

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory

Molekulární biologie a biochemie organismů



Eliška Bubáková

Interakce kovových nanočástic s mikroorganismy

Interactions of metal nanoparticles with microorganisms

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jana Beranová, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.8.2016

Podpis:

Eliška Bubáková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Janě Beranové, Ph.D., za odborné vedení, konzultace, trpělivost a za cenné rady, které mi během psaní této práce poskytla.

Abstrakt

Tématem této bakalářské práce jsou kovové nanočástice a jejich antibakteriální účinky. Nanotechnologiím byla v posledních letech věnována velká pozornost jak v odborných kruzích, tak v médiích. Některé kovové nanočástice vykazují prokazatelné antibakteriální účinky. V současné době, kdy narůstající rezistence patogenních bakterií k běžně užívaným antibiotickým látkám představuje závažný problém, by mohly být kovové nanočástice jedním z možných řešení. Interakce nanočástic s bakteriemi ale nebyly dosud detailně prostudovány a pochopeny. Je také zřejmé, že jejich působení je ovlivněno celou řadou fyzikální a biologických faktorů. Beze zbytku není prozkoumána ani jejich potenciální cytotoxicita pro eukaryotní organismy. Toto vše jsou důvody, proč má užití kovových nanočástic v praxi prozatím své limity. Tato práce shrnuje poznatky, které jsou o baktericidních účincích různých kovových nanočástic momentálně známy.

Klíčová slova: kovové nanočástice, nanotechnologie, antibakteriální účinky, nanostříbro, nanozlato, nanoměď

Abstract

This thesis deals with metal nanoparticles and their antibacterial effects. Nanotechnologies have been paid intensive attention both in scientific and public area. Some metal nanoparticles possess provable antibacterial potential. Nowadays, when the growing resistance of pathogenic bacteria represents an important issue, metal nanoparticles could be one of the potential solutions to the problem. Interactions of metal nanoparticles with bacteria have however not yet been fully understood. It is also evident that their effects depend on various physical and biological factors. The cytotoxicity of nanoparticles to eukaryotic organisms has not been explored in depth either. These all are the reasons why the practical use of nanoparticles has still many limitations. This thesis summarizes information available on the topic of bactericidal effects of metal nanoparticles.

Keywords: Metal nanoparticles, nanotechnology, antibacterial effects, nanosilver, nanogold, nanocopper

Obsah

Abstrakt	IV
Obsah.....	V
Seznam zkratk.....	VI
1 Úvod	1
2 Složení kovových nanočástic	2
3 Syntéza kovových nanočástic.....	3
4 Mechanismy působení kovových nanočástic	4
4.1 Změny na membránách a ve vnitřním prostoru bakterií.....	4
4.2 Porušení vnitřních struktur bakteriální buňky	8
4.3 Indukce produkce reaktivních forem kyslíku	9
4.4 Aktivita iontů.....	10
5 Odpovědi bakteriální buňky na interakci s kovovými nanočásticemi	13
6 Rezistence bakterií k účinkům kovových nanočástic	16
7 Faktory, které ovlivňují antibakteriální aktivitu nanočástic	17
7.1 Vliv materiálu nanočástic na jejich antibakteriální účinky	17
7.2 Vliv velikosti nanočástic na jejich antibakteriální aktivitu	17
7.3 Vliv tvaru nanočástic na jejich antibakteriální aktivitu	18
7.4 Působení nanočástic na gram-negativní a gram-pozitivní bakterie	22
7.5 Vliv koncentrace nanočástic na jejich antibakteriální účinky	23
7.6 Vliv povrchových vlastností nanočástic na antibakteriální účinky nanočástic.....	24
8 Cytotoxicita	27
9 Použití.....	28
10 Závěr.....	30
11 Seznam použité literatury	31

Seznam zkratk

NPs	(Kovové) Nanočástice
AgNPs	Stříbrné nanočástice
AuNPs	Zlaté nanočástice
CuNPs	Měděné nanočástice
PtNPs	Platinové nanočástice
ZnNPs	Zinkové nanočástice
NiNPs	Niklové nanočástice
ROS	Reaktivní formy kyslíku
PAH	Polyallylamin hydrochlorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
BPEI	Větvený polyethylenimin
PE	L-fosfatidyl-ethanolamin
LPS	Lipopolysacharid

1 Úvod

Bakterie mají schopnost vytvořit rezistenci k běžně používaným antibakteriálním látkám (Stoffels *et al.* 2013). Proto se snižuje množství použitelných funkčních antibakteriálních látek, které jsou pro boj s patogenními či potenciálně patogenními bakteriemi nutné. Jedním z možných řešení tohoto problému by mohly být kovové nanočástice, které vykazují antibakteriální účinky. V dnešní době jsou nanomateriály pro své jedinečné vlastnosti zkoumány po celém světě. Nanočástice se svým průměrem pohybují mezi 1-100 nm. Mezi kovové nanočástice (NPs), jejichž antibakteriální účinky byly prokázány, patří nanočástice stříbra (AgNPs), zlata (AuNPs), mědi (CuNPs), platiny (PtNPs), zinku (ZnNPs) a niklu (NiNPs).

Antibakteriální účinky stříbra jsou známy již dlouho a stříbro bylo užíváno již v 19. století při operacích jako vcelku běžný antibakteriální prostředek až do doby objevení prvních antibiotických látek (Silver *et al.* 2006). Kovové NPs díky svému velkému specifickému povrchu a dalším jedinečným vlastnostem vykazují účinky, kterými dokážou zahubit bakteriální buňku. To, co činí NPs tak dobrými baktericidními látkami, je několik různých zásahových míst v bakteriální buňce, což snižuje pravděpodobnost vzniku rezistence (Li *et al.* 2014). Navíc působí nanočástice na široké spektrum mikroorganismů. Antibakteriální účinky nanočástic jsou ovlivňovány řadou faktorů. Těmi jsou například velikost a tvar NPs, struktura povrchu NPs a podobně. Všechny procesy, které z NPs iniciují v bakteriální buňce, zatím ještě nebyly zcela pochopeny.

Tato práce je zaměřena především na mechanismy, kterými kovové NPs působí na bakteriální buňku a rovněž na faktory, které tyto mechanismy a antibakteriální účinky kovových nanočástic ovlivňují.

2 Složení kovových nanočástic

Kovové NPs je možné vyrábět z celé řady kovů. Nejčastěji se kovové NPs vyrábějí ze stříbra a zlata, méně často potom z mědi, titanu, železa, niklu, či platiny, popřípadě mohou být atomy kovů součástí heterogenních nanostruktur.

Atomy kovů mezi sebou tvoří krystalovou mřížku a nacházejí se v pevném skupenství.

3 Syntéza kovových nanočástic

Existuje několik metod, pomocí kterých je možné kovové NPs syntetizovat. Jde o metody chemické, biologické a fyzikální.

NPs vznikají krystalizací. Nejprve dojde k redukci soli a k nukleaci, po které se tvoří zárodky krystalu. Zárodky dále vyrostou do zrn, která se vyvinou do různých tvarů. Nastavením vhodného pH, teploty a poměru koncentrací reaktantů, lze určit při chemické syntéze velikost a tvar vznikajících nanočástic. Tvar je možné také upravit pomocí obalových molekul, viz kapitola 7.6 (Amin *et al.* 2014).

Pro chemickou syntézu kovových NPs jsou potřeba tři základní látky. První z nich je prekurzor. Prekurzorem nanočástic mohou být soli, ve kterých se vyskytuje atom kovu, ze kterého budou NPs syntetizovány, může jimi být například: AgNO_3 , HAuCl_4 (Annamalai *et al.* 2013), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Shende *et al.* 2015). Druhou látkou potřebnou k chemické syntéze je tzv. redukční molekula, která provede redukci soli. Třetí látkou, která musí být při syntéze přítomna, je stabilizační molekula, která pokrývá povrch NPs a proto se může též nazývat obalová molekula. Jako obalová molekula může sloužit například NaBH_4 (Agnihotri *et al.* 2014), ethylenglykol (Sun a Xia 2002), či jiné molekuly.

Další možností výroby NPs je syntéza tzv. biologickou metodou. Mezi její výhody patří šetrnost k životnímu prostředí, nízká náročnost na energii a také to, že při ní není nutné manipulovat s žádnými z toxických chemických látek (Singh *et al.* 2015). Tato syntéza vychází z chemické metody, ale v tomto případě se jako redukční a stabilizační molekuly užívají molekuly biologického materiálu, kterým mohou být například houby *Verticillium* (Mukherjee *et al.* 2001), extrakt ze *Solanum lycopersicum* (Bindhu a Umadevi 2014), extrakt z čerstvých listů *Panax ginseng* (Singh *et al.* 2015), extrakt ze semen *Peganum harmala* (Amin *et al.* 2014) a podobně.

Kovové NPs lze také vyrobit pomocí fyzikální metody. Jedním z příkladů této metody je syntéza v keramickém ohřívači. V tomto případě se syntetizují AgNPs z Ag prekurzoru za teplot okolo $1000\text{ }^\circ\text{C}$. Po evaporaci se prekurzor v plynném skupenství dostane do generátoru, kde je zchlazen, načež dojde k nukleaci a k přechodu do pevné formy. Nevýhoda této metody spočívá v tom, že trvá delší dobu a je náročná na energii. (Jung *et al.* 2006).

4 Mechanismy působení kovových nanočástic

Mechanismy působení NPs jsou mířeny na více komponent bakteriální buňky. Interakce mezi NPs a bakteriemi se mohou lišit podle druhu kovu, ze kterého jsou NPs vyrobené. NPs mohou například působit na bakteriální membrány, na molekuly intracelulárního prostoru, jako jsou DNA a proteiny, mohou indukovat produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a mohou ze svého povrchu uvolňovat toxické ionty. O procesech, které v bakteriálních buňkách při jejich interakcích s nanočásticemi probíhají, toho ale i přes množství studií není tolik známo. Experimenty, které se týkají mechanismů účinku NPs, totiž nejsou standardizované a existují různé faktory, které mohly výsledky laboratorních testů ovlivnit. Většina publikovaných studií se týká AgNPs, za nimiž následují studie, které se zabývají AuNPs, následně měděnými nanočásticemi CuNPs a existuje několik studií, které se zabývají PtNPs. Kromě výše zmíněných kovů a jejich antibakteriálních účinků bylo prokázáno, že i ZnNPs vykazují antibakteriální aktivitu (Babushkina *et al.* 2015) a rovněž byl pozorován antibakteriální účinek NiNPs (Khan *et al.* 2013).

4.1 Změny na membránách a ve vnitřním prostoru bakterií

Bakterie při interakcích s NPs vykazují velké změny na buněčných membránách, které jsou jedněmi z prvních struktur, se kterými NPs interagují.

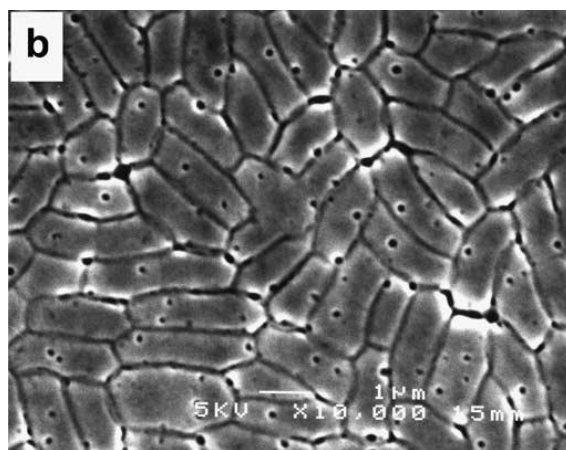
AuNPs, AgNPs, CuNPs i PtNPs jsou schopny narušit integritu bakteriálních membrán, což má za následek zvýšení membránové permeability. Právě kvůli zvýšené propustnosti membrán může z vnitřního prostoru bakterie vyhrěznout cytoplazma, popřípadě další komponenty nacházející se uvnitř bakteriální buňky, jako jsou DNA, či ribozomy (Ansari *et al.* 2014; Badwaik *et al.* 2012; Chwalibog *et al.* 2010; Kar *et al.* 2014; Li *et al.* 2009). Kvůli zvýšení permeability z bakteriální buňky také uniknou její zásoby kationtu K^+ a jejich hladina v intracelulárním prostoru bakterie, která se setkala s AgNPs, poklesne (Lok *et al.* 2006).

Po styku AgNPs, AuNPs i CuNPs s bakteriální cytoplasmatickou membránou dojde ke snížení, či k úplnému kolapsu transmembránového elektrochemického potenciálu, což má za následek snížení produkce ATP a pokles jeho hladiny v buňce. To zapříčiní ztrátu buněčných zásob energie (Cui *et al.* 2012; Deryabin *et al.* 2013; Lee *et al.* 2014; Lok *et al.* 2006). Při interakci buňky s AgNPs jsou také ve větší míře syntetizovány proteiny, jejichž syntéza byla zaznamenána i při styku bakterií s inhibitory ATPasy a s látkami narušujícími chod oxidativní fosforylace, viz kapitola 5 (Lok *et al.* 2006).

