

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**VLIV NANOČÁSTIC STŘÍBRA NA VITALITU
KVASINEK**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

David Bogdanovič

Studijní obor:

Chemie – Biologie v ochraně ŽP

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.

Olomouc 2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	David Bogdanovič
Název práce:	Vliv nanočástic stříbra na vitalitu kvasinek
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.
Rok obhajoby:	2015
Abstrakt:	Cílem této bakalářské práce je studium vlivu nanočástic stříbra na vitalitu kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Byl zkoumán vliv množství přidané disperze nanočástic stříbra na množství kvasinkami vyprodukovaného ethanolu. Nanočástice stříbra byly připraveny modifikovanou Tollensovou metodou a stabilizovány želatinou. Množství vyprodukovaného ethanolu v médiu bylo měřeno pomocí plynového chromatografu (GC) s detektorem plamenové ionizace (FID).
Klíčová slova:	nanočástice stříbra, kvasinky, vitalita, ethanolová fermentace, biologická aktivita
Počet stran:	54
Počet příloh:	1x CD
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: David Bogdanovič

Title: The Influence of Silver Nanoparticles on Vitality of Yeast

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Physical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.

The year of presentation: 2015

Abstract: The aim of this bachelor thesis is study of the influence of silver nanoparticles on vitality of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The influence of the quantity of added dispersion of silver nanoparticles on the amount of ethanol produced by yeast was investigated. Silver nanoparticles were prepared via a modified Tollens proces and stabilized by gelatin. The amount of produced ethanol in the medium was measured by using gas chromatography (GC) with flame ionisation detector (FID).

Keywords: silver nanoparticles, yeast, vitality, ethanol fermentation, biological activity

Number of pages: 54

Number of appendices: 1x CD

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsal samostatně pod vedením pana doc. RNDr. Libora Kvítka, CSc. a to výhradně s použitím citovaných literárních pramenů a zdrojů, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím, aby má bakalářská práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

David Bogdanovič

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce, panu doc. RNDr. Liboru Kvítkovi, CSc., za odborné vedení, cenné připomínky a rady, ale i čas, který mi věnoval při vypracování této práce. Rovněž děkuji i vedoucím kateder anorganické chemie a fyzikální chemie, panu prof. RNDr. Zdeňku Trávníčkovi, Ph.D. a panu prof. RNDr. Michalu Otyepkovi, Ph.D., za možnost vypracování této práce. Děkuji také RNDr. Václavu Rancovi, Ph.D. a paní Karle Slavičkové za pomoc při experimentální části.

OBSAH

ÚVOD	8
1. TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1. Nanotechnologie a nanomateriály	9
1.2. Nanočástice stříbra	10
1.2.1. Charakteristické vlastnosti nanočástic	10
1.2.2. Metody stanovení velikosti nanočástic	13
1.2.3. Metody přípravy nanočástic stříbra	16
1.2.4. Biologická aktivita nanočástic stříbra	17
1.3. Organismus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.3.1. Systém a klasifikace	21
1.3.2. Cytologie	21
1.3.3. Rozmnožování	24
1.3.4. Fyziologie	26
1.3.5. Vitalita a viabilita	28
1.3.6. Význam a použití	29
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
2.1. Chemikálie	30
2.2. Biologický materiál	31
2.3. Přístrojové vybavení	32
2.4. Příprava nanočástic stříbra	32
2.5. Příprava živného média	34
2.6. Postup při kultivaci kvasinek a studiu vlivu nanočástic stříbra na vitalitu kvasinek	35
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	37
3.1. Vlastnosti připravené disperze nanočástic stříbra	37
3.2. Studium vlivu nanočástic stříbra na vitalitu kvasinek	38
3.2.1. Vliv množství nanočástic stříbra v kultivačním médiu na množství vyprodukovaného ethanolu – experiment č. 1	38

3.2.2. Vliv množství nanočástic stříbra v kultivačním médiu na množství vyprodukovaného ethanolu – experiment č. 2	40
3.2.3. Vliv množství nanočástic stříbra v kultivačním médiu na množství vyprodukovaného ethanolu – experiment č. 3	41
3.2.4. Vliv množství nanočástic stříbra v kultivačním médiu na množství vyprodukovaného ethanolu – experiment č. 4	43
3.2.5. Vliv množství nanočástic stříbra v kultivačním médiu na množství vyprodukovaného ethanolu – experiment č. 5	44
3.2.6. Shrnutí výsledků experimentů ovlivnění vitality kvasinek nanočásticemi stříbra	46
3.2.7. Sestavení kalibrační závislosti pro ethanol	47
ZÁVĚR	48
4. SUMMARY	49
5. POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE	50
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	54

ÚVOD

V současné době zaznamenáváme intenzivní rozvoj vědeckého výzkumu v oblasti nanotechnologií, který dává vzniknout řadě materiálů, se kterými se člověk setkává a často nevědomky využívá celá staletí. Významnou roli na tomto poli sehrály koloidy kovů, které se od nepaměti využívaly k barvení keramiky a skla, malování a psaní. Výsostné postavení měl koloid zlata, se kterým v druhé polovině 19. století experimentoval Michael Faraday, čímž zahájil éru koloidní chemie (masivní rozvoj fotografie, boj s mikroorganismy koloidním stříbrem aj.). Samotné stříbro je známé již od starověku díky svým unikátním optickým (barvení skla a keramiky) a biologickým vlastnostem (baktericidní účinky).^{1,2}

Obnovení zájmu o koloidy kovů, v užším slova smyslu nanočástice kovů, je spojen s masivním výzkumem a vývojem sofistikovaných technik studia nanosvětla ve druhé polovině 20. století. Mezi ně řadíme zejména objevy umožňující studium nanočástic jako jsou skenovací elektronová mikroskopie (SEM), mikroskopie atomárních sil (AFM) a mnohé další techniky.^{1,3}

Výsadní postavení v oblastech výzkumu a inovací mají bezesporu nanočástice stříbra, které zažívají opravdovou renesanci po období jejich využití v medicíně na počátku 20. století, tehdy pod názvem koloidní stříbro. Nanočástice stříbra jsou typickým příkladem nanotechnologií dneška a to zejména díky svým specifickým vlastnostem, které jsou dány rozptýlením stříbra v částice o velikosti jednotek až desítek nanometrů. Svědčí o tom i objev velmi citlivé spektroskopické techniky v 70. letech 20. století – povrchem zesílený Ramanův rozptyl, kterým lze v současné době studovat i jedinou molekulu adsorbovanou na povrchu nanočástice stříbra. Podobně, jako i nanočástice dalších kovů, vynikají nanočástice stříbra i svými optickými vlastnostmi. Připravená disperze nanočástic stříbra vykazuje charakteristické, intenzivní oranžovo - žluté zabarvení díky existence tzv. rezonance povrchového plasmonu, jehož maximum v absorpčním spektru je v oblasti okolo 400 nm pro částice velikosti okolo 20 nm. Aktuálně studovaným tématem je rovněž biologická aktivita nanočástic stříbra, vykazující významné baktericidní a fungicidní účinky v boji s jednoduchými organismy, jako jsou bakterie, viry a plísňe (mykózy).^{1,4}

Cílem této bakalářské práce je studium vlivu nanočástic stříbra na vitalitu kvasinek. Byl studován vliv množství přidané disperze nanočástic stříbra do kultivačního média na množství kvasinkami vyprodukovaného ethanolu.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Nanotechnologie a nanomateriály

Pojmy spojené s předponou „nano“, jako jsou nanotechnologie, nanomateriály a nanočástice řadíme v posledních letech mezi nejskloňovanější termíny řady vědních oborů, ale i laické veřejnosti. Ještě v polovině minulého století převládaly představy většiny vědců o tom, že nelze ovládnout hmotu na atomární a molekulární úrovni a využít ji k praktickým aplikacím (miniaturní součástky a stroje, nanoroboti aj.). Za průkopníka a vizionáře v této oblasti je považován fyzik a nositel Nobelovy ceny za fyziku Richard Feynman, který v roce 1959 přednesl svou památnou přednášku „There’s Plenty Room at the Bottom“, v níž mimo jiné předpověděl, že bude možné vytvářet a využívat nové materiály a struktury. Rovněž naznačil, že ve chvíli, kdy bude k dispozici vhodná experimentální technika, tak bude možné nejen manipulovat s „nano“ objekty, ale i zkoumat jejich vlastnosti.^{5,6}

Pro definování nanotechnologií existuje řada definic, ale mezi nejčastěji užívané patří definice zformulovaná Národní nanotechnologickou iniciativou (NNI) v březnu 2004: „Nanotechnologie je výzkum a technologický vývoj na atomové, molekulární nebo makromolekulární úrovni, v rozměrové škále přibližně 1-100 nm. Je to též vytváření a používání struktur, zařízení a systémů, které mají v důsledku svých malých nebo intermediárních rozměrů nové vlastnosti a funkce. Je to rovněž dovednost manipulovat s objekty na atomové úrovni.“⁶

Nanomateriály definujeme podle doporučení Evropské komise ze dne 18. 10. 2011 takto: „Nanomateriálem se rozumí přírodní materiál, materiál vzniklý jako vedlejší produkt nebo materiál vyrobený obsahující částice v nesloučeném stavu nebo jako agregát či aglomerát, ve kterém je u 50 % nebo více částic ve velikostním rozdělení jeden nebo více vnějších rozměrů v rozmezí velikost 1 nm – 100 nm. Agregátem se rozumí částice složená z pevně vázaných nebo sloučených částic. Aglomerátem se rozumí shluk slabě vázaných částic

nebo agregátů, jejichž výsledný vnější povrch je podobný součtu povrchů jednotlivých složek.“⁷

Výjimku tvoří fullereny, grafenové vločky a jedностěnné uhlíkové nanotrubicе s jedním nebo více rozměry pod 1 nm, které jsou rovněž považovány za nanomateriály.⁷

Z hlediska typů lze nanomateriály třídit do skupin podle různých kritérií. Podle normy ISO/TS 2768 je pro klasifikaci zvolen počet souřadnic, ve kterých daná struktura splňuje interval rozměrů 1 – 100 nm. Následně lze nanomateriály rozdělit na:

- 0 dimenzionální – nanorozměrů dosaženo ve všech třech souřadných osách. Patří sem nanočástice kovů, nanokrystaly, kvantové tečky aj.
- 1 dimenzionální – nanorozměrů dosaženo ve dvou souřadných osách. Patří sem nanovláknа, nanotrubicе aj.
- 2 dimenzionální – nanorozměrů dosaženo pouze v jedné souřadné ose. Patří sem nanodesky, tenké vrstvy (vrstva grafitu) aj.
- 3 dimenzionální – vícefázové materiály obsahující kombinace předchozích typů nanomateriálů. Příkladem mohou být nanokompozity.^{5,8}

1.2. Nanočástice stříbra

Z hlediska výše uvedeného kritéria pro klasifikaci nanomateriálů, patří nanočástice stříbra mezi 0 dimenzionální materiály s definovanou velikostí od 1 do 100 nm.^{5,8} Naproti tomu, z hlediska koloidní chemie, řadíme nanočástice stříbra do koloidně disperzních systémů, které jsou jedním ze tří případů tzv. disperzních soustav.^{2,9}

1.2.1. Charakteristické vlastnosti nanočástic

Koloidní disperze nanočástic stříbra se skládá ze dvou fází, tudíž se z hlediska klasifikace disperzních soustav jedná o soustavu heterogenní. Heterogenní (nestejnorodá) disperzní soustava je tvořena dvěma fázemi – disperzním prostředím (spojitá část soustavy) a disperzní fází (rovnoměrně rozptýlená část soustavy). Hranici mezi disperzní fází a disperzním prostředím tvoří tzv. fázové rozhraní, kde se vlastnosti jedné fáze mění skokem na vlastnosti fáze druhé. Pro fázové rozhraní disperze je charakteristické, že zaujímá velkou plochu v porovnání s vlastním objemem

dispergované fáze. S tím také souvisí specifické chování koloidní disperze nanočástic stříbra (ale i dalších nanočástic kovů), která je unikátní svými optickými, kinetickými, elektrickými a dalšími specifickými vlastnostmi. Specifita chování nanočástic stříbra vyplývá zejména z malých rozměrů částic (řádově několik jednotek až desítek nanometrů) a velké plochy fázového rozhraní.⁹

1.2.1.1. Optické vlastnosti

Mezi charakteristické vlastnosti disperzí nanočástic patří optické vlastnosti související s fyzikálními parametry nanočástic, jako jsou velikost, vlastní absorpce světla látek tvořící disperzní fázi, elektrická vodivost a mnohé další.⁹

Při průchodu světla disperzí nanočástic se intenzita světelných paprsků zmenšuje z důvodu existence jevů, jako je absorpce a rozptyl světla.¹⁰ Studium zákonitostí průchodu světla různými soustavami je možné určit například koncentraci a strukturu částic tvořící disperzní fázi.¹¹ Velikost absorpce a rozptylu elektromagnetického záření (světelného paprsku) závisí zejména na jeho na vlnové délce a charakteru disperze nanočástic. V disperzních systémech nanočástic a systémech s částicemi větších rozměrů se uplatňuje hlavně rozptyl světla.^{2,12}

Absorpce záření

Při absorpci elektromagnetického záření (světelného paprsku, kvanta energie) dochází k takovým energetickým změnám stavů elektronů, které mají za následek zvýšení vnitřní energie částic, která se přemění v energii tepelnou.^{2,9} Množství světla, které je pohlceno látkou A je vyjádřeno pomocí absorbance a ta je definována pomocí Lambert – Beerova zákona:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon cd, \quad (1)$$

kde I je intenzita prošlého záření, I_0 je intenzita dopadajícího záření, ϵ je molární absorpční koeficient ($1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c je koncentrace látky (mol l^{-1}) a d (cm) je tloušťka vrstvy, kterou prochází světelný paprsek.^{9,10}

Rozptyl záření

Při ozáření částic elektromagnetickým zářením (světelným paprskem o srovnatelné vlnové délce nebo větší než je velikost částic) nedochází k pohlcení kvanta světelné energie, jak je tomu u absorpce, ale kvantum přijaté světelné energie je náhodně emitováno všemi směry bez změny vlnové délky.^{9,10,12}

Rozptyl světla je složitý jev, který může zahrnovat odraz, lom, ohyb, tak i interferenci světla. Poprvé byl tento jev pozorován Johnem Tyndallem, podle kterého je popsán efekt rozšiřujícího se paprsku (ve tvaru kužele) procházející koloidní disperzí – Tyndallův efekt.⁹

