

# STUDIUM BIOCIDNÍCH ÚČINKŮ NANOČÁSTIC STŘÍBRA

**Jana Řihová Ambrožová, Pavlína Čiháková, Vladimíra Škopová**

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav technologie vody a prostředí, Technická 5,  
166 28 Praha 6, e-mail: jana.ambrozova@vscht.cz, pavlina.adamkova@vscht.cz,  
skopovav@vscht.cz*

## **Abstract: The study of the nanoAg particles biocid effects**

Nanoparticles and nanomaterials have found applying in many communication industries, in medicine and households. Silver nanoparticles have especial position among nanoparticles thanks unique catalytic quality, optical quality and high biocide activities. Disinfection quality of silver is significantly exploited in elimination of microbial contamination e.g. bacteria species *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio* sp. etc. As well, the frequent applications of nanoparticles in practice there are attached with much discussed hazards. Nanoparticles can enter the environment by various ways, and there pose hazard for organisms. The effectivity of silver containing commercial preparations was tested on culture of chlorococcal alga *Desmodesmus quadricauda* and species of bacteria *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*. Preparations, containing silver nanoparticles, have shown high effect of alga elimination in solution and on material surface.

**Key words:** *biodeterioration, nanosilver, toxicity, bacteria and algae, environment*

## **1. ÚVOD**

Pracoviště VŠCHT Praha se podílí na řešení projektu č. DF11P01OVV012, který je zaměřený na *Materiály a technologie pro záchranu a zachování kulturního dědictví Programu NAKI*. Jedním z cílů projektu je vývoj nových materiálů a nanotechnologií, které by byly na bázi biocidních prostředků o zvýšené účinnosti a zároveň byly šetrné k ošetřovanému materiálu i k životnímu prostředí. Pracoviště ÚFCH J. Heyrovského AV ČR, v.v.i. Praha se zaměřuje na přípravu nanočástic kovů (primárně stříbra), pracoviště Ústavu technologie vody a prostředí VŠCHT Praha následně zjišťuje účinnost a působení vyvinutých roztoků s nanočásticemi na zkušebních organismech. Jelikož je projekt č. DF11P01OVV012 směřovaný na ochranu stavebních památek před jejich biodeteriorací, byly prováděny akvatické testy zejména na řasách (chlorokokálních a vláknitých) a vybraných druzích bakterií (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*). Testovány byly i případné biocidní účinky na plísně a jejich spory vyskytující se v ovzduší. Následujícím stupněm testování účinnosti nanočástic, které v současné době probíhají, jsou testy zaměřené na reálné matrice vzorků povrchových (eutrofních) a odpadních vod (včetně čistírenských kalů).

### **1.1 Nanočástice stříbra**

Nanočástice kovů, v porovnání s běžnými částicemi kovů, mají větší inhibiční účinek a potenciál na odstranění chemického a mikrobiálního znečištění. Nanočástice mají zajímavé vlastnosti závislé na jejich velikosti, mají extrémně velkou plochu, která poskytuje lepší kontakt s mikroorganismy. Čím jsou částice menší, tím silnější je jejich katalytická aktivita (PANYALA et al. 2008). Trendem současnosti je používání nanočástic stříbra, které se aplikují v nanovrstvě na povrch ošetřovaného materiálu. Nanočástice stříbra jsou silně fungicidní, algicidní a baktericidní a to již v relativně nízkých dávkách, díky čemuž je lze použít v medicíně, zdravotní péči, ve farmakologii na výrobu antibakteriálních látek a dezinfekčních činidel. Nanostříbro se přidává do komponent, které jsou součástí praček, ledniček, robotických vysavačů a klimatizačních zařízení, používá se v elektronice, při instalaci vedení (přípojky v mikroelektronice) a minimalizaci elektronických zařízení a obvodů. Nanočástice stříbra jsou součástí klimatizačních jednotek, některých HEPA filtrů (provozy s vysokými nároky na čistotu vzduchu), filtrů osazených v kabinách dopravních prostředků (letadla, auta). Nanočástice stříbra se úspěšně přidávají v podobě prášku do barev a materiálů ve stavebnictví, čímž se prodlužuje životnost

materiálu a často se oddaluje působení koroze. Tento způsob aplikací lze využít i v ochraně památek (ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ et al. 2014).

## 1.2 Působení stříbra na organismy

Není přesně známo, zda je toxický efekt způsoben vlastní nanočásticí nebo je to způsobeno vznikajícími stříbrnými ionty (NAVARRO et al. 2008). Toxické účinky stříbra na mikroorganismy mají nejen samotné stříbrné ionty, ale i sloučeniny obsahující stříbro (KIM et al. 2007). V přítomnosti kyslíku je kovové stříbro také baktericidní, protože oxid stříbrný je dostatečně rozpustný a uvolňuje volné ionty  $Ag^+$ . Dosavadní výzkum prokázal, že toxicita stříbra zřejmě souvisí se zastoupením jeho jednotlivých forem spíše než s jeho celkovou koncentrací. Existence různých druhů forem stříbra závisí na fyzikálně-chemických environmentálních podmínkách (RATTE 1999). Přítomnost látek, s nimiž se mohou tvořit kovalentní, koloidní, nebo komplexní vazby, ovlivňuje do značné míry také účinky stříbra. Obecně platí, že přítomnost komplexotvorných látek, teplota, nebo tvrdost vody (zejména přítomnost  $Ca^{2+}$ ) ovlivňuje toxicitu kovů (RATTE 1999, OUKARROUM et al. 2011). Některé studie uvádějí, že rozhodujícím faktorem pro toxicitu stříbra je kladný náboj iontu. Vlivem elektrostatické přitažlivosti mezi kladně nabitým stříbrem a záporně nabitým povrchem buněčné membrány dojde k navázání částice na povrch buňky (KIM et al. 2007).

Nanočástice, které projdou buněčnou stěnou, mohou poškodit vnitřní struktury buňky, toto působení však závisí na druhu daného organismu. Toxicita stříbra na gramnegativní bakterie závisí na koncentraci nanočástic a velmi úzce souvisí s polopropustností buněčné membrány (SONDI & SALOPEK-SONDI 2004). Toxickým působením může dojít ke vzniku nepravidelných pórů ve vnější membráně a tím ke změně její propustnosti, což je způsobeno uvolňováním lipopolysacharidových molekul a membránových proteinů (KIM et al. 2007). Stříbrné ionty inhibují enzymy nitrifikačních bakterií pro cykly fosforu, síry a dusíku (RATTE 1999). Grampozitivní bakterie mají větší odolnost vůči nanočásticím stříbra v porovnání s gramnegativními bakteriemi, což je dáno stavbou buněčné stěny a přítomností či nepřítomností extracelulárních polymerů (JUNG et al. 2008, YANG et al. 2012). Rezistence, adaptace a citlivost mikroorganismů vůči kovům stříbra není přesně známá a je zavádějící ji i obecně specifikovat (WU et al. 2010).