Před interakcí s bakteriálním povrchem musí AgNPs nejdříve překonat elektrostatickou bariéru tvořenou odporem bakteriální buňky a nanočástice (Bondar *et al.* 2012; El Badawy *et al.* 2011). Teprve poté mohou AgNPs působit na molekuly, které se nacházejí na povrchu bakterií. V případě interakce AgNPs s gram-negativní bakterií musí dojít ke styku AgNPs přímo s vnější membránou, která je touto interakcí následně destabilizována (Lok *et al.* 2006). Toto porušení je způsobené stykem

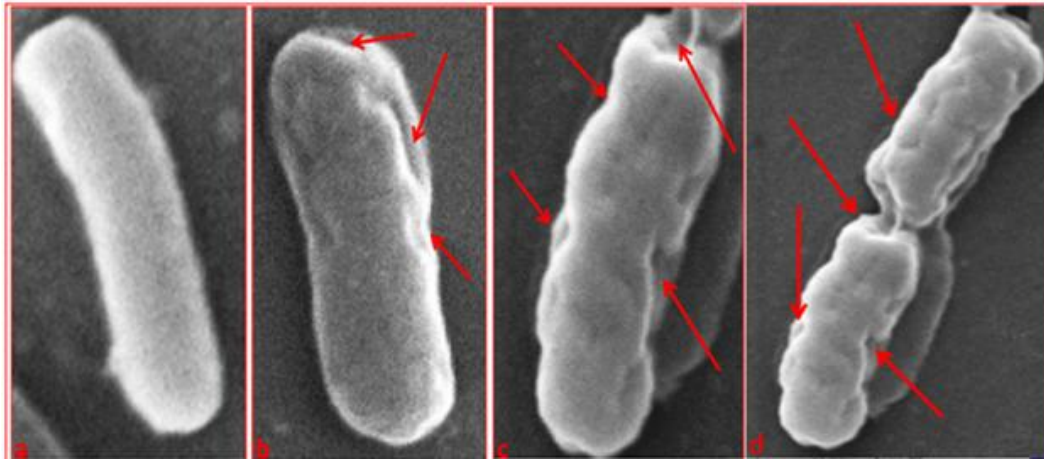
mezi AgNPs a molekulami vnější membrány, kterými mohou být lipopolysacharidy (LPS), nebo L-fosfatidyl-ethanolaminy (PE). AgNPs se při interakci s LPS váží na O-antigenovou část, se kterou vytvoří vodíkovou vazbu. Při poškození funkce LPS však dochází nejen ke zvýšení permeability, ale také ke změnám fluidity membrány a ke změně laterální organizace membrány. Při styku s PE rozbíjí AgNPs fosfodiesterovou vazbu a odštěpí polární hlavičku lipidu, čímž změní amfifilní charakter molekuly. Objeví se též změna v konformaci alkylových řetězců PE (Ansari *et al.* 2014; Li *et al.* 2009). Poté, co AgNPs proniknou přes vnější membránu, peptidoglykanovou vrstvu a periplasmatický prostor, jsou schopny inhibovat funkci dehydrogenáz v respiračním řetězci (Li *et al.* 2009), což způsobí další snížení buněčné respirace (Choi a Hu 2008).

Jedním z důkazů interakce AgNPs s povrchem *Escherichia coli* (*E. coli*) jsou viditelné morfologické změny na bakteriálním povrchu, které jsou na membránách patrné jako jamky, viz Obrázek 1. Takto narušená membrána podporuje už dříve zmíněný fakt, že je zvýšena permeabilita bakteriální buňky (Sondi a Salopek-Sondi 2004).



Obrázek 1: Morfologické změny na bakteriálním povrchu po styku s AgNPs. Buňky *E. coli* byly 4 hodiny inkubovány v LB médiu s $50 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ AgNPs. Snímek byl pořízen skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM), převzato z práce: (Sondi a Salopek-Sondi 2004)

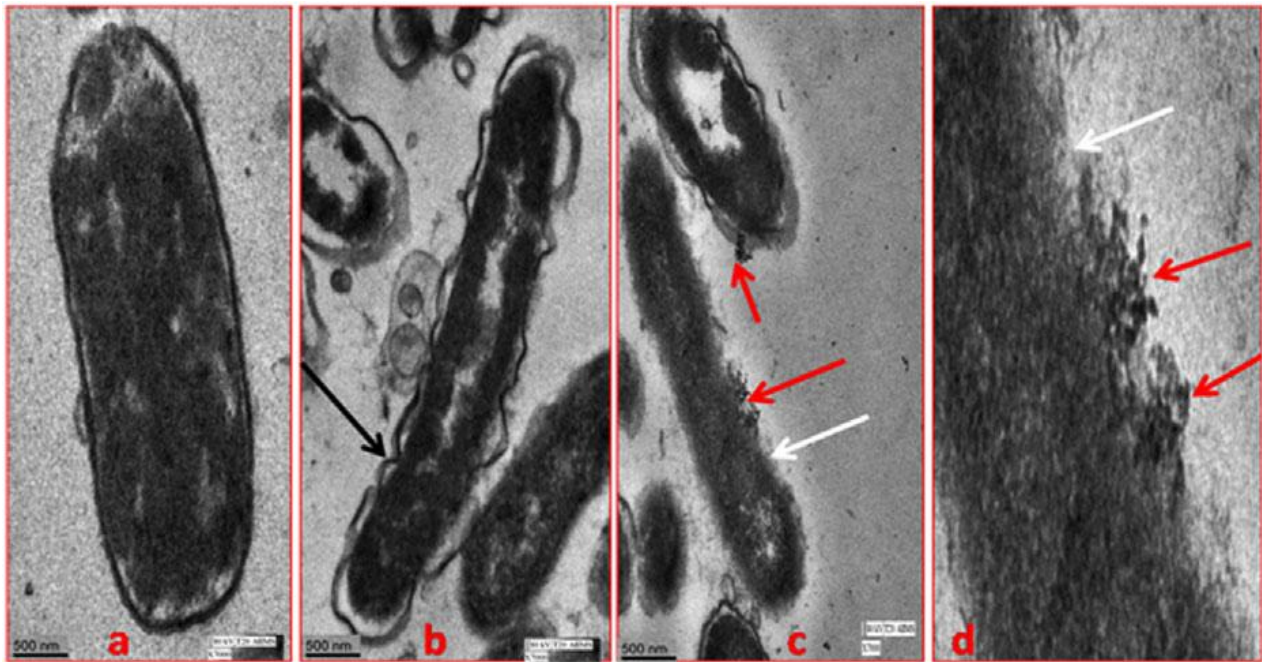
Kromě jamek jsou rozpoznatelné i další značné změny na morfologii povrchů *E. coli*. Na SEM snímku (Obrázek 2) je patrné, jak se mění bakteriální membrána v závislosti na koncentraci AgNPs a jak je porušena její celistvost. Na posledním obrázku (2d) je již narušení buňky velice zřejmé. Můžeme pozorovat velkou ztrátu integrity a spoustu viditelných fragmentů (Ansari *et al.* 2014).



Obrázek 2: Morfologické změny na bakteriální membráně po jejich interakci s AgNPs. a) Buňka *E. coli* v médiu bez AgNPs. na obrázku b) bylo přidáno 10 $\mu\text{g/ml}$ AgNPs a již jsou zde zřejmé jasné strukturální a morfologické změny. na obrázku c) bylo přidáno 20 $\mu\text{g/ml}$ AgNPs a na obrázku d) 30 $\mu\text{g/ml}$ AgNPs. Šipky označují hluboké poškození buněk *E. coli*. Zachyceno pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Převzato z: (Ansari *et al.* 2014)

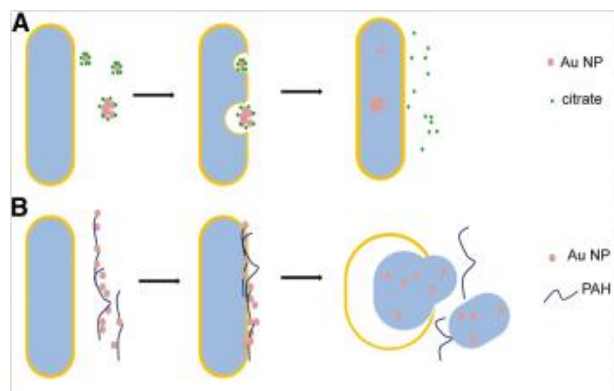
Přijde-li bakteriální buňka *E. coli* do styku s AgNPs, je zřejmé, že dochází k oddělení membrány od zbytku bakterie *E. coli* (Obrázek 3 b-d). Na obrázcích jsou také patrná další poškození membrány, jako je například její potrhání (Ansari *et al.* 2014).

AuNPs mohou být inkorporovány u gram-negativních bakterií *E. coli* do vnější membrány, do peptidoglykanové vrstvy, do cytoplasmatické membrány, či do cytoplasmy. V membránách indukují AuNPs strukturální změny, jako je porušení membrány, po kterém může dojít k prasknutí bakteriální buňky (Badwaik *et al.* 2012; Zhao *et al.* 2010).



Obrázek 3: Poškození membrány *E. coli* vlivem AgNPs (a) buňky *E. coli*, které nepřišly do styku s AgNPs (b-d) *E. coli*, které do styku s AgNPs přišly. Bílé a černé šipky značí částečně narušenou membránu a červené AgNPs. Zachyceno pomocí TEM. Převzato z práce: (Ansari *et al.* 2014)

Účinek AuNPs může být též závislý na druhu obalových molekul, které se nachází na povrchu nanočástice. Byly-li vyrobeny částice o průměru ~20 nm a byly na ně použity dva druhy obalových molekul, citrát a PAH (polyallylamin hydrochlorid), účinnější byly AgNPs obalené PAH. AuNPs obalené citrátem vykazovaly jiný způsob mechanického narušení bakteriálních buněk *E. coli*, než AuNPs obalené PAH. Na AuNPs se váže slaběji citrát než PAH a je-li citrát na povrchu NPs, mají nanočástice vyšší tendenci agregovat. AuNPs obalené citrátem (Obrázek 4a) proniknou do buňky bez molekuly citrátu, který se skrze membránu nedostane. V intracelulárním prostoru začnou vytvářet větší struktury, ale nezpůsobí lyzi bakterie. Oproti tomu AuNPs s PAH (Obrázek 4b) agregují již v médiu do dlouhých řetězců. Vytvořené řetězce adherují na membránu, kterou rozruší, čímž dojde k lyzi bakterie. Urychlení porušení membrány může mít na svědomí také PAH, který přijde s membránou přímo do styku. Potrhány jsou při tomto procesu rovněž agregáty AuNPs s PAH na povrchu. AuNPs se poté vyskytují ve vyhrzenuté cytoplazmě, ovšem již mezi sebou neagregují (Zhou *et al.* 2012).



Obrázek 4: Model působení AuNPs v závislosti na různých obalových molekulách: A) s citrátem jako obalovou molekulou AuNPs, B) s PAH jako obalovou molekulou na povrchu AuNPs; Převzato z: (Zhou *et al.* 2012)

O procesech, které vyvolávají CuNPs působením na bakteriální buňku, toho zatím není mnoho známo. CuNPs při styku s bakteriální membránou vytváří elektrostatickou interakci mezi povrchem CuNPs a povrchem bakteriální membrány. Hlavním důvodem smrti bakteriální buňky při styku s CuNPs je ale pokles transmembránového elektrochemického potenciálu (viz kapitola 4.1) (Deryabin *et al.* 2013).

Účinek platinových nanočástic (PtNP) také prozatím zůstává do hloubky neprozkoumaný, nejspíš kvůli jejich specifickému chování. PtNPs totiž za různých podmínek nepůsobí na všechny bakterie (Gopal, Manikandan, *et al.* 2013). PtNPs způsobily vyhřeznutí DNA u gram-pozitivní bakterie *Listeria monocytogenes*, ale při styku s gram-negativní bakterií *Salmonella enteritidis* zůstala DNA uvnitř bakterie (Sawosz *et al.* 2010).

4.2 Porušení vnitřních struktur bakteriální buňky

Při interakcích bakteriálních buněk s NPs se může měnit také charakter buněčných struktur, které se nacházejí uvnitř bakteriální buňky, jako jsou ribozomy, nukleové kyseliny, nebo proteiny.

Stále není jednoznačně zjištěno, zda je při styku s AgNPs narušena struktura DNA. To, že bakteriální buňka po kontaktu s AgNPs tvoří protein RecA, napovídá tomu, že by mělo docházet k porušení DNA (Lee *et al.* 2014), ovšem v jiné studii, jejímiž autory jsou Hwang a kol., nebyla pozorována zvýšená translace proteinu RecA, což indikuje opačnou situaci, kdy DNA poškozena není (Hwang *et al.* 2008).

Pro AuNPs je situace jiná. Dostanou-li se AuNPs do vnitřního prostoru bakteriální buňky, vážou se přímo na ribozomy a na nukleové kyseliny. AuNPs se mohou vázat jak na DNA nukleoidu, tak

i na DNA plazmidů. Plazmidy mohou být touto vazbou s AuNPs plně neutralizované a tudíž mohou AuNPs způsobit jejich nefunkčnost (Zhao *et al.* 2010)

Při styku bakterie s CuNPs je DNA degradována. Tato degradace vede buňku k SOS odpovědi. Porušení DNA ve větší míře způsobují pravděpodobně Cu^{2+} ionty, které jsou z CuNPs uvolňovány (Chatterjee *et al.* 2014) a také, v nižší míře, ROS (Deryabin *et al.* 2013).

Ještě méně jsou prozkoumány antibakteriální účinky PtNPs. I u nich se prokázalo, že malé PtNPs jsou schopné proniknout do vnitřního prostoru buňky (Gopal, Hasan, *et al.* 2013) a uvnitř buňky se přímo navázat na molekulu DNA. Navázáním na DNA PtNPs zapříčiní snížení iniciace replikace DNA, což eventuálně také naruší expresi proteinů (Sawosz *et al.* 2010).

