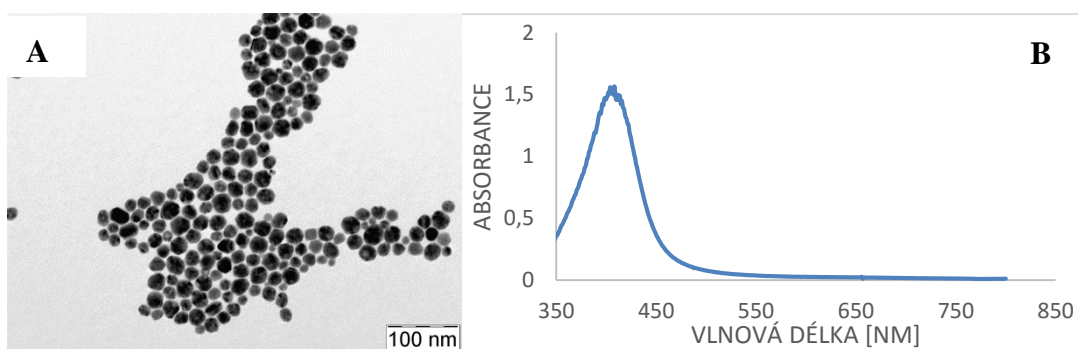


Obr. 8 – řeka Morava

7. Výsledky a diskuze

7.1 Příprava nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra připravené modifikovaným Tollensovým způsobem redukované maltosou měly výslednou průměrnou velikost 28 nm. Průměrná velikost částic stříbra byla měřena pomocí DLS a ověřena transmisí elektronovou mikroskopií (Obr. 9A). Další důležitou charakteristikou nanočástic stříbra je jejich absorpční spektrum, kde je pro tyto nanočástice charakteristické absorpční maximum v rozmezí 400-410 nm nazývané povrchový plasmon (Obr. 9B).



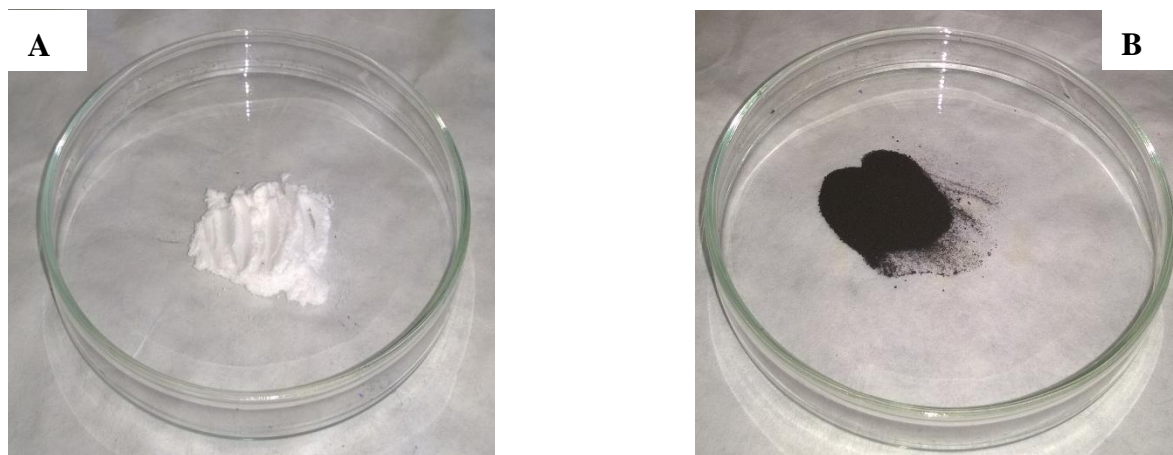
Obr. 9 – A) TEM snímek a B) a absorpční maximum nanočástic stříbra

7.2 Příprava nanokompozitu Ag@SiO₂

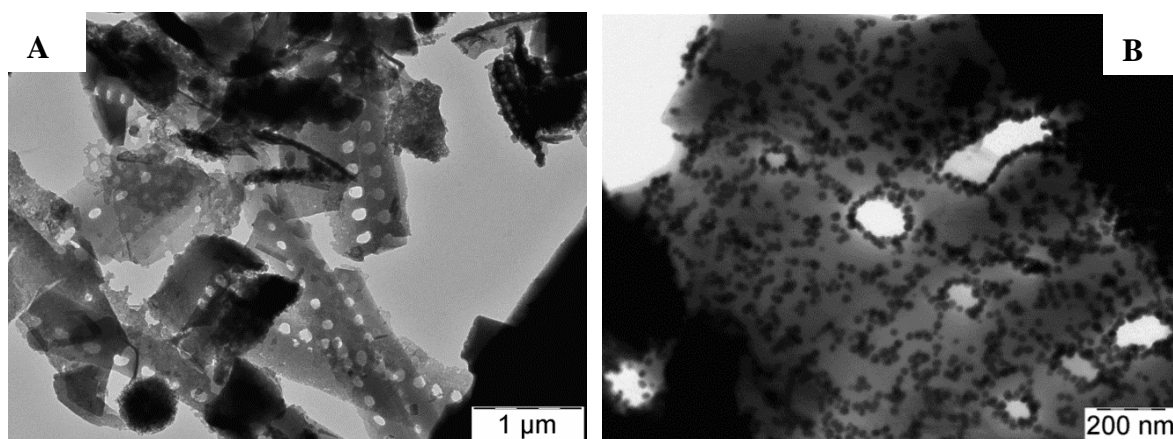
V průběhu práce byly použity k přípravě kompozitu dva typy křemeliny. Lišily se hlavně velikostí částic deklarovaných od výrobců. Křemelina DIF-BO měla velikost částic 25 μm a Diacelit 100 μm . Po chemické stránce byly téměř shodné, jelikož byly tvořeny z 85% z SiO₂ a zbylých 15% tvořily Al₂O₃, TiO₂, K₂O, Na₂O nebo Fe₂O₃.

K přípravě kompozitu bylo použito metody layer-by-layer, která spočívá v opakovaném nanášení látek nesoucí opačný náboj. Tato metoda byla nezbytná, jelikož jak částice stříbra, tak křemelina mají záporný povrchový náboj a tudíž se odpuzují. Ke změně povrchové náboje byla použita látka PDDA, která změnila povrchový náboj křemeliny ze záporného na kladný. Poté bylo možno adsorbovat záporně nabitě nanočástice stříbra na povrch částic křemeliny. Množství navázaného stříbra na 1g křemeliny bylo měřeno pomocí AAS. Při koncentraci 216 mg Ag/l v koloidní disperzi stříbra se navázalo na křemelinu DIF-BO 35,6 mg Ag/g kompozitu a na křemelinu Diacelit 21,9 mg Ag/g kompozitu. Obě křemeliny měly vlivem přítomnosti nanočástic stříbra zcela

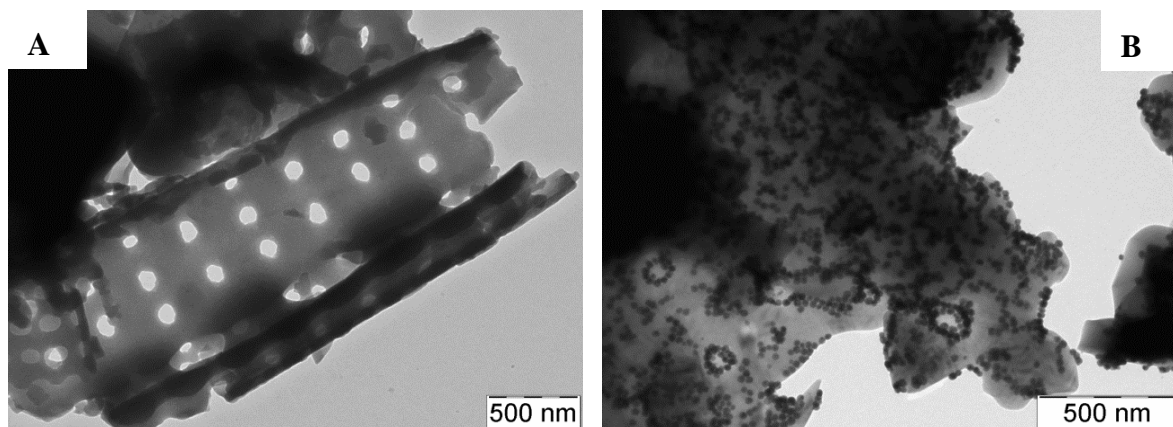
černou barvu. Menší množství navázaných nanočástic stříbra na Diacelitu lze vysvětlit menší pórovitostí křemeliny a menší celkovou plochou povrchu vzhledem k výrazně vyššímu rozměru částic křemeliny.



Obr. 10 – A) čistá křemelina DIF-BO a B) kompozit DIF-BO/nanoAg



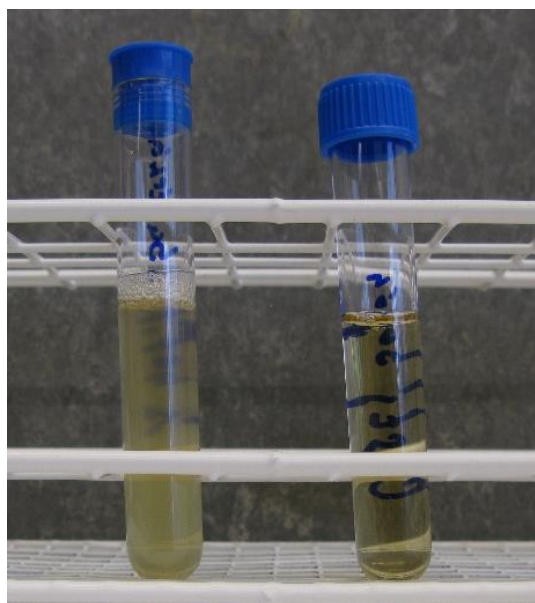
Obr. 11 - A) TEM snímky DIF-BO bez nanočástic Ag a B) s nanočásticemi Ag



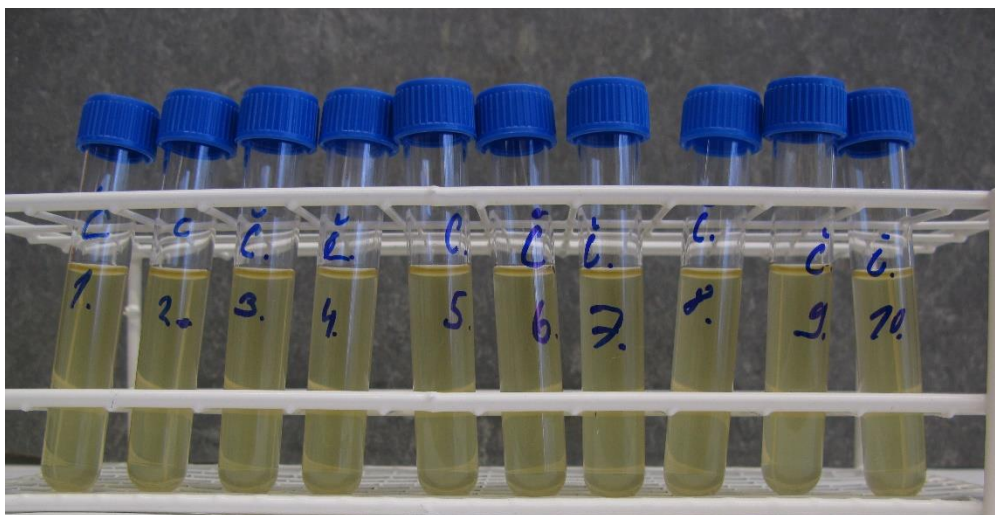
Obr. 12 – A) TEM snímky Diacelitu bez nanočástic Ag a B) s nanočásticemi Ag

