

## FOTOTROFNÍ DETERIOGENY A JEJICH ELIMINACE Z POVRCHŮ NANOČÁSTICEMI STŘÍBRA

JANA ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, PAVLÍNA ADÁMKOVÁ a VLADIMÍRA ŠKOPOVÁ

Ústav technologie vody a prostředí, Fakulta technologie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
jana.ambrozova@vscht.cz, adamkova@vscht.cz, skopovav@vscht.cz

Došlo 20.8.13, přijato 21.11.13.

Klíčová slova: biodeteriorace, nanotechnologie, stříbro, toxicita, řasy a sinice

### Obsah

1. Úvod
2. Fototrofní deterioGENY
3. Stříbro a jeho působení na organismy
4. Účinnost preparátů se stříbrem
5. Závěr

### 1. Úvod

Na povrchy staveb, konstrukcí a památek působí fyzikální, chemické a biologické vlivy, speciálním případem je antropogenní činnost. Materiál staveb není vůči těmto vlivům zcela odolný, což bohužel dokazuje stav některých historických budov. Závažným problémem je biologická degradace (biodeteriorace). Biodeteriorace je jakákoliv nepříjemná změna vlastností materiálu způsobená životní aktivitou mikroorganismů, tzv. deterioGENŮ (sinic, řas, lišejníků, mechrostů, bakterií a mikromycet), které ve většině případů esteticky poškozují budovy, funkčně je degradují a typicky vegetačně zabarvují. Průběh deteriorace a následná kolonizace povrchu organismy závisí na jeho fyzikálních charakteristikách a lithotypu (mramor, vápennec, travertin, dolomit, pískovec a žula), mikroklimatu a podmínkách prostředí.

Správná identifikace organismu, určení fáze kolonizace povrchu a vztahy mezi populacemi jsou základem úspěšného pochopení ekologie studovaného povrchu a tím pádem i vhodné metody ošetření již napadeného povrchu<sup>1–3</sup>. K ošetřování povrchů se používají mechanické, fyzikální a chemické postupy, které je možné kombinovat s aplikací permeabilizérů (dezintegrace lipopolysacharidické vrstvy buněčné stěny a zvýšení citlivosti organismu

k hydrofóbním antibiotikům), inhibitorů pigmentů (tricyclazol, arbutin, capropamid, cerulenin) a exopolysacharidů (deriváty na bázi bismutu) a fotodynamických činidel (methylénová modř, hydroxylové radikály uvolňované působením UV na roztok peroxidu vodíku)<sup>4</sup>. Tento kombinovaný přístup je daleko účinnější, protože z praxe je známá rezistence biofilmů vůči biocidům, způsobená prodloužením doby penetrace antimikrobiálního činidla do extracelulární matrix biofilmu, zpomalením růstové rychlosti organismů osidlující biofilm a fyziologickými změnami způsobenými interakcí mikroorganismů ve společenství biofilmu<sup>5</sup>.

Chemické postupy ošetřování povrchů využívají víceméně potenciálně nebezpečné a někdy toxické biocidy. Z ekotoxikologického hlediska je perspektivní využívání, ve své podstatě ekologicky šetrných technologií a postupů na bázi nanotechnologie. Nanotechnologie vychází z předpokladu, že každý povrch má své specifické vlastnosti, které je možné prostřednictvím nanovrstev modifikovat. Povrchy materiálů se díky aplikaci nanovrstev stávají mechanicky i chemicky odolné, snižuje se sací schopnost materiálu, jsou chráněny před korozí, nedovolují kolonizaci povrchu mikroorganismy (bakterie, plísně) a jejich usazování, plochy jsou čisté a hygienicky nezávadné. Nanotechnologie našly uplatnění v mnoha odvětvích průmyslu, existuje mnoho možností jejich využití, zejména pak přímé využití nanočástic kovů (stříbro, zlato, měď, zinek, titan). Nanočástice se aplikují v nanovrstvě na povrch ošetřovaného materiálu, nebo se aplikují ve formě částic rozptýlených v roztoku. Při aplikaci zvolených kovových částic se uvažuje oligodynamický efekt, který je vlastností kovů bránit růstu a množení virů, bakterií, řas, mikromycet a parazitů.

Možnost aplikace nanomateriálů či přímo nanočástic kovů na povrchy konstrukcí a staveb z důvodu ochrany objektů před jejich biodeteriorací se zvažuje i v památkářství a je i záměrem řešeného projektu NAKI. Předpokládá se přímá aplikace nanočástic na povrchy, které jsou již napadeny mikroorganismy a nebo se předpokládá omezení jejich výskytu preventivním zásahem, a to aniž by došlo k výraznému poškození ošetřovaného povrchu.

### 2. Fototrofní deterioGENY

Povrchy staveb, konstrukcí a památek jsou zajímavým biotopem s biocenózami adaptovanými na extrémní podmínky. Jak již bylo řečeno v úvodní části článku, je pro volbu vhodného ošetření povrchu a nebo preventivní zásah žádoucí správně identifikovat biodeterioGEN, strategii jeho přežívání a fyzikální a chemické podmínky specifikující jeho výskyt<sup>6</sup>.