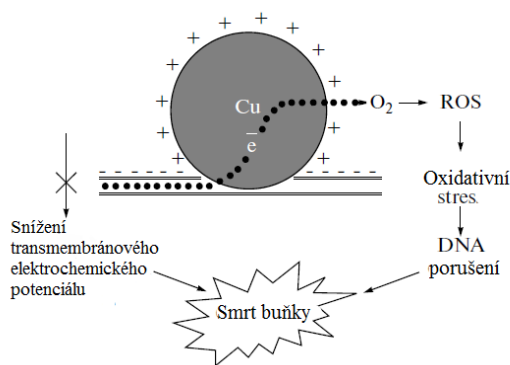
4.3 Indukce produkce reaktivních forem kyslíku

Schopnost nanočástic indukovat ROS hraje nejspíš v jejich antibakteriální aktivitě velikou roli, jelikož tyto molekuly dokážou dále poškozovat buňku.

Při interakci AgNPs s bakterií se koncentrace ROS v bakteriální buňce zvýší (Choi a Hu 2008; Lee *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2013). Nebezpečí pro bakteriální buňky spočívá především v tom, že mohou AgNPs vstoupit do intracelulárního prostoru a zde indukovat produkci zejména superoxidových radikálů, které jsou schopny poškozovat proteiny a membrány (Hwang *et al.* 2008). AgNPs mohou v kyselém prostředí kromě toho tvořit také hydroxylové radikály z H_2O_2 , které jsou schopné napadnout a poškodit membránu, čímž přispějí k dalšímu zvýšení její permeability (Loo *et al.* 2015).

Na rozdíl od AgNPs a dalších kovových nanočástic nebyla zaznamenána indukce produkce ROS v bakteriálních buňkách při jejich styku s AuNPs (Cui *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2013). Výsledek další studie, která byla ale prováděna na eukaryotních buňkách, ovšem tvrdí, že zde AuNPs dokážou generovat ROS (Fatima *et al.* 2015) a je tedy nejasné, zda AuNPs generují ROS též v prokaryotních organismech.

CuNPs svou přítomností rovněž indukují tvorbu ROS (Kar *et al.* 2014). Je-li CuNP inkorporována do cytoplasmatické membrány (Obrázek 5), dojde skrze CuNPs k přenosu elektronu z respiračního řetězce na molekulu kyslíku, která je následně proměněna v superoxidový aniont. Superoxidový aniont se poté přeměňuje na peroxid vodíku, který způsobí oxidativní stres (Deryabin *et al.* 2013). ROS tímto způsobem zapříčiní rozsáhlé peroxidace lipidů a oxidaci proteinů. Oxidace proteinů je při kontaktu s CuNPs 25-50x vyšší než oxidace proteinů bakteriální buňky, která nepřišla do styku s CuNPs. Jak míra peroxidace lipidů, tak oxidace proteinů, je přímo úměrná koncentraci CuNPs (Chatterjee *et al.* 2014).



Obrázek 5: Tvorba ROS a předpokládaný mechanismus antibakteriálního působení CuNPs; Převzato a upraveno z: (Deryabin *et al.* 2013)

V jedné z publikovaných studií bylo zjištěno, že také NiNPs dokážou indukovat produkci ROS v bakteriální buňce, což by mohl být jeden z jejich efektů účinku (Zhang *et al.* 2013). U ostatních kovů nebyla produkce indukce ROS zatím prozkoumána.

4.4 Aktivita iontů

Otázka, kterou se zabývá několik studií, je, zda vykazují kovové nanočástice antibakteriální účinek, či zda za jejich antibakteriálním účinkem stojí uvolňování toxických iontů z povrchu nanočástic, popřípadě jak velkou roli ionty uvolňované kovovými nanočásticemi v jejich celkové antibakteriální aktivitě kovových NPs mají.

To, že AgNPs uvolňují kationty Ag^+ je již dlouho známo (Hwang *et al.* 2008). Studie, které se zabývají tím, zda jsou ionty Ag^+ hlavní příčinou antibakteriální aktivity, kterou AgNPs vykazují, mluví rozporuplně a navrhují dvě možné hypotézy. První možností je, že za celou antibakteriální aktivitu AgNPs jsou zodpovědné Ag^+ ionty a AgNPs samy o sobě žádnou toxicitu k bakteriálním buňkám nevykazují a fungují pouze jako nosiče iontů, které kationtům Ag^+ zajistí snadný vstup do intracelulárního prostoru. Je dlouho známo, že k tomu, aby se z Ag^0 uvolnily Ag^+ kationty, je potřeba kyslík a kyselé prostředí, což popisuje rovnice:



Když byly AgNPs uchovávány v anaerobním prostředí, aby z nich nemohly být uvolňovány ionty, neprojeví téměř žádný baktericidní účinek, což by mohl být jeden z hlavních důkazů, že AgNPs samy o sobě antibakteriální účinek nevykazují (Xiu *et al.* 2012).

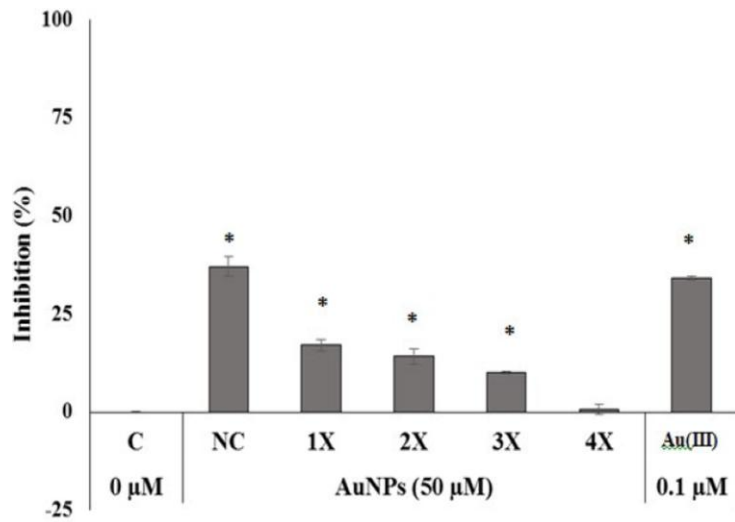
Druhou možností je, že samotné AgNPs mají antibakteriální účinky, které vylučování iontů Ag^+ posiluje (Kawata *et al.* 2009). K této hypotéze se přiklání studie, kde byly AgNPs stabilizované

a očištěné od iontů a dalších nečistot a i přesto byla antibakteriální aktivita zaznamenána (Ansari *et al.* 2014).

Ionty Ag^+ , které jsou z AgNPs vylučovány, mají při interakci s bakterií samy několik potvrzených účinků. Ag^+ se navazují především na thiolovou skupinu (-SH) aminokyselin, kterými jsou glutathion a methionin, a které se vyskytují v proteinech membrány i v proteinech intracelulárního prostoru (Liau *et al.* 1997). Naváže-li se Ag^+ na tyto aminokyseliny v proteinech, může proteiny připravit o jejich běžnou funkci (Feng *et al.* 2000).

Ag^+ také narušují proteiny respiračního řetězce, což má za následek jeho nefunkčnost a případnou smrt buňky (Holt a Bard 2005). Vzhledem k tomu, že Ag^+ působí takovýmito způsoby na bakteriální buňky, je jasné, že by se na míru uvolňování na Ag^+ mělo přihlídnout již před začátkem syntézy kovových NPs, protože čím více je z AgNPs uvolňováno iontů, tím je jejich baktericidní efekt znatelnější (Samberg *et al.* 2010). Mělo by se též vzít v potaz, že protony, které se dostávají na povrch bakterií, kde vytvářejí elektrochemický gradient a které tvoří těsně nad membránou kyselého prostředí, mohou v aerovaném médiu pozitivně ovlivnit stupeň uvolňování Ag^+ z AgNPs. Proto AgNPs, které se přiblíží k cytoplasmatické membráně, následně produkují vyšší množství Ag^+ (Xiu *et al.* 2012).

Tímto problémem se někteří vědci zabývali také u AuNPs. Stejně jako u AgNPs existuje pro AuNPs teorie, že za jejich antibakteriálními účinky stojí aktivita kationtů Au^{3+} , které samy vykazují antibakteriální aktivitu. To potvrzuje studie, ve které se AuNPs pomocí centrifugace očišťovaly od iontů a částic, načež začalo docházet spolu se zvyšujícím se počtem centrifugací ke snižování antibakteriální aktivity AuNPs (Obrázek 6). Inhibice růstu bakterií klesla z počátečních 37 % na 1 % po čtvrté centrifugaci. To indikuje, že ionty jsou z části, ne-li úplně, odpovědné za antibakteriální efekt, protože po tom, co jsou ze vzorku AuNPs odstraněny Au^{3+} , AuNPs téměř neinhibují bakteriální růst (Dasari Tp a Y 2015). Této hypotéze ale odporuje jiná studie, kde AuNPs vykazovaly antibakteriální efekt i přesto, že byl proveden test na roztoku AuNPs, který měl odhalit přítomnost Au^{3+} iontů, ale přítomnost kationtů v něm nebyla prokázána (Badwaik *et al.* 2012).



Obrázek 6: Inhibice růstu bakterií *E. coli* vlivem AuNPs v závislosti na počtu centrifugací, při kterých jsou postupně odstraňovány kationty Au^{3+} . na obrázku je zřejmé, jak míra inhibice klesá spolu s množstvím centrifugací. Vpravo je inhibice zapříčiněná Au^{3+} ionty. Inhibition = inhibice. NC=Před centrifugací. Převzato z: (Dasari Tp a Y 2015).

5 Odpovědi bakteriální buňky na interakci s kovovými nanočásticemi

Poté, co přijde bakteriální buňka do styku s kovovými nanočásticemi, má snahu se různými způsoby adaptovat na stres, který nanočástice vyvolávají. Bakterie proto mění charakter exprese proteinů, což zvyšuje šance na její přežití v prostředí s kovovými NPs.

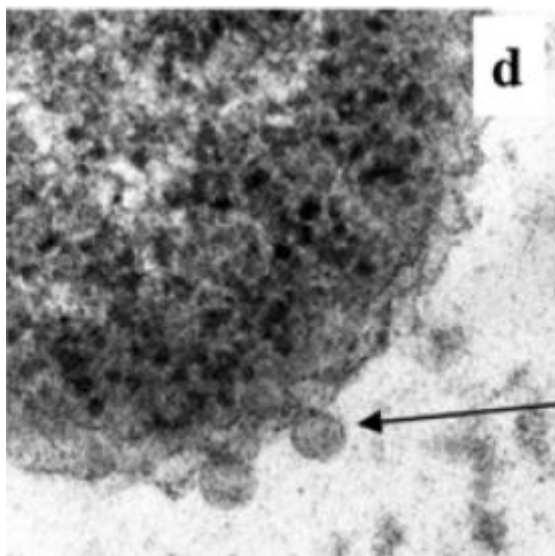
Odpověď bakteriální buňky, která přijde do styku s AgNPs, se do určité míry podobá apoptóze eukaryotických buněk. K této situaci, podobné apoptóze, dochází i při styku bakterií s baktericidními antibiotiky. Mezi znaky, které vykazuje bakteriální buňka, a které se také vyskytují u eukaryotických buněk při apoptóze, patří fragmentace DNA, snížení elektrochemického potenciálu, a aktivace proteinů podobných kaspáze. Dalším znakem je zvýšení koncentrace Ca^{2+} v bakteriální buňce. AgNPs rovněž nepřímo ovlivňují distribuci fosfolipidů v cytoplasmatické membráně. Ca^{2+} totiž stimuluje aktivitu enzymů skrambláz. Ty způsobí přechod fosfatidylserinu (PS), fosfolipidu, který se za obvyklých podmínek nachází ve vnitřním listu cytoplasmatické membrány, do listu vnějšího (Dwyer *et al.* 2012; Lee *et al.* 2014; Mirnikjoo *et al.* 2009). V eukaryotických buňkách je PS přítomný ve vrchní vrstvě cytoplasmatické membrány při apoptóze signálem pro makrofágy, který poukazuje na to, které buňky by měly být makrofágy pohlceny (Fadok *et al.* 1992). V prokaryotických buňkách dále dochází také k expresi proteinu RecA, což je pravděpodobně způsobeno fragmentací DNA. Rovněž byla zaznamenána buněčná filamentace způsobená proteinem Sula, který inhibuje dělení buňky. Jak exprese RecA, tak filamentace jsou známkou SOS odpovědi buněk v důsledku jejich interakcí s AgNPs (Dwyer *et al.* 2012; Huisman *et al.* 1984; Lee *et al.* 2014).

Bakteriální buňka při styku s AgNPs zesílí intenzitu translace obalových proteinů vnější membrány, OmpA, OmpC, OmpF, OppA a MetQ, jejichž zvýšená translace se vyskytuje také při interakci bakterie s látkami, které inhibují ATPasu a s látkami, které narušují chod oxidativní fosforylace. Protože již ale buňka nemá kvůli poklesu transmembránového elektrochemického potenciálu energii na jejich translokaci skrze cytoplasmatickou membránu, zůstávají tyto prekurzory proteinů akumulované v cytoplasmě, a tudíž nemohou plnit svou funkci. Též je zvýšena exprese proteinů teplotního šoku 30S ribozomální podjednotky, IbpA a IbpB. Funkcí IbpA a IbpB je zvýšit bakteriální rezistenci k vyšším teplotám a také k oxidativnímu stresu, což se nejspíš děje v tomto případě (Kitagawa *et al.* 2000; Lok *et al.* 2006).

U gram-negativních bakterií *E. coli* a *Salmonella typhi* (*S. typhi*) byla při jejich interakci s AgNPs zaznamenána defosforylace dvou neidentifikovaných proteinů. Zatím ale nebyla publikována studie, která by zjistila, o jaké proteiny se jedná (Shrivastava *et al.* 2007).