Antimikrobiální aktivita stříbra se projevuje na několika úrovních. Nanočástice stříbra mohou poškodit buněčnou stěnu buď samotným vlastním působením nebo uvolněním iontů stříbra nebo tvorbou reaktivních kyslíkových forem (CHOI et al. 2008). Za přímý mechanismus účinku nanočástic stříbra je považováno poškození buněčné stěny, jako nepřímý účinek je brána tvorba reaktivních kyslíkových forem a uvolňování iontů z částice (SIRIPATTANAKUL-RATPUKDI & FÜRHACKER 2014). Buňka chráněná obaly zůstává nadále vitální, stříbro působí nejprve bakteriostaticky, teprve dalším zvyšováním koncentrace roztoků s ionty stříbra se jeho účinek mění na baktericidní. Přítomnost buněčné stěny ovlivňuje citlivost mikroorganismů na působení stříbra (OUKARROUM et al. 2011). Zvýšený podíl stříbra se sorbuje na povrchu buňky, proniká dovnitř a akumuluje se v cytoplazmatické membráně, kde jsou přítomny hlavní enzymatické systémy buňky. Stříbrné nanočástice generují uvnitř mikroorganismů volné radikály, které ničí buněčné funkce (KIM et al. 2007). Stříbro blokuje elektronový přenos mezi enzymy dýchacího řetězce a reaguje s -SH- skupinami oxidačních enzymů, tím se zastavuje intenzivní metabolismus buňky a buňka postupně odumírá (WU et al. 2010).

Stříbrné nanočástice mají selektivní inhibiční účinek na řasy a sinice (PARK et al. 2010). Buněčná stěna řas představuje primární místo interakce a bariéru pro vstup nanočástic. Skládá se z celulózy, polysacharidů a glykoproteinů, což jsou látky, které poskytují prostřednictvím nespecifické interakce vazebná místa pro nanočástice. Vlivem interakce mezi nanočásticí a buněčnou stěnou může dojít k poškození buněčné membrány (NAVARRO et al. 2008). Nanočástice se také adsorbují na buněčném povrchu, což má za následek stínící efekt či zvýšení hmotnosti. Oba efekty snižují dostupnost světla pro fotosyntézu. U různých druhů organismů byla pozorována indukce oxidativního stresu a toxické působení na fotosystém II. Při oxidativním stresu byla zaznamenána snížená exprese genu kódujícího malou podjednotku

fotosyntetického enzymu. Buňky vystavené oxidativnímu stresu mají poškozené proteiny, nižší mastné kyseliny i DNA, zvýšený podíl peroxidovaných mastných kyselin, a toto vede k nezvratnému poškození až ke smrti (OUKARROUM et al. 2012, KŘÍŽKOVÁ et al. 2009, HIRIART-BAER et al. 2006).

## 2. MATERIÁL A METODIKA

Před vlastním testováním laboratorně vyvinutých koloidních roztoků s nanočásticemi stříbra byl nejprve prozkoumán trh s dostupnými komerčními výrobky reklamujícími přítomnost nanočástic stříbra, koloidního anebo iontového stříbra. Testovány byly např. přípravky Deargen-200, koloidní stříbro, Silver Water, Antibakterin Strong, Silver Sanitex, Silver Protect a Bioteq. Bylo zjištěno, že na výslednou toxicitu má vliv koncentrace a velikost částic a složení jednotlivých přípravků. V rámci vodní expozice bylo již dříve prokázáno, že nanočástice mohou být více toxické než odpovídající ionty. Laboratorními testy inhibice růstu řas a případné eliminace fototrofních organismů bylo ověřeno, že nejvyšší toxicitu vykazuje přípravek, který obsahuje nanočástice stříbra s větší reakční plochou než ostatní částice. Komerčně dostupné přípravky s částicemi stříbra vykazovaly účinnost eliminace i fototrofních nárostů na exponovaných plochách *in situ* v terénu (ADÁMKOVÁ & ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ 2013, ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ et al. 2014a). Po uskutečnění testů se zkušebními organismy na komerčních přípravcích byly testům podrobeny laboratorně připravené roztoky nanočástic (viz 2.1) na zkušebních organismech, kterými byly řasy (viz 2.2), bakterie (viz 2.3) a plísně (viz 2.4).

### 2.1 Roztoky nanočástic

Pro testování biocidního účinku stříbra byly pracovištěm Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i. Praha připraveny nanočástice stříbra o velikosti v rozsahu od 5 nm do 70 nm pomocí Tollensovy metody (redukce stříbrné soli pomocí borohydridu). Tímto postupem lze získat nanočástice kovů o velmi malých rozměrech. Tollensova metoda byla modifikována tak, aby byl dosažen ekologicky šetrný roztok, který by obsahoval nanočástice příslušného kovu. Modifikace spočívá ve využití sacharidů jako redukující látky, z cukrů byly využity monosacharidy glukóza, galaktóza, xylóza a disacharidy maltóza a laktóza. Pro testy byly použity roztoky nanočástic definované velikosti s následujícím označením: NANOAgB1 (5 nm), NANOAgB2 (9 nm), NANOAgGL1 (20 nm), NANOAgM1 (37 nm), NANOAgL1 (43 nm), NANOAgX500 (64 nm) a NANOAgG1 (70 nm). Pro testy inhibice byly vždy připraveny stejné koncentrace roztoků, aby bylo možné výsledky mezi sebou vzájemně porovnávat. Jednalo se o koncentrace  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $18,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (koncentrace byly zvoleny na základě předběžných testů a dále již publikovaných výsledků testů, viz ADÁMKOVÁ & ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ 2013).

