
VÝUKA CHEMIE

NANOTECHNOLOGIE VE VÝUCE PŘÍRODNÍCH VĚD

MARKÉTA VANÍČKOVÁ^a,
JANA SOUKUPOVÁ^{a,b} a LIBOR KVÍTEK^{a,b}

^a Univerzita Palackého, Katedra fyzikální chemie, tř. 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, ^b Centrum pro výzkum nanomateriálů, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
jana.soukupova@upol.cz

Došlo 15.3.10, přijato 17.5.10.

Klíčová slova: nanočástice stříbra, iontové stříbro, toxicita, trepka velká

Úvod

Nanotechnologie představují zásadní technologický zlom ve vývoji lidstva, který je srovnatelný s nástupem elektronizace založené na polovodičových materiálech z období druhé poloviny 20. století. Optimistické předpovědi rychlého rozvoje nanotechnologií jsou v posledních letech doprovázeny silným hlasem ekologických iniciativ, které varují před možnými negativními dopady nanotechnologických produktů na životní prostředí, člověka nevyjímaje. Bez ohledu na zatím ne zcela jasný environmentální dopad nanoproduktů, pronikly již mnohé nanomateriály z vědeckých laboratoří do běžného života. S nanotechnologickými produkty se tak mají možnost setkat lidé, kteří ani mnohdy netuší, co pojem „nanotechnologie“ představuje. Právě tyto lidé jsou ale snadno ovlivnitelní ať již populistickými výroky ze strany horlivých zastánců nanotechnologií, tak ze strany jejich odpůrců. Studenti však ovlivnitelní být rozhodně nemusí a mohou si vytvořit objektivní názor na základě vědomostí a vlastních zkušeností s nanomateriály. Možnost setkat se s těmito materiály by jim měla poskytnout již výuka přírodovědných předmětů na středních školách. Právě nové trendy ve výuce na základních i středních školách, ve kterých hraje nezastupitelnou roli mezioborové pojetí výuky přírodních věd, napomáhají škole splnění této důležité úlohy. K integrovanému pojetí výuky přírodních věd chce přispět i tento článek, který přibližuje studentům jeden z nanomateriálů z pohledu jeho přínosu i rizik pro člověka a životní prostředí.

Nanočástice stříbra umožňují propojit poznatky z chemie, fyziky, biologie a ekologie do jednoho celku

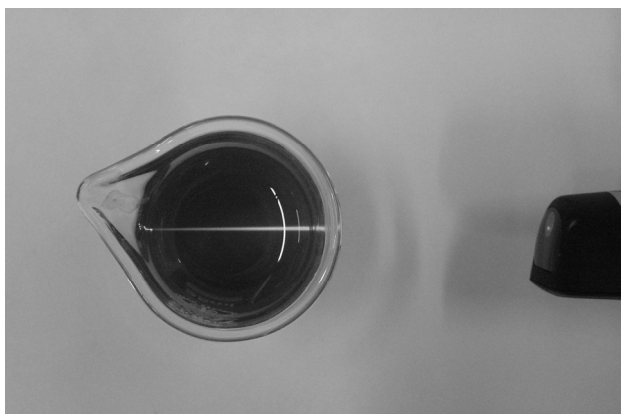
zasazeného do rámce nejnovějších vědeckých poznatků. V tomto směru jsou nanočástice stříbra ideálním objektem, protože stříbro samotné je studentům velmi dobře známé minimálně ve své makroskopické podobě (tzn. jako stříbrolesklý ušlechtilý kov). V rámci navržených experimentů si budou moci studenti připravit nanočástice stříbra (chemická fáze) a podrobit je interakci se světlem (fyzikální fáze). Biologický, resp. ekologický, pohled na nanočástice stříbra přináší následný toxikologický experiment prokazující výrazně nižší toxicitu nanočástic stříbra vůči jednobuněčnému organismu trepky velké v porovnání se stříbrem iontovým.