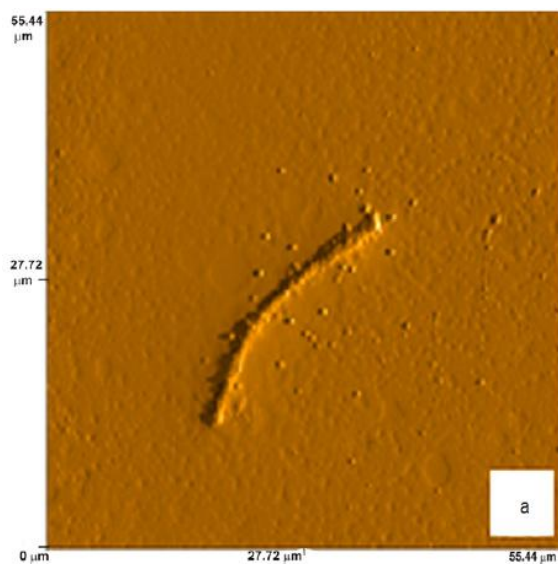
Odpovědi, které vykazují bakterie při styku s AuNPs se poněkud liší od odpovědi na AgNPs. Gram-negativní buňky začnou při interakci s AuNPs tvořit vezikuly vnější membrány (Obrázek 7) a také při interakci s AuNPs dojde k inhibici syntézy většiny proteinů (Badwaik *et al.* 2012; Zhao *et*

al. 2010). Například je negativně regulována exprese genů, které kódují alfa a beta proteinové domény v F1 podjednotce ATP-syntázy. Existují ale i proteiny, jejichž exprese je zvýšena. Mezi tyto proteiny patří proteiny pro chemotaxi a pro flagelární motilitu. To je způsobeno tím, že bakterie v první chvíli odpovídají na AuNPs pokusem uniknout. Pro pohyb je ale spotřebovávaná energie, které v pozdějších hodinách dojde z důvodu dříve zmíněného kolapsu membránového potenciálu, či kvůli nízké aktivitě ATP-syntázy (Cui *et al.* 2012).



Obrázek 7: Vezikuly vnější membrány vytvořené po styku bakteriální buňky s AuNPs. *E. coli* při styku s AuNPs. Šipka ukazuje na vytvářející se vezikul vnější membrány. Zachyceno pomocí TEM. Převzato z: (Badwaik *et al.* 2012).

Bylo také pozorováno několik odpovědí bakteriálních buněk při jejich interakci s CuNPs. Jednou pozorovanou odpovědí byla filamentace bakteriální buňky. K té dochází následkem depolarizace cytoplasmatické membrány (Chatterjee *et al.* 2014). Filamentace byla pozorována jak u gram-negativních buněk *E. coli* (Obrázek 8), tak i u gram-pozitivní bakterie *Bacillus subtilis* (Chatterjee *et al.* 2012).



Obrázek 8: Filamentace v důsledku depolarizace membrány způsobena stykem s CuNPs. Filamentární *E. coli* o délce 30 mikrometrů v přítomnosti CuNPs; Pořízeno pomocí AFM (Atomic force microscopy) Převzato z: (Chatterjee *et al.* 2012).

6 Rezistence bakterií k účinkům kovových nanočástic

Důležitou otázkou je také to, zda si bakterie dokážou vyvinout proti NPs rezistenci, případně jak rychle ji dokážou rozvinout. Možnost vyvinutí bakteriální rezistence proti AuNPs je v porovnání s běžnou antibiotickou látkou gentamicinem méně pravděpodobná. Hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro AuNPs se téměř nesnižuje ani po 20-30 generacích bakterií *E. coli* i *Staphylococcus aureus*. Oproti tomu u bakterií ošetřených gentamicinem došlo spolu s dalšími generacemi k výraznému snížení MIC (Li *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2010). Některé studie se také věnují rezistenci bakterií proti AgNPs. Rezistence k AgNPs se ani po pěti generacích bakterií nijak neprojevila, na rozdíl od rychlého vyvinutí rezistence k tetracyklinu a clarithromycinu (Amin *et al.* 2014).

7 Faktory, které ovlivňují antibakteriální aktivitu nanočástic

Existuje široké spektrum faktorů, které dokážou ovlivnit jak sílu antibakteriálních účinků NPs, tak způsob poškození bakteriální buňky. Kromě vlastností samotných NPs, jako jsou například velikost a tvar, to mohou být také vlastnosti bakterií a vlastnosti prostředí, ve kterém interakce mezi nanočásticemi a bakteriemi probíhají. Tyto faktory mohou mít různě významný vliv a jejich pochopení je nutným předpokladem pro praktické využití antibakteriálních účinků nanočástic, popřípadě pro vytváření NPs s výhodnějšími antibakteriálními účinky.

7.1 Vliv materiálu nanočástic na jejich antibakteriální účinky

Jedním z nejdůležitějších faktorů je druh kovu, ze kterého jsou kovové NPs vyrobeny. Neliší se výhradně jen silou baktericidních účinků, ale také různým charakterem procesů, které NPs na bakteriálních buňkách způsobují, a o kterých pojednává kapitola č. 4. CuNPs prokázaly vyšší antibakteriální účinek než ZnNPs a AgNPs (Babushkina *et al.* 2015; Yoon *et al.* 2008). AgNPs však prokázaly vyšší antibakteriální účinek v porovnání s AuNPs (Fatima *et al.* 2015).

7.2 Vliv velikosti nanočástic na jejich antibakteriální aktivitu

Velikosti nanočástic se pohybují mezi 1-100 nm v průměru a mnoho studií dokazuje, že jejich průměr je jednou z hlavních vlastností, které mají vliv na jejich antibakteriální aktivitu. Nanočástice se od větších těles liší svým velkým poměrem povrchu a objemu, jinak řečeno specifickým povrchem. Čím jsou nanočástice menší, tím se zvětšuje jejich specifický povrch a snižuje jejich objem, tudíž je poměr povrchu a objemu vyšší. Tímto zvyšováním specifického povrchu nanočástic se zvyšuje množství atomů na povrchu nanočástic. To znamená, že menší nanočástice mají větší možnost interagovat s dalšími částicemi, plochami, či v tomto případě s povrchem bakterie.

AgNPs s menším průměrem vykazují výraznější antibakteriální účinek v porovnání s většími AgNPs (Agnihotri *et al.* 2014; Choi a Hu 2008; Lu *et al.* 2013; Panacek *et al.* 2006; Shameli *et al.* 2012). Malé AgNPs s průměrem ~1,5 nm mohou proniknout skrze membránu do intracelulárního prostoru buňky a jejich antibakteriální aktivita je silnější. AgNPs větší než 10 nm nejsou schopny do bakteriální buňky proniknout, ale přilnou na membránu a naruší její permeabilitu natolik, že může dojít až k lýzi buňky (Bera *et al.* 2014). To, že menší AgNPs vykazují vyšší antibakteriální aktivitu, není ale patrné pouze v rozmezí průměrů 1-10 nm, ale také v rozmezí velikostí 10-100 nm. NPs o průměru ~25 nm měly nejnižší MIC (minimální inhibiční koncentrace) pro několik různých druhů bakterií a tedy vykazovaly největší antibakteriální aktivitu v porovnání s většími NPs s průměrem ~35 nm, které byly účinnější než NPs s průměrem ~44 nm a ~50 nm (Panacek *et al.* 2006). Pokud jsou AgNPs větší, nebo vytváří v roztoku větší agregáty, dojde ke snížení jejich specifického povrchu a tím i ke snížení jejich antibakteriální aktivity (Lok *et al.* 2007). Dalším důvodem lepšího antibakteriálního efektu menších AgNPs může být i to, že menší AgNPs uvolňují snadněji ionty Ag^+ , které rovněž

dokážou poškodit bakterie, viz kapitola 4.4 (Sotiriou a Pratsinis 2010). Lze tedy říci, že by se velikostí dala regulovat antibakteriální účinnost AgNPs, protože menší nanočástice jsou hned z několika důvodů účinnější (Shameli *et al.* 2012).

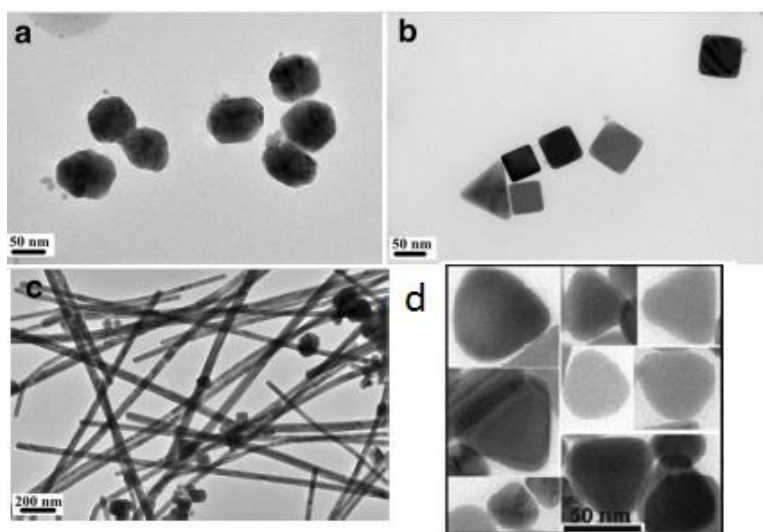
Stejně jako u AgNPs, má velikost, čili specifický povrch, AuNPs vliv na celkovou antibakteriální aktivitu. Také zde platí pravidlo, že AuNPs s menším průměrem mají vyšší antibakteriální účinky než AuNPs s větším průměrem (Hayden *et al.* 2012; Lima *et al.* 2013). Vliv velikosti u AuNPs ale nejspíš nebude tak výrazný, jako u AgNPs, protože další publikovaná studie ukázala, že větší AuNPs, s průměrem až ~120 nm, mají vyšší antibakteriální efekt než AuNPs menších průměrů, ~60 nm a ~25 nm (Badwaik *et al.* 2012), případně byl antibakteriální efekt různých velikostí AuNPs podobný (Ameer Azam 2009), což mohlo být způsobeno různými dalšími faktory, jako je tvar, obalová molekula, povrchový náboj a podobně, které jsou pojednány dále.

U ostatních kovových nanočástic nejsou antibakteriální účinky v závislosti na velikosti zatím příliš prostudované. Bylo však pozorováno, že PtNPs o průměru 1-2 nm dokážou vstoupit do bakteriální buňky, a způsobit její smrt. Větší PtNPs, o průměru 5-20 nm již antibakteriální účinek neměly a s bakteriální membránou téměř neinteragovaly (Gopal, Hasan, *et al.* 2013).

7.3 Vliv tvaru nanočástic na jejich antibakteriální aktivitu

Síla antibakteriálních účinků NPs je také závislá na jejich tvaru. Publikované studie, které se soustředí na tvar, se týkají především AgNPs.

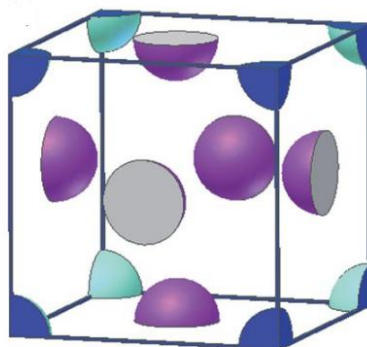
Kovové nanočástice mohou mít několik různých tvarů. Takovými tvary jsou například: podlouhlé nanokabely a nanotyče, dále nanokostky, nanosféry a triangulární tvary (Obrázek 9).



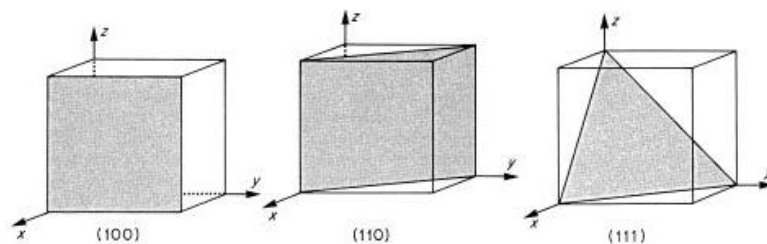
Obrázek 9: Různé tvary stříbrných nanočástic; a) Ag nanosféry, b) Ag nanokostky, c) Ag nanokabely; d) triangulární pláty. Snímky pořízeny pomocí SEM; Převzato z: (Hong *et al.* 2015; Pal *et al.* 2007)

Krystalová mřížka kovů, ze kterých jsou syntetizované NPs, má strukturu fcc (kubicky plošně centrovanou), viz Obrázek 10. Je několik možností pro uspořádání atomů v krystalové mřížce na povrchu NPs. Toto uspořádání je definováno Millerovým číslem. Millerovo číslo udává uspořádání atomů skrze rovnoběžnost ploch krystalové mřížky s krystalografickými osami v pořadí x, y a z. Je-li strana plochy rovnoběžná s osou, je tato strana označena jako 0. Není-li žádná plocha rovnoběžná s danou osou, tato strana je označena jako 1. Trojčísle následně znamenají, se kterými osami jsou hrany ploch rovnoběžné (x, y, z). Na vnějším povrchu kovů se objevují především krystalické plochy s nízkým Millerovým indexem – (111), (100) a (110) (Obrázek 11). Struktura rozložení atomů v krystalové mřížce na povrchu (100) a (111) je ilustrovaná viz Obrázek 12.

Kulatými závorkami se popisují jednotlivé plochy a složenými závorkami je popisován celý tvar složený z několika stejných ploch (Obrázek 13) (Miller 1839; Tilley 2006; Vávra a Losos 2011). Typ ploch má vliv na povrchovou energii kovových nanočástic a tato povrchová energie je u ploch s nízkými Millerovými indexy nejvyšší u rovin (110), nižší u (100) a nejnižší u (111) (Wen a Zhang 2007). Povrchová energie představuje míru porušených vazeb při vzniku nového povrchu (Holec a Mayrhofer 2012). Lze říci, že každý tvar částic má svůj specifický poměr ploch na svém povrchu, viz obrázek 13.