Dnes již klasickou teorii rozptylu světla popsal v roce 1871 lord Rayleigh, který se však omezil na velmi zředěné disperze s částicemi menšími než je vlnová délka světla, nevykazující vlastní absorpci světla a umístěné v dostatečné vzdálenosti od sebe. Podle této teorie se částice chová jako oscilující dipól, který vyzařuje pohlcené kvantum energie náhodně do všech stran bez změny vlnové délky a kde rozptýlená intenzita světla I_θ závisí na polarizovatelnosti α (elektrická vlastnost rozptylující se částice), vlnové délce světla λ , vzdálenosti od detektoru r , permitivitě vakua ϵ_0 a pozorovacím úhlu θ .^{9,11,13}

$$\frac{I_\theta}{I_0} = \frac{8\pi^4}{r^2\lambda^4} \left(\frac{\alpha}{4\pi\epsilon_0} \right)^2 (1 + \cos^2\theta) \quad (2)$$

Na principu difrakce (rozptylu) světla na jednotlivých částicích disperze funguje i ultramikroskop, který měl velký význam zejména při rozvoji koloidní chemie.¹¹ Je nutné poznamenat, že ultramikroskopem se nepozorují samotné částice disperze, ale je pozorováno světlo rozptýlené disperzními částicemi. Jednotlivé částice se nejčastěji jeví jako zářící body na temném pozadí.^{9,12}

Náhradou klasického zdroje světla při rozptylu (např. žárovka) za laser (koherentního zdroj záření) může v určitých směrech docházet k interferenci rozptýleného záření, která má za následek zesílení intenzity rozptýleného záření. Vlivem Brownova pohybu částic disperze dochází ke kolísání intenzity rozptýleného záření v čase okolo průměrné hodnoty intenzity. Tento jev nazýváme dynamický rozptyl světla, na jehož principu pracují přístroje pro stanovení velikostní distribuce disperze nanočástic (např. metoda DLS).⁹

Povrchová plazmonová rezonance

Pro disperze nanočástic stříbra (ale i dalších nanočástic kovů) je charakteristické zabarvení díky existenci tzv. povrchového plasmonu – masivní absorpce světla (vzrůst o několik řádů) při určitých vlnových délkách. Existence tohoto jevu je výsledkem kolektivní oscilace elektronů vodivostního pásu nanočástic kovů s elektromagnetickým vlněním (světelným paprskem). Výsledkem toho je charakteristické žlutooranžové intenzivní zabarvení disperze nanočástic stříbra.^{4,13} Pro nanočástice stříbra (velikost kolem 20 nm) je charakteristická frekvence oscilačního pohybu elektronů s maximem v oblasti kolem 400 nm v absorpčních spektrech.¹⁴

1.2.2. Metody stanovení velikosti nanočástic

Základním problémem popisu vlastností nanočástic je stanovení velikosti částic disperze respektive stanovení velikostní distribuce disperze nanočástic.¹³ Ve většině případů připravených disperzí nanočástic se jedná o soustavy polydisperzní (disperze tvořená nanočásticemi o různé velikosti). Takovou soustavu se zastoupením částic s různou velikostí charakterizuje distribuční křivka, která je vyjádřením distribuční funkce – umožňuje rozdělení nanočástic do velikostních tříd.^{9,13}

Z hlediska metod můžeme rozdělit konkrétní postupy ke stanovení velikosti nanočástic na metody nepřímé (nemikroskopické metody) a metody přímé (mikroskopické metody).^{3,13}

Následující část práce pojednává o stěžejních metodách studia velikosti nanočástic.

1.2.2.1. Metody nepřímé (nemikroskopické metody)

Metoda dynamického rozptylu světla (DLS)

Stanovení distribuce velikosti disperze nanočástic metodou DLS (rovněž nazývaná jako foton korelační spektroskopie nebo kvazielastický rozptyl světla) je založeno na měření fluktuace intenzity rozptýleného laserového záření, okolo její průměrné hodnoty, od zkoumaného vzorku disperze nanočástic.^{3,10,15}

Fluktuace je způsobená interferenčním zesilováním a zeslabováním rozptýleného světla na nanočásticích disperze, které podléhají Brownovu pohybu (pozn.: částice polydisperzních systémů vykazují odlišné chování související s rozdílnou velikostí částic). Metoda pro stanovení velikosti nanočástic, přinášející s sebou řadu

výhod, je v současné době hojně užívaná, jak z důvodu časové nenáročnosti, pořizovací ceny, tak i zejména z hlediska reprodukovatelnosti výsledku.¹⁵

Hlavní nevýhodou mohou být určité nesrovnalosti ve výsledcích, které mohou souviset se solvatačním obalem nanočástic nebo s naadsorbovanou vrstvou na povrchu nanočástic (např. stabilizace želatinou). Získaná průměrná velikost nanočástic tak nemusí přímo korelovat s výsledky získanými například elektronovou mikroskopií (nahodnocení velkých nanočástic, frakce malých nanočástic se ztratí ve velké intenzitě záření rozptýleného na větších částicích apod.).¹³

1.2.2.2. Metody přímé (mikroskopické metody)

Mezi vhodné metody přímého studia velikosti a tvaru disperzí nanočástic patří elektronová mikroskopie, která k zobrazení předmětů využívá, na rozdíl od klasické světelné mikroskopie, svazek rychle letících elektronů. Vlnová délka tzv. de Broglieho vlny elektronů je díky urychlovacímu napětí mnohem menší než vlnová délka světla, tudíž i rozlišovací mez elektronového mikroskopu je až 1000x menší než u světelného mikroskopu.^{2,3}

V současné době existuje řada metod využívajících pro studium velmi malých objektů elektronový svazek, ale mezi základní metody studia nanočástic rozhodně patří transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a skenovací elektronová mikroskopie (SEM).

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Princip této techniky je založen na zobrazování a pozorování předmětů s nanorozměry pomocí svazku elektronů, které jimi procházejí.

První elektronový mikroskop TEM byl postaven v roce 1933 Ernstem Ruskou a jeho kolegy, kteří byli za svůj objev a přínos v oblasti fyziky oceněni Nobelovou cenou. Transmisní elektronový mikroskop je z hlediska stavby principiálně obdobný stavbě světelného mikroskopu. Zásadní rozdíl tkví v principu zobrazování proudem urychlených elektronů a k tomu musí být elektronový mikroskop uzpůsoben. Základním požadavkem je, aby vnitřní prostor mikroskopu, ve kterém se pohybují elektrony, byl vakuován z důvodu krátkého dosahu elektronového svazku ve vzduchu, zabránění ionizace vzduchu a kontaminace tubusu se vzorkem. Zdrojem urychlených elektronů je obvykle elektronová tryska (např. wolframová katoda, katoda z monokrystalu boridu lanthanu nebo tzv. uhlíkové nanotuby). Vzniklý svazek urychlených elektronů

je korigován a soustředěn k dopadu na pozorovaný vzorek pomocí elektromagnetických čoček (např. cívky, kondenzory). Po průchodu záření vzorkem následuje zvětšovací optická soustava tvořená opět elektromagnetickými čočkami a clonami, které promítají výsledný zvětšený obraz předmětu na detektor (např. fluorescenční stínítko). K záznamu obrazu se vedle fotomateriálu využívá speciálních CCD kamer. Obvyklé zvětšení běžných TEM mikroskopů je v rozmezí hodnot $10^2 - 10^6$ s rozlišením jednotek nm. ^{3,5}

Obdobně jako zobrazování světelným mikroskopem, nabízí i TEM mikroskop možnost zobrazovat ve světlém a tmavém poli. Například v případě, kdy je tloušťka vzorku menší, tak je výsledný obraz ve světlém poli málo kontrastní a využívá se tak obraz v tmavém poli. ⁵

Modifikací TEM je mikroskop s vysokým rozlišením (HRTEM), který vedle intenzity elektronového záření vyhodnocuje i fázi elektronového záření. Tímto typem mikroskopu je v současné době dosahováno rozlišení až 0,08 nm. Pomocí HRTEM je možné studovat např. krystalické vlastnosti nanostruktur, jako je uspořádání atomů a atomárních rovin nanočástic ^{3,5}

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronový mikroskop se používá především k zobrazení povrchu vzorku. K postupnému zobrazování (skenování) povrchu se využívá úzkého svazku elektronů, které mohou se vzorkem interagovat a uvolňovat další signály (např. informace o složení vzorku). Nespornou výhodou této metody je výsledná hloubka ostrosti obrazu na výstupu.

Z hlediska konstrukce se SEM mikroskop výrazně liší od TEM mikroskopu. Hlavním důvodem je to, že u SEM dochází k detekci signálů, které urychlený svazek elektronů uvolnil po dopadu na povrch preparátu. Na rozdíl od TEM je SEM mikroskop mimo jiné vybaven řadou dalších detektorů (např. detektor sekundárních odražených elektronů, detektor rentgenového záření apod.) a elektronikou na zesílení a zpracování signálů k tvorbě výsledného obrazu. Na konečnou kvalitu výsledného obrazu má vliv tzv. stigmátor (soustava cívek v objektivu), který koriguje astigmatismus elektromagnetických čoček. Rozlišovací mez SEM mikroskopu závisí především na tloušťce urychleného elektronového svazku. Při použití wolframové katody se rozlišovací mez pohybuje v rozmezí 10 – 15 nm. U výkonnějších SEM mikroskopů je dosahováno rozlišovací meze menší než 5 nm. ^{3,5}

1.2.3. Metody přípravy nanočástic stříbra

K přípravě nanočástic stříbra se používají obecně dva způsoby metod přípravy. Jedná se metody dispergační (top down) a metody kondenzační (bottom up). V případě dispergačních metod jde o přípravu nanočástic z látek makroskopické povahy za pomoci mechanických, či fyzikálně – chemických postupů. Naopak metody kondenzační využívají nejčastěji chemickou reakci k spojování atomů nebo molekul analytických disperzí za tvorby disperze nanočástic.⁹⁻¹¹

1.2.3.1. Metody dispergační

Dispergační metody jsou k přípravě nanočástic stříbra užívány zřídka. Praktický význam pro přípravu má například laserová ablace a elektrické rozprašování. **Laserová ablace** funguje na principu působení laserového paprsku na vhodný stříbrný makroskopický materiál (např. stříbrná fólie). **Elektrické rozprašování** využívá k dispergaci elektrického proudu. Princip metody je odtrhávání nanočástic stříbra vlivem elektrického oblouku mezi elektrodami – stříbrnými dráty.^{9,10}

1.2.3.2. Metody kondenzační

Kondenzační metody patří v současné době, jak z hlediska aplikovatelnosti, tak i variability mezi metody daleko četnější. Princip kondenzace je nejčastěji založen na chemické reakci analytických disperzí, kdy se z původně rozpustné sloučeniny stříbra vytvoří nanočástice stříbra v daném prostředí nerozpustné. Takovými roztokovými metodami lze poměrně snadno připravit nanočástice s charakteristickými nebo požadovanými vlastnostmi.⁹ V následující části budou popsány pouze dvě metody přípravy nanočástic stříbra, které byly pro experimentální část stěžejní.

Mezi dnes již klasické postupy přípravy nanočástic stříbra řadíme **borohydridovou metodu** spojenou se jmény objevitelů Albrechta, Blatchforda a Creightona. Metoda je založená na redukcí roztoku dusičnanu stříbrného (AgNO_3) borohydridem sodným (NaBH_4), jakožto silným redukčním činidlem, ve vodném prostředí. Takto připravená disperze nanočástic je poměrně stabilní. Velikost nanočástic se pohybuje v rozmezí od 5 do 20 nm a vzniklá disperze nanočástic stříbra vykazuje v absorpčním spektru maximum při vlnové délce okolo 400 nm.^{1,14,16}

Druhá metoda vychází z historického Tollensova postupu přípravy stříbrného zrcátka a důkazu redukujících cukrů – redukce diamminstříbrného komplexu

redukujícím cukrem, např. glukózou. **Modifikovaná Tollensova metoda** je vhodná z důvodu možnosti řízené přípravy nanočástic stříbra jak výběrem redukčního činidla (nejen redukující cukry), tak i koncentrací výchozích látek pro studium vlivu velikosti nanočástic stříbra na jejich vlastnosti. Vhodnými úpravami koncentrací reakčních složek lze připravit částice s velikostí od 25 do 400 nm. Při užití tetrahydridoboritanu sodného, jako silného redukčního činidla lze připravit velmi malé nanočástice stříbra s velikostí od 3 do 12 nm.^{1,14}

Primárně připravené vodné disperze nanočástic roztokovými, kondenzačními metodami nejsou příliš vhodné pro praktické aplikace z důvodu agregační nestability. K zabránění agregace a zvýšení stability disperze nanočástic stříbra lze použít řadu látek, jako jsou povrchově aktivní látky, přírodní polymery, syntetické polymery aj. Vysokou schopnost stabilizace z řad přírodních polymerů vykazují například želatina.¹

Nanočástice stříbra připravené modifikovanou Tollensovou metodou s přidavkem želatiny ještě před samotným redukčním činidlem vykazují dlouhodobou stabilitu proti agregaci a zvýšenou antibakteriální aktivitu, která je v korelaci s velikostí připravených nanočástic stříbra. Velikost nanočástic při použití tetrahydridoboritanu sodného jako redukčního činidla činí zhruba 5 nm.^{14,17}

Problematika zabývající se přípravou a způsoby modifikace nanočástic stříbra je stále otevřeným tématem. Jedním z mnoha cílů výzkumu je zvládnout přípravu nanočástic stříbra tzv. „na míru“, aby bylo možné připravit nanočástice stříbra s jasně definovanými rozměry, morfologií a vhodnými parametry za účelem dané aplikace.¹⁸

1.2.4. Biologická aktivita nanočástic stříbra

Antimikrobiální aktivita sloučenin stříbra, ale i stříbra samotného je známá již dlouhou dobu. První dochované zmínky o užívání stříbrných nádob nebo mincí vhozených do hliněných nádob ke konzervaci vody a dalších tekutin sahají do dob starověkého Řecka a Říma. Další dochované zmínky pocházejí ze středověku, kdy se práškové stříbro užívalo jako přísada do jídel, která měla zabránit rozvoji různých nemocí. Nadměrným užíváním této formy elementárního stříbra vzniká tzv. argyrie – otrava stříbrem s charakteristickými symptomy, jako je šednutí kůže, sliznic a většinou nenávratná depozice stříbra v důležitých orgánech (játra, ledviny apod.).¹⁹

S rozvojem koloidní chemie v průběhu devatenáctého, zvláště pak dvacátého století, vzbudila připravená koloidní disperze stříbra zájem zejména v mikrobiologických oborech a medicíně. Pokles zájmu studia biologické aktivity a praktického využití koloidního stříbra byl způsoben objevem antibiotik, která se dostala do vedoucí pozice v boji proti bakteriím a infekčním nemocem.¹⁹