Teoretická část

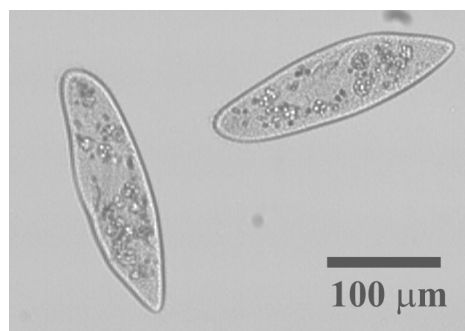
Koloidní chemie je rozsáhlým vědním oborem zahrnujícím systémy, které lidstvo používá od nepaměti. Například mléko je typickým reprezentantem disperzní soustavy koloidního typu. Tento systém, ostatně jako všechny koloidní systémy, obsahuje dvě složky – disperzní prostředí a disperzní fázi (pozn. u mléka – vodné prostředí a tukové částice)¹. Aby mohl být systém označen jako koloidní, musí splňovat podmínku², že velikost částic disperzní fáze se pohybuje v rozsahu od 1 nm po přibližně 1000 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Nanosystémy přitom představují specifický typ koloidně disperzních soustav, které obsahují částice disperzní fáze ve velikostním rozsahu od 1 do 100 nm. Vědní odvětví, které se zabývá těmito nanomateriály, je pak označováno jako nanotechnologie. Nanomateriály mají na rozdíl od makroskopických forem (angl. bulk) chemicky identických materiálů zcela odlišné fyzikální, chemické i biologické vlastnosti. Odlišnost těchto charakteristik souvisí právě s jejich nanorozměrem. Typickým příkladem materiálu mající rozdílné vlastnosti v makroskopické a nanoskopické podobě je stříbro. Přechodem z makro- do nanorozměru pozbývá typické stříbrolesklé zbarvení a nabývá žlutooranžové až žlutošedé zbarvení, jsou-li nanočástice rozptýlené ve vodné disperzi. Nicméně nanočásticová podoba tohoto kovu není zcela známá. Široká veřejnost se s ní ale může setkat např. v „nezapáchajících ponožkách“³ či v domácích spotřebičích, kde jsou nanočástice deklarované jako „to něco“, co má antibakteriální vlastnosti⁴. Biologická aktivita makroskopické formy stříbra je známa poměrně dlouho. V nanočásticové podobě jsou antibakteriální účinky stříbra mnohokrát zesíleny, ovšem nejvyšší antibakteriální aktivity dosahuje stříbro rozdispergované až do atomární podoby – iontové stříbro – tedy stříbro obsažené ve sloučeninách v oxidačním stavu +I (cit.⁵).

Nanočástice stříbra lze obecně připravit pomocí dvou zcela odlišných fyzikálně-chemických metod, a to metodami dispergačními nebo kondenzačními. Prvně jmenované

metody jsou založené na rozměňování (dispergaci) makroskopického materiálu na materiál nanoskopických rozměrů v elektrickém oblouku či laserovým zářením⁶. Druhá skupina metod je naopak založena na skládání jednotlivých atomů do částic o finální velikosti několika jednotek či desítek nanometrů. Podstatou kondenzačních metod je nejčastěji redukce prekurzoru v podobě stříbrných solí (např. dusičnan stříbrný⁷) redukčním činidlem (např. tetrahydridoboritan sodný⁸, citronan sodný⁹ či řada redukujících sacharidů⁷). Jednoduchou metodu přípravy nanočástic stříbra představuje modifikace Tollensovy reakce, kterou je na středních školách demonstrována přítomnost redukujících sacharidů za vzniku stříbrného zrcátka¹⁰. Vhodným nastavením reakčních podmínek lze ale místo makroskopického stříbra připravit stříbro nanoskopické. Vzhledem ke své velikosti není bohužel možné nanočástice stříbra pozorovat klasickým optickým, nýbrž elektronovým mikroskopem. Ovšem vzhledem k velké finanční a časové náročnosti použití elektronového mikroskopu jsou v pedagogické praxi používány levnější a dostupnější nepřímé metody pozorování nanočástic založené na rozptylu světla. Kovové nanočástice, a tedy i nanočástice stříbra, jsou detegovatelné na základě charakteristické absorpce světla. K té u nanočástic stříbra dochází v oblasti vlnových délek 400–420 nm, a proto lze pozorovat i pouhým okem charakteristické žlutooranžové až žlutošedé zbarvení jejich disperzí¹¹. Přítomnost nanočástic v disperzi ale můžeme potvrdit již na základě zmíněného rozptylu světla za použití laserového ukazovátka. Intenzivní záření laseru je na částicích rozptýleno a pouhým okem tak můžeme, v kolmém směru k procházejícímu paprsku, pozorovat světelný kužel procházející disperzí – Tyndallův kužel (obr. 1, cit.¹²). Jako referenční vzorek lze použít destilovanou vodu. Vzhledem k tomu, že destilovaná voda neobsahuje částice, které by dokázaly rozptýlit dopadající laserové záření, nelze průchod laserového paprsku tímto homogenním prostředím pozorovat.