### 2.2 Testy na řasách

Biocidní účinek nanočástic stříbra byl testován na vybraných druzích chlorokokálních a vláknitých zelených řas. Klasický test toxicity, zaměřený na zjištění účinnosti inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus quadricauda* (kmen GREIFSWALD 15), byl na základě ČSN EN ISO 8692 modifikován. Nanočástice mohou adsorbovat živiny z media a tím inhibovat růst řas (ARUOJA et al. 2009). Ve vodě (prakticky ve všech vodných roztocích) dochází k agregaci nanočástic, ta je závislá jednak na koncentraci částic, ale také na hodnotě pH, iontové síle, koncentraci a složení přírodní organické hmoty a dalších charakteristikách (OUKARROUM et al. 2012). Modifikace klasického testu spočívá ve volbě jiného typu zředovací vody (zde Knoppův roztok), zvýšení výchozí koncentrace řasového inokula (80 tisíc cenobií) a zvolení menšího objemu testovaného roztoku (25 ml). Knoppův roztok byl zvolen, aby se zabránilo reakci preparátu se zředovacím médiem a tím pádem i případné interferenci složek v roztoku. Tento typ zředovací vody obsahuje v předepsaném poměru sloučeniny  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{FeCl}_3$ . Součástí mikroskopického vyhodnocení vzorků bylo použití fluorescenčního nástavce s cílem posoudit vitalitu buněk na základě autofluorescence chlorofylu-a. Celistvost buněčné stěny byla pozorována po obarvení Calcofluor White pod fluorescenčním nástavcem

mikroskopu. V závislosti na kultivačních podmínkách a teplotě bylo pozorováno i shlukování částic, proto bylo zavedeno i stanovení koncentrace chlorofylu-a (dle ČSN ISO 10 260), jako dalšího údaje vypovídajícího o případné stimulaci či inhibici biomasy a růstu řas.

Pro řasové testy toxicity byly na našem pracovišti při řešení projektu použity také vláknité řasy rodů *Ulothrix*, *Spirogyra*, *Klebsormidium* a *Stigeoclonium* (ADÁMKOVÁ et al. 2013b). Průběh i vyhodnocení testů je mnohem složitější, než testy na chlorokokálních řasách a nelze použít stejný způsob hodnocení, jako u chlorokokálních řas. Testy na chlorokokálních řasách vychází z uzanční normy ČSN EN ISO 8692 spočívající v kvantifikaci buněk řas v testovaném objemu a na základě inhibice růstu buněk zjištění inhibičního účinku. Vláknité řasy jsou diskutabilní zkušební organismy, provedení zkoušky toxicity podle tohoto schématu není snadné. U organismu není jednoznačná kvantifikace (stélka, buňka) a způsob aplikace inokula ke vzorku. Řešením, které se nabízí, je založení testu na stanovení koncentrace chlorofylu-a a její případná inhibice či stimulace pro test toxicity. Jelikož druhy vláknitých zelených řas nejsou individuálními buňkami, jako chlorokokální řasy, ale jsou tvořeny několika buňkami umístěnými ve vláknech (trichální stélka), je potřeba respektovat delší generační dobu a zvolit delší dobu expozice testu.

### 2.3 Testy na bakteriích

Testy s nanočásticemi stříbra byly uskutečněny na čistých kulturách bakterií druhů *Escherichia coli* (gramnegativní bakterie) a *Enterococcus faecalis* (grampozitivní bakterie). Testy probíhaly na základě kultivací čistých bakteriálních kmenů v pevných živných médiích (m-FC a Slanetz-Bartley). Dle předchozích výsledků testů na řasách a na  $\text{AgNO}_3$  (viz kap. 2.2) byly zvoleny zkoušené koncentrace preparátů s nanočásticemi stříbra  $0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,03 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $18,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Odečty počtu kolonií v jednotlivých koncentracích byly uskutečněny v čase 0 h a 24 h.

### 2.4 Testy na plísních ve vzduchu

Biocidní účinek nanočástic stříbra nebyl testován přímo na čistých kulturách plísní v laboratoři, ale na plísních a sporách přirozeně se vyskytujících ve vzduchu v prostředí (rody *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*). Z geotextilie, používané jako filtrační náplň vzduchových filtrů, byly nastříhány čtverce  $30\times 30 \text{ cm}$ , které byly ošetřeny nástřikem preparátů obsahující nanočástice stříbra definovaných rozměrů. Nástřik byl proveden pomocí rozprašovače, kterým se na povrch geotextilie ve 3 opakováních aplikoval objem 10 ml (koncentrace  $18,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Po každém nástřiku se ponechal preparát do textilie zaschnout. Geotextilie impregnované zkoušenými preparáty byly, po biologické stránce, hodnoceny třemi způsoby. Zpracovány byly tzv. spady vzduchu, který byl nasáván z reálného prostředí filtračním zařízením a následně procházel přes impregnovanou (či kontrolní) geotextilii na misky s živným SBA médiem (SBA, tj. Sabouraudův agar) exponované po dobu 15 min a 30 min. Druhým typem vzorku byl výluh z geotextilie s cílem zjistit přítomnost a životaschopnost spor mikromycet. Třetím vzorkem byl výstřížek textilie aplikovaný přímo na misku s živným SBA médiem za účelem zjištění nárůstu mikromycet. Kultivace exponovaných misek probíhala při teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 5 dní, poté následovalo vyhodnocení misek, spočítání vyrostlých kolonií a jejich posouzení pod stereolupou s cílem jejich přesné identifikace (ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ et al. 2014).

## 3. VÝSLEDKY TESTŮ

Uvedené výsledky se týkají zjištění účinku laboratorně připravených nanočástic testovaných ve vodných roztocích s řasami a bakteriemi, popř. následně aplikovaných nástřikem na geotextilii. Smyslem prováděných zkoušek je možné využití nanočástic pro případnou ochranu památek před biodeteriáci. Do testování byly zahrnuty všechny laboratorně připravené roztoky s nanočásticemi, které byly dosud pro potřeby projektu připraveny. Naše pracoviště se zabývá pouze zjištěním účinku nanočástic na vybrané zkušební mikroorganismy, nikoliv technologií aplikace nanočástic na povrch materiálu nebo přímo do materiálu.

### 3.1 Testy na řasách

Vzájemné porovnání zjištěných EC50 v testech toxicity s chlorokokální řasou *Desmodesmus quadricauda* u dodaných přípravků uvádí tab. 1, porovnání a závislost EC50 na velikosti nanočástic uvádí obr. 1. Shlukování nanočástic stříbra mělo významnou roli v tomto typu testů toxicity, shluky řas se chovají zcela odlišně, což vede k fyzikálním a chemickým změnám prostředí a proto mají přípravky různé toxické účinky.