Velmi diskutovaným problémem, který je spojen s nadměrným užíváním antibiotik, je vznik rezistence bakterií na tato antibiotika. V současné době tak zaznamenáváme obnovený zájem o baktericidní účinky koloidní disperze stříbra, v užším slova smyslu nanočástic stříbra, které přinášejí naději v boji s rostoucí rezistencí vůči antibiotikům. Vědecký výzkum zabývající se biologickou aktivitou nanočástic stříbra je nadějný zejména z toho důvodu, že zatím nebyla zaznamenána rezistence bakterií vůči nanočásticím stříbra z důvodu specifických mechanismů působení, které jsou především dány malými rozměry nanočástic a velkým povrchem.
1,19

Moronese et al. (2005) studovali baktericidní efekt nanočástic stříbra a zjistili, že baktericidní vlastnosti nanočástic jsou závislé na velikosti nanočástic stříbra (přibližně 1 – 10 nm), které přímo interagují s bakteriemi. V této práci testovali čtyři typy gram-negativních bakterií: *E. coli*, *V. cholera*, *P. aeruginosa* a *S. typhus*. Vliv koncentrace nanočástic stříbra na růst bakterií se lišil druh od druhu, ale při koncentraci nad 75 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nebyl zaznamenán růst žádného z testovaných druhů bakterií. Pomocí elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že pravděpodobný mechanismus účinku nanočástic stříbra na růst bakterií je dán interakcí s buněčnou stěnou a proniknutím nanočástic dovnitř buňky, kde mimo jiné reagují s SH - skupinami proteinů a sloučeninami obsahující fosfor (např. DNA). Vlivem těchto změn dochází k zastavení proteosyntézy, dýchacího řetězce, buněčného dělení a dochází k tzv. apoptóze – programované buněčné smrti.²⁰

Obdobně i Panáček et al. (2006), kteří studovali syntézu, charakterizaci a antibakteriální aktivitu nanočástic stříbra. Nanočástice stříbra byly připravené modifikovanou Tollensovou metodou, kdy k redukci diamminstříbrného komplexu se jako nejvhodnější jevila maltóza se vznikajícími nanočásticemi o přibližné velikosti 25 nm a největší antibakteriální aktivitou. Antibakteriální aktivita byla studována na gram-pozitivních a gram-negativních bakteriích, zahrnující i vysoce multirezistentní druh bakterií jako je methicillin – rezistentní *Staphylococcus aureus*. Byla prokázána závislost antibakteriální aktivity nanočástic stříbra na jejich velikosti. Vysoká

antibakteriální aktivita byla patrná i při celkové koncentraci stříbra kolem $2 \mu\text{g ml}^{-1}$.²¹

Dále byl na tomto poli studován vliv surfaktantů (povrchově aktivních látek) a polymeru na stabilitu a antibakteriální aktivitu nanočástic stříbra, kdy zejména při použití SDS (dodecylsíranu sodného) – anionického surfaktantu, byl zaznamenán největší vliv povrchové modifikace na antibakteriální aktivitu připravených nanočástic stříbra. Takto stabilizované nanočástice, jak bylo pozorováno zvláště u gram-pozitivních bakterií, mají větší schopnost pronikat nebo narušovat jejich buněčnou stěnu. Získané výsledky stabilizovaných nanočástic pomocí SDS jsou srovnatelné s působením iontového stříbra, testovaného jako referenční vzorek.²²

Vedle jednoduchých prokaryotických organismů byla studována i toxicita nanočástic stříbra vůči jednobuněčnému eukaryotickému organismu *Paramecium caudatum*. Dosažené výsledky demonstrují fakt, že nanočástice stříbra o koncentraci pod 25 mg.l^{-1} nemají toxický účinek, zatímco iontové stříbro si zachovává toxicitu ještě při koncentraci $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ a způsobuje okamžitou smrt organismu. V této práci byla toxicita testovaného organismu vyjádřena pomocí LT_{50} (čas od přidání nanočástic stříbra do vzorku do doby, kdy dochází k úhynu 50% testovaných organismů). Dále bylo zjištěno, že připravená disperze nanočástic o koncentraci 108 mg.l^{-1} , která sloužila i k testování antibakteriální aktivity u bakterií v předchozích studiích, měla nižší efekt na eukaryontní organismus *Paramecium caudatum* než jak tomu bylo v případě testovaných bakterií. Navíc byla toxicita připravené disperze nanočástic stříbra hodnocena pomocí koncentrace, která vedla k úhynu 50% testovaných organismů po 1 hodině kontaktu s disperzí nanočástic stříbra (1h LC_{50}). Hodnota 1h LC_{50} , představující klíčový parametr ke kvantifikaci environmentální toxicity nanočástic stříbra, činí 39 mg.l^{-1} . Vedle nemodifikovaných byla testována toxicita i modifikovaných nanočástic stříbra proti organismu *Paramecium caudatum*. Výsledkem této studie je zvýšení toxicity nanočástic stříbra vlivem modifikace zejména neionickým surfaktantem Tween 80, kdy došlo k snížení hodnoty 1h LC_{50} z 39 mg.l^{-1} na 16 mg.l^{-1} .²³

Rovněž byly provedeny studie, které vedle antibakteriální aktivity a toxicity zkoumaly fungistickou aktivitu nanočástic stříbra vůči patogenním plísním *Candida* spp. Nanočástice stříbra připravené, jako v předchozích případech, modifikovanou Tollensovou metodou vykazovaly inhibiční efekt vůči testovaným kvasinkám rodu *Candida* při koncentraci stříbra nejméně $0,21 \text{ mg.l}^{-1}$. Inhibiční efekt byl zvýšen vlivem stabilizace nanočástic stříbra pomocí dodecylsíranu sodného (SDS), kdy minimální

inhibiční koncentrace (MIC) činila 0,05 mg.l⁻¹. Současně se studiem fungistatické aktivity byla provedena i studie zabývající se fungicidní aktivitou (MFC) vůči testovaným kvasinkám rodu *Candida*. Získaná hodnota MFC je vyšší ve srovnání s hodnotami MIC. Nanočástice stříbra zabily všechny testované kvasinky při koncentraci 27mg.l⁻¹. Referenční hodnota MFC iontového stříbra činila 13,5 mg.l⁻¹. Stabilizované nanočástice stříbra vykazují vyšší fungistatickou aktivitu, která je výsledkem vyšší agregátní stability. Navíc surfaktanty (např. SDS) narušují buněčnou stěnu kvasinek, čímž se zvyšuje její senzitivita k nanočásticím stříbra.²⁴

Podle Hwanga et. al (2012) nanočástice stříbra zvyšují antifungální efekt tím, že indukují apoptózu buněk kvasinek *Candida albicans* vlivem zvýšení hydroxylových radikálů. Buňky kvasinek vystavené nanočásticím stříbra vykazují zvýšenou produkci těchto reaktivních oxidujících radikálů (ROS), které se akumulují v mitochondriích a iniciují jejich fragmentaci, což má za následek spuštění programované buněčné smrti, neboli apoptózy.²⁵

Zatímco existuje mnoho studií zabývajících se antibakteriální aktivitou nanočástic stříbra, tak studií zkoumajících vliv nanočástic stříbra na kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je velmi málo. V roce 2012 a 2013 byly zveřejněny články zabývající se vlivem nanočástic stříbra na eukaryotní buňky kvasinek rodu *Saccharomyces*. Syntéza nanočástic stříbra proběhla přímo v růstovém médiu s kvasinkovými buňkami, redukcí dusičnanu stříbrného tetrahydridoboritanem sodným. Hodnota MIC činila 48,51 µg.ml⁻¹ a hodnota MKC (minimum killing concentration) činila 70,07 µg.ml⁻¹. Dále bylo zjištěno, že růst kvasinkových buněk v přítomnosti nanočástic stříbra vykazuje signifikantní změny zejména v rychlosti růstu a generační doby. Zatímco buňky rostoucí bez přítomnosti nanočástic stříbra vykazují neporušenou buněčnou stěnu a homogenní distribuci chromatinu, tak buňky rostoucí v přítomnosti nanočástic stříbra vykazují deformace buněčné stěny. Navíc byly objeveny tmavé skvrny, které indikují depozici a penetraci nanočástic na vnější membráně buňky, ale i uvnitř buněk. Dále byly zaznamenány změny intracelulárních metabolitů (např. celkové množství proteinů a volných aminokyselin.), u kterých došlo, v přítomnosti vyšší koncentrace nanočástic stříbra, ke snížení. Současné studie, které se zabývají vlivem nanočástic stříbra na genové úrovni buněk naznačují, že nanočástice stříbra mohou indukovat odlišnou genovou expresi klíčových genů, které jsou zodpovědné za celou řadu buněčných pochodů.^{26,27}

1.3. Organismus *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou lidstvem využívány již tisíce let. První doklady o využívání kvasinek při zkvašování pšeničných nápojů a pečení chleba sahají do roku 6000 př. n. l. – do doby tzv. neolitu. Na objasnění záhady, kdo může za změny chuťových vlastností pšeničného nápoje a růst těsta v dížích se muselo počkat tisíce let. Zvrat přišel s objevem mikroskopu v 17. století biologem A. van Leeuwenhoekem, který jako první pozoroval malé kuličky v suspenzi piva. Louis Pasteur v roce 1857 objevil, že kvašení způsobují živé organismy a rovněž dokázal, že mohou žít jak v anaerobních, tak i v aerobních podmínkách. Přejít z anaerobního metabolismu na aerobní a snížení spotřeby sacharidů nazýváme Pasteurův efekt.^{28,29,30}

1.3.1. Systém a klasifikace

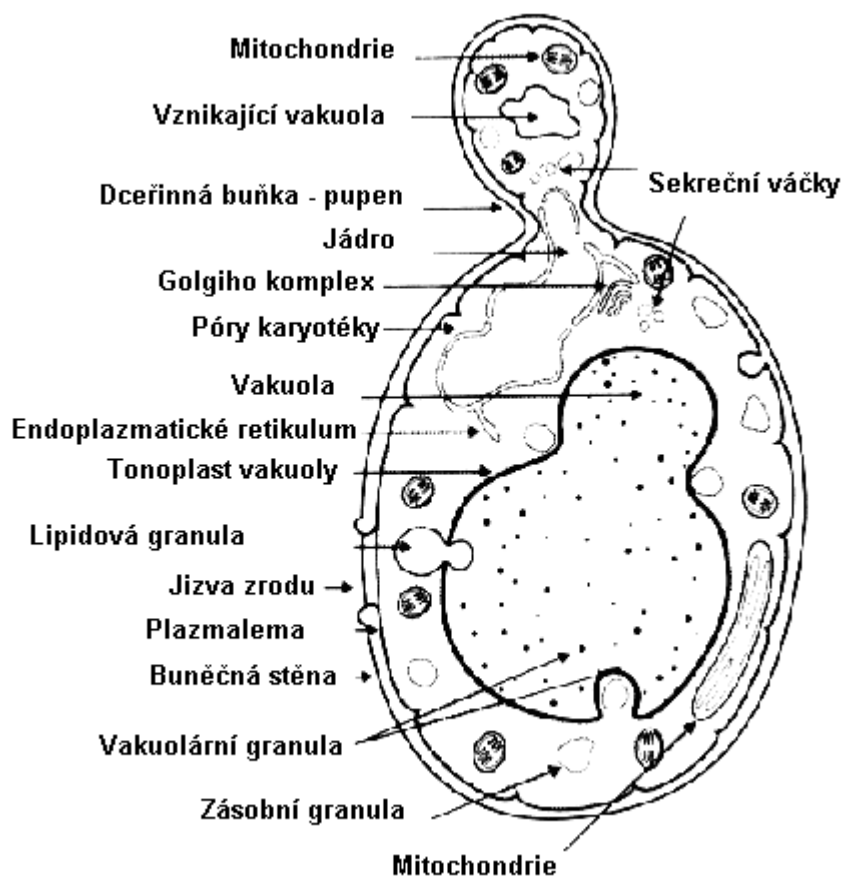
Kvasinky rodu *Saccharomyces* patří mezi jednobuněčné eukaryotní a z hlediska výživy heterotrofní mikroorganismy, které řadíme do říše hub (Fungi).^{28,31} Název organismu vychází z latinských výrazů *Saccharo* – cukr a *Myces* – houba.³⁰ Český název je odvozen od schopnosti většiny druhů kvasinek zkvašovat jednoduché, ale i složitější cukry na ethanol a oxid uhličitý.

Kvasinky řadíme do impéria Eukaryota – vykazující charakteristické rysy eukaryotické buňky, říše hub (Fungi) a podle způsobu pohlavního rozmnožování do oddělení Ascomycota (vřeckaté, vřeckovýtrusné houby). Další systém a klasifikace prochází mohutnými změnami díky novým poznatkům oboru molekulární buněčné biologie. Vyjdeme – li z tradičního, zjednodušeného systému, řadíme kvasinky do třídy *Saccharomycetes*, řádu *Saccharomycetales* (kvasinkotvaré, „pravé“ kvasinky), čeledě *Saccharomycetaceae* a rodu *Saccharomyces*.^{29,32,33}

1.3.2. Cytologie

Kvasinka rodu *Saccharomyces* je eukaryotní organismus a je tvořena jedinou buňkou. Jedná se o vícefázový systém, ve kterém membrány ohraničují jednotlivé buněčné orgány (kompartmenty). Tvar buněk souvisí se způsobem rozmnožování, které se děje pučením nebo dělením. Nejčastěji má však tvar elipsoidní, vejčitý

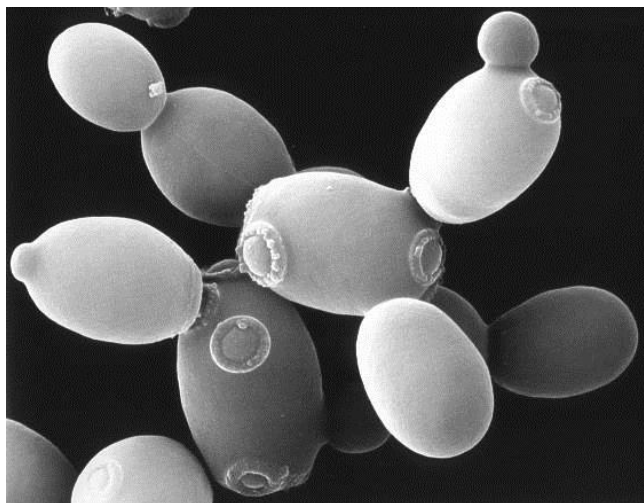
až kulovitý. Velikost buňky kvasinky se pohybuje od 6 μm do 8 μm . Velikost je klíčová k determinaci stáří organismu.