Obr. 1. Tyndallův jev. Průchod laserového paprsku zředěnou disperzí nanočástic stříbra (1:1). Pozorováno pod úhlem 90°



Obr. 2. Organismus trepky velké (*Paramecium caudatum*)

Stříbro, ať ve své nanočásticové nebo iontové podobě, je v současné době často používáno k antibakteriální úpravě povrchů běžných materiálů, např. textilií. Odtud se pak mohou jak nanočástice, tak i ionty stříbra dostávat do životního prostředí (např. při praní), kde mohou významným způsobem narušit biologickou rovnováhu¹³. Výrazný dopad, podobně jako u jiných těžkých kovů, může být pozorován především na nejnižší taxonomické úrovni, tzn. u prokaryotických a jednoduchých eukaryotických organismů. Důsledky toxického účinku na této úrovni mohou mít ovšem významný dopad na potravní řetězec, jehož jsou tyto organismy součástí. Jednoduchý eukaryotický organismus trepky velké (*Paramecium caudatum*) je proto standardně používaným indikátorem toxicity znečišťujících látek v životním prostředí (obr. 2, cit.¹⁴). Tento organismus je proto využitelný i ke stanovení toxického účinku nanočástic a iontů stříbra i proto, že díky své velikosti (180 až 250 μm) je již velmi dobře pozorovatelný pod optickým mikroskopem. Navíc není jeho laboratorní chov nikterak složitý. Z těchto důvodů je tento organismus využíván často i na středních školách v rámci biologických cvičení¹⁵. Trepka velká je organismus, který se neustále pohybuje. Kromě toho, že se pomocí řasinek, které pokrývají celý povrch tohoto organismu, pohybuje v médiu, zároveň rotuje kolem vlastní buněčné osy. Toxickým znečištěním kultury dojde k ovlivnění obou těchto pohybů. Nejdříve dojde k zastavení jedince na místě a trepka rotuje pouze kolem své osy. Následně pak dochází k zastavení i tohoto pohybu a organismus umírá. Mrtvý organismus se poté kompletně rozloží bez zanechání jakýchkoliv v mikroskopu pozorovatelných buněčných segmentů, které by znečišťovaly kulturu. Pro vyjádření toxicity látek vůči živým organismům je používána řada parametrů, např. parametr LC_{50} (lethality concentration of 50 % of organisms = koncentrace, při které dojde za definovaný čas k úhynu 50 % organismů přítomných ve vzorku)¹⁵. Nicméně přesnost stanovení této koncentrace a přesnost zaznamenání úhynu 50 % organismů je v prostředí středněškolských laboratoří velmi složitá. Pro kvantitativní studium toxicity je tak vhodnější využití dalšího parametru – LT_{100} (lethality time of 100 % of organisms = čas, za který

dojde k úhynu 100 % organismů). Jedná se vlastně o čas, kdy dojde k zastavení pohybu všech přítomných trepek ve vzorku, popř. rozpadu těl jedinců, kteří uhynuli dříve. Vyhodnocení toxického účinku nanočásticového a iontového stříbra lze tak jednoduše realizovat porovnáním časů pro úhyn všech trepek při stejné koncentraci různých forem stříbra ve vzorku.

Experimentální část

Pomůcky

K provedení experimentů je nutné mít k dispozici lžičku, stříčku, váženku, váhy, zkumavky, kádinky, odměrné baňky, skleněné pipety (nejlépe o objemu 5 ml), balónek, skleněnou tyčinku, kapátko, optický mikroskop, podložní sklíčko, buničinu, laserové ukazovátka a stopky. Pokud škola disponuje magnetickou míchačkou a míchadlem, je vhodnější použít toto zařízení místo méně intenzivního míchání skleněnou tyčinkou. Úspěšnost neutralizace původně připravené silně alkalické disperze nanočástic stříbra může být ověřena pH-metrem či lakmusovými papírky.