**Tab. 1:** Stanovené hodnoty EC50 u testovaných NANO přípravků na chlorokokálních řasách *Desmodesmus quadricauda*

NANO Přípravek (velikost nanočástice)	AgB1 (5 nm)	AgB2 (9 nm)	AgGL1 (20 nm)	AgM1 (37 nm)	AgL1 (43 nm)	AgX500 (64 nm)	AgG1 (70 nm)
EC50 [mg·l <sup>-1</sup> ]	1,03-1,05	1,88-2,29	4,20-5,86	2,80-4,75	5,98-8,77	17,27-20,87	7,81-8,52

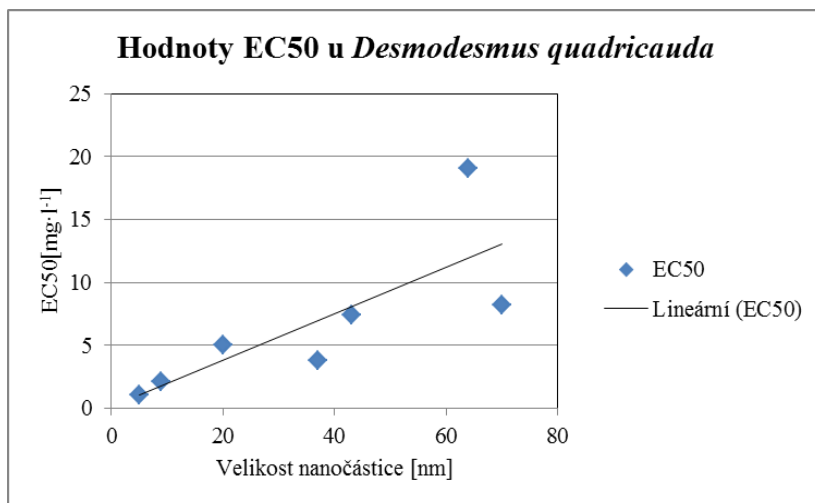
Inhibiční efekt přípravku NANOAgB1 se projevil již po 24 h, a to i v té nejnižší nasazené koncentraci, kdy byla již většina buněk mrtvá. Během testu byly pozorovány tmavé shluky, pravděpodobně se jednalo o agregaci částic stříbra. Jelikož se 100% inhibice projevila již při koncentraci 1 mg·l<sup>-1</sup> a to hned po 24 h expozice, byl proveden ještě jeden test s nižším rozsahem koncentrací 0,1 mg·l<sup>-1</sup>, 0,3 mg·l<sup>-1</sup> a 0,5 mg·l<sup>-1</sup>. Koncentrace NANOAgB2 byly nasazené i v nižší oblasti pro porovnání s přípravkem NANOAgB1. Koncentrace 0,1 mg·l<sup>-1</sup>, se projevila toxická již po 24 h, oproti koncentracím 0,5 mg·l<sup>-1</sup> a 1 mg·l<sup>-1</sup>, kde byla inhibice velmi nízká. Vzhledem k tomu, že se inhibiční efekt začal projevovat až nad koncentrací 1 mg·l<sup>-1</sup>, byla koncentrace 0,1 mg·l<sup>-1</sup> vyřazena z vyhodnocení. U koncentrací 3 mg·l<sup>-1</sup> až 18,5 mg·l<sup>-1</sup> se projevil inhibiční efekt již po 24 h aplikace, kdy většina buněk vykazovala mortalitu.

Z cukerných koloidů se jako nejučinnější projevil maltózový koloid NANOAgM1. U koncentrace nad 3 mg·l<sup>-1</sup> se biocidní účinek dostavil po 24 h expozice. Po 72 h se začaly objevovat buňky ve shlucích. Na konci testu byla většina buněk u koncentrací nad 5 mg·l<sup>-1</sup> mrtvá. U přípravku připraveného redukcí cukrem glukóza, NANOAgGL1, docházelo během testu k shlukování cenobií, což bylo pravděpodobně způsobeno ochrannými mechanismy, vytvářením obalů a využíváním cukrů (oxidativní stres). Za 24 h expozice se projevila účinnost u koncentrací 10 mg·l<sup>-1</sup> a 18,5 mg·l<sup>-1</sup>. V porovnání s kontrolou byl po 48 h zaznamenán pomalejší nárůst celé kultury nasazených buněk řas, po 72 h se začaly objevovat shluky cenobií.

K tvorbě shluků docházelo i u dalších cukerných koloidů, jako např. laktóza NANOAgL1 a xylóza NANOAgX500. Účinky NANOAgL1 se začaly projevovat po 24 h expozice od koncentrace 3 mg·l<sup>-1</sup>, u nejvyšší koncentrace 18,5 mg·l<sup>-1</sup> bylo více jak 50 % buněk již mrtvých. Po 48 h došlo k obnovení populace buněk, na konci testu u koncentrací 3 mg·l<sup>-1</sup> a 5 mg·l<sup>-1</sup> bylo 30 % buněk mrtvých, u 18,5 mg·l<sup>-1</sup> byla 100% inhibice růstu. Během testu se u cukerného koloidu objevovaly četné shluky cenobií.

U přípravku NANOAgX500 se účinnost začala projevovat již po 24 h u nejvyšších koncentrací, a to u 10 mg·l<sup>-1</sup> a 18,5 mg·l<sup>-1</sup>. Po 48 h se začaly účinky projevovat i u nižších koncentrací, u koncentrace 5 ppm byla větší část buněk již mrtvá. Nicméně, po 72 h došlo k obnově populace buněk řas, na konci testu byla v koncentracích 1 mg·l<sup>-1</sup> a 3 mg·l<sup>-1</sup> většina buněk živých.

Po 24 h expozice byl u přípravku NANOAgG1 téměř ve všech nasazených koncentracích nárůst buněk řas srovnatelný s kontrolou. Výjimku tvořila koncentrace 18,5 mg·l<sup>-1</sup>, kde se projevila výrazná toxicita při nasazení testu. Po 48 h byl nárůst srovnatelnější, ale začaly se objevovat shluky cenobií, což znehodnocovalo počítání buněk. Po 72 h se již projevíly účinky u koncentrací 5 mg·l<sup>-1</sup> a 10 mg·l<sup>-1</sup>. V průběhu testu bylo zaznamenáno výrazné shlukování cenobií řas, díky němuž neodpovídal počet buněk stanovené koncentraci chlorofylu-a.



**Obr. 1:** Závislost hodnoty EC50 na *Desmodesmus quadricauda* na velikosti nanočástic testovaných přípravků s nanostříbrem (viz tab. 1)

Při srovnání přípravků od nejúčinnějšího k méně účinnému, je toxicita nanostříbra na chlorokokální řasy *Desmodesmus quadricauda* následující: NANOAgB1 (5 nm) > NANOAgB2 (9 nm) > NANOAgGL1 (20 nm) > NANOAgM1 (37 nm) > NANOAgG1 (70 nm) > NANOAgL1 (43 nm) > NANOAgX500 (64 nm).

### 3.2 Testy na bakteriích

U bakterie *Escherichia coli* nelze přesně říci, jestli docházelo k rostoucí inhibici se zmenšující se velikostí částic, jako v případě interpretace výsledků testů uskutečněných na řasách.