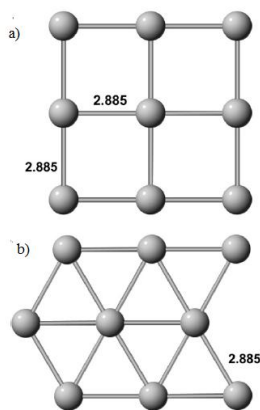


Obrázek 10: Struktura atomů krystalové mřížky kubicky plošně centrované. Tuto strukturu krystalové mřížky mají kovy. Převzato z: (To *et al.* 2013)



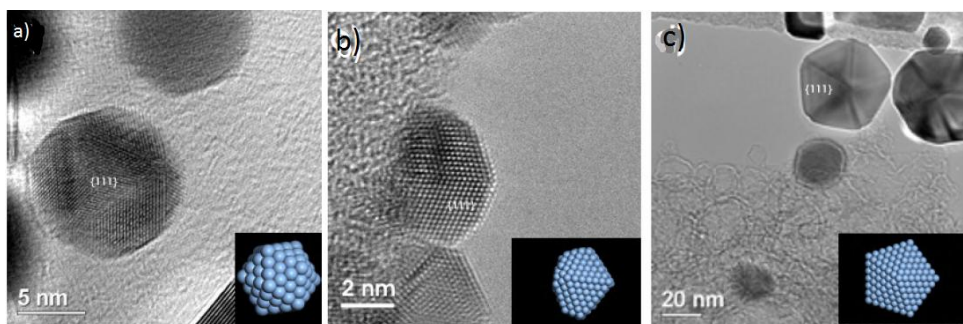
Obrázek 11: Krystalografické osy x , y a z . Je na nich je zobrazeno uspořádání atomů do třech typů ploch, jejichž hodnota je určena Millerovým indexem. Zdroj: (Hook a Hall 1991)

Uspořádání atomů, a tedy tvar, závisí stejně jako velikost NPs na způsobu syntézy nanočástice. Při syntéze se ve fázi nukleace vytvoří zárodky krystalu. Zárodky dále vyrostou do zrn, která mohou být deformována. Jednou z možných deformací je tzv. dvojčatění, které může být jednočetné i mnohočetné. K dvojčatění může dojít, vytvoří-li se v určitém místě roviny krystalické mřížky další rovina, která je symetrická s původní krystalickou mřížkou (Buerger 1945). Tyto deformace dále určují tvar NPs, jako je například dekahedron z mnohočetného dvojčatění, či pravá bipyramida z jednočetného dvojčatění, viz obr. 14. Kromě tohoto defektu se mohou objevit i vrstevnaté chyby, ze kterých vzniknou triangulární pláty (Amin *et al.* 2014). Různé tvary lze definovat také uspořádáním atomů na povrchu nanočástic.

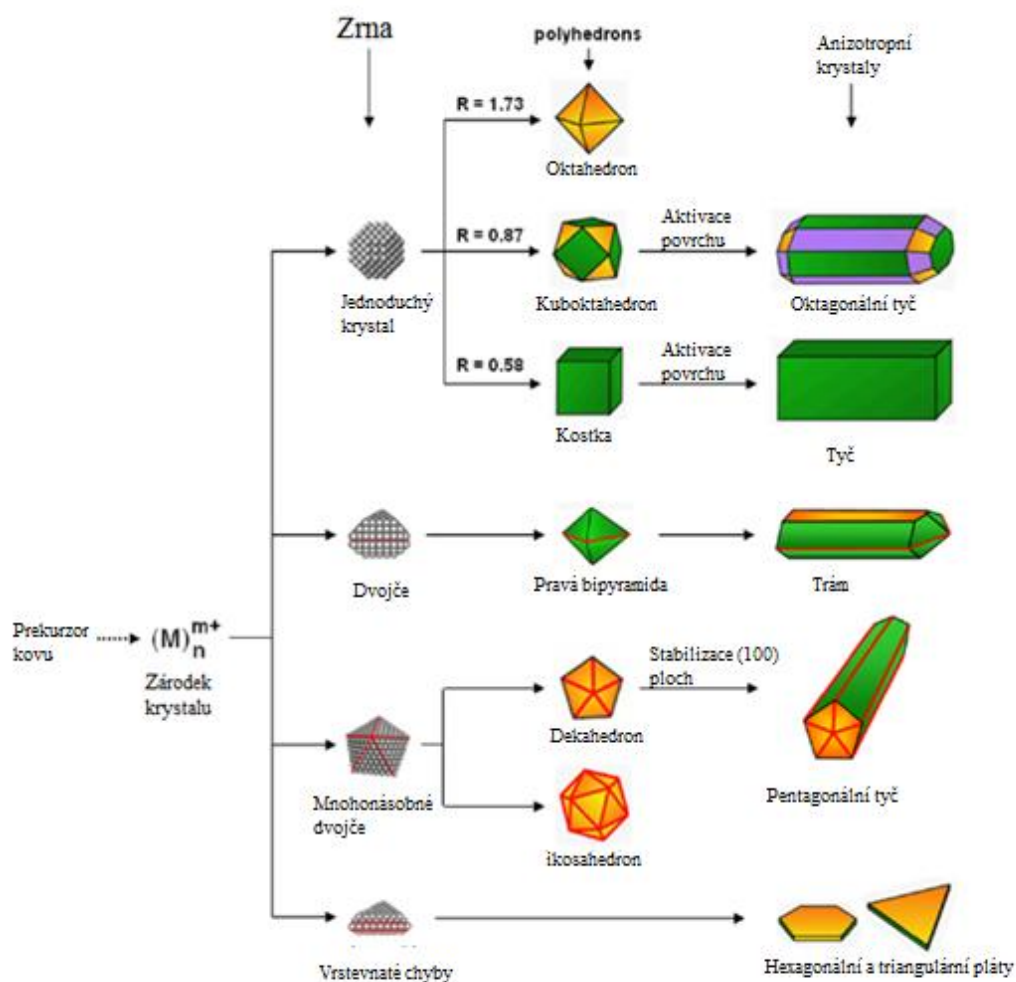


Obrázek 12: Struktura krystalové mřížky na povrchu nanočástic. Plochy (100) (a), plochy (111) (b).

Převzato z: (Kilin *et al.* 2008)



Obrázek 13: Morfologie AgNPs s krystalickými plochami (111) a jejich modely; Snímek ze SEM, vpravo dole: model; a) ikosahedron AgNPs, b) dvojče, c) dekahedron. (Morones *et al.* 2005).



Obrázek 14: Postupný vývoj tvarů NPs, které se odvíjejí od druhu zrna. Zelené plochy (100), oranžové plochy (111) a fialové plochy (110). $R = \text{Poměr množství ploch (111)/(100)}$. Zdroj obrázku: (Xia *et al.* 2009)

Plochy s Millerovým indexem (100) mají vyšší energii než plochy s indexem (111). To je důvod, proč mají nanosférické AgNPs s převládajícími plochami (111) slabší antibakteriální účinky než nanokostky, na kterých převládají plochy (100) (Hong *et al.* 2015; Xia *et al.* 2009). Naproti tomu nanosférické AgNPs s převládajícím povrchem (100) byly méně účinné než triangulární pláty s plochami (111) (Pal *et al.* 2007). Je to pravděpodobně dáno tím, že triangulární pláty mají vyšší povrchovou energii než ostatní tvary kvůli velkému povrchu a to i přes to, že se na nich vyskytuje především (111) plocha (Washio *et al.* 2006; Xia *et al.* 2009). Rovněž při charakterizování ploch AuNPs bylo zjištěno, že jejich účinné krystalické plochy se skládají především z (111) ploch (Annamalai *et al.* 2013; Zhang, Zheng, *et al.* 2011).

Zatím nejsou experimentálně ověřeny vlivy tvaru na antibakteriální efekty nanočástic jiných kovů, než je stříbro. Gopal a kol. ale provedli experiment s PtNPs, po kterém usoudili, že je možné, že u PtNPs bude mít vliv na antibakteriální účinek také tvar. PtNPs ve tvaru nanosfér totiž dokážou lépe proniknout skrze bakteriální poriny než PtNPs v podobě nanokostek (Gopal, Hasan, *et al.* 2013).

I v případě různých tvarů hraje svou roli specifický povrch a styk bakteriální membrány s NPs, což je patrné především u nanokabelů a nanotyčiček, které mají mnohem nižší baktericidní aktivitu, než nanokostky a nanosféry (Hong *et al.* 2015; Pal *et al.* 2007). To, že nanokabely mají oproti ostatním nanočásticím nižší antibakteriální efekt, lze přičítat menší ploše styku povrchů. Plocha styku povrchu AgNPs ve tvaru nanokabelu s povrchem bakterie je totiž kvůli rovnému a dlouhému tvaru nanokabelu značně omezená a tím pádem mají takové AgNPs sníženou možnost rozrušit membránu (Hong *et al.* 2015).

7.4 Působení nanočástic na gram-negativní a gram-pozitivní bakterie

Jak je zmíněno výše, pro antibakteriální účinky NPs je důležitý kontakt s povrchem bakterie. Tudíž je pro ně též důležité, jaký charakter má povrch buněčné stěny, nebo vnější membrány bakterií. Dalo by se předpokládat, že kvůli odlišným molekulám na povrchu budou určité rozdíly ve stupni inhibice mezi gram-negativními a gram-pozitivními bakteriálními buňkami.

Tato problematika je však nejasná. Dle některých publikovaných studií mezi inhibicí těchto dvou skupin bakterií pomocí AgNPs není velký rozdíl (Agnihotri *et al.* 2014; Bera *et al.* 2014; Shameli *et al.* 2012). Jiné studie prokázaly lepší antibakteriální účinky AgNPs na gram-negativní bakterie (dos Santos *et al.* 2012) a další naopak na gram-pozitivní (Shrivastava *et al.* 2007). AuNPs se ukázaly účinnější při styku s gram-pozitivními bakteriemi než s gram-negativními (Lokina *et al.* 2014).

Prozatím neexistuje ani jasný závěr týkající rozdílu míry antibakteriálních účinků CuNPs na gram-pozitivní a gram-negativní bakterie. Některé publikované studie prokázaly, že jsou k CuNPs odolnější gram-negativní bakterie (Ruparelia *et al.* 2008; Yoon *et al.* 2008), a v jiných, kde bylo

testováno několik gram-pozitivních a gram-negativních druhů, nebyl zřejmý žádný významný trend v míře antibakteriální aktivity v závislosti na charakteru povrchu buňky (Shende *et al.* 2015).

Tak význačné neshody v publikovaných studiích mohou být způsobeny různými experimentálními podmínkami a rozdílnými vlastnostmi NPs, které byly při pokusech použity. Je tudíž pravděpodobné, že mohou být nanočástice s odlišnými vlastnostmi různě specifické k různým bakteriím.

7.5 Vliv koncentrace nanočástic na jejich antibakteriální účinky

Dalším faktorem, který ovlivňuje antibakteriální účinek nanočástic, je jejich koncentrace, či spíše poměr jejich množství k počtu živých bakteriálních buněk.

Čím vyšší koncentrace NPs je v médiu přítomna, tím je antibakteriální efekt výraznější. (Agnihotri *et al.* 2014; Badwaik *et al.* 2012; Sondi a Salopek-Sondi 2004; Yoon *et al.* 2008). To, že je antibakteriální efekt závislý na koncentraci, se projeví například v tekutém médiu. Tam se AgNPs navazují na části mrtvých bakterií a postupně se v médiu začínají srážet v agregáty, které už baktericidní účinky nevykazují, čili koncentrace volných AgNPs, které mají antibakteriální účinky, v médiu postupně klesá. Proto je v médiu na začátku výrazná lag fáze, která je přímo úměrná koncentraci. Lag fáze trvá až do doby, kdy se koncentrace AgNPs vykazujících antibakteriální účinky sníží natolik, že bakteriální kultura může začít růst. K naprosté inhibici bakteriálního růstu v tekutém médiu je proto potřeba vyšší počáteční koncentrace účinných AgNPs. Musí být alespoň tak vysoká, aby dokázala zahubit všechny bakteriální buňky dříve, než se koncentrace AgNPs vykazujících antibakteriální aktivitu vinou agregace sníží (Shrivastava *et al.* 2007; Sondi a Salopek-Sondi 2004). Pro *E. coli* ve 100 ml komplexního média s 10^7 CFU/ml bylo toto iniciační množství AgNPs, po jehož přidání nedošlo k růstu ani po 24 hodinách, 10 μg triangulárních AgNPs; pro jiné tvary je tato koncentrace vyšší (Pal *et al.* 2007). MIC se pro bakteriální buňky *E. coli* o hustotě 10^5 - 10^6 CFU/ml může v závislosti na velikostech AgNPs pohybovat mezi 20 – 110 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AgNPs a pro *S. aureus* za stejných podmínek mezi 70-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Agnihotri *et al.* 2014).

MIC AuNPs je pro *S. aureus* 330 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a pro *S. typhi* 370 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Lokina *et al.* 2014). MIC CuNPs pro *E. coli* byl 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pro kulturu o hustotě 10^7 buněk/ml (Chatterjee *et al.* 2012).

Koncentrací NPs je možné ovlivnit také dobu, za kterou bude zcela inhibován růst bakteriální kultury. Rychlost antibakteriálního účinku CuNPs je závislá na koncentraci CuNPs, které jsou bakteriální buňky vystavené. Čím vyšší je koncentrace CuNPs, tím dříve jsou bakterie zahubeny (Deryabin *et al.* 2013).