Chemikálie a biologický materiál

Syntéza nanočástic stříbra vyžaduje prvotní přípravu zásobních roztoků: dusičnanu stříbrného (AgNO_3 ; $0,005 \text{ mol dm}^{-3}$), amoniaku (NH_3 ; $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$), hydroxidu sodného (NaOH ; $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$) a D-glukosy ($0,05 \text{ mol dm}^{-3}$). Za účelem zneutralizování silně alkalické disperze nanočástic stříbra (pH 11,4) je použit roztok kyseliny octové (CH_3COOH ; $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Zároveň je třeba si připravit roztok dusičnanu stříbrného o koncentraci $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$, který obsahuje stejné množství stříbra jako připravená disperze, ale v iontové podobě. Biologický materiál, tedy kulturu trepky velké, lze získat standardní metodou ze senného nálevu¹⁵. Pro veškeré experimenty, zahrnující přípravu nanočástic stříbra a přečištění kultury trepky velké, je nutné použít destilovanou či demineralizovanou vodu.

Pracovní postup

Chov trepky velké

Kulturu trepky velké získáme ze senného nálevu po 14 dnech (cit.¹⁵). Takto připravenou tzv. primární kulturu musíme ale následně přečistit vzhledem k vysokému obsahu elektrolytů, jejichž přítomnost je pro provedení následných toxikologických testů naprosto nežádoucí. Ze senného nálevu tedy odpipetujeme $0,5 \text{ ml}$ „primární kultury“ do zkumavky a doplníme do objemu 10 ml destilovanou vo-

dou. Takto nově založenou kulturu necháme dostatečně namnožit (po dobu cca 7 dní). Indikací správného namnožení kultury je přítomnost alespoň 20 jedinců v jedné kapce kultury přenesené na podložní sklíčko.

Příprava a detekce nanočástic stříbra ve vodné disperzi

Příprava nanočástic stříbra vyžaduje několik po sobě jdoucích kroků, jejichž pořadí je nutné dodržet. Nejdříve si připravíme diaminstříbrný kation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ prostým smícháním 5 ml roztoku AgNO_3 ($0,005 \text{ mol dm}^{-3}$) s 5 ml NH_3 ($0,025 \text{ mol dm}^{-3}$). Následným přidavkem 10 ml roztoku NaOH ($0,025 \text{ mol dm}^{-3}$) nastavíme pH systému (na hodnotu rovnou 11,4), které je nezbytné k syntéze nanočástic. Všechny tyto reakční komponenty dobře promícháme buď skleněnou tyčinkou, nebo lépe pomocí elektromagnetické míchačky a míchadla. Posledním krokem je vlastní redukce, kterou provedeme přidavkem 5 ml D-glukosy o koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ (viz rov. (1)). Přidavek musí být proveden velmi rychle, a tak si odpipetujeme 5 ml této redukční látky do kádinky. Celý objem roztoku redukční látky poté najednou přilijeme k ostatním složkám reakční směsi. Následně musíme celou reakční směs velmi intenzivně míchat po dobu cca 5 min. Příprava nanočástic stříbra je dokončena v okamžiku, kdy už reakční směs nemění svou barvu; tedy v tom okamžiku, kdy vzniklá disperze dosáhne žluto-šedého zbarvení.

Vzniklou vodnou disperzi poté podrobíme interakci s laserovým paprskem. Přítomnost nanočástic stříbra je potvrzena vznikem Tyndalova kužele. Pro potřeby testů toxicity musíme nejdříve připravenou vodnou disperzi nanočástic stříbra zneutralizovat. Již samotné vysoké pH disperze (pH 11,4) je totiž pro testovaný organismus trepky velké toxické, a proto je nutné disperzi nejprve zneutralizovat. Za tímto účelem přidáme k připraveným 25 ml disperze nanočástic stříbra, po kapkách a za současného intenzivního míchání, 2 ml CH_3COOH ($0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Tímto způsobem snížíme pH z hodnoty 11,4 na hodnotu cca 7,1.