Jako první v potravním řetězci kolonizují podklady fototrofní a chemotrofní bakterie, sinice a řasy, vzniká biofilm a podklad pro další organismy<sup>7</sup>. Biofilm se vytváří ve speciálně nutričně chudém prostředí tak, že nejprve dochází k transportu organických molekul a buněk k povrchu, dále pak k adsorpci organických molekul za vzniku podmiňeného povrchu, na který se adsorbují buňky. Tyto buňky rostou a vzniká systém extracelulární polymerové substance, který představuje hydratovaná polyaniontová polysacharidická matrix produkovaná polymerasami navázanými na lipopolysacharidickou složku buněčné stěny<sup>8</sup>. Každý z organismů, přítomných v biofilmech, působí na povrchy různým způsobem. Pokud je povrchová vrstva biofilmu tvořena fotosynteticky aktivními organismy, je zajištěn přísun živin pro další, v biofilmu přítomné a troficky závislé, organismy. Bakterie a mikromycety remineralizují organickou hmotu a podporují nový nárůst sinic a řas. Na organickém materiálu biofilmů tvořených sinicemi a řasami se vyživují heterotrofní organismy, které využívají zdroj uhlíku a dusíku a intracelulární produkty uvolněné lyzí buněk řas a sinic<sup>9</sup>.

Fotosynteticky aktivní mikroorganismy jsou potenciálně nejvíce agresivní k povrchům vzhledem ke své fotolitotrofní povaze<sup>2,10</sup>. Srážení uhličitánů je typické pro sinice a zelené řasy (např. fontány mají podobné prostředí jako je v tekoucích vodách), u mnoho taxonů řas je známá produkce organických kyselin<sup>1,9,11</sup>. Slizovité obaly u sinic fungují jako rezervoáry vody a umožňují kolonizaci podkladu i v suchém prostředí (rody *Gloeocapsa*, *Gloeotheca*, *Phormidium*, *Chroococcus*, *Plectonema*, *Scytonema*, *Lyngbya*, *Microcoleus*)<sup>12</sup>. Tím je zajištěna biologická aktivita biofilmu, zvýšena kapacita retence vody v biomase biofilmu a umožnění růstu biofilmu, tvorbě organické hmoty a procesy humifikace usnadňují přisednutí mechů a vyšších rostlin<sup>9,11,13,14</sup>.

Další z otázek při kolonizaci povrchu materiálu je, zda organismus při kolonizaci povrchu preferuje specifický typ podkladového materiálu (lithotypu), který je v literatuře definovaný jako „bioreceptivity index“. Tento index by měl udávat informaci o potenciálním nebezpečí kolonizace určitého lithotypu a mohl by se stát velmi cenným nástrojem při volbě vhodné metody, přípravku či technologie ošetření materiálu<sup>9,15,16</sup>. Kamenné podklady, na území Evropy, kolonizuje mnoho druhů půdních řas, nejrozšířenějšími jsou zástupci rodů *Chlorella*, *Stichococcus*, *Chlorococcum* (nevyskytuje se na dolomitech) a *Klebsormidium*<sup>17</sup>. Rod *Chlorella* se vyskytuje také na cihlách, rod *Chlorococcus* na maltě<sup>3</sup>. Řasy z rodů *Stichococcus* a *Apatococcus* se vyskytují na vápenitých podkladech a na stavbách<sup>17</sup>. Druh *Stichococcus bacillaris* je nenáročný na živiny a vyskytuje se i na žule, která je všeobecně kolonizována velmi málo druhy díky hodnotě pH a velmi malé porozitě<sup>11</sup>. Na vlhkých kamenech se vyskytují rozsivky (*Nitzschia*, *Navicula*), zlativky<sup>3</sup> a některé drobné chlokokální řasy<sup>18</sup>. Na travertinu se díky porozitě, hrubosti a propustnosti podkladu vyskytují řasy rodů *Oocystis*, *Staurastrum*<sup>11</sup> a *Cosmarium*, který je navíc velmi citlivý, narušuje integritu substrátu a variabilně reaguje na teplotní a

chemické změny<sup>1</sup>. Jednobuněčné sinice preferují vápenité podklady, vláknité sinice bez heterocyst raději křemité<sup>2</sup>.

Přichycené organismy vytvářejí charakteristická zbarvení a inkrustace. U šedých povrchů převažují mikromycety, vyskytují se bakterie (*Micrococcus*, *Bacillus*, *Geodermatophilus*) a řasy s extracelulární polymerovou substancí. Černé povlaky jsou způsobené většinou sinicemi, které mají velký význam při kolonizaci uhličitánového povrchu, kde se vlivem produkce organických kyselin projevuje jejich korozivní aktivita<sup>3</sup>. Žluté a oranžové povrchy způsobují v některých případech pigmentující bakterie *Micrococcus* a *Bacillus*, řasy a sinice jsou lokalizovány v hlubších vrstvách, mikromycety se většinou v tomto typu povlaku nevyskytují<sup>19</sup>. Na krustách černých sulfátů (sulfidy z ovzduší) roste sinice *Gloeotheca*. Pod černými povlaky na kamenitých substrátech se vyskytují kryptoendolitické typy řas *Trentepohlia*, *Chlorella* a *Klebsormidium*<sup>11</sup>.