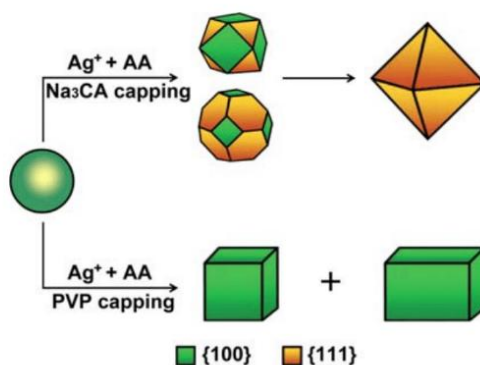
7.6 Vliv povrchových vlastností nanočástic na antibakteriální účinky nanočástic

Na antibakteriální účinek NPs by mohly mít kromě dalších vliv také jejich fyzikální vlastnosti, zejména jejich náboj, respektive zeta potenciál, a hydrofobicita.

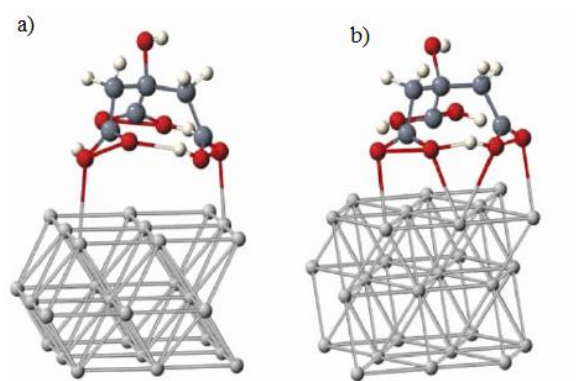
Povrchový náboj NPs lze odvodit z hodnoty zeta potenciálu (Bondar *et al.* 2012). Částice v roztoku jsou obklopeny ionty, které tvoří tzv. elektrickou dvojrstvu. Elektrická dvojrstva se skládá se dvou vrstev, vnitřní Sternovy vrstvy, ve které jsou ionty pevně vázané k částici, a vnější vrstvy, kde jsou ionty vázány slaběji. Povrchu elektrické dvojrstvy se říká rovina skluzu. Obě vrstvy s ionty jsou ale k tělesu přitahovány a při pohybu tělesa se od ní ani jedna z vrstev neodděluje. Elektrokinetický zeta potenciál je potenciálový rozdíl mezi okolním médiem a elektrickou dvojrstvou, tedy potenciál v místě, které se označuje jako rovina skluzu. Zeta potenciál má vždy opačné znaménko než ionty vnější vrstvy, je způsoben elektrickým nábojem nanočástice a závisí na pH a dalších vlastnostech prostředí, ve kterém se těleso nachází. Je-li hodnota zeta potenciálu 0, je částice v izoelektrickém bodě a má nejnižší stabilitu. Hodnota zeta potenciálu závisí u kovových nanočástic také na druhu molekuly, která obaluje její povrch (McNaught a Wilkinson 1997).

Obalové (stabilizační) molekuly na povrchu NPs jsou nutné pro jejich syntézu. Váží se na povrch NPs a obvykle jde o molekuly citrátu, PVP (polyvinylpyrrolidon), nebo BPEI (větvený polyethylenimin), ale mohou být použity i jiné molekuly (Ivask *et al.* 2014). Mezi nejúčinnější obalové molekuly na povrchu AgNPs mezi H₂, citrátem, PVP a BPEI, patří AgNPs s větveným polyethyleniminem (BPEI). Je tomu tak, jelikož NPs s BPEI na povrchu mají vysokou kladnou hodnotu zeta potenciál +41 mV, zatímco NPs s H₂, PVP, popřípadě s citrátem vykazují nižší hodnoty zeta potenciálu. Gram-pozitivní bakterie druhu *Bacillus* má v těchto podmínkách zeta potenciál ~-37 mV (El Badawy *et al.* 2011; Ivask *et al.* 2014). Nanočástice s kladnou hodnotou zeta potenciálu mají proto k zápornému zeta potenciálu povrchu bakterie vyšší afinitu, čili snadněji a lépe přilnou k její membráně. Pro silnější antibakteriální účinek je vhodnější, aby byl mezi hodnotou zeta potenciálu nanočástice a povrchem buňky co nejvýraznější rozdíl, což je důvod, proč měly nejvyšší antibakteriální efekt částice pokryté BPEI. Tento faktor však nemá na výslednou antibakteriální aktivitu nanočástic větší vliv, než je jejich tvar a velikost. Je to spíše tak, že po tom, co nanočástice prostoupí elektrostatickou bariéru mezi svým povrchem a povrchem bakteriální buňky, začnou mít vliv ostatní vlastnosti, jako je tvar a velikost AgNPs. Nutno však podotknout, že kromě náboje povrchu AgNPs musíme vzít vždy v potaz také náboj každé bakteriální membrány (Deryabin *et al.* 2013; El Badawy *et al.* 2011). Obalové molekuly jsou užívané i pro svůj stabilizační účinek na nanočástice. Bez jejich přítomnosti by nanočástice agregovaly a usazovaly se, což by snižovalo jejich antibakteriální účinek (El Badawy *et al.* 2010).

Obalové molekuly mohou rovněž zapříčinit změnu tvaru NPs (Obrázek 15). Změna tvaru se se odvíjí dle toho, na jaký druh povrchu NP se obalová molekula lépe váže a který stabilizuje. Příkladem může být citrát, který se preferenčně váže na (111) plochy AgNP, čímž tyto plochy stabilizuje. Důvody silnější vazby citrátu s (111) je způsoben tím, že molekula citrátu tvoří s atomy AgNP 4 vazby, naproti tomu s plochou (100) tvoří molekula citrátu pouze 2 vazby. Je tomu tak proto, že citrát a plocha (111) mají shodnou symetrii (Obrázek 16) (Kilin *et al.* 2008). To, že je preferenčně stabilizována plocha (111), vede ke krystalovému růstu ostatních ploch, které nejsou chráněné, a proto se na ně snadno adují molekuly atomů Ag. Díky tomu vznikají tvary AgNPs, na jejichž povrchu převládají (111) plochy, což může být například oktahedron (Zeng *et al.* 2010). Jako obalová molekula může sloužit také PVP. Na rozdíl od citrátu se váže na (100) plochy a nechává obnažené a nestabilizované ostatní plochy, které rostou (Sun *et al.* 2003). To způsobí změnu tvaru, ve kterém je hlavním druhem plochy (100), což je např. nanokostka. Tvar nanočástic je možné pomocí obalových molekul měnit také později. Přidáme-li k nanokostkám molekuly citrátu (v tomto případě $\text{Na}_3\text{-citrát}$), změní se nanokostka s převládajícími plochami (100) v oktahedron s plochami (111) (Zeng *et al.* 2010). Obalové molekuly mohou též ovlivňovat mechanismus účinku, viz kapitola 4.1.



Obrázek 15: Přeměna nano zrna ve sférickém tvaru na jiné tvary v přítomnosti různých obalových molekul. Citrát (Na_3CA) stabilizuje plochy (111), což má za následek tvorbu oktahedronu s převládajícími plochami (100). PVP stabilizuje plochy typu (100), což má za následek tvorbu nanokostek a nanotyčí s převládajícími plochami (100). Převzato z: (Zeng *et al.* 2010).



Obrázek 16: Vazby molekuly citrátu na různé plochy NPs. Vazba na plochu (100) dvěma vazbami (a); Vazba na plochu (111) čtyřmi vazbami (b). Červené atomy: kyslík, šedomodré: uhlík, bílé: vodík, šedé: atomy kovu. Převzato z: (Kilin *et al.* 2008).

U AuNPs se studovala i hydrofobicita jejich povrchů. Jsou-li povrchy AuNPs vysoce hydrofobní, budou na povrchu membrány agregovat mezi sebou a do buňky se nedostanou. Agregace AuNPs také vykazuje určité vzory, jež se liší dle toho, zda přijdou AuNPs do styku s povrchem gram-pozitivní, nebo gram-negativní bakterie. Na gram-pozitivní bakterii se tvoří agregáty rychleji, zatímco na gram-negativní se agregáty tvoří pomaleji a oproti agregátům gram-pozitivních bakterií jsou menší (Hayden *et al.* 2012).

8 Cytotoxicita

O cytotoxicitě některých nanočástic, zejména AgNPs, pro eukaryotní buňky existuje několik publikovaných studií a jsou o ní vedeny rozsáhlé diskuze. To, jak to skutečně je a jaké riziko se v kovových NPs skrývá, zatím nemá jasný závěr.

AgNPs byly shledány několika studiiemi v množství 100-150 $\mu\text{g/ml}$ jako cytotoxické (Fatima *et al.* 2015), zatímco jiné poukázaly na to, že cytotoxické v množství, kdy již vykazují antibakteriální aktivitu, nejsou (Gogoi *et al.* 2015; Mohanty *et al.* 2012). U AuNPs rovněž nemá zkoumání míry toxicity pro eukaryotní buňky zatím jasný výsledek. Některé studie je uvádějí, že AuNPs nevykazují žádnou cytotoxicitu (Fatima *et al.* 2015). Naproti tomu jiné studie prokázaly, že v malých velikostech (1,2-1,4 nm) AuNPs cytotoxické jsou, což napovídá tomu, že by tento faktor mohl mít vliv na cytotoxickou aktivitu stejně, jako má na antibakteriální (Pan *et al.* 2007). CuNPs dle jedné studie vykazují toxicitu pro eukaryotní buňky, v tomto případě proti hepatocytům (Gallyas *et al.* 2016). Avšak studií týkajících se cytotoxicity CuNPs a ostatních kovů zatím nebylo publikováno dost na to, aby bylo možné vyvodit jasný závěr.

9 Použití

Antibakteriální účinky, které nanočástice vykazují, mohou být využity různým způsobem také v praxi. Jejich využití do budoucna by mohlo přivést lepší obranu proti infekcím, které bakterie způsobují například v ústech, nebo by mohly efektivně zabraňovat usazování bakterií na povrchu nemocničních potřeb, či potravin.

Jedním ze způsobů, jakým lze AgNPs použít, je dekontaminace vody od bakteriálního znečištění. K tomu dopomáhá nanostruktura $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-Ag}$, ve které jsou AgNPs na povrchu částic Fe_3O_4 , které obaluje SiO_2 . Sloučenina SiO_2 chrání částice Fe_3O_4 před oxidací a pevně připojí AgNPs k jejímu povrchu. Tyto nanostruktury ve vodě působí jako účinná antibakteriální látka a jejich výhoda spočívá též v tom, že mohou být z vody snadno odstraněny pomocí magnetu (Zhang, Niu, *et al.* 2011).

Antibakteriální účinky AgNPs mohou mít řadu možností aplikace v medicínské praxi. Například by se daly použít jako antibakteriální povrchy obvazů a pro další biomedicínské materiály (Bera *et al.* 2014). Baktericidní efekt AgNPs byl rovněž úspěšně testován na aerobních i anaerobních bakteriích, které se nachází v ústní dutině. Výsledky napověděly, že by AgNPs mohly mít význam v dentálním lékařství, AgNPs byly totiž také testovány na bakteriích, které se nachází na povrchu zubů, a které byly účinkem AgNPs zahubeny. Proto by bylo možné předejít zubním kazům a parodontálním onemocněním. Kromě toho by mohly být AgNPs pokryté zubní implantáty a mohly by být používány i k výplachu úst (Lu *et al.* 2013). Jako alternativa v zubním lékařství proti tvorbě bakteriálního filmu by také mohly fungovat NiNPs, které prokázaly svou antibakteriální aktivitu proti bakteriím běžně se vyskytujícím v ústech (Khan *et al.* 2013). AgNPs mohou být rovněž inkorporovány do kanyl, čímž by bylo možné předejít vzniku biofilmu při podávání transfúzí. Tento antibakteriální efekt AgNPs byl ale zkoumán prozatím jen *in vitro* (Maki 2010). Některé navrhované aplikace AgNPs se v první řadě soustředí na jejich schopnost uvolňovat Ag^+ kationty. AgNPs jsou v tomto případě inkorporovány do plazmového polymeru ve formě SiO_x , či ve formě hexamethylidisiloxanu, díky kterému jsou z AgNPs kontinuálně uvolňovány kationty Ag^+ . Tímto povlakem by mohl být potahován například povrch implantátů, čímž by měly být chráněny před tvorbou biofilmu (Kuzminova *et al.* 2016).

AgNPs by též mohly být účinným pomocníkem v potravinářském průmyslu. Protože jsou účinné proti běžným patogenům, jako jsou *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia nematodiphila*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Vibrio parahaemolyticus*. Bylo by možné užívat je jako AgNPs pro dezinfekci potravin, pro jeho čištění, případně by AgNPs mohly být zaváděny do potravinových obalů, aby se předešlo zachycování bakterií. To by snížilo riziko kontaminace jídla bakteriemi, které by mohly způsobit infekci (Rajeshkumar a Malarkodi 2014; Zarei *et al.* 2014).

AgNPs jsou také efektivní v případě, že jsou umístěny na filtry z aktivovaných uhlíkových vláken, kde jsou AgNPs schopné inhibovat bakterie, které by potenciálně mohly proniknout do struktury filtru (Yoon *et al.* 2008). AgNPs mají též potenciál k využití v textilním průmyslu a mohly by být integrované například do textilií laboratorních plášťů (Xue *et al.* 2012). Dále by se antibakteriální aktivita AgNPs dala využít přidáním do nátěrů, které by se daly použít k pokrytí skla, dřeva, či dalších materiálů, čímž by se předešlo usazování bakterií na plochách (Kumar *et al.* 2008).