Experiment vyhodnocující toxicitu nanočásticového a iontového stříbra

Testy zhodnocující toxicitu obou forem stříbra provedeme následujícím způsobem. Tři vzorky o různé koncentraci nanočástic stříbra připravíme tak, že připravenou disperzi naředíme destilovanou vodou 2,5krát (tzn. 2 díly disperze nanočástic stříbra + 3 díly destilované vody), druhý vzorek naředěný 25krát (tzn. 1 díl 2,5krát zředěné disperze a 9 dílů destilované vody) a třetí vzorek naředěný 250krát (1 díl 25krát zředěné disperze smícháme s 9 díly destilované vody). Z každé ze tří připravených disperzí odpipetujeme 1 ml do předem připravené zkumavky, kterou označíme číslem (1, 2, 3) podle klesající koncentrace stříbra. Stejný způsob ředění aplikujeme i u vzorků obsa-



Tabulka I

Toxický účinek iontového stříbra a nanočástic stříbra na trepku velkou vyjádřený pomocí LT_{100}

Finální zředění	Koncentrace stříbra v systému [mol dm^{-3}]	Hodnota LT_{100} [s]	
		iontová forma stříbra – Ag^+	nanočásticová forma stříbra – Ag^0
5×	0,0002		
50×	0,00002	<i>doplň student</i>	<i>doplň student</i>
500×	0,000002		

hujících iontové stříbro. Tyto vzorky označíme písmeny – A, B, C. Přídavek kultury trepky velké ke vzorkům 1–3 a A–C musíme provést až těsně před vlastním mikroskopickým pozorováním. Přídavkem 1 ml kultury ke každému ze šesti vzorků dojde ještě k dodatečnému zředění koncentrace stříbra na konečné hodnoty $0,0002 \text{ mol dm}^{-3}$; $0,00002 \text{ mol dm}^{-3}$ a $0,000002 \text{ mol dm}^{-3}$ v obou sériích.

Vlastní toxický efekt nanočásticového i iontového stříbra zhodnotíme stanovením parametru LT_{100} . Po přidavku kultury trepky velké ke vzorku stříbra (1 ml + 1 ml) a po promíchání přeneseme kapku vzorku co nejrychleji na podložní sklíčko. V okamžiku smíchání příslušné formy stříbra a kultury testovaného organismu spustíme stopky a měříme čas, za který uhynou všechny trepky v pozorované kapce. Pro pozorování použijeme zvětšení 40×. Maximální doba pozorování je 10 min. Výsledky pozorování zaznamenáme do připravené tabulky I. Pro větší věrohodnost získaných výsledků je vhodné provést tento experiment u každého vzorku třikrát, i když při zachování popsaného postupu jsou výsledky experimentu velmi dobře reprodukovatelné. V případě, kdy po 10 min pozorování nedojde k úhynu trepek ve vzorku, zapisujeme do tabulky hodnotu $LT_{100} > 600 \text{ s}$.

Závěr

Na základě provedených experimentů zjistíme hodnoty LT_{100} , jejichž porovnáním vyhodnotíme, která z obou testovaných forem stříbra je toxičtější.

Metodické poznámky pro učitele a otázky pro studenty

Metodické poznámky

Příprava vodné disperze nanočástic stříbra. Po celou dobu přípravy nanočástic stříbra je nutné dbát na přesnost pipetování jednotlivých reakčních komponent a pořadí jejich přidání. Nanejvýše nutné je také intenzivní míchání reakční směsi především od okamžiku přidání redukčního činidla až do ukončení redukce indikované změnou zbar-

vení směsi. Před vlastní přípravou je vhodné důkladně umýt všechny kádinky a odměrné baňky v destilované vodě. Reakční kádinku je navíc vhodné vymýt zředěnou kyselinou dusičnou (1:1) a následně i destilovanou vodou.

Indikace toxického účinku stříbra na trepku velkou. Při pozorování kultury trepky velké pod mikroskopem lze zaznamenat jisté změny v chování jedinců. Vlivem stříbra, v příslušné formě a toxické koncentraci, dochází k pozorovatelnému omezení pohybu trepky, která se v první fázi přestane pohybovat v médiu a rotuje pouze kolem vlastní osy. Následně dojde k zastavení i tohoto pohybu, což indikuje úhyn organismu. Postupem času dojde k rozpuštění celé buňky trepky velké.

Evaluace toxického účinku stříbra vůči trepce velké. Pozorováním kultury trepky velké ovlivněné studovanými koncentracemi stříbra v nanočásticové či iontové formě dojdeme k závěru, že se snižující se koncentrací iontového stříbra bude docházet k nárůstu času, po který je trepka velká schopná přežít. Zatímco v roztoku iontového stříbra o koncentraci $0,00002 \text{ mol dm}^{-3}$ dojde k úhynu všech trepek během cca 20 sekund, u koncentrace desetkrát nižší lze úhyn všech trepek pozorovat až po 2,5 minutách. Tento trend není ovšem patrný u nanočásticového stříbra a během deseti minut nedojde k úhynu organismů v kultuře ani u nejvyšší testované koncentrace. Nicméně je možné otestovat i koncentrace vyšší a zjistit, při jaké koncentraci bude docházet k úhynu trepek v rámci stanoveného časového intervalu 10 minut.