### 3. Stříbro a jeho působení na organismy

Stříbro se využívá v různých odvětvích průmyslu, zejména pro své dezinfekční účinky, které jsou známé již od starověku. Ve své podstatě je inertní, nicméně i přes to reaguje např. s vodou, čímž dochází k jeho ionizaci. Ionizované stříbro je vysoce reaktivní, váže se na tkáňové proteiny a způsobuje strukturální změny v bakteriálních buněčných stěnách a jaderných membránách eukaryotických buněk, což vede k deformaci a následné smrti buňky<sup>20</sup>. Volné ionty stříbra jsou silně fungicidní, algicidní a baktericidní, a to již v relativně nízkých dávkách. Ionty stříbra působí na látkovou výměnu organismů, metabolismus, dýchání na buněčné úrovni<sup>21</sup>. Toxické účinky stříbra na mikroorganismy mají nejen stříbrné ionty, ale i sloučeniny obsahující stříbro<sup>22,23</sup>. V přítomnosti kyslíku je kovové stříbro rovněž baktericidní, protože oxid stříbrný je dostatečně rozpustný a uvolňuje volné ionty stříbra, které inhibují enzymy uplatňující se v cyklech fosforu, síry a dusíku<sup>24</sup>.

Mechanismus účinku je závislý na vazbě přípravku na povrch materiálu a jeho proniknutí do buňky. Avšak využití stříbra a jeho solí má své limity, protože mikroorganismy jsou schopné uvolňovat stříbrné ionty z kovu a tím zvyšovat jejich koncentraci. Některé studie uvádí, 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<sup>22</sup>. Dosavadní výzkum prokázal, že toxicita zřejmě souvisí se zastoupením jednotlivých forem stříbra spíše než celková koncentrace stříbra. Stříbro reaguje s aminovými, imidazolovými, fosfátovými a karboxylovými skupinami membrán či enzymů, čímž způsobuje jejich denaturaci<sup>25</sup>. Tento princip působení je i důvodem, proč si patogenní organismy nemohou na přípravky a preparáty s koloidním stříbrem vyvinout rezistenci. Toxicita a účinky stříbra jsou ve své podstatě neselektivní, jiné účinky vykazuje při expozici na

prokaryotickou nebo eukaryotickou buňku, jednobuněčný nebo mnohobuněčný organismus, popř. trofickou úroveň (destruent, producent, konzument).

Nanočástice stříbra byly jedny z prvních nanočástic kovů, které vstoupily na komerční trh. Toxicita stříbra závisí na koncentraci nanočástic a velmi úzce souvisí s polopropustností buněčné membrány<sup>26</sup>. Antimikrobiální aktivita se projevuje ve třech úrovních. Částice stříbra se naváží na povrch buňky, kde mohou jednak ovlivnit propustnost membrány a také buněčné dýchání. Nanočástice stříbra mohou být absorbovány buněčným obalem, proniknout do nitra buňky, kde mohou reagovat se sloučeninami obsahujícími síru a fosforové skupiny, jako je např. DNA a tím naruší některé z funkcí, zjm. funkce, které odpovídají za dělení buňky<sup>21</sup>. 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<sup>27</sup>. Zvýšený podíl stříbra se sorbuje na povrchu buňky, proniká dovnitř a akumuluje se v cytoplazmatické membráně, kde jsou přítomny hlavní enzymatické systémy buňky. Stříbro blokuje elektronový přenos mezi enzymy dýchacího řetězce, reaguje s SH- skupinami oxidačních enzymů, zastavuje se intenzivní metabolismus buňky a buňka postupně odumírá<sup>28</sup>. Toxickým působením může dojít ke vzniku nepravidelných porů ve vnější membráně a tím ke změně její propustnosti, což je způsobeno uvolňováním lipopolysacharidových molekul a membránových proteinů<sup>22</sup>. Není přesně známo, zda je toxický efekt způsoben vlastní nanočásticí nebo je to způsobeno vznikajícími stříbrnými ionty<sup>29</sup>. Stříbrné nanočástice generují uvnitř mikroorganismů volné radikály, které ničí buněčné funkce<sup>22</sup>. U různých druhů organismů byla pozorována indukce oxidativního stresu, a také toxické působení na fotosystém II (cit.<sup>29</sup>). Buňky vystavené oxidativnímu stresu mají poškozené proteiny, nižší mastné kyseliny i DNA, zvýšený podíl peroxidovaných mastných kyselin, a to vede k nezvratnému poškození až ke smrti. Při oxidativním stresu byla zaznamenána snížená exprese genu kódujícího malou pod-

jednotku fotosyntetického enzymu. Toxicita nanočástic stříbra závisí na množství a síle přítomných ligandů<sup>30,31</sup>, dále význam má i velikost buněk<sup>32</sup>.

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 (např. ethylendiamintetraacetát) nebo tvrdost vody (zejména přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$ ) ovlivňuje toxicitu kovů<sup>23</sup>. Při posuzování inhibičních účinků se musí brát zřetel na teplotu, při vyšší teplotě se zvyšuje příjem kovů buňkou. Při 25 °C se projevoval toxický efekt, inhibice elektronového zachytu. Při stejné koncentraci byl při 31 °C inhibiční účinek vyšší. Teplota ovlivňuje účinnost nanočástic stříbra na fotosystém II. Se zvyšující se teplotou se zvyšuje vliv na strukturální vlastnosti fotosyntetického aparátu. Stříbrné nanočástice vyvolávají silný pokles fotosyntézy, což se projevuje na celkovém kvantovém výtěžku primárního fotosystému a na elektronovém transportu<sup>33</sup>.