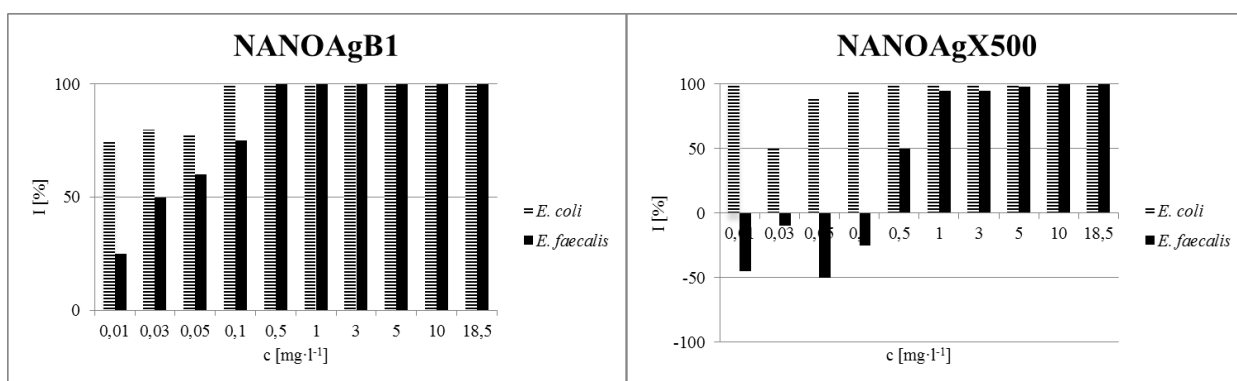
U přípravku NANOAgB1 byla po 24 h u koncentrací od 0,1 mg·l<sup>-1</sup> do 18,5 mg·l<sup>-1</sup> zaznamenána v testech 100% inhibice růstu bakterií. U koncentrací 0,01 mg·l<sup>-1</sup> až 0,05 mg·l<sup>-1</sup> byla inhibice růstu 80%. U přípravku NANOAgB2 koncentrace 0,01 mg·l<sup>-1</sup> působila stimulačně na růst bakterií, koncentrace 0,03 mg·l<sup>-1</sup> vykazovala 80% inhibici, 100% inhibice byla následně zaznamenána u koncentrací v rozpětí od 0,05 mg·l<sup>-1</sup> do 18,5 mg·l<sup>-1</sup>. NANOAgGL1 byl 100% účinný na eliminaci růstu bakterií u koncentrací od 1 mg·l<sup>-1</sup> do 18,5 mg·l<sup>-1</sup>, koncentrace 0,01 mg·l<sup>-1</sup> byla 75% a koncentrace v rozsahu 0,03 mg·l<sup>-1</sup> až 0,5 mg·l<sup>-1</sup> byly na úrovni 80 % až 95 % inhibice růstu. Přípravky NANOAgM1 a NANOAgX500 působily 100% inhibičně u všech koncentrací, kromě 0,01 mg·l<sup>-1</sup> a 0,03 mg·l<sup>-1</sup>. NANOAgL1 v koncentraci 0,01 mg·l<sup>-1</sup> působil na růst bakterií stimulačně, postupná účinnost v inhibici růstu bakterií od 60 % do 100 % byla zaznamenána v rozsahu koncentrací od 0,03 mg·l<sup>-1</sup> až 18,5 mg·l<sup>-1</sup>. Stimulační účinky v nižších koncentracích byly zjištěny i v případě NANOAgG1, zde od 0,01 mg·l<sup>-1</sup> do 0,05 mg·l<sup>-1</sup>. Od koncentrace 0,1 mg·l<sup>-1</sup> až do 18,5 mg·l<sup>-1</sup> byl zjištěn 100% účinek aplikovaného přípravku.

Inhibice a účinnost přípravků s nanočásticemi na eliminaci růstu bakterií *Escherichia coli* klesala následně v řadě NANOAgB1(5 nm) > NANOAgX500 (64 nm) > NANOAgM1 (37 nm) > NANOAgG1 (70 nm) > NANOAgB2 (9 nm) > NANOAgL1 (43 nm) > NANOAgGL1 (20 nm).

Na bakterii *Enterococcus faecalis* byly účinky přípravků poněkud odlišné, což je dáno tím, že jsou enterokoky všeobecně rezistentnější druhy bakterií na některé biocidní přípravky. Například přípravek NANOAgB1, který vykazoval výraznou inhibici růstu na *Escherichia coli* se obdobně inhibičně choval i na bakteriích *Enterococcus faecalis*, zatímco NANOAgB2, který byl na bakterii *Escherichia coli* poměrně neúčinný, se projevil s větší účinností v eliminaci růstu bakterií *Enterococcus faecalis*, anebo přípravek NANOAgX500, který byl v podstatě účinný na *Escherichia coli*, u bakterie *Enterococcus faecalis* naopak v nižších koncentracích vykazoval spíše stimulační účinky (viz obr. 2). U přípravku NANOAgB1 se zvyšující se koncentrací od 0,01 mg·l<sup>-1</sup> do 18,5 mg·l<sup>-1</sup> byl po 24 h zaznamenán trend zvyšující se účinnosti eliminace růstu bakterií, zde např. 0,01 mg·l<sup>-1</sup> (25 %), 0,03 mg·l<sup>-1</sup> (50 %), 0,05 mg·l<sup>-1</sup> (60 %), 0,1 mg·l<sup>-1</sup> (75 %). Od koncentrace 0,5 mg·l<sup>-1</sup> a výše byla účinnost 100%. U přípravku NANOAgB2 byla 100%

inhibice zjištěna až u koncentrací  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $18,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . U NANOAgG1 byl trend zvyšující se inhibice růstu zaznamenán v koncentraci  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , po 24 h expozice byla 100% inhibice růstu dosažena u koncentrace  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $18,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Přípravky NANOAgM1 a NANOAgX500 působily 100% inhibičně u koncentrací od  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  do  $18,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Koncentrace  $0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $0,03 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  působily stimulačně, 95% inhibice růstu byla zjištěna u koncentrací  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . NANOAgX500 a NANOAgL1 působily v koncentracích  $0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  až  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  stimulačně. V případě NANOAgX500 byla v rozsahu koncentrací  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  až  $18,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  zaznamenána 100% inhibice růstu. Přípravek NANOAgL1 měl trochu jiné projevy a působení na inhibici růstu bakterií, 45% až 95% inhibice byla zjištěna v rozsahu koncentrací  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  až  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 100% inhibice byla zjištěna až u koncentrací  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $18,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . NANOAgG1 vykazoval na bakteriích 100% inhibici růstu v rozsahu použitých koncentrací  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  až  $18,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . V koncentracích  $0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  až  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  byla inhibice 45% až 95%.

Při srovnání přípravků od nejúčinnějšího k méně účinnému, je toxicita nanostříbra na bakterie *Enterococcus faecalis* následující: NANOAgG1 (70 nm) > NANOAgB2 (9 nm) > NANOAgGL1 (20 nm) > NANOAgB1 (5 nm) > NANOAgM1 (37 nm) > NANOAgL1 (43 nm) > NANOAgX500 (64 nm).