7.3 Stanovení antimikrobiální aktivity při průtoku vody přes kompozit

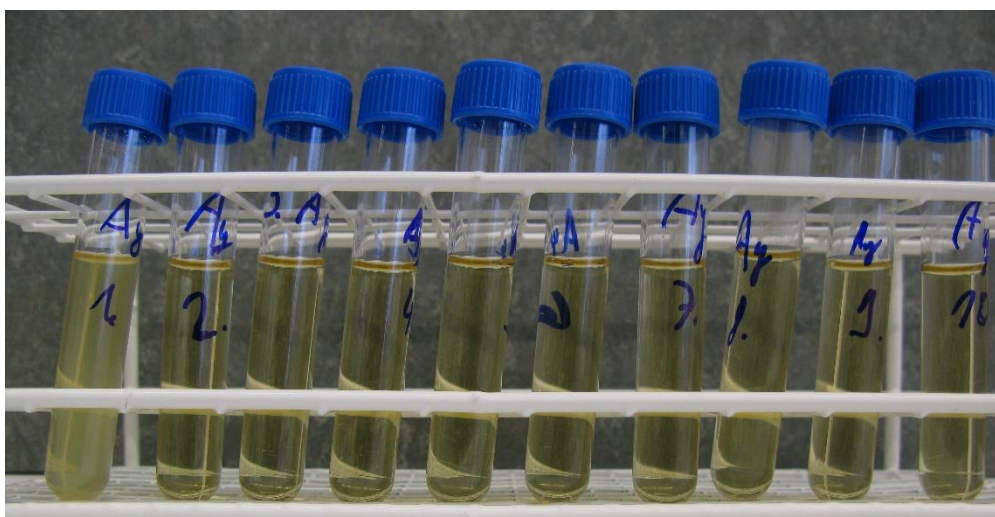
Nejdříve byla prováděna filtrace bakteriálních suspenzí přes jemnější křemelinu DIF-BO. Pro srovnání byla použita i čistá DIF-BO křemelina bez nanočástic Ag. Zde bylo na základě růstu bakterií, který byl prokázán tvorbou zákalu v kultivačním bujónu MH (Obr. 14) a naměřenou absorbancí (hodnoty absorbance jako u nefiltrované vody) bujónu po kultivaci přefiltrované vody (Obr. 16), dokázáno, že čistá křemelina není schopna zadržet bakterie. Část bakterií se zachytí na povrchu či v pórech částic čisté křemeliny, ale jakmile se ucpou, dostávají se dále do vody a čistá křemelina nevykazuje antibakteriální účinky, zatímco křemelina se stříbrem zabíjí bakterie již po prvních 10 minutách při navážce 2,2 g kompozitu, což bylo dokázáno nezakalenými bakteriálními bujóny po kultivaci (Obr. 15) a absorbancí (Obr. 16) stejně nízkou jako negativní kontrola, která obsahuje pouze čistý bujón.



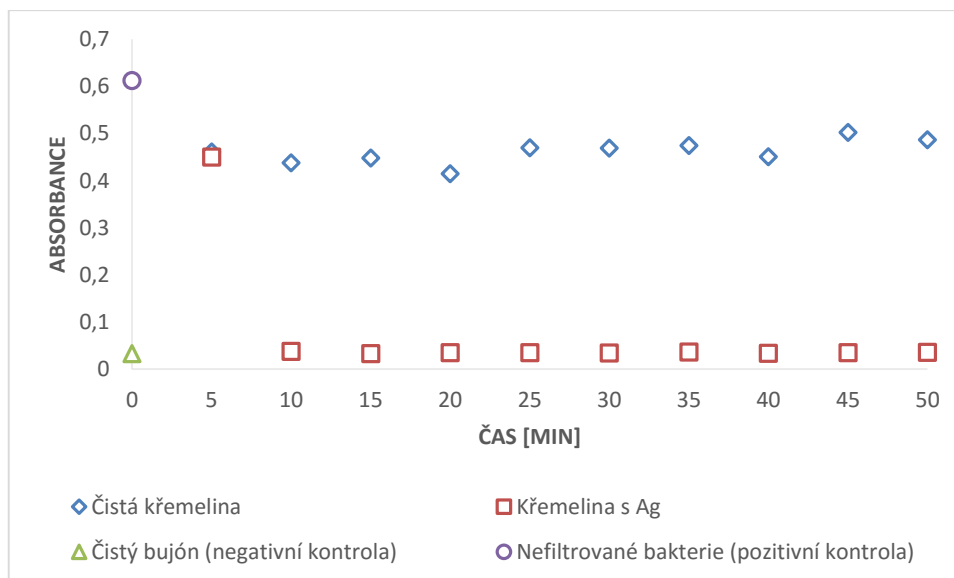
Obr. 13 – Zákal (růst bakterií) po kultivaci vody nefiltrované (vlevo) a čistého bujónu bez bakterií (vpravo) jako pozitivní, resp. negativní kontrola růstu bakterií po 24 hod. kultivaci při 36°C



Obr. 14 – Výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci vody filtrované přes čistou DIF-BO křemelinu

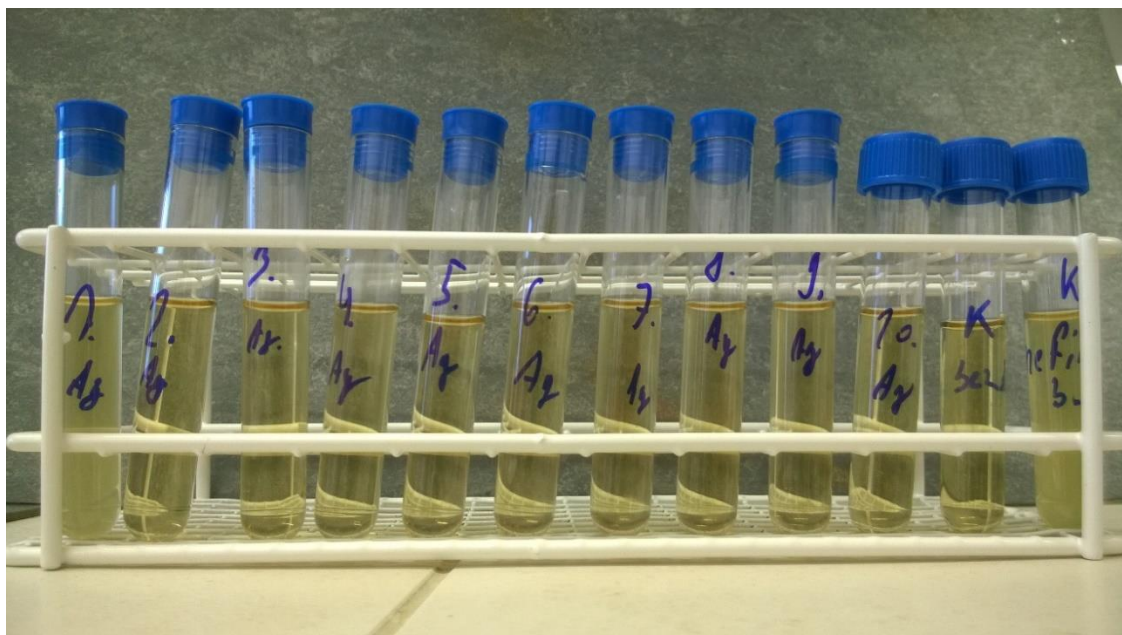


Obr. 15 – Výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci vody filtrované přes DIF-BO/nanoAg kompozit

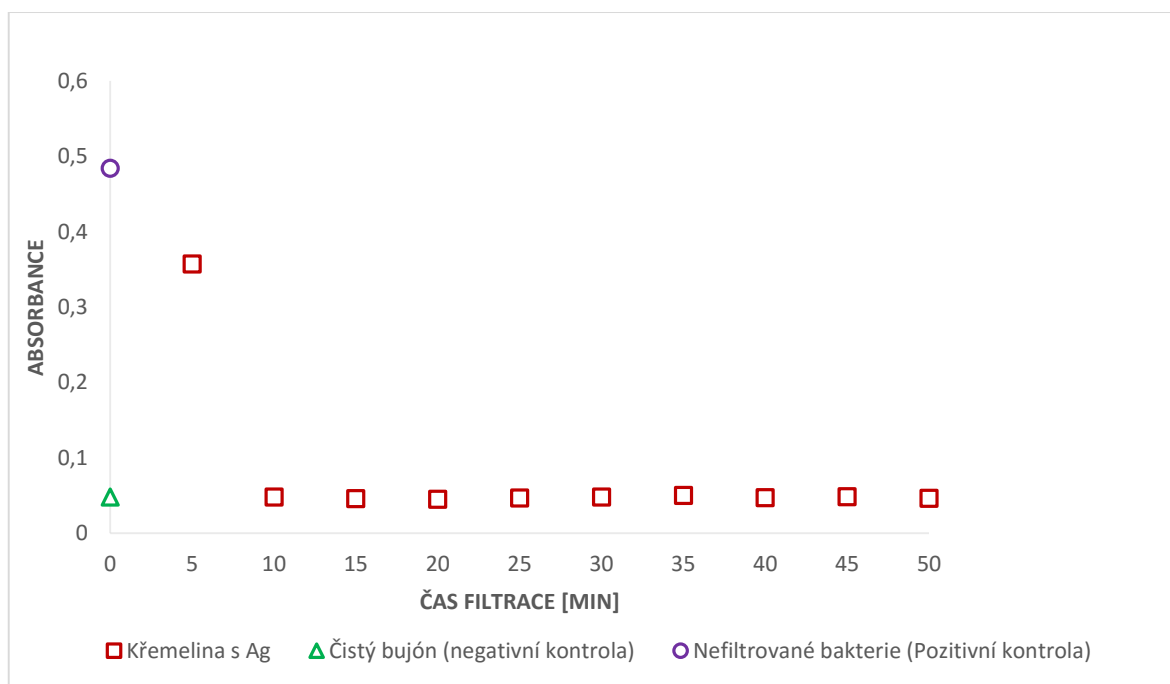


Obr. 16 – hodnoty absorbance zákalu po kultivaci bakteriální suspenze filtrované přes kompozit křemelina DIF-BO/nanoAg a čistou DIF-BO křemelinu

Kvůli nízkému průtoku vody při filtraci, který činil maximálně 24 ml/hod, byla ověřována antibakteriální účinnost hrubší křemeliny Diacelit obsahující nanočástice Ag. Průtok byl v tomto případě 60 ml/hod. Vzhledem k tomu, že na této křemelíně bylo navázáno méně stříbra (21,9 mg Ag/g), byla použita větší navážka 2,5 g pro filtraci. Filtrování bakteriální suspenze přes čistou křemelinu Diacelit nebylo prováděno, jelikož lze očekávat stejný výsledek, jako v případě výsledků s čistou křemelínou DIF-BO. Výsledky kultivace bujónu s odebranými vzorky přefiltrované vody prokázaly, že bakterie přežívaly pouze do prvního odběru v čase 5 minut, v dalších odebraných vzorcích se již bakterie nevyskytovaly, jak prokázala kultivace, po které nebyl ve zkumavkách s kultivačním bujónem patrný zákal (Obr. 17). Rovněž hodnoty absorbance bujónů s odebranými vzorky přefiltrované vody po kultivaci byly s výjimkou prvního odběru nízké a srovnatelné s negativní kontrolou (Obr. 18).