#### 4. Účinnost preparátů se stříbrem

Na trhu jsou běžně dostupné výrobky reklamující přítomnost nanočástic stříbra, koloidního či iontového stříbra, spolu s deklarovanou účinností eliminace patogenických organismů, zejména bakterií a plísní. Pro potřeby řešeného projektu NAKI č. DF11P01OVV012, jehož výzkum je zaměřen na vývoj nových materiálů a technologií a ověření jejich funkčnosti, byl nejprve prozkoumán trh nabízející komerční výrobky řady firem, uvádějících u svých přípravků přítomnost nanočástic stříbra. Nabízené produkty mají často atest na deklarovanou účinnost eliminace patogenních organismů, bakterií a plísní, nicméně testy na řasách a vyšších organismech většinou doložené nejsou. Další otázkou je, zda je skutečně účinná avizovaná přítomná složka nanostříbra. Informace o charakteru, specifikaci a použití přípravků byly získány z volně dostupných portálů web stran společností. Cílem průzkumu bylo zjistit, jaké přípravky jsou dodávány, k čemu jsou určeny a jaké je jejich skutečné složení, zejména pokud jde o typ

Tabulka I  
Komerční přípravky pro řasové testy inhibice

Přípravek	Specifikace získaná z web stran (či dodacího listu)
Deargen-200	obsahuje komplexní ionty stříbra, složení koncentrátu je destilovaná voda, elektrolytické ionty stříbra, ligandy a synergické potravinářské látky (kyselina citrónová, peroxid vodíku, a další). Koncentrace stříbra je 200 mg l <sup>-1</sup>
Silver Sanitex	neobsahuje izopropylalkohol, vyrábí se v koncentracích 10 a 30 ppm (dle použití). Balení o obsahu 500 ml vystačí na plochu cca 15 až 20 m <sup>2</sup> zasaženého prostoru
Bioteq	8000 ppm nanostříbra, nanočástice stříbra zakotvené na anorganickém nosiči a hydrosolů stříbra
Koloidní stříbro	metalické stříbro suspendované v čisté lékařské vodě, velikost částic se pohybuje od 1,5 do 5 nm. Produkt je dodáván v koncentraci 10 ppm a objemu 300 ml. Aplikuje se na suchý a čistý povrch ve vzdálenosti 20 cm, spotřeba je 10 až 20 ml na m <sup>2</sup> , doba působení 24 h
Silver Water	přírodní kosmetika bez parfemace a jakýchkoliv chemických přísad
Antibakterin	obsahuje koncentraci stříbra 40 ppm a dodává se v objemu 500 ml

stříbra (koloidy, ionty, velikost částic). Přípravky, které byly zvoleny pro laboratorní a terénní testování, jsou specifikovány v tab. I. Zvolené přípravky byly použity ke zjištění účinnosti eliminace fototrofních deteriogenů přímo z povrchů v terénu, a dále pak i v řasových testech inhibice růstu v laboratorních podmínkách.

Vybrané preparáty byly nejprve postupně aplikovány v terénu, v reálném prostředí, přímo na beton (o různé porozitě a sklonu povrchu vzhledem k terénu – celkem 8 ploch), na plast a polykarbonát (celkem 5 ploch), na kámen (celkem 5 ploch), na hliník (celkem 3 plochy), na kanadský šindel (střešní krytina vyrobená z organických vláken a bitumenu – živice, celkem 2 plochy) a na dřevo (celkem 3 plochy). Na základě makroskopického posouzení vzhledu zasažené plochy byla předběžně zjištěna eliminace již vytvořeného fototrofního nárůstu různé velikosti plochy, mocnosti vrstvy a stáří.

Přípravky obsahující stříbro se při testech přímé aplikace na plochy porostlé mikroorganismy (řasy, sinice, mikromycety, mechorosty, lišejníky) osvědčily. Nicméně smyslem a podstatou každého testu inhibice (eliminace) mikroorganismů je zjištění efektivně účinných inhibičních koncentrací ( $EC_{50}$ ), které se zjistí na základě laboratorního testu s akvatickou kulturou. Výsledky z dále uvedeného testování nejsou placenou či neplacenou reklamou, nebo doporučením pro použití přípravků. Bližší informace o složení (viz tab. I), se nepodařilo bohužel zjistit, proto byla koncentrace stříbra dodatečně u jednotlivých výrobků stanovena pracovištěm centrálních laboratoří VŠCHT Praha.

Řasový test toxicity byl zvolen proto, že se chlorokokální řasy velmi často na vlhkých a smáčených plochách budov vyskytují a jsou obtížným typem biodeteriogenu, což vyplynulo z literární rešerše a studia biodeteriorace. Test toxicity na řasách, obecně, spočívá ve zjištění inhibice růstu buněk řas vystavených působení zkoušené látky (koncentrace). Po dobu 96 h se denně prošetřuje vzorek testované látky s nasazeným organismem pod mikroskopem na rastru počítací komůrky, čímž se zjistí počet buněk (či cenobii) v objemu 1 ml. Ze zjištěných počtů buněk (či cenobii) řas v průběhu testu se zjistí inhibice růstu a případná  $EC_{50}$ . Při úvaze přípravy řasového testu dle ČSN ISO 8692 (cit.<sup>34</sup>), jeho průběžného vyhodnocení a konečné

zjištění účinné inhibiční koncentrace byl pro testy zvolen modelový organismus, chlorokokální řasa *Desmodesmus* (*Scenedesmus*) *quadricauda* kmen Greifswald 15 ze sbírky řas BÚ AV ČR Třeboň. Tato jednobuněčná zelená řasa patří v systematickém přehledu mezi tzv. zelenivky (*Chlorophyceae*) řádu *Chlorellales*. Vyskytuje se často ve volné vodě i v nárostech na povrchu smáčených či ve vodě ponořených předmětů. Výhodou tohoto druhu řasy je neschopnost tvorby odpočinkových stádií, v laboratorních podmínkách není problém s kultivací a namnožením buněk. Při testech poskytuje jednoduchý způsob vyhodnocení míry odezvy na zkoušenou látku a interpretaci výsledků. *Desmodesmus quadricauda* je také organismem, na kterém byl vyvinut původní řasový test toxicity a test na stanovení trofického potenciálu vody.