**Obr. 2:** Porovnání inhibičního účinku přípravku NANOAgB1 (5 nm) a NANOAgX500 (64 nm) na bakteriích *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis* po 24 h působení

### 3.3 Testy na plísních ve vzduchu

Mikromycety, které procházely přes kontrolní vzorek geotextilie (bez nástřiku) a byly následně zachyceny na SBA médiu, měly výrazně větší záchyt a nárůst než spady vystavené geotextilii s nástřikem nanopřípravku. V porovnání s kontrolním vzorkem, tj. geotextilií bez povrchové úpravy nástřikem, byly všechny aplikované přípravky s nanočásticemi účinné. Na jednotlivých agarových miskách byly vykultivovány následující taxony: kontrola (*Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*), NANOAgB1 (*Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*), NANOAgB2 (*Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*), NANOAgGL1 (*Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*), NANOAgM1 (*Fusarium*, *Alternaria*), NANOAgL1 (*Penicillium*, *Fusarium*), NANOAgX500 (*Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Alternaria*), NANOAgG1 (*Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*). Do jisté míry lze spekulovat i na cílenou eliminaci jednotlivých taxonů plísní (abundance a diverzita) ze vzduchu při aplikaci jednotlivě použitého nanopřípravku nástřikem na geotextilii.

Prokazatelnou účinnost eliminace mikromycet, u typu vzorku čtverce aplikovaného na SBA médium, vykazoval přípravek NANOAgX500 s velikostí nanočástic stříbra 64 nm a NANOAgG1 s velikostí nanočástic stříbra 70 nm. U typu vzorku spadů vzduchu proudícího skrze ošetřenou geotextilii na SBA misku byly účinné aplikace přípravků NANOAgB1 (5 nm), NANOAgB2 (9 nm) a NANOAgX500 (64 nm). U typu vzorku výluhu z geotextilie (ošetřené nanopřípravkem a vystavené proudícímu vzduchu) byla zaznamenána významná účinnost eliminace plísní v případě přípravků NANOAgG1 (70 nm), NANOAgM1 (37 nm) a následně NANOAgL1 (43 nm). Z výsledků (viz tab. 2) lze usoudit, že pro případnou eliminaci

mikromycet by byla vhodná kombinace velikostního spektra nanočástic, než se zaměřit pouze na jednu velikost nanočástice. Trend nárůstu plísní byl zjištěn pouze u vzorků spadů vzduchu proudícího přes geotextilii ošetřenou nanopřípravkem na misku u přípravků s velikostí nanočástic od  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  do  $37 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

**Tab. 2:** Stanovené hodnoty účinnosti eliminace plísní, obsažených ve vzduchu a testovaných metodou nasávání v porovnání s kontrolou, při testech s NANO přípravky

Přípravek NANO	AgB1	AgB2	AgGL1	AgM1	AgL1	AgX500	AgG1
<b>Spady</b> (účinnost eliminace)	66 %	66 %	55 %	39 %	58 %	61 %	46 %
<b>Výluh</b> (účinnost eliminace)	55 %	55 %	64 %	82 %	82 %	64 %	91 %
<b>Celková účinnost eliminace</b>	61 %	61 %	60 %	61 %	69 %	70 %	63 %

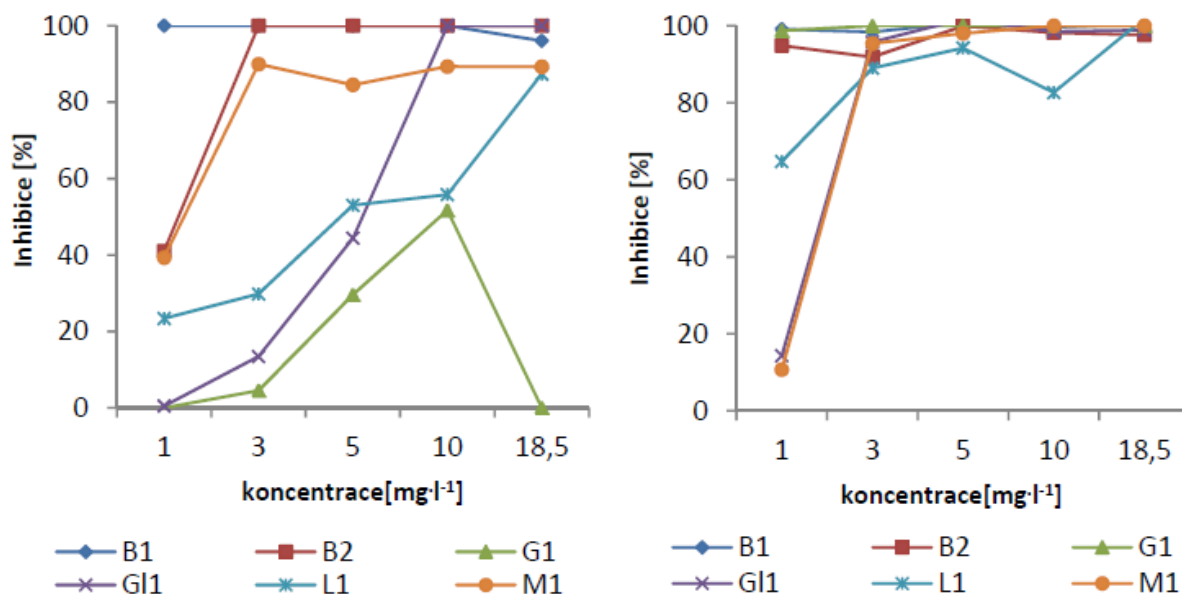
#### 4. DISKUSE

Námi provedené laboratorní testy do jisté míry potvrdily v literatuře uváděné údaje o zvyšujícím se toxickém účinku nanočástic se snižující se jejich velikostí (MUKHERJI S. et al. 2012, ARUOJA et al. 2009, CHOI et al. 2008). Jedná se zejména o testy s chlorokokálními řasami *Desmodesmus quadricauda*. Se snižující se velikostí nanočástic, v našem případě od 70 nm do 5 nm, byla pozorována zvyšující se toxicita na růst chlorokokálních řas *Desmodesmus quadricauda*. Většina přípravků nanočástic od koncentrace  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  vykazovala inhibici růstu mikroorganismů 100 %. Inhibice a účinnost přípravků s nanočásticemi na eliminaci růstu řas klesala následně od  $5 \text{ nm} > 9 \text{ nm} > 20 \text{ nm} > 37 \text{ nm} > 70 \text{ nm} > 43 \text{ nm} > 64 \text{ nm}$ . Menší nanočástice představuje větší reakční povrch a tím pádem i vyšší toxický účinek (KIM et al. 2007). Rovněž se prokázala toxicita nanočástic na inhibici růstu řas v porovnání s testy s iontovým stříbrem (ADÁMKOVÁ et al. 2013).