Protože AuNPs jsou uváděny jako vůbec, či málo cytotoxické pro eukaryotické buňky, existuje snaha navazovat na ně obalové molekuly v podobě běžných antibiotických molekul, jako je vancomycin, či amoxicillin. AuNPs, ke kterým byly připojené tyto antibiotické látky, prokázaly nižší MIC, než tyto antibiotické prostředky samotné, což neplatilo pouze pro běžné gram-pozitivní a gram-negativní bakterie, ale také pro bakterie jinak rezistentní na tato antibiotika a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. Možným důvodem pro lepší baktericidní účinek by mohla být vyšší možnost interakce bakteriálního povrchu s antibiotickou molekulou, která je navázána na povrchu AuNPs. (Kalita *et al.* 2016; Lai *et al.* 2015).

V ČR jsou v současné době vyráběny ponožky, trička a další textil s obsahem AgNPs, které slibují ochranu proti bakteriím. Ve světě jsou poté k dostání povlečení s AgNPs, plyšové hračky, deky a některé další produkty. Také jsou k dostání zubní pasty s přidanými AuNPs, jejich účinek však není ověřen (Project on Emerging Nanotechnologies" 2016).

10 Závěr

Kovové nanočástice mají prokázané antibakteriální účinky na mnoho bakteriálních druhů a to včetně kmenů, které jsou rezistentní k běžným antibiotickým látkám. Jako první interagují NPs s molekulami membrány, popřípadě s molekulami buněčné stěny bakterií a tyto molekuly poruší. NPs jsou schopny narušit elektrochemický transmembránový potenciál, mohou indukovat tvorbu ROS, jsou schopné uvolňovat toxické ionty a některé také dokážou interagovat s DNA. Antibakteriální účinky závisí na množství faktorů, které zahrnují druh kovu, tvar, velikost, hodnota zeta potenciálu, vlastnosti povrchu buňky a rovněž druh bakterií. Pomocí úpravy vlastností nanočástic by se jejich účinky daly přizpůsobit bakteriálním druhům, proti kterým bychom antibakteriální aktivitu vyžadovali, a které bychom chtěli zahubit. Větší počet zásahových míst pro NPs brání mikroorganismům rychlému vytvoření rezistence k NPs a proto jsou kovové nanočástice tak unikátním a perspektivním kandidátem pro budoucí boj s mikroorganismy. Zdaleka však ještě nejsou známy všechny procesy způsobené NPs do detailů. Zkoumat procesy, které způsobí NPs při svém styku s mikroorganismy, je totiž nesnadnou prací. Experimenty jsou prováděny za rozdílných podmínek a s jinými druhy či vlastnostmi kovových NPs, což mnohdy snižuje možnosti pochopení všech účinků. Lepšímu pochopení interakcí NPs s bakteriálními buňkami by též mohly pomoci dlouhodobější experimenty vedené *in vivo*, či testování NPs za standardizovaných podmínek.

Další z otázek, která NPs, zejména potom AgNPs, obklopuje, se týká jejich cytotoxicity. Odpověď je také pořád nejasná a k jednoznačnému závěru by se dalo dojít až po pochopení veškerých průběhů procesů, které NPs v eukaryotních buňkách proběhnou, jsou-li vystaveny působení NPs. Teprve poté, co budou známa potenciální rizika, budeme schopni odhadnout, jaký by mělo běžné používání NPs dopad na životní prostředí a zda stojí za to, i přes tuto potenciální hrozbu, riskovat a užívat kovové NPs v boji proti patogenním druhům bakterií.

11 Seznam použité literatury

- Agnihotri, S., S. Mukherji and S. Mukherji (2014). "Size-Controlled Silver Nanoparticles Synthesized over the Range 5–100 nm Using the Same Protocol and Their Antibacterial Efficacy." RSC Advances **4**(8): 3974-3983.
- Ameer Azam, F. A., Nishat Arshi, M. Chaman and A.H. Naqvi (2009). "One Step Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles and Their Antibacterial Activities against *E. coli* (ATCC 25922 Strain)." International Journal of Theoretical & Applied Sciences **1**(2): 1-4.
- Amin, M., S. Hameed, A. Ali, F. Anwar, S. A. Shahid, I. Shakir, A. Yaqoob, S. Hasan, S. A. Khan and R. Sajjad ur (2014). "Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Structural Features and *In Vivo* and *In Vitro* Therapeutic Effects against *Helicobacter pylori* Induced Gastritis." Bioinorganic Chemistry and Applications **2014**: 1-11.
- Annamalai, A., V. L. P. Christina, D. Sudha, M. Kalpana and P. T. V. Lakshmi (2013). "Green Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Au NPs Using *Euphorbia Hirta* L. Leaf Extract." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **108**: 60-65.
- Ansari, M. A., H. M. Khan, A. A. Khan, M. K. Ahmad, A. A. Mahdi, R. Pal and S. S. Cameotra (2014). "Interaction of Silver Nanoparticles with *Escherichia coli* and Their Cell Envelope Biomolecules." Journal of Basic Microbiology **54**(9): 905-915.
- Babushkina, I. V., I. A. Mamontova and E. V. Gladkova (2015). "Metal Nanoparticles Reduce Bacterial Contamination of Experimental Purulent Wounds." Bulletin of Experimental Biology and Medicine **158**(5): 692-694.
- Badwaik, V. D., L. M. Vangala, D. S. Pender, C. B. Willis, Z. P. Aguilar, M. S. Gonzalez, R. Paripelly and R. Dakshinamurthy (2012). "Size-Dependent Antimicrobial Properties of Sugar-Encapsulated Gold Nanoparticles Synthesized by a Green Method." Nanoscale Research Letters **7**(1): 623.
- Bera, R. K., S. M. Mandal and C. R. Raj (2014). "Antimicrobial Activity of Fluorescent Ag Nanoparticles." Letters in Applied Microbiology **58**(6): 520-526.
- Bindhu, M. R. and M. Umadevi (2014). "Silver and Gold Nanoparticles for Sensor and Antibacterial Applications." Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **128**: 37-45.
- Bondar, O. V., D. V. Saifullina, Shakhmaeva, II, Mavlyutova, II and T. I. Abdullin (2012). "Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells Upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers." Acta Naturae **4**(1): 78-81.
- Buerger, M. J. (1945). "The Genesis of Twin Crystals." American Mineralogist **30**: 469-482.

- Cui, Y., Y. Zhao, Y. Tian, W. Zhang, X. Lu and X. Jiang (2012). "The Molecular Mechanism of Action of Bactericidal Gold Nanoparticles on *Escherichia coli*." Biomaterials **33**(7): 2327-2333.
- Dasari Tp, S. and Z. Y (2015). "Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Gold (I) and (III) Ions and Gold Nanoparticles." Biochemistry & Pharmacology: Open Access **04**(06).
- Deryabin, D. G., E. S. Aleshina, A. S. Vasilchenko, T. D. Deryabina, L. V. Efremova, I. F. Karimov and L. B. Korolevskaya (2013). "Investigation of Copper Nanoparticles Antibacterial Mechanisms Tested by Luminescent *Escherichia coli* Strains." Nanotechnologies in Russia **8**(5-6): 402-408.
- dos Santos, C. A., A. F. Jozala, A. Pessoa Jr and M. M. Seckler (2012). "Antimicrobial Effectiveness of Silver Nanoparticles Co-Stabilized by the Bioactive Copolymer Pluronic F68." Journal of Nanobiotechnology **10**(1): 43.
- Dwyer, D. J., D. M. Camacho, M. A. Kohanski, J. M. Callura and J. J. Collins (2012). "Antibiotic-Induced Bacterial Cell Death Exhibits Physiological and Biochemical Hallmarks of Apoptosis." Molecular Cell **46**(5): 561-572.
- El Badawy, A. M., T. P. Luxton, R. G. Silva, K. G. Scheckel, M. T. Suidan and T. M. Tolaymat (2010). "Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions." Environmental Science & Technology **44**(4): 1260-1266.
- El Badawy, A. M., R. G. Silva, B. Morris, K. G. Scheckel, M. T. Suidan and T. M. Tolaymat (2011). "Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles." Environmental Science & Technology **45**(1): 283-287.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton and P. M. Henson (1992). "Exposure of Phosphatidylserine on the Surface of Apoptotic Lymphocytes Triggers Specific Recognition and Removal by Macrophages." The Journal of Immunology **148**(7): 2207-2216.
- Fatima, F., P. Bajpai, N. Pathak, S. Singh, S. Priya and S. Verma (2015). "Antimicrobial and Immunomodulatory Efficacy of Extracellularly Synthesized Silver and Gold Nanoparticles by a Novel Phosphate Solubilizing Fungus *Bipolaris tetramera*." BMC Microbiology **15**(1): 52.
- Feng, Q. L., J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim and J. O. Kim (2000). "A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*." Journal of Biomedical Materials Research **52**(4): 662-668.
- Gallyas, F., T. Wang, X. Chen, X. Long, Z. Liu and S. Yan (2016). "Copper Nanoparticles and Copper Sulphate Induced Cytotoxicity in Hepatocyte Primary Cultures of *Epinephelus coioides*." Plos One **11**(2): e0149484.
- Gogoi, N., P. J. Babu, C. Mahanta and U. Bora (2015). "Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Alcoholic Flower Extract of *Nyctanthes arbortristis* and *in Vitro* Investigation of Their Antibacterial and Cytotoxic Activities." Materials Science and Engineering: C **46**: 463-469.

- Gopal, J., N. Hasan, M. Manikandan and H.-F. Wu (2013). "Bacterial Toxicity/Compatibility of Platinum Nanospheres, Nanocuboids and Nanoflowers." Scientific Reports **3**.
- Gopal, J., M. Manikandan, N. Hasan, C.-H. Lee and H.-F. Wu (2013). "A Comparative Study on the Mode of Interaction of Different Nanoparticles During MALDI-MS of Bacterial Cells." Journal of Mass Spectrometry **48**(1): 119-127.
- Hayden, S. C., G. Zhao, K. Saha, R. L. Phillips, X. Li, O. R. Miranda, V. M. Rotello, M. A. El-Sayed, I. Schmidt-Krey and U. H. F. Bunz (2012). "Aggregation and Interaction of Cationic Nanoparticles on Bacterial Surfaces." Journal of the American Chemical Society **134**(16): 6920-6923.
- Holec, D. and P. H. Mayrhofer (2012). "Surface Energies of Aln Allotropes from First Principles." Scripta Materialia **67**(9): 760-762.
- Holt, K. B. and A. J. Bard (2005). "Interaction of Silver(I) Ions with the Respiratory Chain of *Escherichia coli*: An Electrochemical and Scanning Electrochemical Microscopy Study of the Antimicrobial Mechanism of Micromolar Ag⁺." Biochemistry **44**(39): 13214-13223.
- Hong, X., J. Wen, X. Xiong and Y. Hu (2015). "Shape Effect on the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Synthesized Via a Microwave-Assisted Method." Environmental Science and Pollution Research **23**(5): 4489-4497.
- Hook, J. R. and H. E. Hall (1991). Solid State Physics. Chichester ; New York, Wiley. ISBN 0471928046.
- Huisman, O., R. D'Ari and S. Gottesman (1984). "Cell-Division Control in *Escherichia coli*: Specific Induction of the SOS Function SfiA Protein Is Sufficient to Block Septation." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **81**(14): 4490-4494.
- Hwang, E. T., J. H. Lee, Y. J. Chae, Y. S. Kim, B. C. Kim, B.-I. Sang and M. B. Gu (2008). "Analysis of the Toxic Mode of Action of Silver Nanoparticles Using Stress-Specific Bioluminescent Bacteria." Small **4**(6): 746-750.
- Chatterjee, A. K., R. Chakraborty and T. Basu (2014). "Mechanism of Antibacterial Activity of Copper Nanoparticles." Nanotechnology **25**(13): 135101.
- Chatterjee, A. K., R. K. Sarkar, A. P. Chattopadhyay, P. Aich, R. Chakraborty and T. Basu (2012). "A Simple Robust Method for Synthesis of Metallic Copper Nanoparticles of High Antibacterial Potency against *E. coli*." Nanotechnology **23**(8): 085103.
- Choi, O. and Z. Hu (2008). "Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria." Environmental Science & Technology **42**(12): 4583-4588.
- Chwalibog, Sawosz, Hotowy, Szeliga, S. Mitura, K. Mitura, Grodzik, M. S. Orłowski and S. Professor (2010). "Visualization of Interaction between Inorganic Nanoparticles and Bacteria or Fungi." International Journal of Nanomedicine: 1085.
- Ivask, A., A. Elbadawy, C. Kaweeterawat, D. Boren, H. Fischer, Z. Ji, C. H. Chang, R. Liu, T. Tolaymat, D. Telesca, J. I. Zink, Y. Cohen, P. A. Holden and H. A. Godwin (2014). "Toxicity Mechanisms in