V laboratoři použitý test toxicity (účinnosti inhibice růstu řas) byl na základě ČSN ISO 8692 modifikován. Modifikace spočívá ve volbě jiného typu zředovací vody (Knoppův roztok), výchozí koncentrace řasového inokula (80 tisíc buněk), objemu testovaného roztoku (25 ml), použití fluorescenčního nástavce a stanovení koncentrace chlorofylu-a. Z důvodu předpokládané reakce preparátu se zředovací médium a interference složek v roztoku byl jako typ zředovací vody zvolen tzv. Knoppův roztok, který obsahuje v předepsaném poměru  $KNO_3$  ( $100 \text{ g l}^{-1}$ ),  $K_2HPO_4$  ( $10 \text{ g l}^{-1}$ ),  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  ( $10 \text{ g l}^{-1}$ ) a  $FeCl_3$  ( $0,1 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ). Vyhodnocení testu je založeno na mikroskopickém hodnocení vzorků a umožňuje sledovat případnou destrukci buněk či morfologické odchylky buněk řas od původního vzhledu. Při použití fluorescenčního nástavce lze aktuálně zjistit i vitalitu buněk na základě autofluorescence chlorofylu-a. Chlorofyl-a, resp. jeho koncentrace (stanovení podle ČSN ISO 10 260, cit.<sup>35</sup>), udává nepřímo objemovou biomasu organismu, a v podstatě udává informace o nárůstu, stimulaci či inhibici řasy zkoušenou látkou. Vyšší koncentrace řasového inokula v menším objemu testovaného roztoku zaručuje správné výsledky stanovení koncentrace chlorofylu-a na začátku testu, přesnější výpočet inhibice růstu a možnost více sad paralelního stanovení v rámci jednoho testu. Koloidní či iontové stříbro nemá vliv na zastoupení fotosyntetických barviv a případnou interferenci při stanovení koncentrace chlorofylu-a<sup>36</sup>.

Přípravek	Koncentrace stříbra		$EC_{50}$ <sup>a</sup> [ $\text{mg l}^{-1}$ ]
	výrobce	centrální laboratoře VŠCHT Praha [ $\text{mg l}^{-1}$ ]	
Deargen-200	$200 \text{ mg l}^{-1}$	200	1,72
Silver Sanitex	$0,01 \text{ g kg}^{-1}$	5,42	1,12
Bioteq	8000 ppm	6660	358
Koloidní stříbro	10 ppm	5,9	0,59
Silver Water	–	3,69	0,15
Antibakterin	40 ppm	42,5	1,43

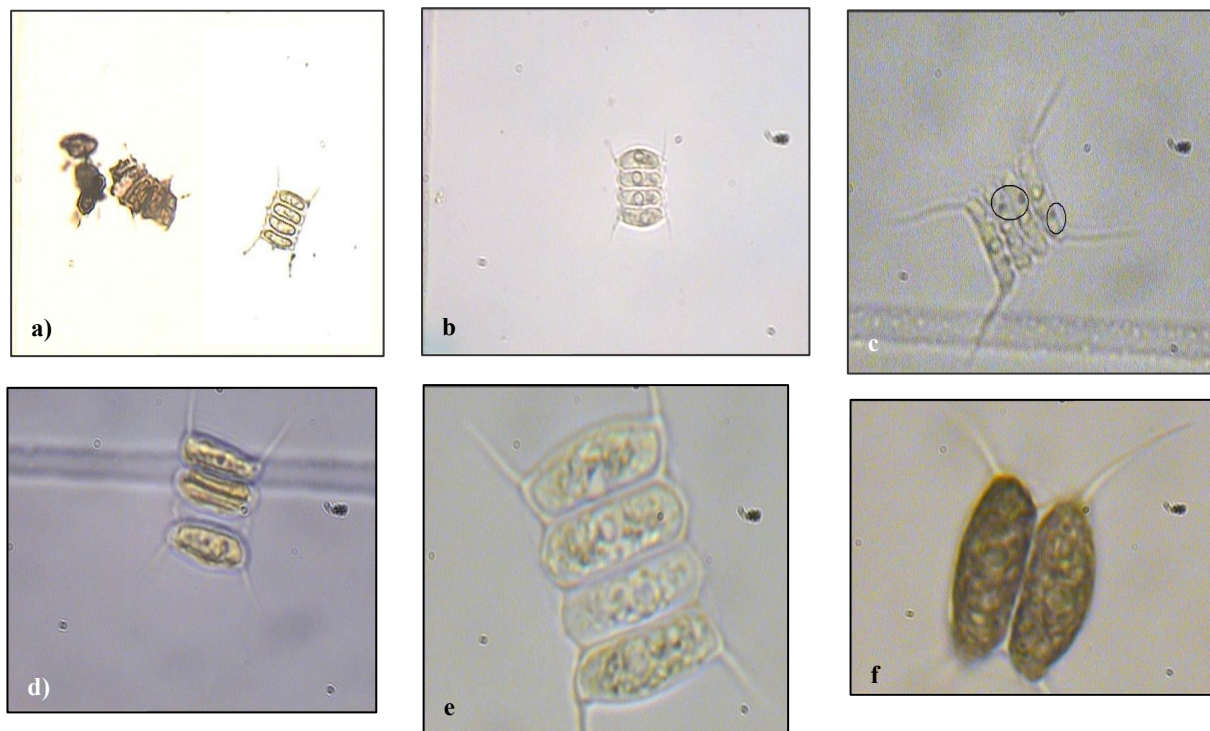
<sup>a</sup>  $EC_{50}$  představuje koncentraci zkoušené látky mající za následek 50 % úhyn či 50 % snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolnímu vzorku.