Obr. 1: Schéma eukaryotické buňky kvasinky. ³⁴ (upraveno)

Kvasinková buňka je tvořená silnou a pevnou **buněčnou stěnou**, jejíž funkcí je zejména opora buňky a ochrana před mechanickými vlivy, osmotickými vlivy a vlivy vnějšího prostředí. Stěna je prostoupena póry, kterými mohou volně difundovat všechny sloučeniny s výjimkou látek vysokomolekulární povahy, jako polysacharidy, bílkoviny aj. S vývojem elektronové mikroskopické techniky bylo zjištěno, že je buněčná stěna tvořená třemi vrstvami, lišící se chemickým složením. Hlavní složkou buněčné stěny jsou polysacharidy, mající vláknitou strukturu, která vytváří hustou a pevnou spleť. Spleť je z velké části vyplněná proteiny a je zde i menší zastoupení lipidů, fosfolipidů a fosforečnanů, které jsou na polysacharidy vázány fosfodiesterovými vazbami. Fosfátové zbytky spolu s karboxylovými skupinami bílkovin dávají buňkám kvasinek záporný náboj, který značně ovlivňuje adsorpci látek z živného prostředí. Mezi hlavní složky stěnových polysacharidů kvasinek patří glukany, mannany a malé množství

glukosaminu a chitinu. Složení jednotlivých vrstev je proměnlivé. Příkladem může být složení vnější vrstvy při spodním kvašení, kdy dochází k výraznému stoupaní obsahu bílkovin oproti mannanům, čímž dochází k flokulaci kvasinek a rychlé sedimentaci. Povrch buněčné stěny nemá jednotnou strukturu, ale je možné pozorovat vyvýšené prstence – jizvy po pučení (jizvy zrodu), jejíž počet slouží k determinaci stáří buňky. Rod *Saccharomyces* pučí na pólech buňky (bipolární pučení).



Obr. 2: Znárodnění pučících kvasinek – snímek z elektronového mikroskopu. ³⁵

Cytoplazmatická membrána (plazmatická m., plazmalema) je poměrně tenká a její tloušťka se pohybuje od 8 nm do 10 nm. Rovněž je tvořená lipidy a proteiny a vytváří řadu vychlípenin dovnitř buňky. Ve fázi buněčného růstu se z vychlípenin odštěpují měchýřky a tubuly. Jev spojený s odštěpováním měchýřků do cytoplazmy nebo ven z těla buňky se souhrnně nazývá pinocytóza. Mezi nejdůležitější funkce tak patří transport látek do buňky - fagocytóza a z těla buňky - exocytóza. Navíc je plazmalema propustná pro malé molekuly bez náboje a tvoří tak osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím. Plazmalema je i místem, kde se odehrává biosyntéza některých komponentů buněčné stěny. **Cytoplazma** mladých buněk kvasinek obsahuje vedle buněčných organel i systém dvojitých membrán – **endoplazmatické retikulum (ER)**. ER vytváří cisterny, lamely a tubuly, obsahující enzymy a zásobní látky. Vnitřní povrch membrány je hladký, zatímco vnější povrch je drsný z důvodu výskytu četných agregátů ribozomů. Jejich hlavní funkcí je syntéza bílkovin. Dále jsou v cytoplazmě přítomny

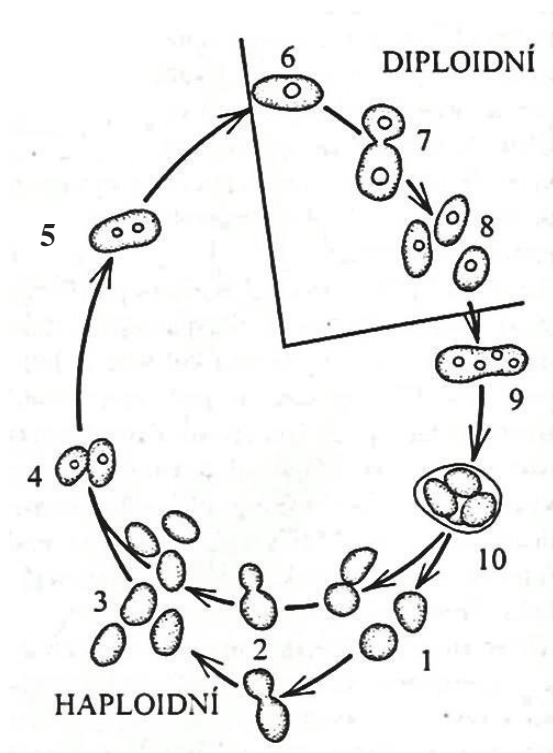
malé tělíska rozličné velikosti a rozmanitého tvaru – **mitochondrie**. Tyto organely jsou rovněž obklopeny dvěma membránami. Vnější membrána má bradavčitý charakter a vnitřní membrána tvoří vchlípeniny dovnitř mitochondrie. Vnitřní vchlípeniny se nazývají kristy. Vedle bílkovin, lipidů a fosfolipidů obsahují i RNA a malé množství DNA, která je nositelem mimojaderné dědičnosti, kdy podle moderní endosymbiotické teorie je původ mitochondrií bakteriální. Hlavní funkcí mitochondrií je respirace – buněčné dýchání a oxidativní fosforylace spojená s tvorbou energie ve formě ATP. Vedle výše popsaných funkcí je mitochondrie místem proteosyntézy, která v mnoha ohledech připomíná mechanismus syntézy bílkovin u bakterií. K nejnápadnějším složkám cytoplazmy kvasinek patří **vakuola**. Jedná se o kulovitý útvar, který je obklopený jednoduchou membránou - tonoplastem. Pro mladé nebo pučící buňky kvasinek je charakteristický výskyt většího počtu vakuol, zatímco starší buňky obsahují pouze jedinou vakuolu, která vyplňuje téměř celý prostor buňky. Uvnitř vakuoly se nachází velké množství hydrolytických enzymů, jako jsou proteinasy, ribonukleasy a esterasy, takže plní podobnou funkci jako lysozomy – rozklad nefunkčních organel, enzymů apod. Vakuola plní rovněž zásobní funkci. Uvnitř vakuoly nalezneme velké množství aminokyselin, deriváty purinů a rezervní zásobu meziproductů metabolismu. Mimo výše popsané organely ještě nalezneme **Golgiho aparát** – komplex zploštělých cisteren, kde dochází k uvolňování měchýřků - vezikulů. Předpokládá se, že hlavní funkcí je transport stavebních látek (prekurzorů) buněčné stěny přes cytoplazmatickou membránu. **Jádro** (nukleus) je kulatá až laločnatá organela, která je od cytoplazmy oddělena dvojitou jadernou membránou – karyotékou s velkými póry. Stupeň komunikace mezi jádrem a cytoplazmou závisí na fyziologické aktivitě buňky. Pomocí výsledků genetických studií bylo zjištěno, že se v haploidním jádře nachází 16 chromozomů. Mimo to se v jádře nachází krátký úsek DNA (2 μm), který má kruhovou strukturu a je obdobný plazmidům u bakterií. Tento plazmid se v diploidním jádře nachází v několika kopiích a našel využití v genovém inženýrství. V prostoru jádra nalezneme i **jadérko**, které lze barvit některými barvicími technikami.

28,31

1.3.3. Rozmnožování

Většina rodů kvasinek, tak i *Saccharomyces cerevisiae* se rozmnožuje **nepohlavně – pučením**. Při pučení vzniká malá dceřiná buňka, která je spojená

s buňkou mateřskou pomocí kanálku. Dceřiná buňka – pupen se neustále zvětšuje, dochází k mitotickému dělení jádra, redistribuci mitochondrií a drobných vakuol. Rozdělení jádra mateřské buňky vede k částečnému přechodu dalších složek cytoplazmy do nově vznikající kvasinkové buňky. Pučení je ukončeno uzavřením kanálku mezi oběma buňkami, nárůstem velikosti dceřiné buňky a spojením drobných vakuol do jedné jediné. V případě kvasinky rodu *Saccharomyces* dochází k bipolárnímu pučení vedoucí k tvorbě dvou nových kvasinkových buněk. Celý cyklus buněčného dělení až po oddělení nové buňky trvá za optimálních podmínek přibližně dvě hodiny. Vedle nepohlavního, dominujícího typu rozmnožování existuje i **pohlavní rozmnožování** a to nejčastěji **somatogamie**, při které dochází k splynutí dvou haploidních buněk za vzniku zygoty. Po splynutí buněk dochází i k spájení jejich jader – karyogamii za vzniku diploidního jádra. Redukčním dělením – meiózou a následně mitózou diploidního jádra zygoty vznikají většinou 4 pohlavní askospory uložené ve vřecku.^{28,29}



(Vysvětlivky: 1 – askospory, 2 – pučení; 3 – nově vzniklé haploidní buňky, 4 – kopulace, 5 – plazmogamie, karyogamie, 6 – zygota s diploidním jádrem, 7 – pučení, 8 – diploidní somatické buňky, 9 – mladé vřecko po meióze, 10 – zralé vřecko se čtyřmi askosporami)

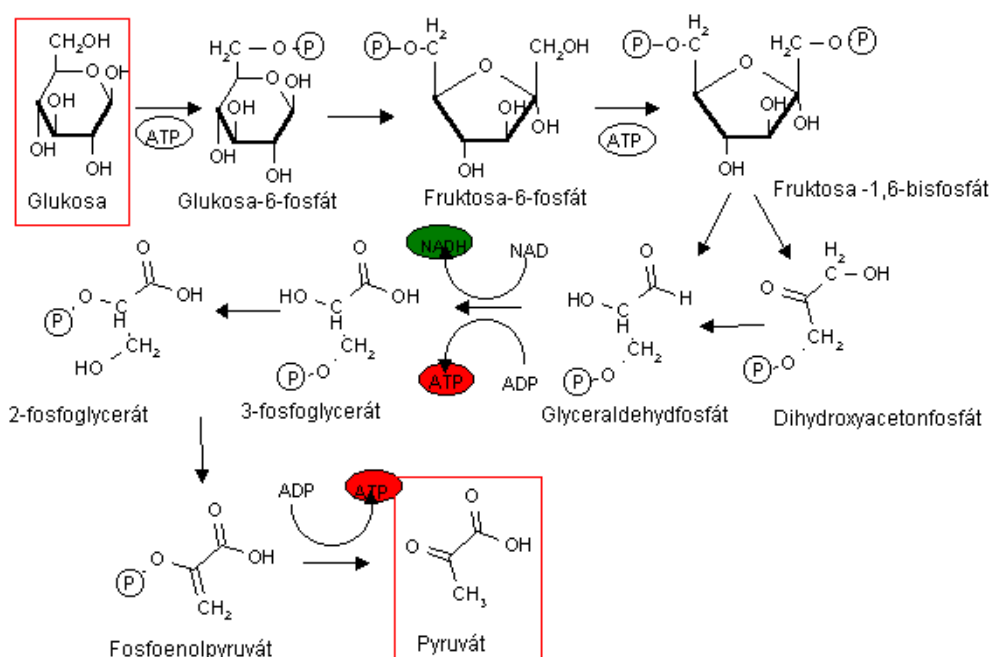
Obr. 3: Životní cyklus kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.²⁹ (upraveno)

1.3.4. Fyziologie

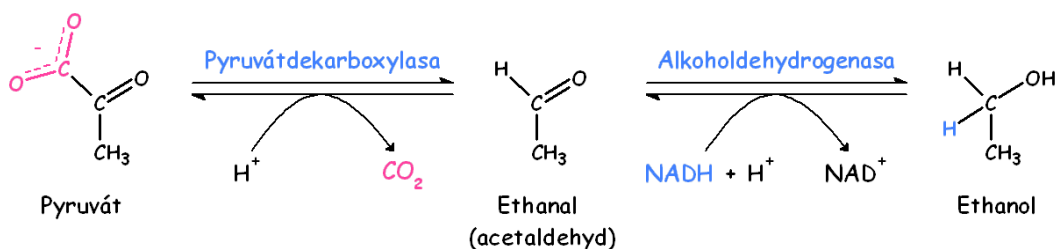
V kvasinkách, ale i ostatních živých organismech probíhá neustálá přeměna látek, která souvisí se získáváním energie a stavebních látek. Tyto základní „kameny“ mají nepostradatelnou roli pro správnou funkci a existenci buňky vůbec. Intenzita přeměny látek – metabolismus je u mikroorganismů silně ovlivněn vnějšími podmínkami: množství živin, pH prostředí, teplota a jiné. Metabolismus kvasinek se obdobně jako u vyšších organismů rozděluje na katabolismus (rozkladné procesy – získ energie a stavebních molekul) a anabolismus (biosyntetické procesy). Z hlediska nároků na kyslík řadíme kvasinky rodu *Saccharomyces* mezi fakultativní anaeroby s převahou fermentativního metabolismu. Schopnost přecházet z aerobního metabolismu na anaerobní souvisí s vnějšími podmínkami a obsahem sacharidů v živném médiu. Snížení spotřeby sacharidů vlivem přechodu na aerobní metabolismus se nazývá Pasteurův efekt. Louis Pasteur zjistil, že v přítomnosti kyslíku dochází u kvasinek k potlačení kvašení. Růst kvasinkových buněk je tudíž rychlejší v aerobních podmínkách z důvodu účinnější přeměny substrátu v energii než metabolismus anaerobní.^{28,31,36}

V této práci se budeme zabývat pouze těmi katabolickými procesy, které jsou nezbytné pro řešenou problematiku v praktické části práce. Základním anaerobním katabolickým procesem je **glykolýza** (Embden – Meyerhof – Parnasova dráha). Její část byla objevena v roce 1897 Hansem a Eduardem Buchnerovými, kteří objasnili enzymovou fermentaci sacharózy na ethanol v bezbuněčném extraktu kvasinek. Glykolýza byla plně objasněna až v roce 1940 a je společná jak pro prokaryontní, tak i eukaryontní organismy. Glykolýzou rozumíme sled několika enzymaticky řízených reakcí, které spočívají v přeměně hexózy na pyruvát a ATP. V první fázi glykolýzy dochází k aktivaci glukózy pomocí fosforylace až na fruktosa – 1,6 – bisfosfát. Tato molekula je dále převedena na dva vzájemně převoditelné triosafosfáty – dihydroxyacetonfosfát a glyceraldehyd – 3 – fosfát. Oxidací těchto tříuhlíkatých fragmentů se tvoří energie ve formě ATP. Navíc je oxidace obou trióz spřažená s redukcí oxidované formy koenzymu NAD^+ na NADH a H^+ . Výsledkem oxidace je fosfoenolpyruvát, který je stabilizován enol – keto tautomerií za odštěpením fosfátu a vzniku produktu glykolýzy - pyruvátu. Z hlediska energetické bilance je čistý zisk při odbourání jedné molekuly glukózy pouze 2 ATP.