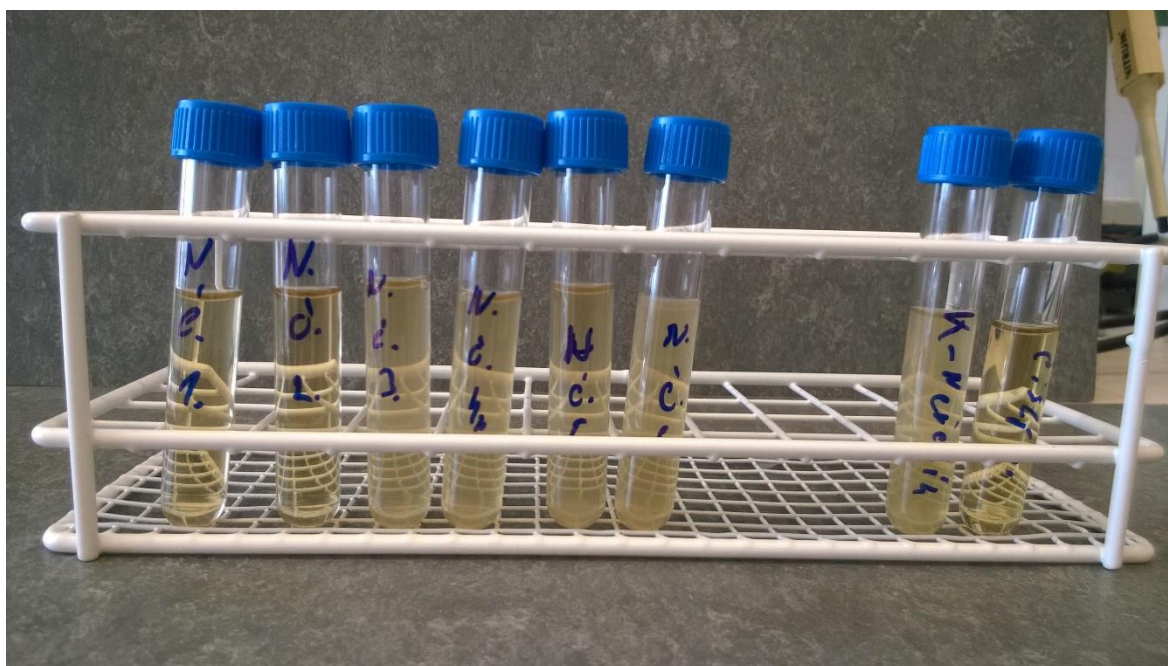
Obr. 17 – výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci vody filtrované přes Diacelit/nanoAg kompozit



Obr. 18 hodnoty absorbance zákalu (bakteriální růst) po kultivaci bakteriální suspenze filtrované přes kompozit křemelina Diacelit/nanoAg a čistou Diacelit křemelinu

Vzhledem k dostatečně rychlému průtoku a antibakteriální aktivitě byla pro experimenty s reálnými vzorky bakteriálně znečištěné vody použita křemelina Diacelit. V tomto případě bylo zkoušeno i menší množství křemeliny a provedenými experimenty bylo prokázáno, že k odstranění bakteriální kontaminace reálných vzorků vod postačuje množství 1,5 g kompozitu. V tomto případě byla filtrována voda z řeky Moravy a z jezírka poblíž Neředína. Pro srovnání byly filtrovány reálné vzorky přes čistý Diacelit.

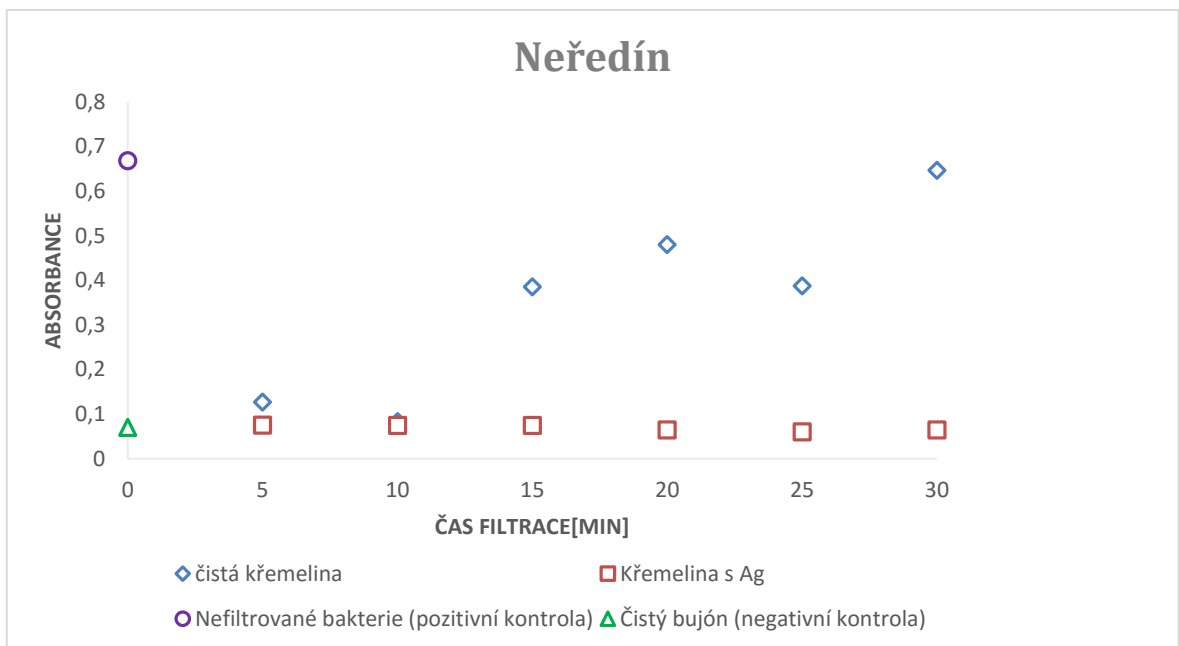
V případě filtrace vody z jezírka je na základě dosažených výsledků patrné, že i čistá křemelina v prvních 10 minutách určitou část bakterií odstranila, ale od 15 minut průtoku již byla filtrovaná voda kontaminovaná (Obr. 19). Na druhou stranu křemelina s nanočásticemi stříbra odstraňuje bakterie již po prvním odběru a po celou dobu filtrace, což prokazují snímek bujónu a absorpční spektra po kultivaci přefiltrované vody (Obr. 20 a Obr. 21).



Obr. 19 – výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci vody z jezírka filtrované přes čistý Diacelit, kontrolní vzorky



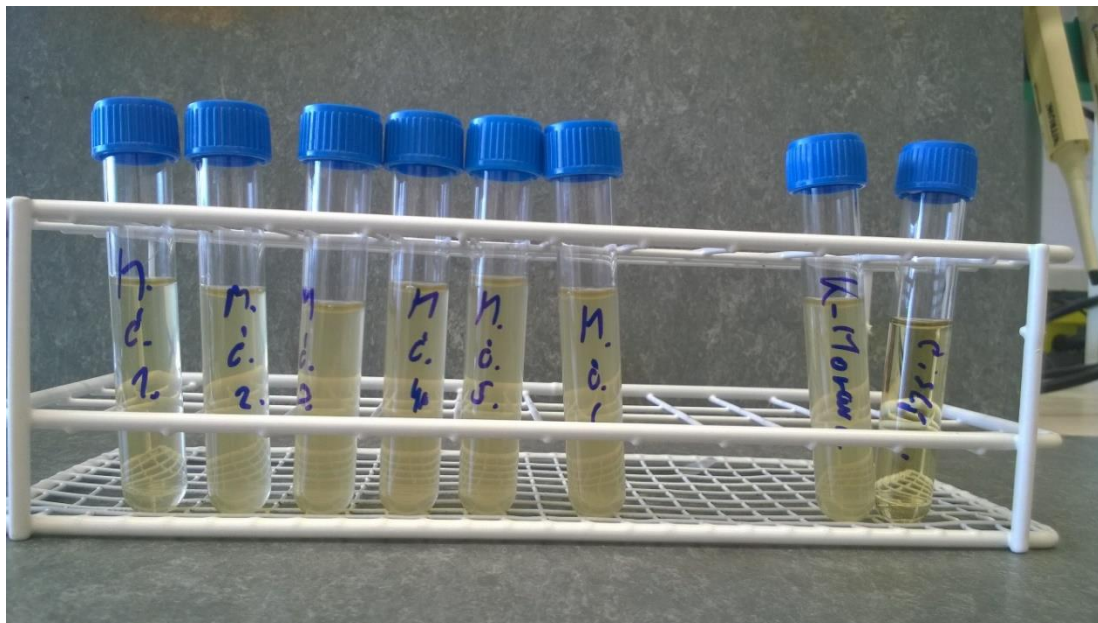
Obr. 20 - výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci vody z jezírka filtrované přes kompozit Diacelit/nanoAg, kontrolní vzorky



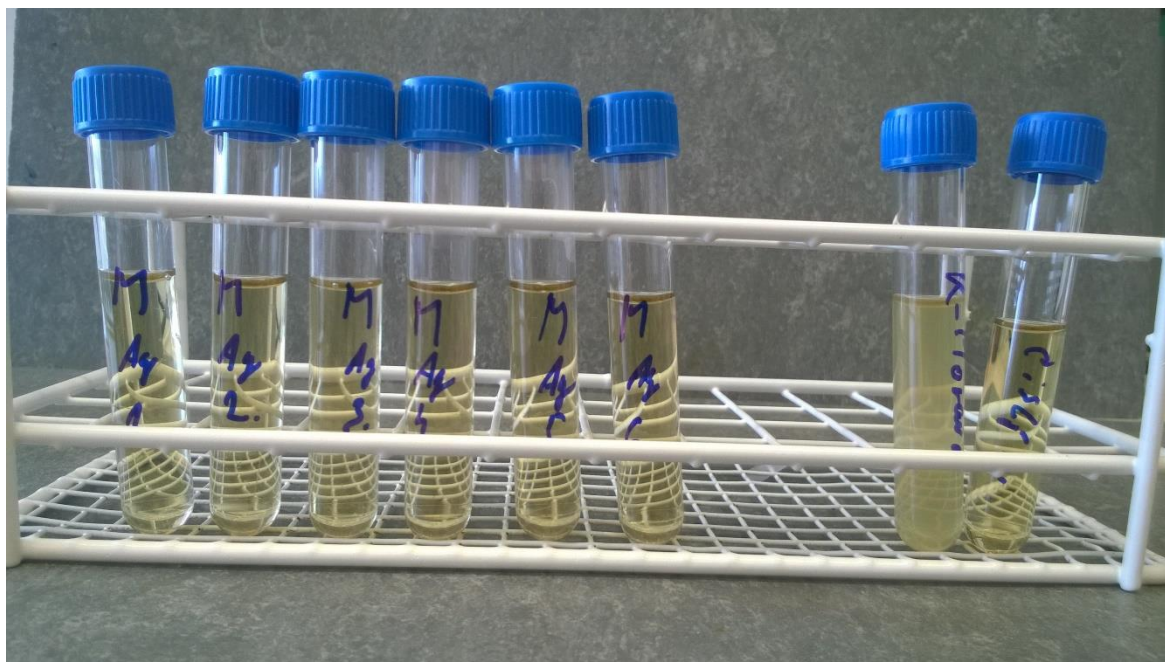
Obr. 21 – Hodnoty absorbance zákalu (bakteriální růst) po kultivaci filtrované vody z jezírka v Neředíně přes kompozit křemelina Diacelit/nanoAg a čistou Diacelit křemelinu