Zjištěné  $EC_{50}$  v  $mg\ l^{-1}$  a informace o toxickém účinku na chlorokokální řasu *Desmodesmus quadricauda* v roztoku uvádí tab. II. Z komerčních přípravků byly neúčinnější ty přípravky, které obsahovaly stříbrné nanočástice, než přípravky s obsahem koloidních částic stříbra. Velikost částic koloidního stříbra se pohybuje v rozmezí od 1 do 1,5  $\mu m$ , nanočástice se pohybují v rozmezích velikostí od 1  $\mu m$  do 100 nm, a velikost buněk rodu *Desmodesmus* se pohybuje v rozmezí  $9\text{--}35 \times 3\text{--}18\ \mu m$ , tudíž částice stříbra mohou pronikat i do buňky, což uvádí i literatura. V důsledku intracelulárního rozpouštění dochází k toxickému působení nanočástic uvnitř buňky a tak mohou být napadeny i vnitřní orgány a struktury. V rámci vodní expozice bylo již dříve prokázáno, že nanočástice mohou být více toxické než odpovídající ionty.

Při mikroskopickém hodnocení vykazovaly buňky řas značnou destrukci a poškození, viz obr. 1. Účinnost přípravků se projevila již po 24 h expozice řasového testu. Při mikroskopickém hodnocení se buňky jeví více poškozeny při aplikaci přípravku Deargen-200 než u přípravku Silver Sanitex a Bioteq. V případě přípravku Deargen-200 byla pozorována reakce mezi stříbrnými ionty a chloridovými ionty z pracovního roztoku, viditelná jako postupné šedavé zakalování vzorku v průběhu testu. Vznikající chlorid stříbrný zpomaloval toxické působení přípravku. Přípravek Bioteq byl z důvodu zbarvení, které by inhibovalo

fotosyntézu a tudíž i vlastní průběh testu, otestován pouze v nižších koncentracích (u ostatních přípravků byla volena koncentrace tak, aby byl zaznamenán účinek v rozmezí od 5 do 100 %, v případě tohoto přípravku se jednalo pouze o koncentrace do 25 % ředění). Přípravky Silver Water, Koloidní stříbro a Antibakterin obsahují koloidní stříbro, jejich účinky na buňky řas nebyly v porovnání s přípravkem Deargen-200 a Bioteq významně destruktivní. V mikroskopu byly při analýze pozorovány buňky, u nichž došlo k proniknutí jednotlivých částic stříbra do buňky (viz obr. 1), avšak celkově nebyly zaznamenány buňky s narušenou strukturou buněčné stěny, jako v případě přípravku Deargen-200. Z přípravků obsahující koloidní stříbro byl vysoce účinný přípravek Silver Water, dále pak přípravek Antibakterin, nejméně účinným se ukázal přípravek Koloidní stříbro.

Při detailnějším pozorování cenobií pod mikroskopem (viz obr. 1) byly patrné rozdíly v účincích, na buňkách řas pozorovány větší tmavé útvary, tudíž lze usuzovat na nabalování stříbra na povrchu buněk řas, částečně lze spekulovat i na pronikání nanočástic dovnitř buněk. Buněčná stěna řas je několikavrstevná, obsahuje glykoproteiny, celulosu, polysacharidy a sporopolenin. Povrch buňky není hladký, jsou zde četné, drobné záhyby. Při pozorování zasažených řas pod větším zvětšením objektivu bylo patrné, že se většina částic stříbra spíše nabalila na povrch této vrstvy. Stříbro



Obr. 1. Patrné účinky komerčních přípravků na buňky cenobií *Desmodesmus quadricauda* při mikroskopickém hodnocení vzorků. a) Deargen-200 (10násobné zvětšení objektivu, značná destrukce buněk cenobia), b) Bioteq, (10násobné zvětšení objektivu, vyblednutí buněk) c) Silver Water (20násobné zvětšení objektivu, akumulace částic stříbra na povrchu buněk), d) Silver Sanitex (20násobné zvětšení objektivu, akumulace částic stříbra na povrchu buněk, destrukce), e) Antibakterin (100násobné zvětšení objektivu, akumulace částic stříbra na povrchu buněk), f) iontové stříbro (100násobné zvětšení objektivu, akumulace částic stříbra na povrchu buněk, zčernání)

se pravděpodobně zachytilo na tomto nerovném povrchu, a tím bránilo řase v jejím metabolismu. I když může být stínící efekt sporný, je velice pravděpodobné, že za větší míru mortality buněk mohl právě popsáný efekt navazování/nabalování stříbra na buňky.