Pyruvát je dále za anaerobních podmínek metabolizován u různých mikroorganismů různě. Cílem jeho přeměny je vždy současná reoxidace redukované formy koenzymu NADH na NAD^+ . U kvasinek rodu *Saccharomyces* navazuje na glykolýzu **alkoholová fermentace (ethanolové kvašení)**, kdy dochází nejprve k dekarboxylaci pyruvátu za tvorby acetaldehydu a CO_2 a poté k redukcí acetaldehydu za tvorby *ethanolu*. Redukce je rovněž spřažena s oxidací koenzymu NADH.^{28, 36-39}



Obr. 4: Anaerobní glykolýza – zjednodušené schéma.³⁸ (upraveno)



Obr. 5: Alkoholová fermentace – zjednodušené schéma.³⁹

Vedle alkoholové fermentace je možné pyruvát metabolizovat i dalšími drahami. U řady organismů (včetně člověka) existuje **laktátová fermentace**, která je lokalizována ve svalových buňkách. Dojde – li k situaci, kdy je v buňkách svalů

nedostatek kyslíku, dochází k přeměně pyruvátu na laktát, který u člověka způsobuje známou bolestivost svalů. Dále je možné pyruvát metabolizovat aerobně v **citrátovém cyklu**, který řadíme mezi nejdůležitější aerobní katabolický proces vůbec. Pyruvát je transportován z cytosolu buňky do matrix mitochondrie, kde dochází k syntéze acetylkoenzymu A na pyruvátdehydrogenasovém komplexu enzymů. Vzniklý acetylkoenzym A je dále oxidován sledem osmi důmyslných reakcí citrátového cyklu na CO₂, ATP a volnou energii, která je uložena do redukovaných koenzymů NADH a FADH₂. Redukované koenzymy jsou dále oxidovány v **dýchacím řetězci** za tvorby ATP. Mechanismus vzniku ATP je vysvětlován tzv. chemiosmotickou hypotézou. Zjednodušeně, vzniklé protony H⁺ jsou pumpovány z vnitřní mitochondriální matrix do vnějšího mezimembránového prostoru za tvorby elektrochemického gradientu. Vnější prostor se tudíž okyseluje. Gradient protonů je využíván proteinem ATP synthasou (ATPasa), kdy při transportu protonů zpět do matrix vzniká energie pro syntézu ATP.

U kvasinek dochází k zajímavému jevu, který se nazývá Crabtreeho efekt. Je – li v médiu přítomný cukr v dostatečně vysoké koncentraci, tak dochází přednostně k anaerobní alkoholové fermentaci a to i za cenu zisku menšího množství energie. Naopak při poklesu koncentrace cukru v médiu pod určitou hladinu dochází k indukci enzymů citrátového cyklu a elektronových přenašečů dýchacího řetězce, které jsou nezbytné pro aerobní metabolismus sacharidů.^{28,31,36}

1.3.5. Vitalita a viabilita

Pro vyjádření kvality kvasinek v závislosti na okolním prostředí, zejména v pivovarské praxi, se ke kontrole a popisu užívá dvou termínů - vitalita a viabilita. Viabilitou se u kvasinkových buněk rozumí reprodukční schopnost, schopnost růst a rovněž udává poměrné zastoupení živých buněk v kultuře vůči mrtvým. Vitalita – životaschopnost, hovoří o fyziologickém stavu dané populace, metabolických kompetencích v souvislosti se stářím buněk nebo při působení vnějších stresových faktorů.⁴⁰⁻⁴²

Pro měření obou vlastností kvasinek existuje řada metod, které jsou různě spolehlivé, mohou být zatíženy chybou nebo vyžadují pestré užití přístrojů laboratoře. Cílem této práce je studium vlivu nanočástic stříbra na vitalitu kvasinkových buněk. Vliv nanočástic stříbra na vitalitu buněk byl nepřímě stanoven z množství metabolicky

vyprodukovaného ethanolu pomocí chromatografu GC/FID v závislosti na množství přidané disperze nanočástic stříbra.

1.3.6. Význam a použití

Modelový organismus *Saccharomyces cerevisiae* patří mezi nejvýznamnější a nejprostudovanější rod kvasinek třídy *Saccharomycetes*. Jeho význam a uplatnění nalezneme zejména v odvětvích potravinářského průmyslu. Nezastupitelnou roli hraje v odvětvích kvasného průmyslu (spodní a svrchní kvašení při výrobě piva, výroba vína, lihu, saké aj.) a droždářského průmyslu (výroba pekařského droždí, krmného droždí aj.) Jednoduchá struktura eukaryotické buňky a snadno „čitelný“ genom zajistil kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae* výsostnou roli modelového organismu v molekulární biologii, mikrobiologii, genetice a biochemii. Příkladem využití mohou být geneticky modifikované buňky kvasinek pro získání řady chemikálií (enzymů, koenzymů, nukleotidů, nukleosidů aj.). Mimo to existují i speciálně vyšlechtěné kmeny vyrábějící ergosterol – provitamin D, který je následně z buněk izolován. ^{28-31,40}

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Chemikálie

V experimentální části byly pro přípravu nanočástic stříbra a jejich stabilizaci použity následující chemikálie:

- dusičnan stříbrný (p. a., Sigma-Aldrich)
- amoniak (p. a. vodný roztok, min 25% (v/v), Sigma-Aldrich)
- hydroxid sodný (p. a., Lach-Ner)
- tetrahydridoboritan sodný (p. a., Sigma-Aldrich)
- želatina (p. a., Loba Feinchemie)

Pro přípravu živného média pro kvasinkovou kulturu rodu *Saccharomyces cerevisiae* byly použity tyto chemikálie:

- D (+) – glukosa, bezvodá (p. a. Lach-Ner)
- VINKA, živná sůl pro kvasinky (FRUTANA s.r.o.)

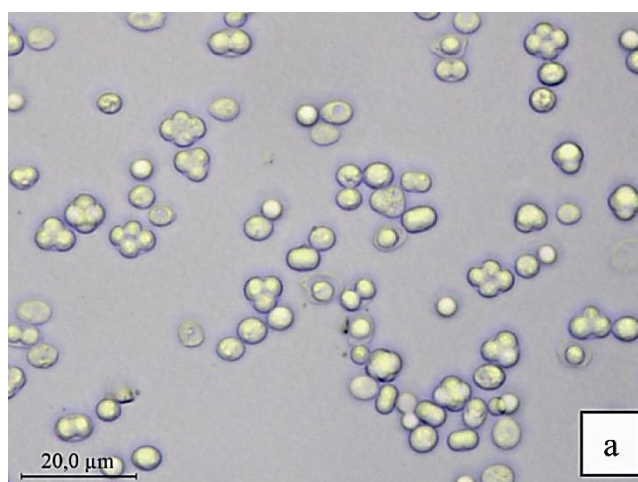
Během experimentální činnosti byly dále použity tyto chemikálie:

- Demineralizovaná voda vyrobená přístrojem Aqual 29 (MERCY, čistota $0,05 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
- Ethanol absolutní (pro UV spektroskopii; 99,8 %; Penta)
- Kyselina dusičná (p. a., min 65 %, Lach-Ner), ředěná v poměru 1:1 s demineralizovanou vodou)

2.2. Biologický materiál

Vliv nanočástic stříbra a jeho toxicita byla studována na jednobuněčných kvasinkových organismech *Saccharomyces cerevisiae* (obr. 6) z oddělení vřeckovýtrusných hub – Ascomycota.

Ve všech experimentech bylo použito sušené droždí SAF INSTANT (10 g; > 98,5 %), obsahující čistou kmenovou kulturu *Saccharomyces cerevisiae* (obr. 7)



Obr. 6: Kmenová kultura kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* ⁴³

Výrobek	Droždí sušené Saf Instant 10 g
Složení	Kmenová kultura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> >98,5% emulgátor: sorbitan monostearat (E491)<1,5%
Barva	Béžově krémová
Struktura	Sypký granulát
Vůně	Charakteristická pro pekařské droždí
EAN kód	30023376
Balící materiál	Droždí v 10 g sáčcích je baleno v ochranné atmosféře. Balící materiál je schválen pro balení potravin.
Sklad. podmínky	do 25 °C v suchu a chladu
Doba trvanlivosti	Vyznačena na obalu každého sáčku. Doba trvanlivosti je 18 měsíců ode dne balení.

Obr. 7: Specifikační list sušeného droždí SAF INSTANT ⁴⁴

2.3. Přístrojové vybavení

Měření velikosti nanočástic stříbra bylo provedeno na přístroji Zeta Potential Analyzer Zeta Plus (Brookhaven Instruments Corporation, USA) pracující na principu DLS (dynamický rozptyl světla). Tento přístroj umí změřit velikost částic v rozsahu 2 nm až 2 μ m, zeta potenciál, polydisperzitu a poskytuje informaci o velikostní distribuci jednotlivých částic.¹⁵

Měření absorbance připravených nanočástic stříbra bylo vyhodnoceno spektrofotometrem Specord S600 (Analytic Jena, Německo). Výsledkem měření, v případě správné přípravy, byla charakteristická UV-VIS spektra s absorpčním maximem okolo 400 nm.

Koncentrace připravené disperze nanočástic stříbra byla zjištěna pomocí atomové absorpční spektrometrie na přístroji ContrAA 300 (Analytic Jena, Německo).

Vliv rostoucího množství přidané disperze nanočástic stříbra na množství vyprodukovaného ethanolu kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* byl určen pomocí plynového chromatografu GC 6820 (Agilent Technologies), který je vybaven 2 detektory: FID (plamenový ionizační detektor) a ETC (detektor elektronového zachytu). Při experimentální práci bylo použito rozhraní GC – FID, z důvodu rychlé separace při analýze sloučenin, v našem případě ethanolu, který lze odpařit bez známek dekompozice.^{1,14,16,17}

Pro další práci spojenou s přípravou nanočástic stříbra byly použity analytické váhy (AND, Japonsko) a elektromagnetické míchadlo s možností ohřevu (Heidolph, Německo). Potřebná sterilizace chemického nádobí a příslušenství pro zabránění růstu nežádoucích mikroorganismů v kultivačním médiu, ve snaze o větší reprodukovatelnost výsledků, byla prováděna v sušárně při teplotě 150 °C po dobu půl hodiny.

2.4. Příprava nanočástic stříbra

K přípravě disperze nanočástic stříbra byla použita modifikovaná Tollensova metoda, která je založená na redukci diamminstříbrného komplexu vhodným redukčním činidlem v alkalickém prostředí. V případě zkoumání vlivu nanočástic stříbra na vitalitu kvasinek byly nanočástice připraveny redukcí tetrahydridoboritanem sodným. Proces syntézy nanočástic stříbra byl dále modifikován přidavkem želatiny, která byla

do roztoku přidána ještě před samotným redukčním činidlem. Přidáním roztoku želatiny do reakčního systému zajistíme dlouhodobou stabilitu disperze vůči agregaci a velikost připravených nanočástic stříbra se pak přibližně pohybuje kolem 5nm.^{1,14,17}

Před samotným zahájením reakce bylo nutné předem připravit zásobní roztoky jednotlivých výchozích reakčních komponent, které ilustruje tabulka 1.

Tab. 1: Přehled výchozích látek pro přípravu nanočástic stříbra

Látka	Množství	Koncentrace
AgNO ₃	25,00 ml	c = 0,001 mol/l
NH ₃	6,25 ml	c = 0,005 mol/l
NaOH	1,00 ml	c = 0,01 mol/l
H ₂ O	57,75 ml	
želatina	10,00 ml	0,5 g/100 ml koloidu
NaBH ₄	25,00 ml	c = 0,01 mol/l

Do připravené kádinky o objemu 150 ml a umístěné na elektromagnetické míchače bylo přidáno 25,00 ml roztoku dusičnanu stříbrného a 6,25 ml vodného roztoku amoniaku. K vytvořenému diamminstříbrnému komplexu bylo za stálého míchání přidáno 57,75 ml vody a 1 ml roztoku hydroxidu sodného. Množství vody je spočítáno na celkový objem reakčního systému 125 ml. Dále bylo přidáno 10 ml zásobního roztoku želatiny (0,5 g želatiny/100 ml koloidu). Na závěr bylo přidáno 25 ml roztoku redukčního činidla - tetrahydridoboritanu sodného za tvorby stabilní disperze nanočástic stříbra o koncentraci 108 mg.l⁻¹.¹⁴

Reakce probíhala za laboratorní teploty přibližně 2 – 3 minuty a výsledná disperze nanočástic stříbra byla vyhodnocena ihned po skončení reakce. Měření byla provedena po každé syntéze nanočástic stříbra a každá hodnota je průměrnou hodnotou tří měření k zajištění relevantnosti výsledků. Průměrná velikost částic byla určena pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS) a z TEM. UV-VIS spektroskopií byla změřena kontrolní spektra, která jsou pro disperzi nanočástic charakteristická. Koncentrace připravené disperze nanočástic stříbra byla získána pomocí atomové absorpční spektrometrie.

2.5. Příprava živného média

Živné médium pro následnou kultivaci modelového organismu *Saccharomyces cerevisiae* se skládalo ze dvou roztoků. První roztok byl připraven rozpuštěním 1 g živné soli pro kvasinky VINKA v 100 ml demineralizované vody. Druhý roztok – roztok D-glukosy byl připraven rozpuštěním 110,10 g D- glukosy v 500 ml demineralizované vody. Erlenmeyrovy baňky, používané pro kultivaci, byly omyty demineralizovanou vodou a číselně označeny. Do připravených baněk bylo odpipetováno po 1 ml zásobního roztoku živné soli VINKA a 70 ml zásobního roztoku D-glukosy. Dále pak byla přidána disperze nanočástic stříbra. Množství přidané disperze nanočástic stříbra v baňkách jednotlivých experimentů se pohybovalo v hodnotách od 0 ml do 80 ml, jak je uvedeno v tabulce 2. Celkem bylo provedeno pět kultivačních experimentů, aby bylo možné získat věrohodná data ilustrující vliv přidané disperze nanočástic stříbra na vitalitu kvasinkových buněk. Připravené baňky s kultivačním roztokem a disperzí nanočástic stříbra byly překryty aluminiovou fólií a sterilizovány v sušárně při 150 °C po dobu 30 minut. Spolu se vzorky byla sterilizována i kovová chemická lžička, určená k pozdějšímu dávkování odváženého množství droždí obsahující modelový organismus *Saccharomyces cerevisiae*. Po půl hodině sterilizace byl materiál ze sušárny vyjmut a po zchlazení na laboratorní teplotu byl připraven pro další práci.

Tab. 2: Množství přidané disperze nanočástic stříbra (v ml) v jednotlivých kultivačních experimentech

	číslo baňky	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
číslo experimentu	1	0	2	5	8	12	15	20	25	30	40		
	2	2	5	8	12	15	20	25	30	40			
	3	2	5	8	12	15	20	25	30	40			
	4	2	5	8	12	15	20	25	30	40	50	60	80
	5	2	5	8	12	15	20	25	30	40	50	60	80
		Gradient množství přidané disperze nanočástic stříbra (v ml)											

2.6. Postup při kultivaci kvasinek a studiu vlivu nanočástic stříbra na vitalitu kvasinek

Po sterilizaci a zchladnutí série baněk s kultivačním médiem a disperzí nanočástic stříbra bylo přidáno 0,5 g sušeného droždí SAF INSTANT. Následně byla kvasinková suspenze důkladně rozmíchána. Připravené vzorky pro kultivaci byly překryty sterilizovanou aluminiovou fólií tak, aby nedocházelo k nežádoucí kontaminaci vzorků mikroorganismy, sporami plísní a hub.