Jako další byla filtrovaná voda z řeky Moravy. Opět zde byla použita čistá křemelina Diacelit ke srovnání. I zde je z dosažených výsledků zřejmé, že čistá křemelina nemá dostatečné desinfekční účinky a již po prvním odběru v 5 minutách je patrný zákal kultivačního bujónu (Obr. 22). Naproti tomu křemelina s nanočásticemi stříbra zabíjí opět

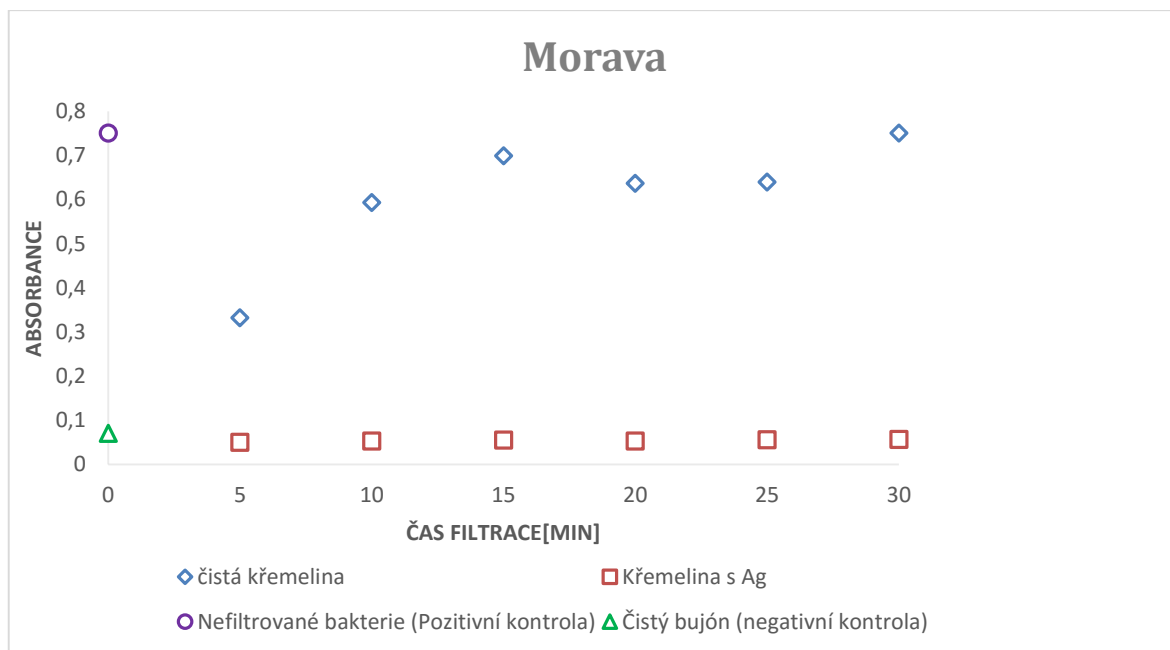
bakterie od začátku až do konce filtrace, jak je vidět na fotkách čistých kultivačních bujónů (Obr. 23) a z hodnot absorbance zákalu bakteriálního bujónu (Obr. 24).



Obr. 22 – výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci vody z řeky filtrované přes čistou křemelinu Diacelit, kontrolní vzorky



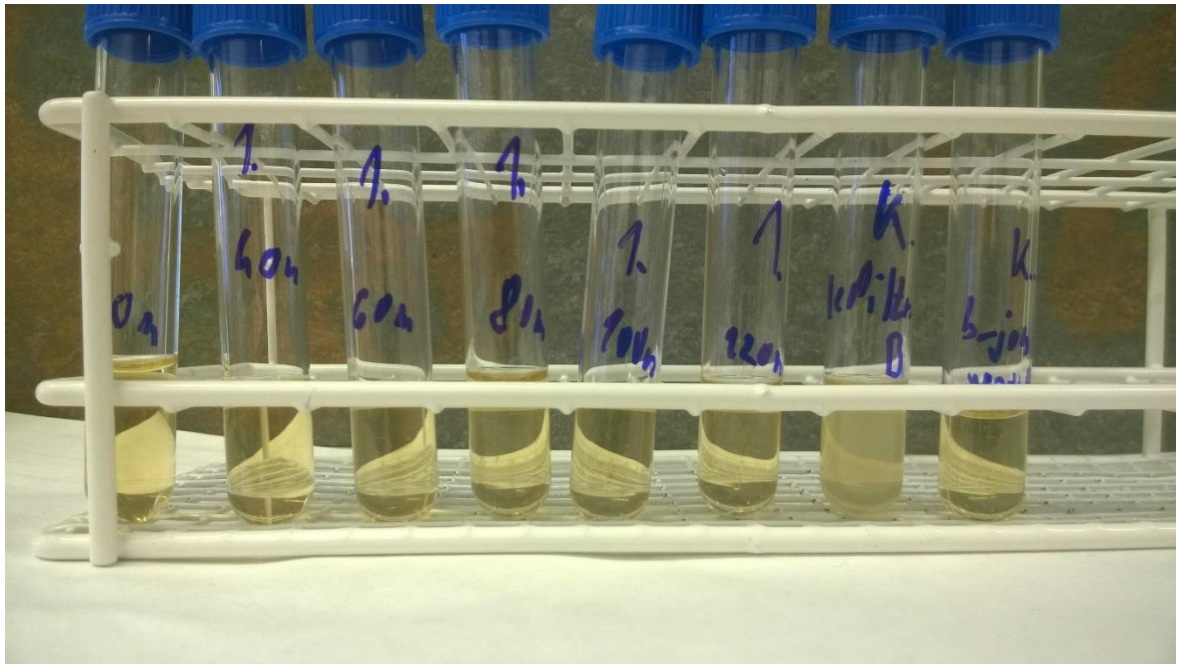
Obr. 23 - výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci vody z řeky filtrované přes kompozit Diacelit/nanoAg, kontrolní vzorky



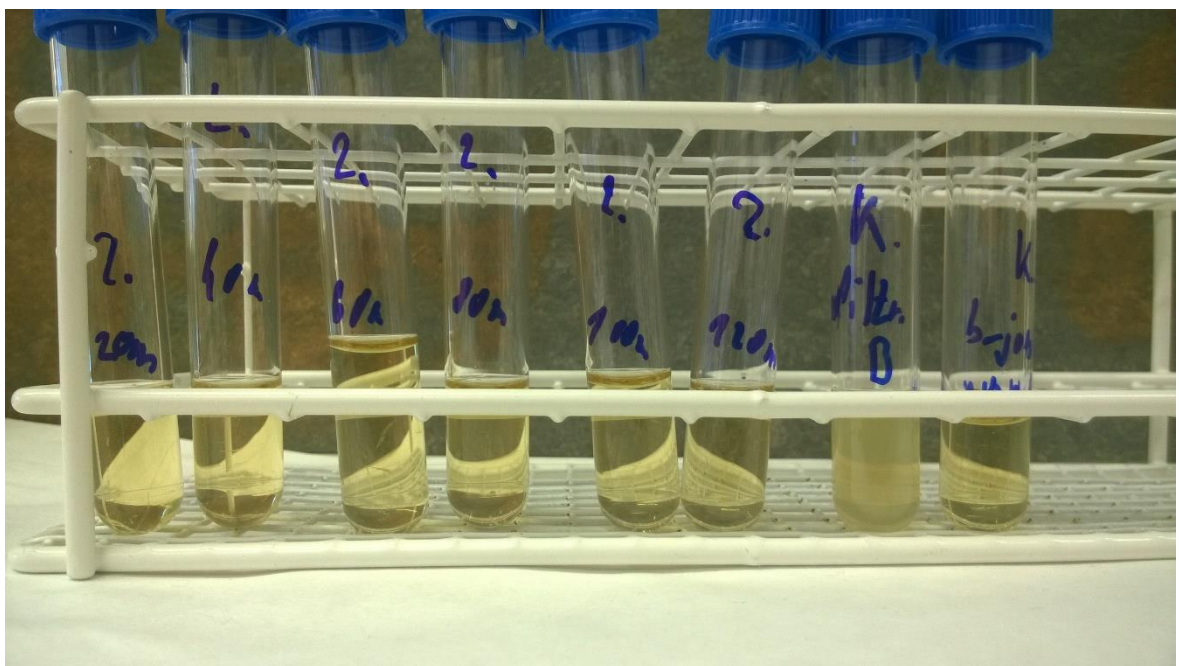
Obr. 24 - Hodnoty absorbance zákalu (bakteriální růst) po kultivaci filtrované vody z jezírka v Neředíně přes kompozit křemelina Diacelit/nanoAg a čistou Diacelit křemelinu

7.4 Stanovení antimikrobiální aktivity při třepání vody s kompozitem

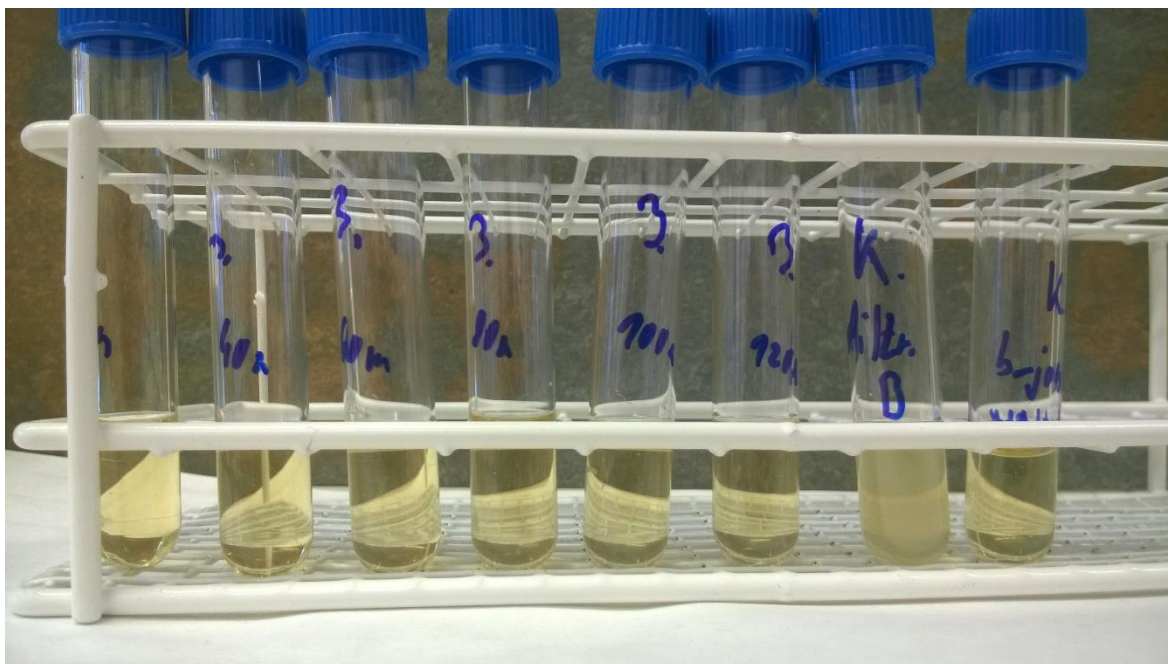
Druhou metodou testování mikrobiální aktivity byla metoda třepání bakteriálních suspenzí s kompozitem. Hlavní výhodou této metody je její praktičnost a rychlost oproti průtokové metodě. Ze snímků nezakalených bakteriálních bujónů (Obr. 25 – Obr. 29) a z naměřených absorbancí zákalu (Obr. 30) po 24 hodinové kultivaci, které jsou shodné s absorbancí čistého bujónu, je patrné, že i vytřepávání bakteriálních suspenzí se všemi uvedenými koncentracemi kompozitu s nanočásticemi stříbra je účinné od prvních odběrů ve 20 minutách a u nejvyšších koncentrací křemeliny s obsahem nanočástic stříbra je zřejmý účinek stříbra již v 10 minutách.