Z literatury je známo, že při zmenšování velikosti jednotlivé částice je tendence ke zvýšení toxicity, a to i v tom případě, že daný materiál je relativně inertní. Většina testovaných komerčních preparátů neobsahovala pouze čisté stříbro, ale také další komponenty. Do jaké míry mohou ovlivnit toxicitu těchto přípravků, není zcela jasné a nelze jednoznačně říci, že účinnou látkou v preparátech je právě přítomná forma stříbra. Z toho důvodu je potřeba provést testy toxicity s roztoky, ve kterých bude pouze definovaná koncentrace jednoho velikostního typu nanočástice, aby se skutečně zjistila účinnost nanočástice specifikované velikosti.

Vlivem interakce mezi nanočásticemi a buněčnou stěnou může dojít k poškození buněčné membrány. Koloidní stříbro je ve vodném roztoku méně stabilní než nanostříbro. Toxicita jednotlivých přípravků na řasy může být ovlivněna také délkou trvání testu. Na začátku testu se může projevat pomalý počáteční růst vlivem prvotního stresu, ale po určité době se mohou buňky řas adaptovat na přítomnost toxikantu. Vliv na případný toxický účinek nanočástice má také buněčný obal, zejména jeho složení, který může vyvolávat agregaci částic, a tím ovlivnit inhibiční účinky. Řasy mohou k regulaci akumulace stříbrných iontů a jeho subcelulární distribuce využít polysacharidy, které zároveň mohou zmírnit jeho toxické účinky na řasy, vysoká produkce polysacharidů může chránit buňky před toxickým působením těžkých kovů.

Při používání nanočástic stříbra je nutné zvažovat nejen eliminaci cílového organismu, ale i případný negativní dopad na ekosystém v širším slova smyslu. S tím souvisí i přenos nanočástic mezi mikroorganismy potravními řetězci, rozdílné působení jen na určité orgány, orgánové soustavy nebo jejich bioakumulace v organismech a abiotickém prostředí. Při vlastním testování účinků nanočástic kovů je totiž většinou vybrán typický organismus, na kterém se zjistí případné účinky, ale vlastní působení nanočástice v životním prostředí s biocenózami již zohledněno není. Do úvahy pak přistupuje v budoucnosti i případné řešení kontaminantů nanočástic naakumulovaných v životním prostředí, jejich negativní působení na populace organismů a nutnost jejich cíleného odstraňování. Řasy mají mimořádný potenciál pro akumulaci rozpuštěných těžkých kovů, zejména pro stříbro. U řas se díky adsorpci rychle váže stříbro na povrchu buňky. Adsorpcí živými i mrtvými buňkami je možná, pokud je stříbro ve formě iontu, nebo se vyskytuje v polárních sloučeninách. Při pokusech se stříbrem a zelenými řasami *Desmodesmus obliquus* narůstala akumulace stříbra poměrně rychle. Bylo dokonce zjištěno, že jakmile je stříbro začleněno do buněčné stěny, zůstává silně vázané, a to i po narušení buněčné stěny pomocí ultrazvuku, při praní v prostředí s pH 2,0, nebo při využití trávicích enzymů. Proto je nepravděpodobné, že by stříbro šlo oddělit od

složek buněčné stěny trávicí metodou. Stříbro začleněné do vnitřních komponent buňky má obzvláště vysokou afinitu na sulfhydrylové skupiny, a proto se váže především na proteiny<sup>23</sup>.

Inhibiční testy s přípravky byly zatím provedeny na modelovém organismu chlorokokální řasy *Desmodesmus quadricauda*. Studie zaměřené na výskyt řas zjistily, že nejčastějšími kolonizátory povrchů jsou kromě jednobuněčných řas (*Chlorellales*) také řasy vláknité (*Klebsormidium flaccidum*, *Ulothrix*)<sup>3</sup>. Testování na vláknitých řasách, u kterých není jednoduché provedení testu, jako v případě chlorokokálních řas, a je nutná jeho modifikace, bude pro posouzení účinku přípravků významné. Důležité je vypracovat postup vhodné metody pro případné ověřování účinnosti přípravků na reálných plochách, což je pro budoucnost ověřování účinnosti preparátů podstatné.

## 5. Závěr

Komerčně dostupné přípravky s částicemi stříbra vykazovaly účinnost eliminace fototrofních nárostů na exponovaných plochách v terénu. 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 zjištěno, že nejvyšší toxicitu vykazuje přípravek, který obsahuje nanočástice stříbra s větší reakční plochou než ostatní částice.

Řešené téma je velmi perspektivní a do budoucna je zapotřebí provést další testy s laboratorně připravenými suspenzemi stříbra a dalších kovů, nanočástic i koloidních částic a zjistit tak účinek formy, typu a koncentrace kovů. Kromě laboratorních testů s chlorokokálními řasami v roztoku bude nutné přistoupit i k ověření účinku látek na dalších typech řas a fototrofních organismů.

Nanočástice stříbra lze využít namísto agresivních chemikálií, které mohou tvořit jiné nebezpečné látky a způsobovat zdravotní obtíže. Je možné jimi ošetřovat vlhké a světlé vystavené plochy ve vodárenských provozech. Vzhledem k tomu, že není přesně známo, jakým způsobem a do jaké míry působí nanočástice kovů na okolní prostředí, nemohou být prozatím použity na plochy, které jsou v přímém kontaktu s vodou a prostředím, ale nikoliv v přímém styku s upravovanou a pitnou vodou (dle vyhlášky č. 409/2005 Sb.<sup>37</sup>). I přes toto omezení je možnost použití velmi široká.