- Escherichia coli* Vary for Silver Nanoparticles and Differ from Ionic Silver." ACS Nano **8**(1): 374-386.
- Jung, J. H., H. Cheol Oh, H. Soo Noh, J. H. Ji and S. Soo Kim (2006). "Metal Nanoparticle Generation Using a Small Ceramic Heater with a Local Heating Area." Journal of Aerosol Science **37**(12): 1662-1670.
- Kalita, S., R. Kandimalla, K. K. Sharma, A. C. Katakai, M. Deka and J. Kotoky (2016). "Amoxicillin Functionalized Gold Nanoparticles Reverts MRSA Resistance." Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications **61**: 720-727.
- Kar, S., B. Bagchi, B. Kundu, S. Bhandary, R. Basu, P. Nandy and S. Das (2014). "Synthesis and Characterization of Cu/Ag Nanoparticle Loaded Mullite Nanocomposite System: A Potential Candidate for Antimicrobial and Therapeutic Applications." Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects **1840**(11): 3264-3276.
- Kawata, K., M. Osawa and S. Okabe (2009). "In Vitro Toxicity of Silver Nanoparticles at Noncytotoxic Doses to HepG2 Human Hepatoma Cells." Environmental Science & Technology **43**(15): 6046-6051.
- Khan, S. T., M. Ahamed, H. A. Alhadlaq, J. Musarrat and A. Al-Khedhairi (2013). "Comparative Effectiveness of NiCl₂, Ni- and NiO-NPs in Controlling Oral Bacterial Growth and Biofilm Formation on Oral Surfaces." Archives of Oral Biology **58**(12): 1804-1811.
- Kilin, D. S., O. V. Prezhdo and Y. Xia (2008). "Shape-Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles: Study of Preferential Surface Coordination with Citric Acid." Chemical Physics Letters **458**(1-3): 113-116.
- Kitagawa, M., Y. Matsumura and T. Tsuchido (2000). "Small Heat Shock Proteins, IbpA and IbpB, Are Involved in Resistances to Heat and Superoxide Stresses in *Escherichia coli*." FEMS Microbiology Letters **184**(2): 165-171.
- Kumar, A., P. K. Vemula, P. M. Ajayan and G. John (2008). "Silver-Nanoparticle-Embedded Antimicrobial Paints Based on Vegetable Oil." Nature Materials **7**(3): 236-241.
- Kuzminova, A., J. Beranová, O. Polonskyi, A. Shelemin, O. Kylián, A. Choukourov, D. Slavínská and H. Biederman (2016). "Antibacterial Nanocomposite Coatings Produced by Means of Gas Aggregation Source of Silver Nanoparticles." Surface and Coatings Technology **294**: 225-230.
- Lai, H. Z., W. Y. Chen, C. Y. Wu and Y. C. Chen (2015). "Potent Antibacterial Nanoparticles for Pathogenic Bacteria." ACS Applied Materials & Interfaces **7**(3): 2046-2054.
- Lee, W., K.-J. Kim and D. G. Lee (2014). "A Novel Mechanism for the Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles on *Escherichia coli*." BioMetals **27**(6): 1191-1201.

- Li, W.-R., X.-B. Xie, Q.-S. Shi, H.-Y. Zeng, Y.-S. Ou-Yang and Y.-B. Chen (2009). "Antibacterial Activity and Mechanism of Silver Nanoparticles on *Escherichia coli*." Applied Microbiology and Biotechnology **85**(4): 1115-1122.
- Li, X., S. M. Robinson, A. Gupta, K. Saha, Z. Jiang, D. F. Moyano, A. Sahar, M. A. Riley and V. M. Rotello (2014). "Functional Gold Nanoparticles as Potent Antimicrobial Agents against Multi-Drug-Resistant Bacteria." ACS Nano **8**(10): 10682-10686.
- Liau, S. Y., D. C. Read, W. J. Pugh, J. R. Furr and A. D. Russell (1997). "Interaction of Silver Nitrate with Readily Identifiable Groups: Relationship to the Antibacterial Action of Silver Ions." Letters in Applied Microbiology **25**(4): 279-283.
- Lima, E., R. Guerra, V. Lara and A. Guzman (2013). "Gold Nanoparticles as Efficient Antimicrobial Agents for *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*." Chemistry Central Journal **7**(1): 11.
- Liu, J. and R. H. Hurt (2010). "Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids." Environmental Science & Technology **44**(6): 2169-2175.
- Lok, C.-N., C.-M. Ho, R. Chen, Q.-Y. He, W.-Y. Yu, H. Sun, P. K.-H. Tam, J.-F. Chiu and C.-M. Che (2007). "Silver Nanoparticles: Partial Oxidation and Antibacterial Activities." JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry **12**(4): 527-534.
- Lok, C. N., C. M. Ho, R. Chen, Q. Y. He, W. Y. Yu, H. Sun, P. K. Tam, J. F. Chiu and C. M. Che (2006). "Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles." Journal of Proteome Research **5**(4): 916-924.
- Lokina, S., R. Suresh, K. Giribabu, A. Stephen, R. Lakshmi Sundaram and V. Narayanan (2014). "Spectroscopic Investigations, Antimicrobial, and Cytotoxic Activity of Green Synthesized Gold Nanoparticles." Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **129**: 484-490.
- Loo, S.-L., W. B. Krantz, A. G. Fane, Y. Gao, T.-T. Lim and X. Hu (2015). "Bactericidal Mechanisms Revealed for Rapid Water Disinfection by Superabsorbent Cryogels Decorated with Silver Nanoparticles." Environmental Science & Technology **49**(4): 2310-2318.
- Lu, Z., K. Rong, J. Li, H. Yang and R. Chen (2013). "Size-Dependent Antibacterial Activities of Silver Nanoparticles against Oral Anaerobic Pathogenic Bacteria." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **24**(6): 1465-1471.
- Maki, Dennis G. (2010). "In Vitro Studies of a Novel Antimicrobial Luer-Activated Needleless Connector for Prevention of Catheter-Related Bloodstream Infection." Clinical Infectious Diseases **50**(12): 1580-1587.
- McNaught, A. D. and A. Wilkinson "IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd Ed. (the "Gold Book")." [online]. 1997 [cit. 25.7. 2016]. Dostupné z: <http://10.1351/goldbook.E01968>.
- Miller, W. H. (1839). A Treatise on Crystallography, For J. & J. J. Deighton. ISBN 0554774194.

- Mirnikjoo, B., K. Balasubramanian and A. J. Schroit (2009). "Mobilization of Lysosomal Calcium Regulates the Externalization of Phosphatidylserine During Apoptosis." The Journal of Biological Chemistry **284**(11): 6918-6923.
- Mohanty, S., S. Mishra, P. Jena, B. Jacob, B. Sarkar and A. Sonawane (2012). "An Investigation on the Antibacterial, Cytotoxic, and Antibiofilm Efficacy of Starch-Stabilized Silver Nanoparticles." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **8**(6): 916-924.
- Morones, J. R., J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez and M. J. Yacaman (2005). "The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles." Nanotechnology **16**(10): 2346-2353.
- Mukherjee, P., A. Ahmad, D. Mandal, S. Senapati, S. R. Sainkar, M. I. Khan, R. Parishcha, P. V. Ajaykumar, M. Alam, R. Kumar and M. Sastry (2001). "Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis." Nano Letters **1**(10): 515-519.
- Pal, S., Y. K. Tak and J. M. Song (2007). "Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*." Applied and Environmental Microbiology **73**(6): 1712-1720.
- Pan, Y., S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau and W. Jahnen-Dechent (2007). "Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles." Small **3**(11): 1941-1949.
- Panacek, A., L. Kvittek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, V. K. Sharma, T. Nevecna and R. Zboril (2006). "Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity." The Journal of Physical Chemistry B **110**(33): 16248-16253.
- Project on Emerging Nanotechnologies." [online]. 2016 [cit. 13.6. 2016]. Dostupné z: <http://www.nanotechproject.org/cpi>.
- Rajeshkumar, S. and C. Malarkodi (2014). "In Vitro Antibacterial Activity and Mechanism of Silver Nanoparticles against Foodborne Pathogens." Bioinorganic Chemistry and Applications **2014**: 581890.
- Ruparelia, J. P., A. K. Chatterjee, S. P. Duttgupta and S. Mukherji (2008). "Strain Specificity in Antimicrobial Activity of Silver and Copper Nanoparticles." Acta Biomaterialia **4**(3): 707-716.
- Samberg, M. E., P. E. Orndorff and N. A. Monteiro-Riviere (2010). "Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles of Different Sizes, Surface Conditions and Synthesis Methods." Nanotoxicology **5**(2): 244-253.
- Sawosz, E., A. Chwalibog, J. Szeliga, F. Sawosz, M. Grodzik, M. Rupiewicz, T. Niemiec and K. Kacprzyk (2010). "Visualization of Gold and Platinum Nanoparticles Interacting with *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*." International Journal of Nanomedicine **5**: 631-637.

- Shameli, K., M. B. Ahmad, S. D. Jazayeri, P. Shabanzadeh, P. Sangpour, H. Jahangirian and Y. Gharayebi (2012). "Investigation of Antibacterial Properties Silver Nanoparticles Prepared Via Green Method." Chemistry Central Journal **6**(1): 73.
- Shende, S., A. P. Ingle, A. Gade and M. Rai (2015). "Green Synthesis of Copper Nanoparticles by Citrus medica Linn. (Idilimbu) Juice and Its Antimicrobial Activity." World Journal of Microbiology and Biotechnology **31**(6): 865-873.
- Shrivastava, S., T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao and D. Dash (2007). "Characterization of Enhanced Antibacterial Effects of Novel Silver Nanoparticles." Nanotechnology **18**(22): 225103.
- Silver, S., L. T. Phung and G. Silver (2006). "Silver as Biocides in Burn and Wound Dressings and Bacterial Resistance to Silver Compounds." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **33**(7): 627-634.
- Singh, P., Y. J. Kim and D. C. Yang (2015). "A Strategic Approach for Rapid Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles by Panax ginseng Leaves." Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology: 1-9.
- Sondi, I. and B. Salopek-Sondi (2004). "Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agent: a Case Study on *E. coli* as a Model for Gram-negative Bacteria." Journal of Colloid and Interface Science **275**(1): 177-182.
- Sotiriou, G. A. and S. E. Pratsinis (2010). "Antibacterial Activity of Nanosilver Ions and Particles." Environmental Science & Technology **44**(14): 5649-5654.
- Stoffels, K., C. Allix-Beguec, G. Groenen, M. Wanlin, D. Berkvens, V. Mathys, P. Supply and M. Fauville-Dufaux (2013). "From Multidrug- to Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: Upward Trends as Seen from a 15-Year Nationwide Study." Plos One **8**(5): e63128.
- Sun, Y., B. Mayers, T. Herricks and Y. Xia (2003). "Polyol Synthesis of Uniform Silver Nanowires: A Plausible Growth Mechanism and the Supporting Evidence." Nano Letters **3**(7): 955-960.
- Sun, Y. and Y. Xia (2002). "Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles." Science **298**(5601): 2176-2179.
- Tilley, R. J. D. (2006). Crystals and Crystal Structures, Wiley. ISBN 9780470029534.
- To, Q. D., G. Bonnet and V. T. To (2013). "Closed-Form Solutions for the Effective Conductivity of Two-Phase Periodic Composites with Spherical Inclusions." Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences **469**(2151).
- Vávra, V. and Z. Losos "Všeobecná Mineralogie." [online]. 2011 [cit. 6.8. 2016]. Dostupné z: <http://mineralogie.sci.muni.cz>.
- Washio, I., Y. Xiong, Y. Yin and Y. Xia (2006). "Reduction by the End Groups of Poly(Vinyl Pyrrolidone): A New and Versatile Route to the Kinetically Controlled Synthesis of Ag Triangular Nanoplates." Advanced Materials **18**: 1745–1749.

- Wen, Y.-N. and J.-M. Zhang (2007). "Surface Energy Calculation of the Fcc Metals by Using the MAEAM." Solid State Communications **144**(3–4): 163-167.
- Xia, Y., Y. Xiong, B. Lim and S. E. Skrabalak (2009). "Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics?" Angewandte Chemie (International ed. in English) **48**(1): 60-103.
- Xiu, Z.-m., Q.-b. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin and P. J. J. Alvarez (2012). "Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles." Nano Letters **12**(8): 4271-4275.
- Xue, C.-H., J. Chen, W. Yin, S.-T. Jia and J.-Z. Ma (2012). "Superhydrophobic Conductive Textiles with Antibacterial Property by Coating Fibers with Silver Nanoparticles." Applied Surface Science **258**(7): 2468-2472.
- Yoon, K. Y., J. H. Byeon, C. W. Park and J. Hwang (2008). "Antimicrobial Effect of Silver Particles on Bacterial Contamination of Activated Carbon Fibers." Environmental Science & Technology **42**(4): 1251-1255.
- Zarei, M., A. Jamnejad and E. Khajehali (2014). "Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles against Four Foodborne Pathogens." Jundishapur Journal of Microbiology **7**(1): e8720.
- Zeng, J., Y. Zheng, M. Rycenga, J. Tao, Z. Y. Li, Q. Zhang, Y. Zhu and Y. Xia (2010). "Controlling the Shapes of Silver Nanocrystals with Different Capping Agents." Journal of the American Chemical Society **132**(25): 8552-8553.
- Zhang, W., Y. Li, J. Niu and Y. Chen (2013). "Photogeneration of Reactive Oxygen Species on Uncoated Silver, Gold, Nickel, and Silicon Nanoparticles and Their Antibacterial Effects." Langmuir **29**(15): 4647-4651.
- Zhang, X., H. Niu, J. Yan and Y. Cai (2011). "Immobilizing Silver Nanoparticles onto the Surface of Magnetic Silica Composite to Prepare Magnetic Disinfectant with Enhanced Stability and Antibacterial Activity." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **375**(1-3): 186-192.
- Zhang, Y., Zheng, guo and Wang (2011). "Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using Chloroplasts." International Journal of Nanomedicine: 2899.
- Zhao, Y., Y. Tian, Y. Cui, W. Liu, W. Ma and X. Jiang (2010). "Small Molecule-Capped Gold Nanoparticles as Potent Antibacterial Agents That Target Gram-negative Bacteria." Journal of the American Chemical Society **132**(35): 12349-12356.
- Zhou, Y., Y. Kong, S. Kundu, J. D. Cirillo and H. Liang (2012). "Antibacterial Activities of Gold and Silver Nanoparticles against *Escherichia coli* and *Bacillus Calmette-Guerin*." Journal of Nanobiotechnology **10**: 19.