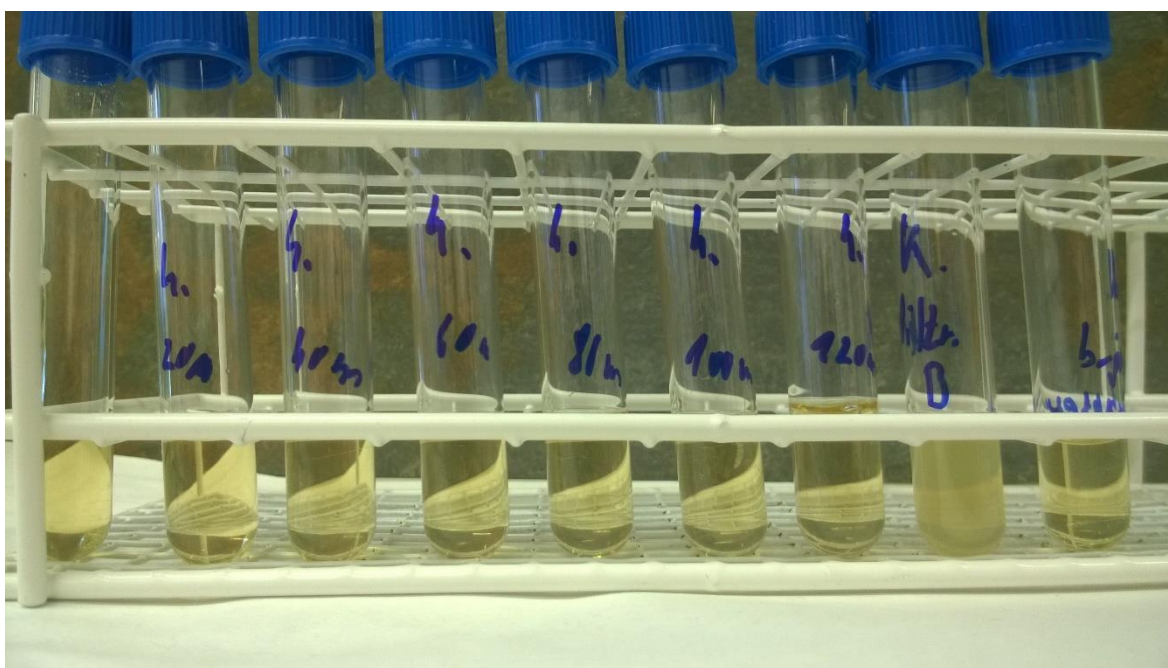
Obr. 25 – Výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci třepané vody s koncentrací 30 mg Ag/l, kontrolní vzorky



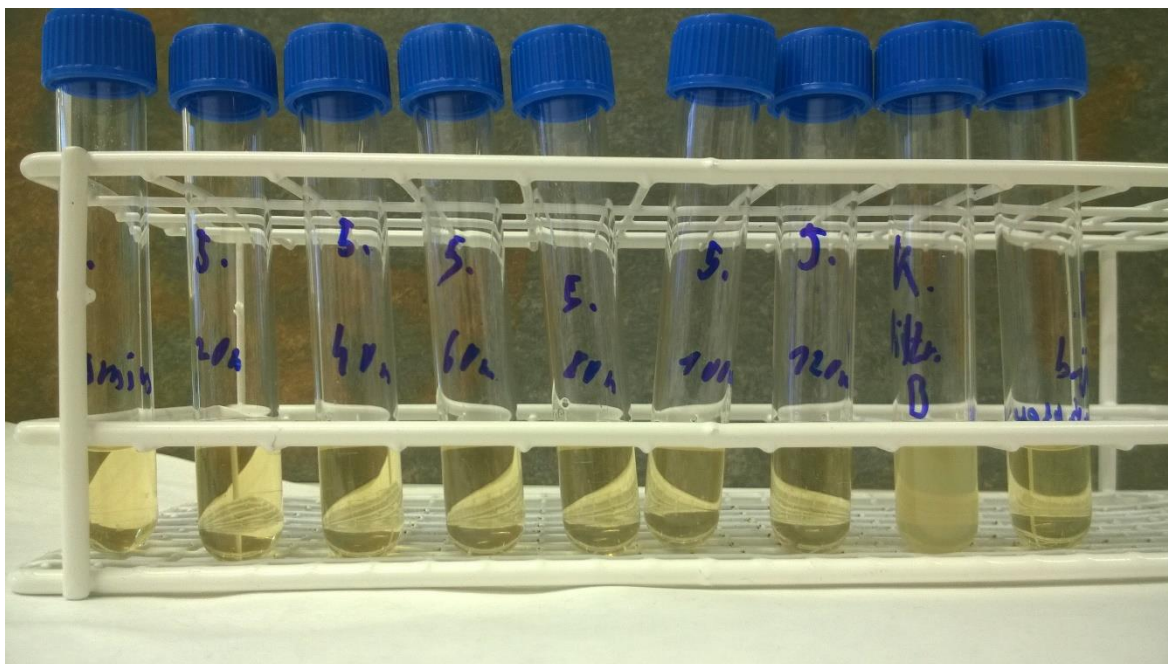
Obr. 26 – Výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci třepané vody s koncentrací 60 mg Ag/l, kontrolní vzorky



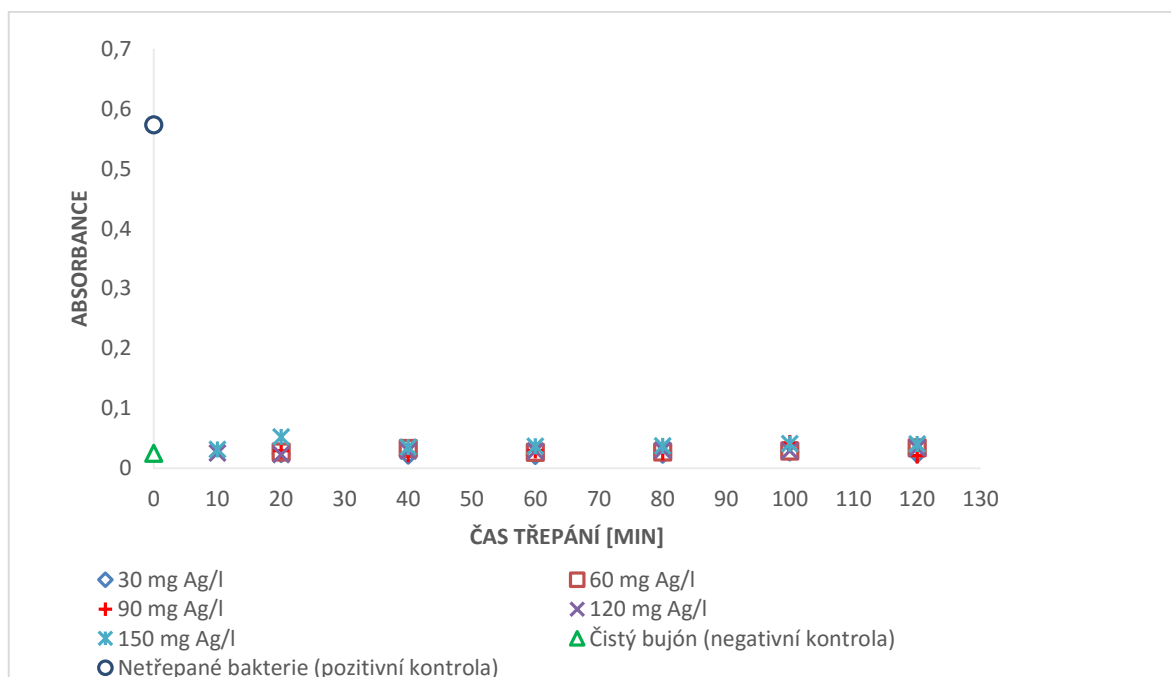
Obr. 27 – Výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci třepané vody s koncentrací 90 mg Ag/l, kontrolní vzorky



Obr. 28 – Výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci třepané vody s koncentrací 120 mg Ag/l, kontrolní vzorky

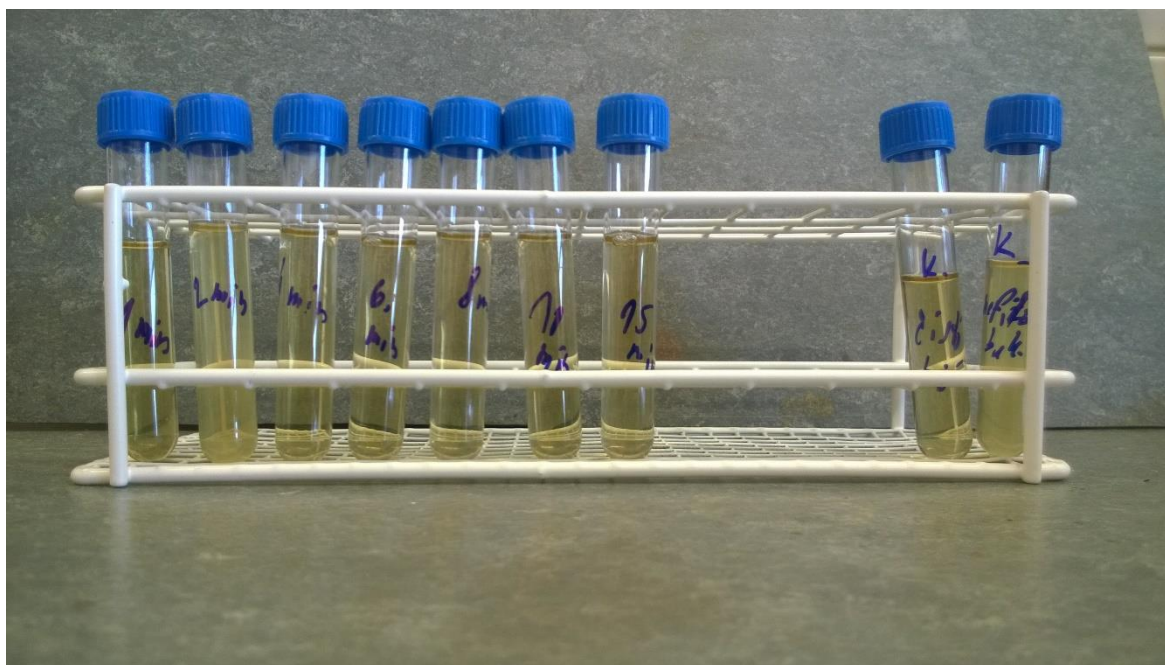


Obr. 29 – Výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci třepané vody s koncentrací 150 mg Ag/l, kontrolní vzorky