Kultivace vzorků jednotlivých experimentů probíhala na pracovišti katedry fyzikální chemie za laboratorní teploty a denního světla po dobu dvou dnů. Třetí den bylo nutné vzorky připravit k měření (Obr. 8). Fakt, že nebylo možné pro kultivaci kvasinek možné použít termostatovaného biologického boxu, se zřejmě promítl do reprodukovatelnosti výsledků jednotlivých biologických experimentů. Zejména kolísání teploty v laboratoři mohlo významně ovlivnit růst kvasinek, čehož důsledkem jsou ne zcela reprodukovatelné hodnoty produkovaného ethanolu za jinak stejných podmínek experimentu. Přes tyto rozdíly v hodnotách kvasinkami produkovaného ethanolu byly v realizovaných měřeních potvrzeny stejné tendence a i hranice toxického působení nanočástic stříbra na testovaný mikroorganismus se pohybují pro jednotlivé experimenty v mezích obvyklých pro biologické experimenty.

Cílem experimentální práce bylo stanovit, jaký vliv má množství přidané disperze nanočástic stříbra na vitalitu kvasinkových buněk. Vitalita kvasinek byla stanovena měřením množství ethanolu, který kvasinky vyprodukovaly alkoholovou fermentací v závislosti na množství přidané disperze nanočástic stříbra do kultivačního média. Měření obsahu ethanolu v kultivačních médiích jednotlivých experimentů bylo stanoveno pomocí chromatografu GC 6820 v režimu s detektorem FID (Agilent Technologies). Příprava vzorků k měření probíhala následovně. Nejprve bylo nutné oddělit ze suspenze kvasinek kapalnou fázi obsahující vedle složek kultivačním roztoku i vyprodukovaný ethanol a ostatní metabolity látkové přeměny. Filtrace byla provedena klasickou filtrací v nálevce na filtračním papíru (Obr. 9). Získané filtráty jednotlivých vzorků experimentů se podrobily analýze na chromatografu GC/FID. Výstupem měření byla hodnota píku (v milivoltech za sekundu) vyjadřující množství kvasinkami vyprodukovaného ethanolu v závislosti na množství přidané disperze nanočástic stříbra do jednotlivých vzorků.



Obr. 8, 9: Příprava vzorků k měření obsahu ethanolu v kulturačním médiu

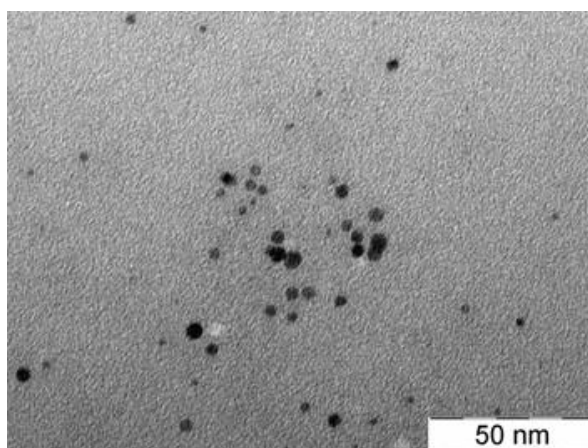
3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1. Vlastnosti připravené disperze nanočástic stříbra

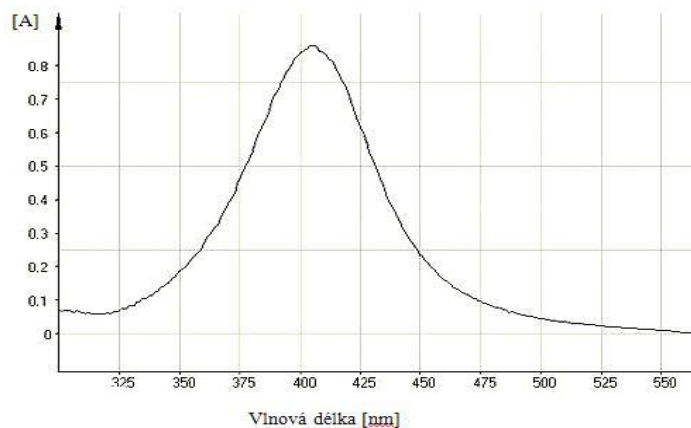
Koloidní disperze nanočástic stříbra byla připravena modifikovanou Tollensovou metodou za použití tetrahydridoboritanu sodného, jako redukčního činidla. Před přidáním redukčního činidla do reakčního systému byl roztok stabilizován želatinou. Průměrná velikost připravených nanočástic činila přibližně 5 nm (Obr. 10). Velikosti připravených nanočástic odpovídalo i naměřené absorpční maximum o vlnové délce 410 nm, které je charakteristické pro nanočástice o této velikosti (Obr. 11). Velikost nanočástic stříbra byla měřena i přístrojem Zeta Potential Analyzer Zeta Plus využívající metodu DLS, ale naměřené hodnoty, pohybující se od 50 nm do 350 nm, byly ovlivněny přítomností želatiny v disperzi. Hodnoty velikosti nanočástic stříbra uváděné v tabulce 3 jsou průměrnou hodnotou tří měření na přístroji DLS. Koncentrace připravené disperze nanočástic stříbra, stanovená pomocí AAS, činila 108 mg.l⁻¹.

Tab. 3: Průměrná velikost nanočástic stříbra měřená metodou DLS

Experiment	1.	2.	3.	4.	5.
Velikost nanočástic[nm]	225	181	167	212	173



Obr. 10: Elektronmikroskopický snímek nanočástic stříbra připravených modifikovanou Tollensovou metodou redukcí tetrahydridoboritanem sodným v přítomnosti želatiny o koncentraci 0,5 hm. %.



Obr. 10: UV/VIS absorpční spektrum připravené koloidní disperze nanočástic stříbra

3.2. Studium vlivu nanočástic stříbra na vitalitu kvasinek

Podle postupu, uvedeného v podkapitole 2.4. byla pro účely všech provedených experimentů připravena disperze nanočástic stříbra o koncentraci stříbra 108 mg.l^{-1} a přibližné velikosti částic stříbra 5 nm. Byl zkoumán vliv množství přidané disperze nanočástic stříbra do kultivačního média na množství vyprodukovaného ethanolu. Množství ethanolu vyprodukovaného v jednotlivých vzorcích experimentů bylo změřeno pomocí plynové chromatografie – GC/FID. Naměřené hodnoty ethanolu byly zprůměrovány a zaznamenány do tabulek. Rovněž byl vypočten obsah nanoAg (v mg.l^{-1}) v jednotlivých vzorcích. Poté byla sestavena kalibrační závislost metodou standardního přídatku ethanolu, díky které bylo možné vypočítat koncentraci kvasinkami vyprodukovaného ethanolu (v mg.l^{-1}) u jednotlivých vzorků. Ze získaných dat byla sestavena grafická závislost vlivu množství nanočástic stříbra na množství vyprodukovaného ethanolu.

3.2.1. Vliv množství nanočástic stříbra v kultivačním médiu na množství vyprodukovaného ethanolu – experiment č. 1

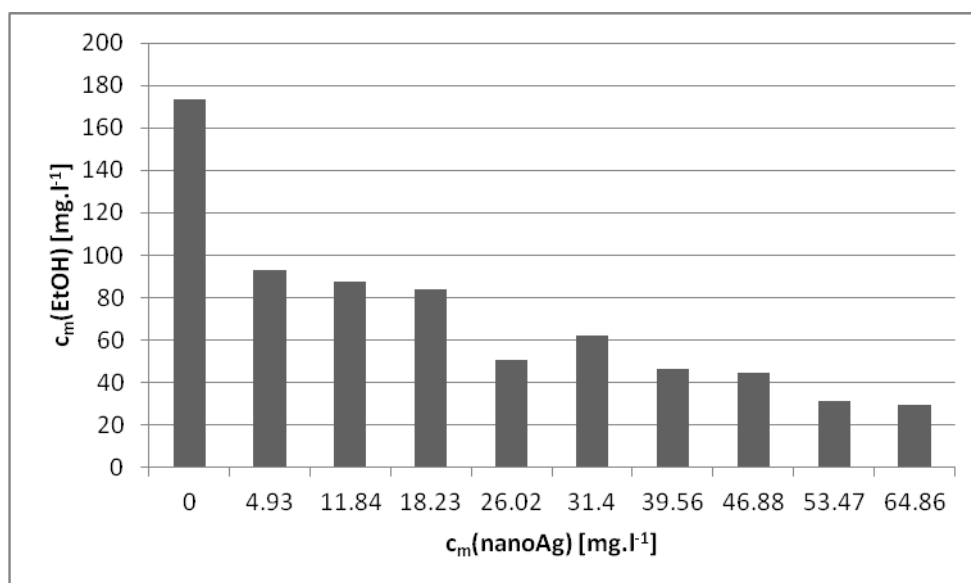
Experiment č. 1 obsahoval sérii deseti vzorků, které se lišily v množství přidané disperze nanočástic stříbra. Vedle srovnávacího vzorku 1, který neobsahoval nanočástice stříbra, byla do dalších vzorků postupně přidána disperze nanočástic (Tab. 4). Provedením experimentu bylo zjištěno, že za daných podmínek, kdy není

v kultivačním médiu přidána disperze nanočástic, je množství vyprodukovaného ethanolu největší a jeho koncentrace činí 173,40 mg.l⁻¹.

Tab. 4: Kvantitativní vyhodnocení vzorků experimentu č. 1

Vzorek	Množství přidané disperze nanoAg [ml]	Koncentrace nanoAg v živném médiu [mg.l ⁻¹]	Plocha píku ethanolu [mV.s]	Koncentrace ethanolu [mg.l ⁻¹]
1	0	0	9372,477	173,40
2	2	4,93	5024,414	92,96
3	5	11,84	4736,267	87,63
4	8	18,23	4526,800	83,75
5	12	26,02	2743,573	50,76
6	15	31,40	3371,228	62,37
7	20	39,56	2502,301	46,30
8	25	46,88	2407,314	44,54
9	30	53,47	1689,857	31,26
10	40	64,86	1592,609	29,47

Se vzrůstajícím množstvím přidané disperze nanočástic stříbra klesalo množství kvasinkami vyprodukovaného ethanolu (Obr. 11). Výrazný pokles ethanolu byl zaznamenán již po přidavku 2 ml disperze do vzorku 2. Hmotnostní koncentrace nanoAg v médiu činila 4,93 mg.l⁻¹. Nejnižší množství ethanolu bylo naměřeno ve vzorku 10, kde bylo do kultivačního média přidáno 40 ml disperze. Hmotnostní koncentrace nanoAg v médiu činila 64,86 mg.l⁻¹.



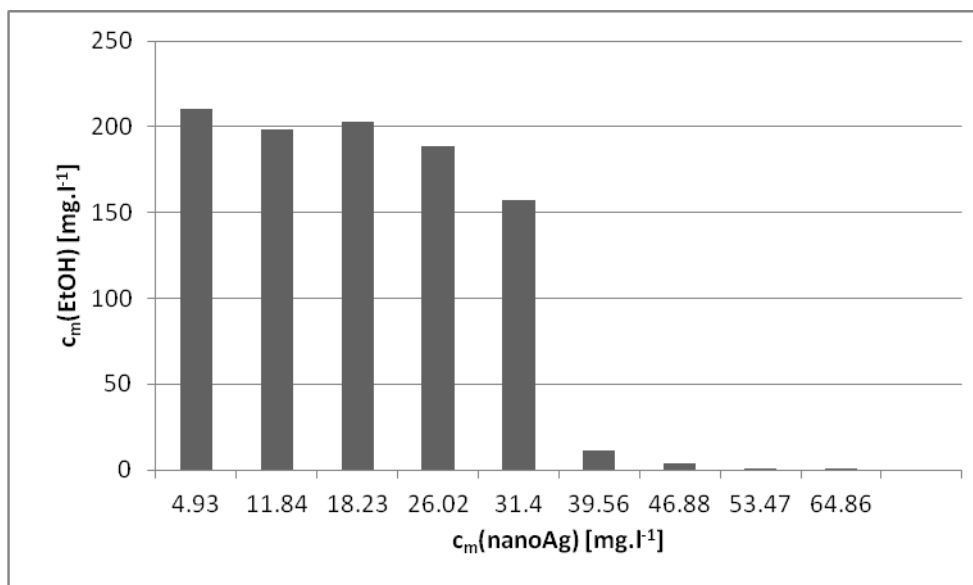
Obr. 11: Graf závislosti kvasinkami vyprodukovaného ethanolu na množství přidané disperze nanočástic stříbra do kultivačního média – experiment č. 1

3.2.2. Vliv množství nanočástic stříbra v kultivačním médiu na množství vyprodukovaného ethanolu – experiment č. 2

Po provedení experimentu č. 2 byly zjištěny odchylky získaných hodnot vyprodukovaného ethanolu oproti prvému experimentu (Tab. 5). Výrazný pokles hodnoty vyprodukovaného ethanolu byl zaznamenán až ve vzorku 6, kde bylo přidáno 20 ml disperze nanočástic stříbra. Hmotnostní koncentrace nanoAg v médiu činila 39,56 mg.l⁻¹. Velmi nízkou hodnotu kvasinkami vyprodukovaného ethanolu vykazoval vzorek 8 a to pouze 0,94 mg.l⁻¹. Hmotnostní koncentrace nanoAg v tomto médiu činila 53,47 mg.l⁻¹. Ve vzorcích s nižším přidavkem nanočástic stříbra byl zaznamenán minimální pokles hodnoty vyprodukovaného ethanolu (vyšší než v prvním případě), což mohlo být způsobeno příznivějšími fyzikálními podmínkami při kultivaci (např. optimálnější teplota, optimálnější intenzita slunečního záření). Výrazná změna v toxicitě nanočástic stříbra oproti prvému experimentu byla pravděpodobně způsobena přítomností nezredukovaného iontového stříbra v disperzi použité pro první experiment. Z dřívějších výzkumů provedených v oblasti přípravy nanočástic stříbra totiž vyplývá, že želatina zpomaluje redukci iontů stříbra a tak se i po několika dnech od přípravy disperze může udržovat nízká koncentrace vysoce aktivního (a toxického) iontového stříbra v připravené disperzi nanočástic stříbra.