Při účinku nanočástic je nutné zohlednit i charakter buněčných povrchů vybraných testovaných řas, které nemají na svém povrchu sliz, což je při účincích nanočástic také podstatné (TIEN 2002). Například *Desmodesmus quadricauda* má bradavičnatou buněčnou stěnu, *Chlorella vulgaris* má hladkou buněčnou stěnu a vláknité zelené řasy mají dotýkající se buňky ve vlákně s hladkými buněčnými stěnami. Mikroskopickými rozbory nebyl zjištěn destrukční vliv nanočástic na celistvost buněčné stěny řas (barvicí metody, Calcofluor White). Nanočástice byly pozorovány spíše jako naakumulované mikroskopické shluky na povrchu buněk. Ve své podstatě touto akumulací částic dochází ke stínění a tedy i k inhibici fotosyntézy (ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ et al. 2014a, CYRUSOVÁ et al. 2015).

Účinek nanočástic na vláknité zelené řasy zatím vykazuje nižší schopnost inhibice růstu. Vysvětlením je uspořádání buněk ve vlákněch, které nejsou celým svým povrchem vystavené působení nanočástic, jako např. jednobuněčná individua buněk chlorokokálních řas. Z tohoto hlediska je porovnání účinků nanočástic stříbra složitější (viz obr. 3). I přes tyto uvedené skutečnosti je žádoucí testy s těmito organismy uskutečnit a tím rozšířit účinky nanočástic stříbra na tento typ organismu. Testování je v současné době předmětem přípravy certifikované metody a památkového postupu, z toho důvodu nejsou v publikaci uvedeny výsledky (ADÁMKOVÁ & ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ 2013, ADÁMKOVÁ et al. 2013).





**Obr. 3:** Výsledná inhibice koncentrace chlorofylu-a jednotlivých preparátů s nanočásticemi stříbra (NANOAg---) pro řasu *Desmodesmus quadricauda* (graf vlevo) a *Klebsormidium* sp. (graf vpravo) (ADÁMKOVÁ et al. 2013b)

Další problematiku, kterou bude nutné postihnout, bude aplikace testů na plochy, s již porostlými organismy, v reálném prostředí. Nelze s určitostí říci, že hodnota EC<sub>50</sub> zjištěná v testu bude stejně efektivní pro aplikaci na plochy napadeného materiálu. Pro potřeby testů účinnosti přípravků přímo na plochách je v současné době v laboratoři modifikován postup, který využívá suspenzi řas zachycenou na filtrech, aplikovaných přímo na živné médium. Vyhodnocení testu je založeno na stanovení koncentrace chlorofylu-a, inhibice u jednotlivých nasazených koncentrací testovaných látek oproti kontrole (ADÁMKOVÁ et al. 2013). U toho typu testování inhibice růstu řas na plochách se projevuje daleko více problémů než u bakterií. Není to jen optimální dávka objemu inokula, množství roztoku, zajištění rovnoměrné distribuce inhibiční látky, ale samotný fakt toho, že řasy jsou fototrofními organismy. Testy na plochách s řasami vyžadují celodenní přísun světla a správnou volbu média (agaru) pro kultivaci. Překážkou testování ploch je zajištění rovnoměrné distribuce stříbra po celé ploše, rovnoměrné rozvrstvení řasové suspenze a zajištění dostatečného přísunu živin a světla (ADÁMKOVÁ & ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ 2013, ADÁMKOVÁ et al. 2013).

Rozdílnost v působení jednotlivých přípravků s nanočásticemi stříbra na čistých kmenech bakterií *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis* může být dána jejich složením, kdy většina obsahuje i určité množství sacharidů, resp. produkty oxidace těchto sacharidů (SONDI I. & SALOPEK-SONDI B. 2004, JUNG et al. 2008). Je možné, že jsou tyto produkty schopny buňky ochránit, či sloužit jako rychlý zdroj energie. Nižší koncentrace, zde 0,01 mg·l<sup>-1</sup> až 0,05 mg·l<sup>-1</sup>, u většiny cukernatých koloidů obsahujících nanočástice stříbra vykazovaly stimulační účinek růstu bakterií *Enterococcus faecalis*, u bakterií *Escherichia coli* nebyl tento efekt častý. Tato zdánlivá stimulace růstu, může být dána neúčinností preparátu v takto nízké koncentraci.

U plísní a jejich eliminace z ovzduší nanočásticemi stříbra není díky variabilitě použitých hodnotících metod posouzení účinků nanočástic jednoduché a jednoznačné. Námí zjištěné výsledky vedou k několika spekulacím a možným zamyšlením. Lze předpokládat, že se nanočástice uvolňují z geotextilie a působí inhibičně i v roztoku (typ vzorku výluhu). Geotextilie opatřené nástřikem zřejmě působí inhibičně na mikroorganismy vyskytující se v proudícím vzduchu. Nutné je zvážit i fakt, že nanosená vrstva nanočástic je, do určité míry, další bariérou, kterou musí nasávaný vzduch spolu s částicemi a organismy překonat. Dalším předpokladem je možnost navázání se nanočástice na procházející partikule a mikroorganismy, možnost inhibovat je a znemožnit jejich kultivaci na živném médiu. Je samozřejmě možné, že jsou částice

i organismy přítomné, ale ne v tzv. kultivovatelném stavu (přítomnost nebyla mikroskopicky potvrzena). Další spekulací je účinnost nanočástic v aplikované vrstvě, jak dokládají např. výsledky z výluhů nebo na médium přímo aplikovaný výstřížek geotextilie. S přihlédnutím ke všem použitým metodám zachytu plísní a následnému vyhodnocení účinnosti aplikovaných nanočástic stříbra je možné říci, že vhodnější přípravky na eliminaci plísní jsou ty, které vykazují přítomnost nanočástic větších rozměrů. Zde se jednalo konkrétně o 43 nm, 70 nm a 64 nm. Inhibice a účinnost přípravků s nanočásticemi na eliminaci růstu plísní ve vzduchu klesala následně v řadě NANOAgL1 (43 nm) > NANOAgG1 (70 nm) NANOAgX500 (64 nm) > NANOAgB1(5 nm); NANOAgB2 (9 nm); NANOAgM1 (37 nm) > NANOAgGL1 (20 nm).