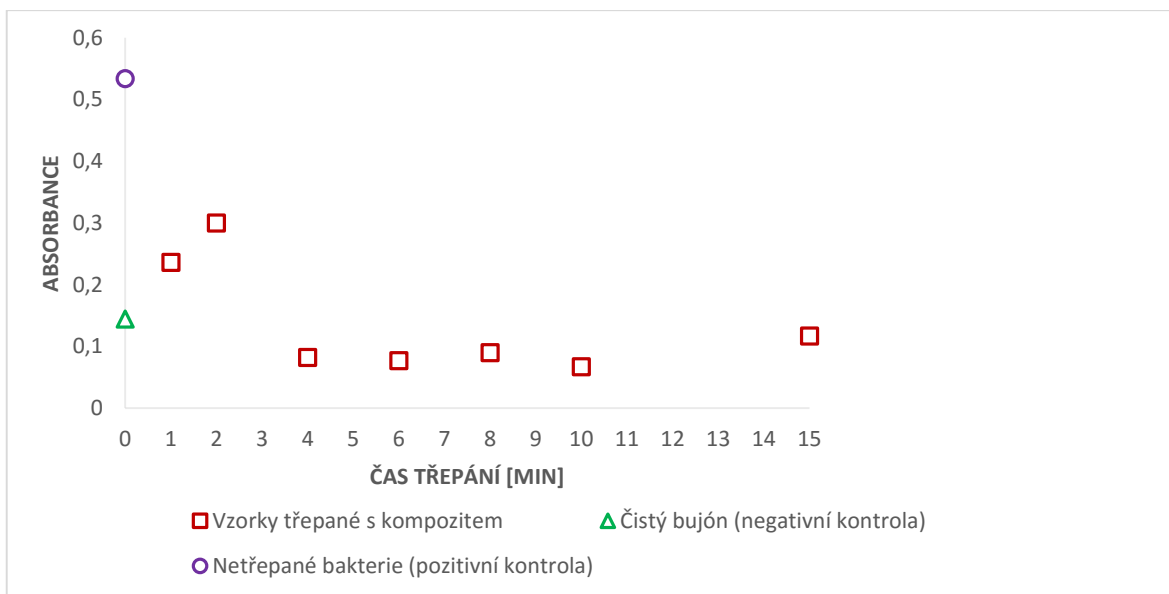


Obr. 30 – hodnoty absorbance zákalu po kultivaci bakteriální suspenze po třepání s různými koncentracemi stříbra s odběry po 20 minutách

Dále bylo pracováno s nejvyšší koncentrací 150 mg Ag/l a antibakteriální účinky byly testovány v kratších časech 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 minutách. Podle fotek (Obr. 31 a Obr. 33) bakteriálních bujónů po kultivaci v daných časech a z hodnot absorbancí zákalu (Obr. 32 a Obr. 34) lze stanovit nejkratší čas, kdy je voda s jistotou zbavena bakterií, na 4 minuty. Z Obr. 31 a Obr. 32 jde vidět, že vzorek je v 1 a 2 minutách zakalený, což značí bakteriální kontaminaci. Z Obr. 33 a Obr. 34 je patrné, že při opakování pokusu byly vzorky již po 2 minutách třepání zbaveny bakterií, jelikož je zakalený pouze vzorek odebraný po 1 minutě třepání. Tyto experimenty prokázaly, že k odstranění bakteriální kontaminace protřepáváním při použití koncentrace 4,4 g/l křemeliny, což odpovídá koncentraci stříbra 150 mg/l, postačuje čas pouhých 5 minut.

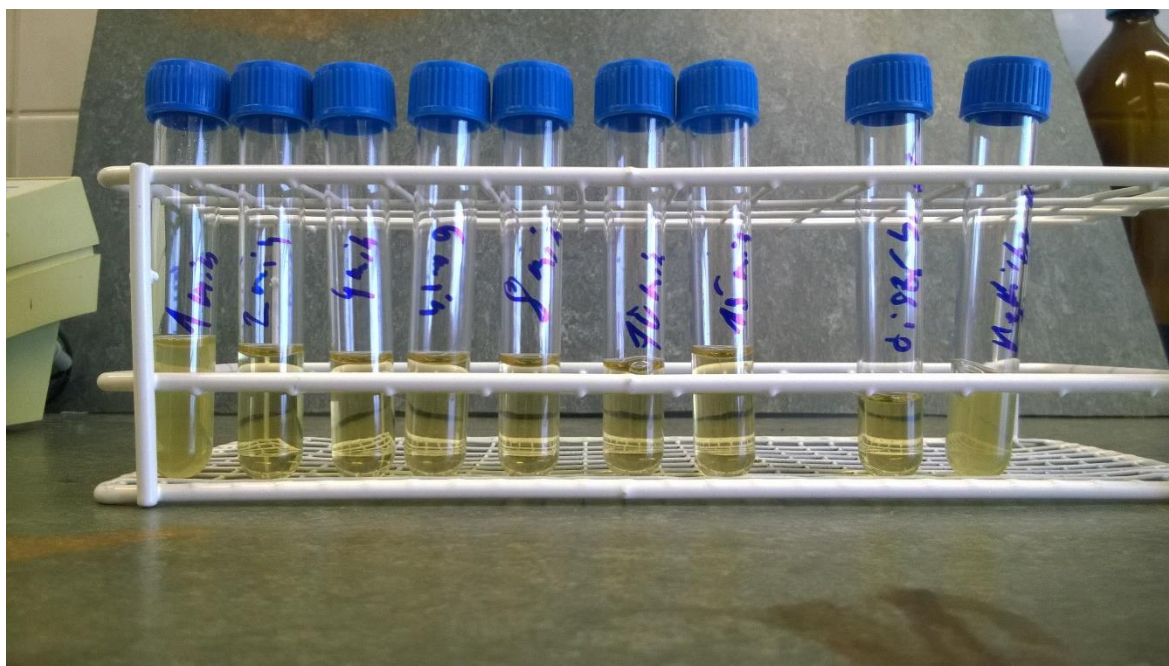


Obr. 31 - Výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci třepané bakteriální suspenze s koncentrací 150 mg Ag/l

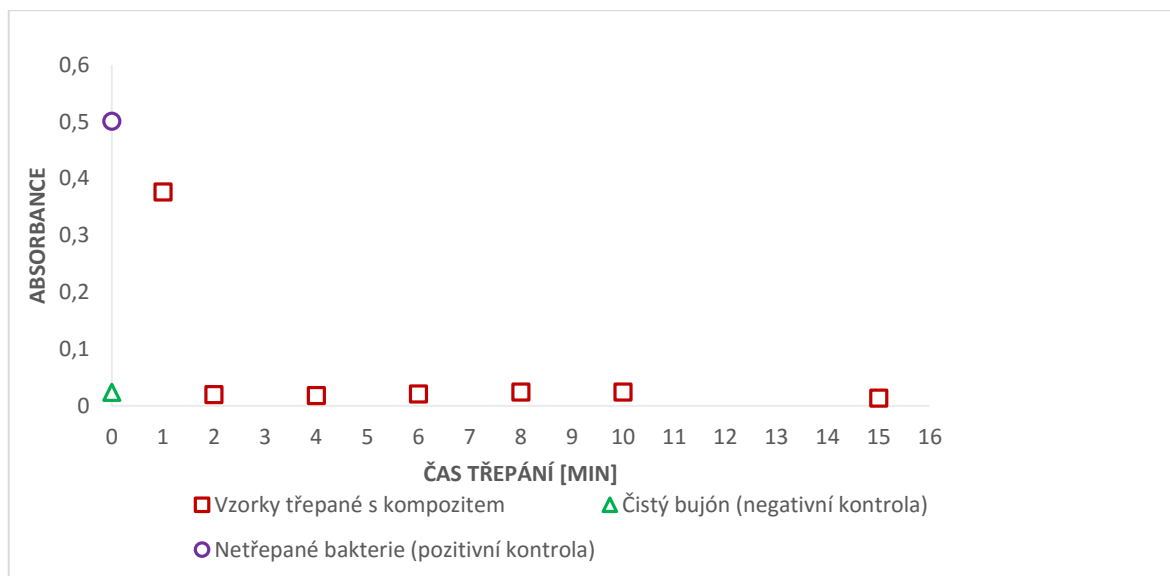


Obr. 32 - Hodnoty absorbance zákalu (bakteriální růst) po kultivaci bakteriální suspenze třepané s koncentrací 150 mg Ag/l

Opakování pokusu:



Obr. 33 - Výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci třepané bakteriální suspenze s koncentrací 150 mg Ag/l

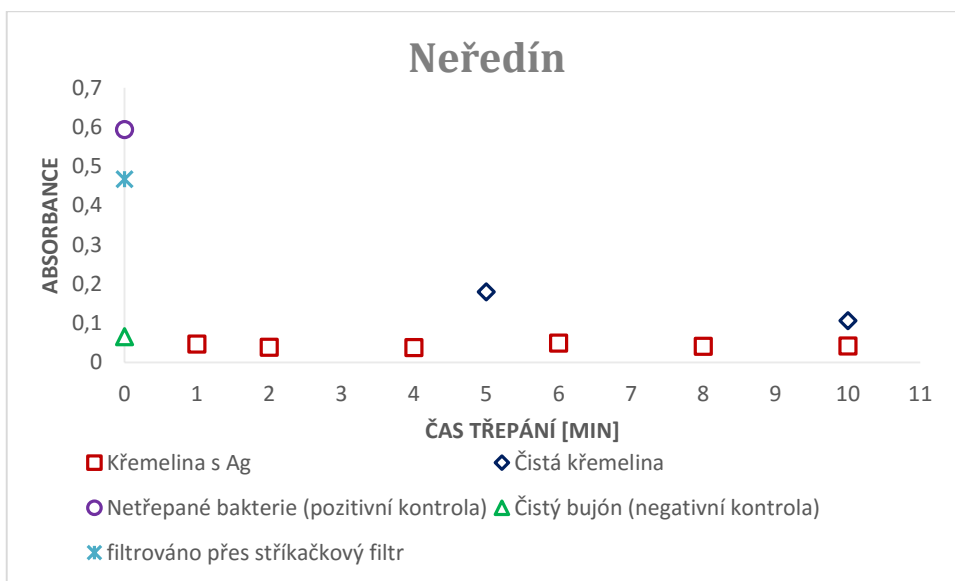


Obr. 34 - Hodnoty absorbance zákalu (bakteriální růst) po kultivaci bakteriální suspenze třepané s koncentrací 150 mg Ag/l

Třepání reálných přírodních vzorků probíhalo naprosto shodně jako u třepání koncentrovaných bakteriálních suspenzí. Navíc bylo prováděno protřepávání vzorků reálné vody s čistou křemelinou bez nanočástic Ag po dobu 5 a 10 minut. Rovněž byly pro kontrolu kultivovány vzorky přímo odebrané z odběrné láhve, nebyly třepány, ale byly pouze přefiltrovány přes stříkačkový filtr s póry o velikosti 3 μm , aby se prokázalo, že bakterie nezadržuje samotný stříkačkový filtr. Podle fotky (Obr. 35) a naměřené absorbance (Obr. 36) zákalu po kultivaci třepané vody z jezírka je patrné, že i čistá křemelina má jisté antibakteriální účinky. Nicméně hodnoty absorbancí jsou zvýšené a prokazují tak mírný nárůst bakterií. Na druhou stranu hodnoty absorbancí vody třepané s kompozitem s obsahem nanočástic stříbra jsou stejné jako hodnoty čistého bujónu (negativní kontroly), což vypovídá o absolutní eliminaci bakterií v třepané vodě. Důvodem snížení množství bakterií v reálném vzorku třepáním v čisté křemelině je nízká koncentrace bakterií v reálném vzorku. Porovnáním kultivace 0,1 ml bakteriální suspenze *E. coli* s koncentrací 10^6 CFU/ml a 0,1 ml vody z jezírka je patrná výrazně nižší koncentrace bakterií v reálném vzorku, která činila 10^3 CFU/ml (Obr. 37).