Otázky

1. Popište způsob, jakým se pohybuje trepka velká ve vodném prostředí/médiu v době, kdy není ovlivněna ani iontovým ani nanočásticovým stříbrem.
2. Mění se chování trepky po přidání iontového stříbra ve srovnání s nanočásticovým stříbrem o stejné koncentraci?
3. Jak se mění chování trepky velké po přidavku nejnižší koncentrace iontového stříbra v určeném časové intervalu 10 minut?

Autoři děkují za finanční podporu Ministerstva školství České republiky (1M6198959201).

LITERATURA

1. Panáček A., Kvítek L.: Chem. Listy 99, 606 (2005).
2. Miyoshi N., Kawano T., Tanaka M., Kadono T., Kosaka T., Kunimoto M., Takehashi T., Hosoya H.: J. Health Sci. 49, 429 (2003).
3. Nanotrade, s.r.o.: *Produkty s antibakteriálními účinky* [online]. 2008. Dostupný z WWW: <http://www.nanotrade.cz/produkty/produkty-s-antibakteriálními-ucinky-2>, staženo 11. 11. 2009.
4. Samsung Silver Nano [online]. 2008. Dostupný z WWW: <http://www.samsung.com/au/silvernano/site.html>, staženo 11. 11. 2009.
5. Panacek A., Kvitek L., Pucek R., Kolar M., Vecerova R., Pizurova N., Sharma V. K., Nevecna T., Zboril R.: J. Phys. Chem., B 110, 16248 (2006).
6. Mafune F., Kohno J., Takeda Y., Kondow, T., Sawabe, H.: J. Phys. Chem., B 104, 9111 (2000).
7. Kvítek L., Pucek R., Panáček A., Novotný R., Hrbáč J., Zbořil R.: J. Mater. Chem. 15, 1099 (2005).
8. Li X., Zhang J., Xu W., Jia H., Wang X., Yang B., Zhao B., Li B., Ozaki Y.: Langmuir 19, 4285 (2003).
9. Pillai Z.S., Kamat P.V.: J. Phys Chem., B. 108, 945 (2004).
10. Kolář K., Kodíček M., Pospíšil J.: *Chemie /Organická a Biochemie/ II pro gymnázia*. SPN, Praha 2005.
11. Slistan-Grijalva A., Herrera-Urbina R., Rival-Silva J. F., Ávalos-Borja M., Castillon-Barraza F. F., Posada-Amarillas A.: Physica E 27, 104 (2005).
12. Ščukin E. D., Percov A. V., Amelinová E. A.: *Koloidní chemie*. Akademia, Praha 1990.
13. Křížková S., Adam V., Kizek R.: Chem. Listy 103, 559 (2009).
14. Miyoshi N., Kawano T., Tahala M., Kadono T., Kosaka T., Kunimoto M., Takahashi T., Hosoya H.: J. Health Sci. 49, 429 (2003).
15. Jelínek J., Zicháček V.: *Biologie pro gymnázia*. Nakladatelství Olomouc, Olomouc 2000.

M. Vaničková^a, J. Soukupová^{a,b}, and L. Kvítek^{a,b}
 (^a Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc; ^b Center for Nanomaterial Research, Palacký University, Olomouc): **Nanotechnology in Teaching Natural Science**

Nanomaterials are now produced in large quantities due to their useful properties different from other materials. Possible toxicity of nanomaterials is currently addressed and discussed. Using a modified Tollens process, an aqueous dispersion of Ag nanoparticles was prepared, on which their unique properties and changes of material characteristics when approaching nano dimensions can be demonstrated. Also, experiments regarding toxicity of nanoparticles were proposed. Toxicity of the nanoparticles was tested on *Paramecium caudatum*. Following the instruction, the students discover that the prepared Ag nanoparticles are much less toxic than ionic Ag. The proposed experiments bring interdisciplinary chemical, physical, and biological findings and knowledge.