## 5. ZÁVĚRY

V projektu jsme se zaměřili na studium problematiky biodeteriorace a biodeteriogenů, nanotechnologie a nanočástic stříbra, podstatnou část jsme směřovali na posouzení biocidního účinku komerčně dostupných a později laboratorně vyvinutých koloidních roztoků s nanočásticemi stříbra. Účinnost přípravků byla laboratorně testována na chlorokokálních řasách (zde popsáný druh *Desmodesmus quadricauda*), částečně byla diskutována i problematika použití vláknitých řas v testech toxicity. Provedeny byly testy inhibičních účinků nanočástic stříbra na čistých kmenech bakterií *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis*. Dále byl posouzen i vliv nanočástic stříbra na případnou eliminaci plísní a spor v ovzduší. Současně bylo testováno i vliv nanočástic stříbra na různých typech organismů (řasy, bakterie, plísně) zjištěno, že výrazně závisí na způsobu přípravy nanopřípravku a na jeho složení, v našem případě použitých roztoků sacharidů.

Nanotechnologie představují ve své podstatě ekologicky šetrnější technologie jako alternativu současným méně prostředí zatěžujícím technologiím. Avšak s rostoucím využíváním nanotechnologií, musíme také zohlednit případná rizika. Nanočástice stříbra jsou schopné svým působením na mikroorganismy ovlivnit biologické čištění, což dokládají i studie z posledních let (SIRIPATTANAKUL-RATPUKDI & FÜRHACKER M. 2014). Z tohoto důvodu jsou potřebné studie zaměřené na působení nanočástic nejen na čisté kultury a kmeny zkušebních organismů, ale i na reálné matrice vzorků vod s přítomnou biocenózou. V současné době na našem pracovišti probíhají testy biocidních účinků přípravků s nanočásticemi na reálných vzorcích povrchových vod a biocenózách aktivovaného kalu. Smyslem provádění testů je prohloubení znalostí účinků nanočástic nejen na čistých sbírkových kmenech bakterií a řas, ale i směsných populací (biocenóz) reálných matic.

**PODĚKOVÁNÍ:** Publikace byla vytvořena v rámci projektu č. DF11P01OVV012 programu NAKI.

## POUŽITÁ LITERATURA

- ADÁMKOVÁ P. & ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ J. 2013. Inhibiční účinek nanočástic kovů na kulturu řas. Sborník konference Vodárenská biologie 2013, Praha 6. - 7. 2. 2013, s. 106-111.
- ADÁMKOVÁ P., ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ J. & ŠKOPOVÁ V. 2013. Mikrobiální znečištění a jeho eliminace pomocí nanočástic kovů.: Zborník přednášek z XV. konference s mezinárodní účastí, Pitná Voda 2013, Trenčianské Teplice, 8. - 10. 10. 2013, s. 135 – 142.
- ARUOJA V., DUBOURGUIER H. CH., KASEMETS K. & KAHRU A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Science of the Total Environment, 407: 1461–1468.
- CHOI O., DENG K. K., KIMT N. J., ROSS L., SURAMPALLI R. Y. & HU Z. 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions and silver chloride colloids on microbial growth. Water Research, 42: 3066-3074.
- CYRUSOVÁ T., PODLIPNÁ R. & VANĚK T. 2015. Vliv nanočástic na rostliny. Chemické Listy 109: 276-280.
- HIRIART-BAER V. P., FORTIN C., LEE D. Y. & CAMPBELL P. G. C. 2006. Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: Influence of thiosulphate. Aquatic Toxicology, 78: 136–148.

- JUNG W., KOO H. C., KIM K. W., SHIN S., KIM S. H. & PARK Y. H. 2008. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *E. coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 2171-2178.
- KIM J. S., KUK E., YU K. N., KIM J.-H., PARK S. J., LEE H. J., KIM S. H., PARK Y. K., PARK Y. H., HWANG CH.-Y., KIM Y.-K., LEE Y.-S., JEONG D. H. & CHO M.-H. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3: 95-101.
- KŘÍŽKOVÁ S., ADAM V. & KIZEK R. 2009. Fytotoxicita stříbrných iontů. *Chemické Listy*, 103: 559-568.
- MIAO A.-J., SCHWEHR K. A., XU CH., ZHANG S.-J., LUO Z., QUIGG A. & SANTSCHI P. H. 2010. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environmental Pollution*, 157: 3034-3041.
- MUKHERJI S., RUPARELIA J. & AGNIHOTRI S. 2012. Antimicrobial Activity of Silver and Copper Nanoparticles: Variation in Sensitivity Across Various Strains of Bacteria and Fungi. Chapter 8: 225-251. In COFFIN. & RAI M. (eds.), *Nano-Antimicrobials*, Springer-Verlag Berlin
- NAVARRO E., BAUN A. & BEHRA R. 2008. Environmental behaviour and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17: 372-386.
- OUKARROUM A., POLCHTCHIKOV S., PERREAULT F. & POPOVIC R. 2011. Temperature influence on silver nanoparticles inhibitory effect on photosystem II photochemistry in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Environmental Science and Pollution Research*, 19: 1755-1762.
- OUKARROUM A., BRAS S., PERREAULT F. & POPOVIC R. 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78: 80-85.
- PANYALA N.R., PEÑA-MÉNDEZ E.M. & HAVEL J. 2008. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? *Journal of Applied Biomedicine*, 6: 117-129.
- PARK M.-H., KIM K.-H., LEE H.-H., KIM J.-S. & HWANG S.-J. 2010. Selective inhibitory potential of silver nanoparticles on the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Biotechnology Letters*, 32: 423-428.
- RATTE H. T. 1999. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 89-108.
- ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ J., ADÁMKOVÁ P. & ŠKOPOVÁ V., 2014a. Fototrofní deteriogeny a jejich eliminace z povrchů nanočásticemi stříbra. *Chemické Listy* 108: 660-666.
- ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ J., ŘÍHA J., ADÁMKOVÁ P. & ŠKOPOVÁ V. 2014b. Prodloužení doby provozu filtračních náplní vzduchových filtrů impregnační nanočásticemi stříbra- SOVAK 23:12/204-15/207.
- SIRIPATTANAKUL-RATPUKDI S. & FÜRHACKER M. 2014. Review: Issues of silver nanoparticles in engineered environmental treatment systems. *Water Air and Soil Pollution*, 225:1939-1956
- SONDI I. & SALOPEK-SONDI B. 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: 177-182.
- WU B., WANG Y., LEE Y. H., HOSRT A., WANG Z., CHEN D. R., SURESHKUMAR R. & TANG Y. J. 2010. Comparative eco-toxicities of nano-ZnO particles under aquatic and aerosol exposure modes. *Environmental Science and Technology*, 44: 1484-1489.
- TIEN C.-J. 2002. Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. *Process Biochemistry*, 38: 605-613.
- YANG G., XIE J., HONG F., CAO Z. & YANG Z. 2012. Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: Effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 87: 839-845.