Obr. 35 - Výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci třepané vody z jezírka s kompozitem (1. – 6. zkumavka zleva) a čistou křemelinou (7. a 8. zkumavka zleva)

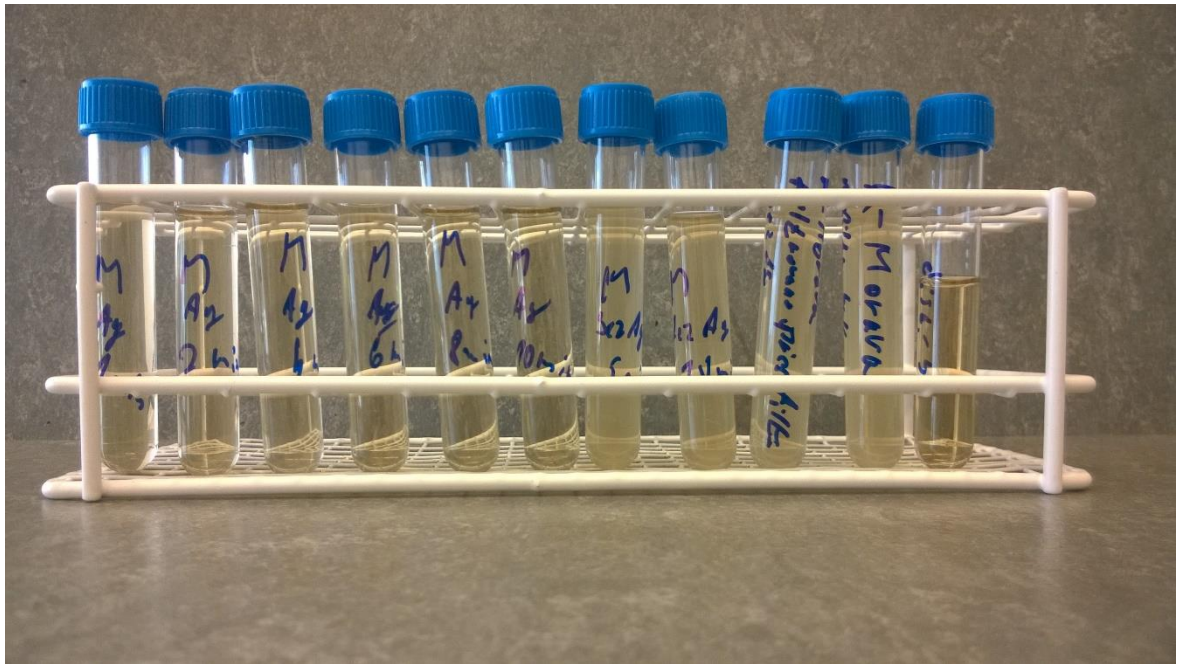


Obr. 36 - Hodnoty absorbance zákalu (bakteriálního růstu) po kultivaci třepané vody z jezírka

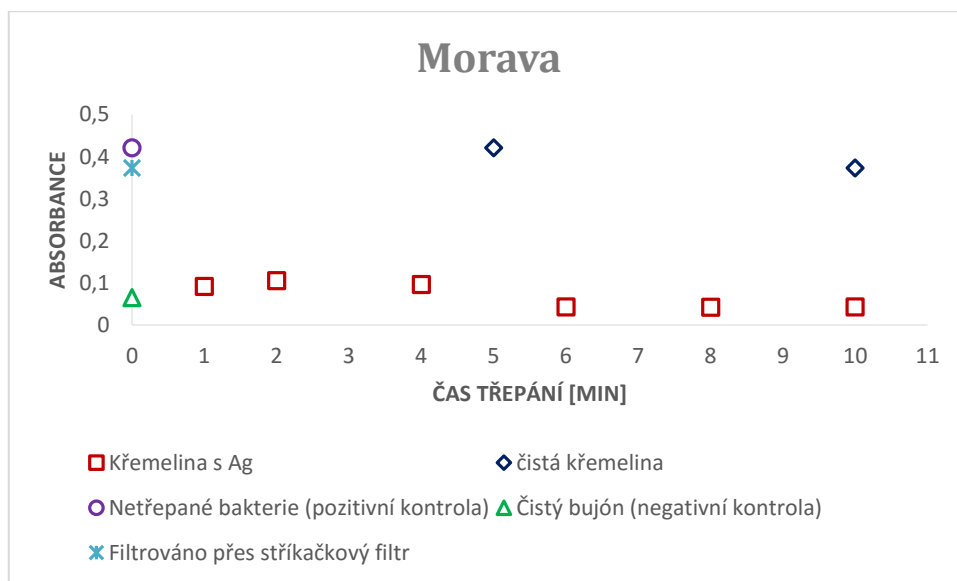


Obr. 37 - Nárůst kolonií tvořících jednotku na agaru po 24 hodinové kultivaci při 36°C bakteriální suspenze E. coli (vlevo) a vody z jezírka (vpravo)

V případě třepání vody odebrané z řeky Moravy je dle dosažených výsledků patrné, že čistá křemelina nevykazuje antibakteriální účinnost, jako tomu bylo v případě vody odebrané z jezírka. Vzorky odebrané v 5 a 10 minutách třepání jsou zakalené (Obr. 38 a Obr. 39), což značí bakteriální kontaminaci. Důvodem je výrazně vyšší bakteriální koncentrace ve vzorku vody z řeky Moravy (10^5 CFU/ml) oproti vzorku z jezírka, což prokázala kultivace 0,1 ml vody na krevním agaru (Obr. 40). Takto vysokou koncentraci bakterií již není schopna čistá křemelina eliminovat. Naproti tomu je z fotek a absorbancí (Obr. 38 a Obr. 39) vidět, že všechny vzorky třepané s kompozitem Diacelit/nanoAg nevykazují žádnou bakteriální kontaminaci, jelikož nejsou zakalené a hodnota absorbancí je shodná s čistým bujónem. Z těchto výsledků lze usoudit, že veškerá bakteriální kontaminace byla odstraněna za méně než minutu.



Obr. 38 - Výsledky tvorby zákalu (bakteriální růst) po kultivaci třepané vody z řeky s kompozitem (1. - 6. zkumavka zleva) a čistou křemelinou (7. a 8. zkumavka zleva)



Obr. 39 - Hodnoty absorbance zákalu (bakteriálního růstu) po kultivaci třepané vody z řeky



Obr. 40 - Nárůst bakteriálních kolonií tvořících jednotku na agaru po 24 hodinové kultivaci při 36°C bakteriální suspenze E. coli (vlevo) a vody z Moravy (vpravo)

7.5 Uvolňování stříbra z kompozitu

Stanovení celkového obsahu stříbra uvolněného z kompozitu v průběhu filtrace po protečení 30 ml vody bylo provedeno na přístroji AAS. Pro srovnání byl použit vzorek vody před filtrací.

Koncentrace stříbra ve vzorku před filtrací byla stanovena na 1,5 $\mu\text{g/l}$ a po filtraci na 37,3 $\mu\text{g/l}$. Množství stříbra ve vodě nesmí překročit koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$ podle vyhlášky č.252/ 2004 Sb., která stanovuje požadavky na pitnou vodu. Zde byla koncentrace uvolněného stříbra 35,8 $\mu\text{g/l}$ a tudíž byla splněna podmínka daná vyhláškou.

Závěr

Cílem této bakalářské práce byla příprava kompozitu složeného z nanočástic stříbra a křemeliny. Následně byl tento kompozit použit jako filtrační materiál k odstranění mikrobiální kontaminace vod.

V rámci práce byly použity k přípravě kompozitu dva typy křemeliny a to hrubší křemelina Diacelit a jemnější DIF-BO. Kompozit byl připraven metodou layer-by-layer. Tato metoda využívá opakovaného vrstvení látek s opačným povrchovým nábojem. Jelikož mají jak stříbrné nanočástice, tak křemelina záporný náboj, bylo nutné k jejich spojení použít polymerní látku PDDA, která změnila povrchový náboj křemeliny ze záporného na kladný a umožnila tak záporně nabitým nanočásticím stříbra adsorpci na povrch křemeliny. Na jemnější křemelinu DIF-BO bylo navázáno maximálně 35,6 mg Ag/g kompozitu a na hrubší křemelinu Diacelit bylo naadsorbováno maximální množství stříbra 21,9 mg Ag/g kompozitu.

Následně byly tyto dva kompozity použity pro dvě různé metody stanovení mikrobiální aktivity. První metoda testovala mikrobiální aktivitu při průtoku vody skrze kompozit. Pro tuto metodu byl vybrán kompozit připravený z křemeliny Diacelit, jelikož umožňoval průtok většího množství vody. Bylo zjištěno, že při navážce 2,5 g byl schopen odstranit bakterie kmenu *E. coli* z bakteriální suspenze a při menší navážce 1,5 g bakteriální kontaminaci vod z řeky Moravy a jezírka Neředín. Další metodou, při které byla testována mikrobiální aktivita, bylo třepání bakteriálně kontaminovaných vod. Zde bylo dokázáno, že kompozit připravený z křemeliny DIF-BO s koncentrací stříbra 150 mg/l dokáže během 4 minut vydesinfikovat bakteriální suspenzi *E. coli*. Stejná koncentrace byla schopná odstranit bakterie z reálných přírodních vzorku odebraných z řeky Moravy a jezírka Neředín za méně než minutu. Bylo také u obou metod potvrzeno, že i samotná křemelina má jisté antibakteriální účinky, kdy jsou bakterie z počátku filtrace zachytávány do póru křemeliny, ale po jejich ucpání je křemelina vůči bakteriím neúčinná a proto je nutné k úplné desinfekci vod použít kompozit obsahující nanočástice stříbra.

Summary

The aim of this work was to prepare a composite made of silver nanoparticles and diatomite. This composite was used as filtration material for water contamination removal.

Two different types of diatomite were used in the process. The first of them was Diacelit, a rougher diatomite, and the second type was the smoother DIF-BO. The layer-by-layer method was used when making the composite. This method uses repeated adding of layers with different surface charge. Silver nanoparticles and diatomite have negative surface charge and that is why it was necessary to use polymer PDDA, which changes negative charge of diatomite to positive charge and allows the adsorption of negatively charged silver nanoparticles on the surface of diatomite. The amount of silver in the smoother DIF-BO was 35,6 mg Ag/g of the composite and in the rougher Diacelit was the amount of silver 21,9 mg Ag/g of the composite.

These two composites were subsequently used for two different methods of determination of their antimicrobial effects. The first method tested the antimicrobial effects by water flowing through the composite. For this method, the Diacelit composite was chosen, because it allows a better water flow. It was discovered that 2,5 g of this composite could remove bacteria *E. coli* from the bacterial suspension and 1,5 g made it possible to remove bacteria from the water from Morava river and Neředín lake. When using the second method, water and composite were being shaken together. It was discovered that the composite made of DIF-BO diatomite with silver concentration of 150 mg Ag/l can kill all bacteria in the bacterial suspension in 4 minutes. The same concentration could disinfect samples taken from Morava river and Neředín lake in less than one minute. Both methods confirm that pure diatomite has some disinfectant effects at the start of the filtration because of the many pores it has. But when all pores are blocked, diatomite becomes ineffective with respect to water disinfection. That is why a composite made of silver nanoparticles has to be used in order to remove microbial contamination from water.