Tab. 5: Kvantitativní vyhodnocení vzorků experimentu č. 2

Vzorek	Množství přidané disperze nanoAg [ml]	Koncentrace nanoAg v živném médiu [mg.l ⁻¹]	Plocha píku ethanolu [mV.s]	Koncentrace ethanolu [mg.l ⁻¹]
1	2	4,93	11379,846	210,54
2	5	11,84	10725,855	198,44
3	8	18,23	10953,229	202,65
4	12	26,02	10192,347	188,57
5	15	31,40	8496,254	157,19
6	20	39,56	601,034	11,12
7	25	46,88	197,758	3,66
8	30	53,47	50,986	0,94
9	40	64,86	16,442	0,30



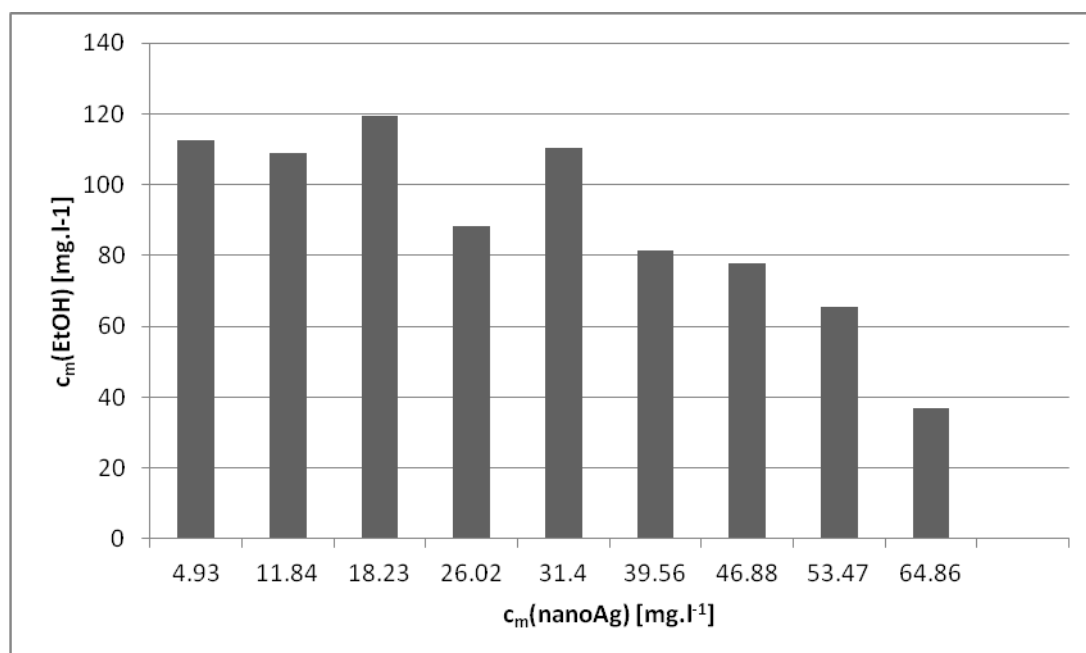
Obr. 12: Graf závislosti kvasinkami vyprodukovaného ethanolu na množství přidané disperze nanočástic stříbra do kultivačního média – experiment č. 2

3.2.3. Vliv množství nanočástic stříbra v kultivačním médiu na množství vyprodukovaného ethanolu – experiment č. 3

Výsledky experimentu č. 3 jsou více srovnatelné s druhým experimentem zejména z hlediska množství vyprodukovaného ethanolu, méně pak z hlediska pozorovaných závislostí produkce ethanolu na množství nanočástic stříbra v systému. Výraznější pokles hodnoty vyprodukovaného ethanolu byl zaznamenán u vzorku 4, kde bylo přidáno 12 ml disperze nanočástic stříbra. Hmotnostní koncentrace nanoAg v médiu činila 26,02 mg.l^{-1} . Celkově ale nebyl vliv nanočástic na vitalitu kvasinek tak výrazný jako v předchozích experimentech.

Tab. 6: Kvantitativní vyhodnocení vzorků experimentu č. 3

Vzorek	Množství přidané disperze nanoAg [ml]	Koncentrace nanoAg v živném médiu [mg.l ⁻¹]	Plocha píku ethanolu [mV.s]	Koncentrace ethanolu [mg.l ⁻¹]
1	2	4,93	6081,342	112,51
2	5	11,84	5889,238	108,96
3	8	18,23	6453,19	119,39
4	12	26,02	4779,651	88,43
5	15	31,40	5962,176	110,31
6	20	39,56	4393,93	81,29
7	25	46,88	4198,596	77,68
8	30	53,47	3531,402	65,33
9	40	64,86	1989,262	36,80



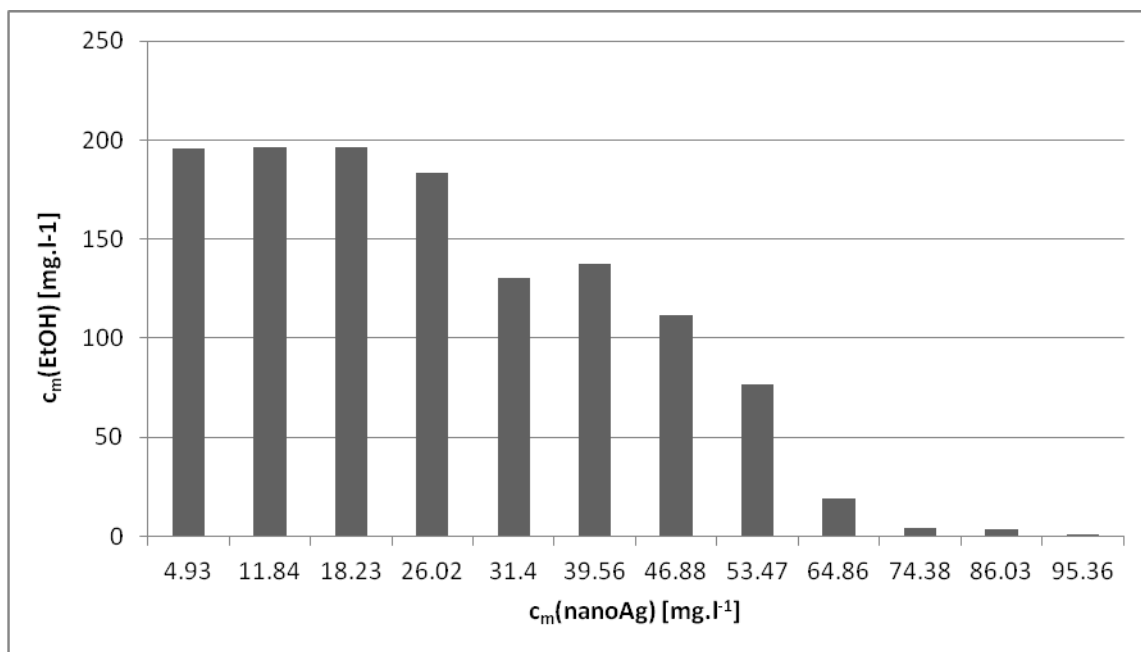
Obr. 13: Graf závislosti kvasinkami vyprodukovaného ethanolu na množství přidané disperze nanočástic stříbra do kultivačního média – experiment č. 3

3.2.4. Vliv množství nanočástic stříbra v kultivačním médiu na množství vyprodukovaného ethanolu – experiment č. 4

Další experiment č. 4 vycházel uspořádáním z předchozích výsledků. Byla zejména prodloužena série růstu koncentrace nanočástic stříbra v živném médiu, neboť v předchozích experimentech i při nejvyšší použité koncentraci kvasinky produkovaly významná množství ethanolu. Výraznější pokles hodnot vyprodukovaného ethanolu byl poprvé sledován u vzorku 5 s 15 ml přidané disperze. Hmotnostní koncentrace nanočástic stříbra v tomto médiu činila 31,40 mg.l⁻¹. Velmi nízkých hodnot vyprodukovaného ethanolu bylo dosaženo u vzorků s množstvím přidané disperze nanočástic stříbra 40 ml a více.

Tab. 7: Kvantitativní vyhodnocení vzorků experimentu č. 4

Vzorek	Množství přidané disperze nanoAg [ml]	Koncentrace nanoAg v živném médiu [mg.l ⁻¹]	Plocha píku ethanolu [mV.s]	Koncentrace ethanolu [mg.l ⁻¹]
1	2	4,93	10579,243	195,73
2	5	11,84	10619,438	196,47
3	8	18,23	10613,002	196,35
4	12	26,02	9901,000	183,18
5	15	31,40	7050,410	130,44
6	20	39,56	7424,574	137,36
7	25	46,88	6030,811	111,58
8	30	53,47	4148,150	76,74
9	40	64,86	1045,805	19,35
10	50	74,38	241,658	4,47
11	65	86,03	190,943	3,53
12	80	95,36	59,354	1,1



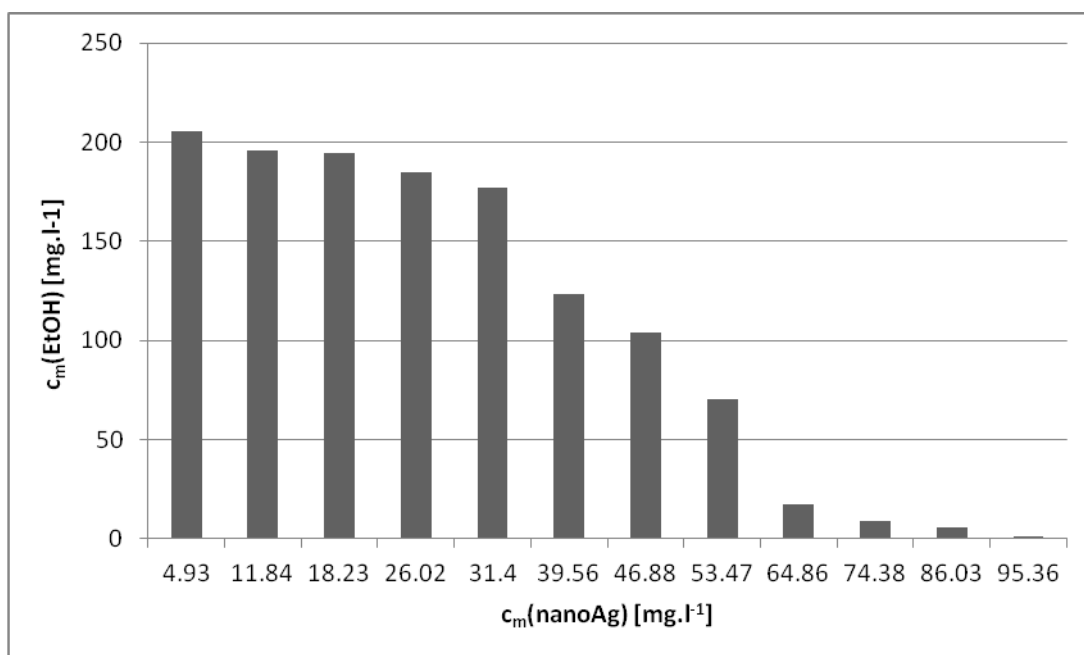
Obr. 14: Graf závislosti kvasinkami vyprodukovaného ethanolu na množství přidané disperze nanočástic stříbra do kultivačního média – experiment č. 4

3.2.5. Vliv množství nanočástic stříbra v kultivačním médiu na množství vyprodukovaného ethanolu – experiment č. 5

Poslední experiment byl proveden pro potvrzení výsledků předchozích experimentů s koncentrační škálou stejnou jako v případě experimentu č. 4. Z naměřených hodnot byla získána závislost vlivu množství přidané disperze nanočástic stříbra na množství kvasinkami vyprodukovaného ethanolu. Se zvyšujícím množstvím přidané disperze bylo zaznamenáno kontinuální snižování hodnot vyprodukovaného ethanolu. Nápadné snížení hodnoty vyprodukovaného ethanolu bylo sledováno u vzorku 6, kdy bylo do kultivačního média přidáno 20 ml disperze nanočástic stříbra. Velmi nízké hodnoty vyprodukovaného ethanolu byly naměřeny ve vzorcích, kde do kultivačních médií bylo přidáno 40 ml a více disperze nanočástic stříbra.

Tab. 8: Kvantitativní vyhodnocení vzorků experimentu č. 5

Vzorek	Množství přidané disperze nanoAg [ml]	Koncentrace nanoAg v živném médiu [mg.l ⁻¹]	Plocha píku ethanolu [mV.s]	Koncentrace ethanolu [mg.l ⁻¹]
1	2	4,93	11099,646	205,36
2	5	11,84	10585,392	195,84
3	8	18,23	10502,886	194,32
4	12	26,02	9984,215	184,72
5	15	31,40	9575,423	177,16
6	20	39,56	6685,128	123,68
7	25	46,88	5624,747	104,07
8	30	53,47	3794,464	70,20
9	40	64,86	937,017	17,34
10	50	74,38	471,103	8,71
11	65	86,03	303,553	5,62
12	80	95,36	77,006	1,42



Obr. 15: Graf závislosti kvasinkami vyprodukovaného ethanolu na množství přidané disperze nanočástic stříbra do kultivačního média – experiment č. 5

3.2.6. Shrnutí výsledků experimentů ovlivnění vitality kvasinek nanočásticemi stříbra

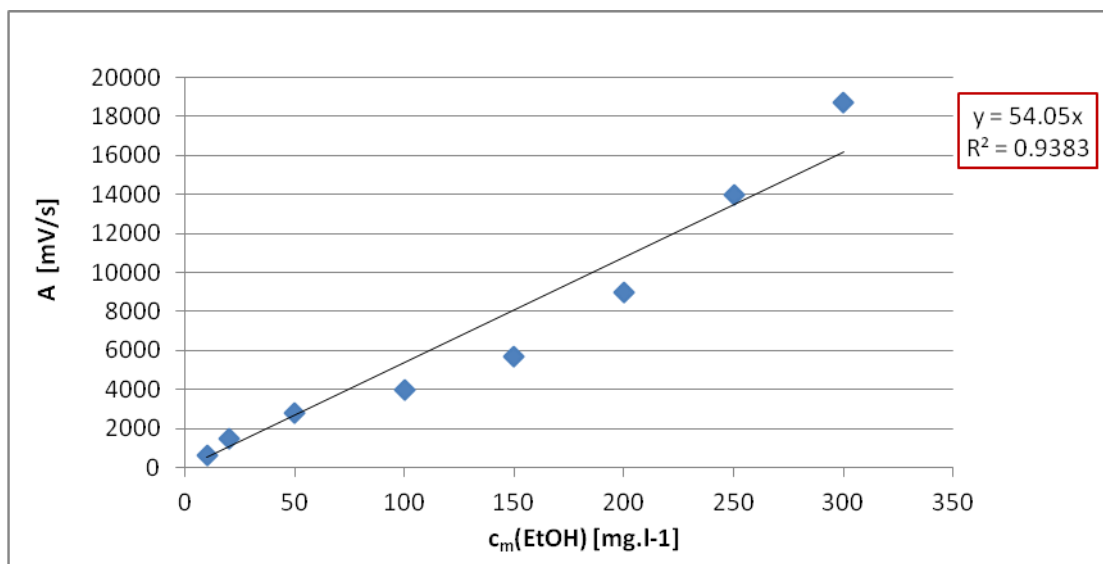
Provedené experimenty prokazují toxické účinky nanočástic stříbra na studovaný mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae*. V následující tabulce č. 9 jsou shrnuty význačné hodnoty koncentrací nanočástic stříbra v živném médiu, související jak s prudkým poklesem vitality kvasinek, tak i s poklesem množství vyprodukovaného ethanolu na polovinu výchozího množství (experiment s minimálním přídatkem nanočástic stříbra), který lze v prvním přiblížení považovat za hodnotou LC50 nanočástic stříbra pro testované kvasinky.