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

## LITERATURA

1. Macedo M. F., Miller A. Z., Dionísio A., Saiz-Jimenez C.: *Microbiology* 155, 3476 (2009).
2. Tomaselli L., Lamenti G., Bosco M., Tiano P.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 46, 251 (2000).

3. Ortega-Calvo J. J., Ariño X., Hernandez-Marine M., Saiz-Jimenez C.: *Sci. Total. Environ.* 167, 329 (1995).
4. Polo A., Cappitelli F., Brusetti L., Principi P., Villa A., Giacomucci L., Ranalli G., Sorlin, C.: *Microb. Ecol.* 60, 1 (2010).
5. Young M. E., Alakomi H. L., Fortune I., Gorbushina A. A., Krumbein W. E., Maxwell I., McCullagh C., Robertson P., Saarela M.: *Environ. Geol.* 56, 631 (2008).
6. Miller A. Z., Laiz L., Gonzalez J. M., Dionísio A., Macedo M. F., Saiz-Jimenez C.: *Sci. Total. Environ.* 405, 278 (2008).
7. Bolívar F. C., Sánchez-Castillo P. M.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 40, 205 (1997).
8. Morton L. H. G., Greenway D. L. A., Gaylarde C. C., Surman S. B.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 41, 247 (1998).
9. Miller A. Z., Dionísio A., Macedo M. F.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 57, 136 (2006).
10. Pentecost A.: *Br. Phycol. J.* 27, 145 (1992).
11. Schumann R., Häubner N., Klausch S., Karsten U.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 55, 213 (2005).
12. Crispim C. A., Gaylarde C. C.: *Microb. Ecol.* 49, 1 (2005).
13. Prieto B., Silva B., Rivas T., Wierzchos J., Ascaso C.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 40, 191 (1997).
14. Ascaso C., Wierzchos J., Castello R.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42, 29 (1998).
15. Bellinzoni A. M., Caneva G., Ricci S.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 51, 203 (2003).
16. Lamenti G., Tiano P., Tomaselli, L.: *J. Appl. Phycol.* 12, 427 (2000).
17. Flores M., Lorenzo J., Gómez-Alarcón G.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 40, 241 (1997).
18. Zurita Y. P., Cultrone G., Castillo P. S., Sebastián E., Bolívar F. C.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 55, 55 (2005).
19. Urzi C., Realini M.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42, 45 (1998).
20. Lansdown A. B.: *Silver. I: Journal of Wound Care* 11, 125 (2002).
21. Guang Y.: *Carbohydr. Polym.* 87, 839 (2012).
22. Kim J. S.: *Biol. Med.* 3, 95 (2007).
23. Panáček A., Kvítek L., Pucek R.: *J. Chem. Phys.* 110, 16248 (2006).
24. Ratte H. T.: *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 89 (1999).
25. Percival S. L., Bowler P.G., Russel D.: *J. Hosp. Infection* 60, 1 (2005).
26. Sondi I., Salopek-Sondi B.: *J. Colloid Interface Sci.* 275, 177 (2004).
27. Oukarroum A., Polchtchikov S.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 877 (2011).
28. Bing W., Yin W., Yi-Hsuan L., Horst, A.; Zhipeng W., Da-Ren Ch.: *Environ. Sci. Technol.* 44, 1484 (2010).
29. Navarro E., Baun A., Behra R.: *Ecotoxicology* 17, 372 (2008).
30. Oukarroum A.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 80 (2012).
31. Křížková S., Adam V., Kizek R.: *Chem. Listy* 103, 559 (2009).
32. Hiriart-Baer V. P.: *Aquat. Toxicol.* 78, 136 (2006).
33. Aruoja V., Dubourguier H. C, Kasemets K., Kahru A.: *Sci. Total. Environ.* 407, 1461 (2009).
34. ČSN ISO 8692: *Kvalita vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas* (2012)
35. ČSN ISO 10 260: *Jakost vod – Měření biochemických ukazatelů. Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu-a* (1996)
36. Vyslyšelová P.: *Bakalářská práce*. Univerzita Palackého, Olomouc 2010.
37. Vyhláška č. 409/2005 Sb. *o hygienických požadavcích na výrobky přicházející do přímého styku s vodou a na úpravu vody*.

**J. Říhová Ambrožová, P. Adámková, and V. Škopová** (*Department of Water Technology and Environmental Engineering, Institute of Chemical Technology Prague*): **Phototrophic Deteriogens and Their Elimination from Surfaces by Nanoparticles**

This review deals with the current state of biodeterioration caused mainly by phototrophic organisms. Due to their metabolic activity, growth and life strategy, the microorganisms cause, erosion, degradation and colouring of building surface. Physical and chemical effects also contribute to biodeterioration. Identification of biodeteriogens and determination of the degree of surface colonization are the basis of conservation of building surface. Chemical methods of surface treatment might be hazardous and, therefore, the use of environment-friendly methods based on nanotechnologies seem more promising. This review deals with toxicity of Ag compounds, colloids, particles and ions. Some commercial products were tested both outdoors and in laboratory. The algal toxicity test has been modified and carried out on chlorococcal algae *Desmodesmus quadricauda* Greifswald 15. The preparations containing Ag nanoparticles are highly effective in solution and on materials surface. Their toxicity was mainly affected by their concentration and particle size. Ag nanoparticles are more toxic than Ag ions. The highest toxicity was found with preparations containing Ag nanoparticles with reactive surface.