8. Reference

1. MALÝ, J., MALÁ, J. *Chemie a technologie vody*. Brno : ARDEC, 2006. 80-86020-50-9.
2. PANÁČEK, A., KVÍTEK, L., PRUCEK, R.,. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *Journal of physical chemistry B*. 2006, Sv. 110(33), 16248–16253.
3. KVÍTEK, L. a PANÁČEK, A. *Základy koloidní chemie*. Olomouc : UPOL, 2007.
4. Brownian motion. *Merriam-Webster*. [Online] [Citace: 9. 12 2015.] <http://www.merriam-webster.com/dictionary/brownian%20motion>.
5. FISHER, O. a kol. *Fyzikální chemie*. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1984. 66-00-16/1.
6. ATKINS, P. a DE PAULA, J. *Fyzikální chemie*. Praha : VŠCHT, 2013. 978-80-7080-830-6.
7. BRDIČKA, R. a DVOŘÁK, J. *Základy fyzikální chemie*. Praha : Academia Praha, 1977.
8. ŠČUKIN, E.D., PERCOV, A.V. a AMELINOVÁ, E.A. *Koloidní chemie*. Praha : Academia Praha, 1990.
9. POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha : VŠCHT Praha, 2008.
10. Cosgrove, T. *Colloid Science: Principles, Methods and Applications*. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 2010.
11. NOVÁK, J. *Fyzikální chemie*. Praha : VŠCHT, 2008.
12. Zaheer Khan, Shaeel Ahmed Al-Thabaiti, Abdullah Yousif Obaid, A.O. Al-Youbi. Preparation and characterization of silver nanoparticles by chemical. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, Sv. 82, 513-517.

13. KVÍTEK, L., PRUCEK, R. The preparation and application of silver nanoparticles. *Journal of material science*. 2005.
14. VLČKOVÁ, B., GRU, X.J., MOSKOVITS, M. SERS Excitation Profiles of Phthalazine Adsorbed on Single Colloidal Silver Aggregates as. *Journal of physical chemistry B*. 1997, Sv. 101, 1588-1593.
15. LEE, P.C., MEISEL, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *Journal of Physical Chemistry*. 1982, Sv. 86, 3391-3395.
16. BELL, W.C., MYRICK, M.L. Preparation and Characterization of Nanoscale Silver Colloids. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2001, Sv. 242, 300-305.
17. LAMBERT, P.A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, Sv. 57(10), 1471-1485.
18. GUZMAN, M., DILLE, J., GODET, S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2012, Sv. 8(1), 37-45.
19. Nanotrade. [Online] 3. 1 2016. <https://www.nanosilver.cz/Nanoprodukty/>.
20. BALL, P. Martin Fleischmann (1927–2012). *Nature*. 2012, Sv. 489 (34).
21. Lin XM, Cui Y, Xu YH, Ren B, Tian ZQ. Surface-enhanced Raman spectroscopy: substrate-related issues. *anal bioanal chem*. 2009, Sv. 394(7), 1729-1745.
22. Hossain MK, Kitahama Y, Huang GG, Han X, Ozaki Y. Surface-enhanced Raman scattering: realization of localized surface plasmon resonance using unique substrates and methods. *Anal bioanal chem*. 2009, Sv. 394(7), 1747-1760.
23. ATAROD, M., NASROLLAHZADEH, M., SAJADI, S.M. Euphorbia heterophylla leaf extract mediated green synthesis of Ag/TiO₂ nanocomposite and investigation of its excellent catalytic activity for reduction of variety of dyes in water. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016, Sv. 462, 272-279.

24. ABDULHAFID M. ELDERNAWI, M. JAMEL RIOUS, KHALIL IBRAHIM AL-SAMARRAI. CHEMICAL, PHYSICAL AND MINERALOGICAL, CHARACTERIZATION OF AL-HISHAH DIATOMITE AT SUBKHAT GHUZAYIL AREA, LIBYA. *International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences*. 2014, Sv. 2 (4), 165-174.
25. ANTONIDES, L.E. DIATOMITE. *U.S. Geological Survey Mineral Commodity Summaries*. 1998, 56-57.
26. *Czech Mini Breweries*. [Online] 3. 1 2016. <http://www.ceskeminipivovary.cz/nabidka/vyroba/komponenty-pivovaru/priprava-piva-k-prodeji/filtrace-piva/svickove-filtry/>.
27. FULTON, G.P. *Diatomaceous earth filtration for safe drinking water*. Reston : American Society of Civil Engineers, 2000.
28. Bakr, Hossam Elden Galal Morsy Mohamed. Diatomite: Its Characterization, Modifications and Applications. *Asian Journal of Material Science*. 2010, Sv. (3), 121-136.
29. Clubvital.cz. [Online] 3. 1 2016. <http://www.club-vital.cz/kremelina-diatom-x>.
30. BF Bílek Filtry. *Filtrační křemelina zažívá ve vinařství renesanci*. [Online] 3. 1 2016. <http://filtrace.com/clanky-a-odborne-texty/detail/49/filtracni-kremelina-zaziva-ve-vinarstvi-renesanci/>.
31. KANG, SZ., BO, LY., LI, XY., MU, J. Facile Preparation of Fe₃O₄/Carbon Nanocomposite With High Lithium Storage Capacity. *SYNTHESIS AND REACTIVITY IN INORGANIC METAL-ORGANIC AND NANO-METAL CHEMISTRY*. 2016, Sv. 46(5), 647-652.
32. KHANAHMADZADEH, S., HOSSEINY, G. Synthesis, Characterization, and Thermal Properties of Fe₂TiO₅/Cellulose and Cellulose Acetate Nanocomposites. *SYNTHESIS AND REACTIVITY IN INORGANIC METAL-ORGANIC AND NANO-METAL CHEMISTRY*. 2016, Sv. 46 (5), 713-717.

33. HONG, TC., RADHIKA, T., RAMALINGAM, R.J. Ag-ZnO Incorporated Silica Based Bio-Nanocomposite Prepared by Low Cost Method for Photocatalytic Dye Degradation. *SYNTHESIS AND REACTIVITY IN INORGANIC METAL-ORGANIC AND NANO-METAL CHEMISTRY*. 2016, Sv. 46(5), 741-746.
34. JALEH, B., SHAHBAZI, N., JABBARI, A. Optical and Thermal Properties of Polycarbonate-TiO₂ Nanocomposite Film. *SYNTHESIS AND REACTIVITY IN INORGANIC METAL-ORGANIC AND NANO-METAL CHEMISTRY*. 2016, Sv. 46(4), 602-607.
35. ATAROD, M., NASROLLAHZADEH, M., SAJADI, S.M. Euphorbia heterophylla leaf extract mediated green synthesis of Ag/TiO₂ nanocomposite and investigation of its excellent catalytic activity for reduction of variety of dyes in water. *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*. 2016, Sv. 462, 272-279.
36. Ummartyotin, S. a kol. Development of transparent bacterial cellulose nanocomposite film as substrate for flexible organic light emitting diode (OLED) display. *Industrial Crops and Products*. 2012, Sv. 35.
37. YUAN, P., FAN, M., YANG, D. Montmorillonite-supported magnetite nanoparticles for the removal of hexavalent chromium [Cr(VI)] from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*. 2009, Sv. 166.
38. Zhe-Fei Li, Hangyu Zhang, Qi Liu, Lili Sun, Lia Stanciu a Jian Xie. Fabrication of High-Surface-Area Graphene/Polyaniline. *Applied Materials & Interfaces* . 2013, Sv. 5(7), 2685–2691.
39. JinYoung Kim, SungBum Choi, JunHong Noh a kol. Synthesis of CdSe–TiO₂ Nanocomposites and Their Applications to TiO₂ Sensitized Solar Cells. *American Chemical Society*. 2009, Sv. 25(9), 5348-5351.
40. Iler, R.K. Multilayers of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1966, Sv. 21.

41. BEYER, S., MAK, W.C., TRAU, D. Reverse-Phase LbL Encapsulation of Highly Water Soluble Materials. *Langmuir*. 2007, Sv. 23, 8827-8832.
42. de Villiers, M.M., Otto, D.P., Strydom, S.J. Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011, Sv. 63.
43. RATH, G., HUSSAIN, T., CHAUHAN, G. Collagen nanofiber containing silver nanoparticles for improved wound-healing applications. *Journal of drug targeting* . 2016, Sv. 24, 520-529.
44. AHMED, H.B., EMAM, H.E. Layer by Layer Assembly of Nanosilver for High Performance Cotton Fabrics. *FIBERS AND POLYMERS*. 2016, Sv. 17, 418-426.
45. XU, Z.H., Ye, S.J., Antimicrobial polysulfone blended ultrafiltration membranes prepared with Ag/Cu₂O hybrid nanowires. *JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE*. 2016, Sv. 509, 83-93.
46. PETER, A., MIHALY-COZMUTA, L. Changes in the microbiological and chemical characteristics of white bread during storage in paper packages modified with Ag/TiO₂-SiO₂, Ag/N-TiO₂ or Au/TiO₂. *Food Chemistry* . 2015, Sv. 197, 790-798.
47. BET-MOUSHOUL, E., FARHADI, K. Development of novel Ag/bauxite nanocomposite as a heterogeneous catalyst for biodiesel production. 2016, Sv. 92, 12-21.
48. XU, J., WANG, C. A graphene-interlayered magnetic composite as a multifunctional SERS substrate. *RSC ADVANCES*. 2015, Sv. 5, 62101-62109.
49. WU, H., HUANG, D. Silver nanoparticles/polyethyleneimine/graphene oxide composite combined with surfactant film for construction of an electrochemical biosensor. *ANALYTICAL METHODS*. 2016, Sv. 8, 2961-2966.
50. PANÁČEK, A., BALZEROVÁ, A. *Základy toxikologie a ekotoxikologie*. Olomouc : UPOL, 2013.

51. LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny*. Praha : Karolinum, 2009. 978-802-4614-144.
52. BENCKO, V. *Hygienu : Učební texty k seminářům a praktickým cvičením*. Praha : Karolinum, 1998. 80-7184-551-5.
53. HORÁK, J., LINHART, I., KLUSOŇ, P. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Praha : VŠCHT, 2004. 80-7080-548-X.
54. KVÍTEK, L. *Metody studia koloidních soustav -prozatímní učební text*. Olomouc : Katedra fyzikální chemie Přf UPOL, 2006.
55. Kýmlová, J. Katalog metod v biofyzice. *Výukový portál 1. lékařské fakulty UK v Praze*. [Online] 6. 12 2015. <http://portal.lf1.cuni.cz/clanek-793-katalog-metod-v-biofyzice>.
56. NAVRÁTIL, L., ROSINA, J. a kol. *Medicínská biofyzika*. Praha : Grada publishing, a.s., 2005. 978-80-247-1152-2.
57. KVÍTEK, L. *Studium přípravy a aplikačních*. Olomouc : autor neznámý, 2008.
58. CREIGHTON, J.A., BLATCHFORD, C.G., ALBRECHT, M.G. Plasma Resonance Enhancement of Raman Scattering by Pyridine Absorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*. 1979, Sv. 75, 790-798.
59. Balzerová, A. *Příprava a studium antimikrobiálních vlastností nanokompozitu Ag/PDDA-křemelina*. Olomouc : autor neznámý, 2012.