Tab. 9: Shrnutí výsledků testování vlivu nanočástic stříbra na vitalitu kvasinek

Experiment č.	Koncentrace nanoAg v bodě prudkého poklesu produkce ethanolu [mg.l ⁻¹]	Koncentrace nanoAg pro pokles produkce ethanolu na 50% [mg.l ⁻¹]
1	26,02	39,56
2	39,56	39,56
3	39,56	64,86
4	31,4	53,47
5	39,56	46,88
průměr (\bar{x})	35,22	48,87
Směrodatná odchylka (ΔX)	2,80	4,77

3.2.7. Sestavení kalibrační závislosti pro ethanol

Pro větší názornost získaných hodnot vyprodukovaného ethanolu byla sestavena kalibrační přímka ethanolu (graf 16), díky které bylo možné vypočítat koncentraci kvasinkami vyprodukovaného ethanolu jednotlivých vzorků experimentů.



Obr. 16: Graf kalibrační závislosti pro ethanol

Vzorec pro výpočet koncentrace ethanolu (A – plocha píku, y – hodnota z rovnice kalibrační přímky)

$$c(\text{EtOH}) = \frac{A}{y}; [\text{mg.l}^{-1}]$$

Podle tohoto vzorce byl přepočten signál z GC/FID na koncentraci ethanolu v provedených experimentech dokumentovaných výše.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo studium vlivu nanočástic stříbra na vitalitu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Vitalita kvasinek byla hodnocena pomocí množství vyprodukovaného ethanolu v závislosti na množství přidané disperze nanočástic stříbra. Pro účely této práce byly připraveny nanočástice stříbra modifikovanou Tollensovou metodou, kde jako redukční činidlo byl použit tetrahydridoboritan sodný. Disperze nanočástic stříbra byla stabilizována želatinou.

Sérií experimentů byl potvrzen výrazný vliv množství přidané disperze nanočástic stříbra do kultivačního média na množství kvasinkami vyprodukovaného ethanolu. Ze všech experimentů vyplývá, že s rostoucím množstvím přidané disperze, klesá množství vyprodukovaného ethanolu. Významný pokles hodnot vyprodukovaného ethanolu byl zaznamenán již po přidavku cca 20 ml připravené disperze nanočástic stříbra do živného média, což odpovídá koncentraci stříbra v médiu $35,22 \pm 2,80 \text{ mg.l}^{-1}$.

Za předpokladu, že množství vyprodukovaného ethanolu je přímo úměrné vitalitě kvasinek lze ze získaných výsledků odhadnout hodnotu LC50 na úrovni koncentrace nanočástic stříbra $48,87 \pm 4,77 \text{ mg.l}^{-1}$ (pro přidavek 25 ml disperze). Ze všech provedených experimentů navíc vyplývá, že přidání 40 ml a více disperze nanočástic stříbra vede k masivnímu poškození kvasinkových buněk, které se odrazilo výrazným poklesem hodnot vyprodukovaného ethanolu.

Realizovaný výzkum prokázal, že interakci živých organismů s toxickými látkami, v tomto případě nanočásticemi stříbra, lze úspěšně sledovat i na základě produkce jejich metabolitů, což umožňuje i kvantifikaci toxických účinků pro nižší než toxické dávky na rozdíl od klasických mikrobiologických metod.

4. SUMMARY

The aim of this bachelor thesis was to study the effect of silver nanoparticles on the vitality of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Yeast vitality was evaluated by the quantity of produced ethanol, depending on the amount of added dispersion of silver nanoparticles. For the purposes of this work were prepared silver nanoparticles by Modified Tollens method where the used reducing agent was sodium borohydride. The dispersion of silver nanoparticles was stabilized with gelatin.

Series of experiments confirmed the significant effect of added quantities of the dispersion of silver nanoparticles into the culture medium on the amount of ethanol produced by yeast. All the experiments indicate that with increasing amounts of added dispersion the amount of produced ethanol decreases. A significant decrease in the values produced ethanol was recorded after about 20 ml additions of prepared dispersion of silver nanoparticles in the culture medium. This value is corresponding to a concentration of silver in the culture medium $35,22 \pm 2,80 \text{ mg.l}^{-1}$.

Assuming that the amount of ethanol produced is directly proportional to the vitality of yeast we can estimate the value of LC50 concentration from obtained results. Obtained value of silver nanoparticles concentration is $48,87 \pm 4,77 \text{ mg.l}^{-1}$ (for the addition of 25 ml of the dispersion). All the experiments also show that the addition of 40 ml or more of silver nanoparticles dispersion leads to a massive damage to yeast cells. That reflected a significant decrease of produced ethanol values.

Realized research has shown that the interaction of living organisms with toxic substances, in this case the silver nanoparticles, can be successfully monitored on the basis of production of their metabolites, which allows quantification of toxic effects for less than a toxic dose unlike conventional microbiological methods.

5. POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE

1. Kvítek, L.; Pucek, R.; Panáček, A.; et al. (2009): Nanočástice stříbra – příprava, vlastnosti a aplikace. Sborník mezinárodní konference NANOCON 2009, Rožnov pod Radhoštěm. ISBN 978-80-87294-12-3
2. Bartovská, L., Šišková M. (2005): Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. VŠCHT Praha. 244 s. ISBN 80-7080-579-x
3. Kubínek, R. (2011): Jak měřit „NANO“. Nástroje pro měření a vyhodnocování nanostruktur. PřF UP v Olomouci. ISBN 978-80-244-2689-1
4. Kvítek, L. (2005): Nanotechnologie dneška – koloidní stříbro. Katedra fyzikální chemie, PřF UP v Olomouci. Dostupné z: <http://fch.upol.cz/vyzkum/srozum/nanotechnologie.pdf> (staženo dne 21. 2. 2015)
5. Hošek, J. (2010): Úvod do nanotechnologie. Vyd. 1. ČVUT Praha. 170 s. ISBN 978-80-01-04555-8.
6. Prnka, T., Šperlink, K. (2004): Nanotechnologie. Česká společnost pro nové materiály a technologie. Repronis Ostrava. 70 s. ISBN 80-7329-070-7
7. Potočník J. et al. (2011): Doporučení Evropské komise ze dne 18. října 2011 o definici nanomateriálu. Úřední věstník Evropské unie. Dostupné z: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2011.275.01.0038.01.CES (staženo dne 6.4. 2015)
8. Norma ISO/TS 27687 (2008): Nanotechnologies -Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. Dostupné z: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:27687:ed-1:v2:en> (staženo dne 6.4. 2015)
9. Kvítek, L., Panáček A. (2007): Základy koloidní chemie. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 70 s. ISBN 978-80-244-1669-4
10. Berg, C. J. (2010): An introduction to interfaces and colloids. The bridge to nanoscience. World Scientific Publishing Singapore. 785 s. ISB 13 978-981-4293-07-5
11. Shchukin, E. D., Percov, A. V., Amelinová, E. A., Zelenev A.S. (2001): Colloid and Surface Chemistry, 1 st Edition, Elsevier, 774 s. ISBN 9780444500458

12. Novák, J., Bartovská, L., Cibulka, I., et al. (2009): Fyzikální chemie bakalářský a magisterský kurz. VŠCHT Praha, ISBN 978-80-7080-675-3.
13. Kvítek, L. (2006): Metody studia koloidních soustav. Katedra fyzikální chemie PřF UP v Olomouci. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/msk.pdf>
14. Sivera, M. (2011): Vliv polymerních látek na přípravu a vlastnosti nanočástic stříbra. Diplomová práce, PřF Olomouc
15. Kvítek, L.; Novotný, R.; Píkal, P. (1998): Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla. Chemické listy 92: 431 – 433.
16. Panáček, A.; Kvítek, L.; Pucek, J.; et al. (2006): Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. Journal of Physical Chemistry B, 110: 16248 – 16253.
17. Sivera M.; Kvítek L.; Soukupová J.; Panáček A.; Pucek R.; et al. (2014): Silver Nanoparticles Modified by Gelatin with Extraordinary pH Stability and Long-Term Antibacterial Activity. PLoS ONE 9(8): e103675.
18. Zajoncová L. a kol. (2012): Vybrané kapitoly z chemie (nejen pro střední školy), PřF Univerzity Palackého v Olomouci, ISBN 978-80-244-3013-3
19. Pucek, R., Kvítek, L., Hrbáč, J.: (2004): Silver Colloids – Methods of preparation and utilization. Facultas Rerum Naturalium. Chemica 43, vol. 43.
20. Morones, J. R., Elechiguerra, J. L, Camacho, A. et al. (2005): The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 16: 2346-2352.
21. Panáček, A., Kvítek, L., Pucek, R. et al (2006): Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. The Journal of Physical Chemistry B, 110: 16248-16253.
22. Kvítek, L., Panáček, A., Soukupová, J. et al. (2008): Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). The Journal of Physical Chemistry C, 112: 5825-5834.
23. Kvítek, L., Vaničková, M., Panáček, A. et al. (2009): Initial Study on the Toxicity of Silver Nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. The Journal of Physical Chemistry C, 113: 4296-4300.

24. Panáček, A., Kolář, M., Večeřová, R. et al. (2009): Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*, 30: 6333-6340.
25. Hwang, I., Lee, J., Hwang J. H. et al. (2012): Silver nanoparticles induces apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *The FEBS Journal*, 279: 1327-1338.
26. Debabrata, D., Giasuddin, A. (2012): Silver nanoparticles damage yeast cell wall. *International Research Journal of Biotechnology*. Vol. 3(3): 37-39.
27. Debabrata, D., Giasuddin, A. (2013): Cellular responses of *Saccharomyces cerevisiae* to Silver Nanoparticles. *International Research Journal of Biotechnology*. Vol. 8(1): 72-77.
28. Kocková - Kratochvílová, A. (1982): *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 483 s. Edícia potravinárskej literatúry.
29. Kalina, T.; Váňa, J. (2010): *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 606 s., 32 s. obr. příl. ISBN 9788024610368.
30. Vše o droždí. Dostupné z: <http://www.vseodrozdi.cz/cs/index.php> (22. 3. 2015)
31. Šilhánková, L. (2008): *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. Praha: Academia, 363 s. ISBN 9788020017031
32. Systém a klasifikace rodu *Saccharomyces* podle BIOLIB – Taxonomic tree of plants and animals. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id360869/> (19. 3. 2015)
33. Systém a klasifikace rodu *Saccharomyces* podle Species Fungorum. Dostupné z: <http://www.speciesfungorum.org/Names/GSDspecies.asp?RecordID=163963> (19. 3. 2015)
34. Schéma eukaryotické buňky kvasinky. Dostupné z: <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/beer/yeast/yeast2.htm> (upraveno; posl. aktualizace 30. 4. 1999)
35. Znázornění pučících kvasinek – snímek z elektronového mikroskopu. Dostupné z: http://www.foodnews.ch/x-plainmefood/30_produkte/Bier_Gaerung_hist.html (staženo dne 20. 3. 2015)
36. Vodrážka, Z. (1996): *Biochemie*. 2., opr. vyd. Praha: Academia, 191 s. ISBN 9788020006004.

37. Vinařství - biochemie alkoholové fermentace. Dostupné z:
http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1186(posl.
aktualizace 20. 6. 2013)
38. Mikeš, V. (1997): Základní pojmy z biochemie – Anaerobní glykolýza.
Dostupné z:
http://orion.chemi.muni.cz/zakladni_pojmy_z_biochemie/page0110.ht
39. Peč, P. (2012): Základy biochemie – Metabolismus cukrů – přednáška č. 3.
Dostupné z: <http://ibiochemie.upol.cz>
40. Kosař, K. (2000): Technologie výroby sladu a piva. Výzkumný ústav pivovarský
a sladařský - Praha, 398 s. ISBN 80-902658-6-3.
41. Hollerová, I., Sigler K., Kadlecová J., Šrogl J. (2005): Vitalita a viabilita
národních kvasnic: Metody posuzování a vliv buněčných systémů pro stresovou
rezistenci. Kvasný průmysl roč. 51 – číslo 1.
42. Košin P., Šavel J., Kolouchová I., Brož A. (2007): Viabilita a vitalita kvasnic
v provozním kvašení. Kvasný průmysl roč. 53 – číslo 2.
43. Kmenová kultura kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Dostupné z:
[http://www.vinicavino.sk/de/vinarsky-vyskum/autochtonne-kultury-
saccharomyces-cerevisiae-vo-vinarskej-praxi/](http://www.vinicavino.sk/de/vinarsky-vyskum/autochtonne-kultury-saccharomyces-cerevisiae-vo-vinarskej-praxi/)
(staženo dne 25. 2. 2015)
44. Specifikační list sušeného droždí SAF INSTANT. Dostupné z:
[http://www.drozdi.cz/upload/files/Specifikacni_listy/Specifikacni_list_Saf_insta
nt_10g.pdf](http://www.drozdi.cz/upload/files/Specifikacni_listy/Specifikacni_list_Saf_insta
nt_10g.pdf) (staženo dne 1. 3. 2015)

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- GC – plynový chromatograf
- FID – detektor plamenové ionizace
- ETC – detektor elektronového záchytu
- AFM – mikroskopie atomárních sil
- SEM – skenovací elektronová mikroskopie
- TEM – transmisní elektronová mikroskopie
- NNI – Národní nanotechnologická iniciativa
- DLS – Dynamic Light Scattering, dynamický rozptyl světla
- HRTEM - High-resolution transmission electron microscopy, transmisní mikroskop s vysokým rozlišením
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- RNA – ribonukleová kyselina
- SDS – dodecylsírán sodný
- MIC – minimální inhibiční koncentrace
- MFC – minimální fungicidní koncentrace
- ROS – reaktivní oxidující radikály
- MKC – minimum killing concentration, minimální hodnota k zabití
- ATP – adenosintrifosfát
- NAD⁺ - oxidovaná forma nikotinamiduadeninudinukleotidu
- NADH – redukováná forma nikotinamiduadeninudinukleotidu
- FADH₂ – redukováná forma flavinuadeninudinukleotidu
- UV – VIS – ultrafialová – viditelná část spektra
- AAS – atomová absorpční spektrometrie
- nanoAg – nanočástice stříbra
- EtOH – ethanol
- LC₅₀ – letální koncentrace pro 50% testovaných organismů
- LT₅₀ – letální čas, čas do smrti 50% testovaných organismů