

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
Katedra botaniky

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory



Bakalářská práce

**Využití křemičitých struktur rozsivek a chrysomonád v  
nanotechnologiích**  
**Applications of diatom and chrysophyte silica structures in  
nanotechnologies**

**Barbora Burýšková**

Vedoucí práce:  
doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

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

V Praze, 13. 5. 2015

Podpis

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Yvonne Němcové, Ph.D., za její trpělivost, vstřícnost a odborné vedení při vypracování bakalářské práce. Dále mé díky patří spolužákům z Přírodovědecké fakulty, za skvělou podporu a motivaci.

## **Abstrakt**

Rozsivky a chrysomonády (chrysofyta) jsou jednobuněčné organismy se schopností biomineralizace dovedené k dokonalosti. Zabudováváním křemíku do svých schránek tvoří rozsivky propracované křemičité 3D struktury nesoucí hierarchicky uspořádané póry různé velikosti (na úrovni mikro- a nanoměřítko). Rozsivky se v přírodě vyskytují téměř ve všech vodních a aeroterestrických prostředích. Podílejí se na globálním cyklu Si a představují významné primární producenty. Jejich schránky (frustuly) mají druhově specifickou morfologii. Frustula má unikátní optické, fotonické a mechanické vlastnosti. Na Zemi je více než 12 000 druhů rozsivek, což představuje poměrně obrovskou diverzitu tvarů křemičitých schránek, které lze využít v nanotechnologiích, přesto se zatím experimentálně pracuje jen s několika málo druhy. Silifikující chrysofyta mají buňky pokryté šupinami stejného chemického složení, jako frustuly rozsivek. Využití křemičitých šupin těchto organismů v nanotechnologiích je zatím zcela na počátku. Cílem bakalářské práce je shrnout znalosti o využití rozsivek a chrysomonád ve vznikajících technologiích, a sumarizovat dosud publikované informace o využití frustul pro biosensing. Perspektivní je využití frustul pro dopravu a selektivní uvolnění terapeutických látek, což by mohlo otevřít rozsivkám široké pole působnosti především v medicíně.

**Klíčová slova:** rozsivky, chrysofyta s křemičitými šupinami, nanotechnologie, nanočástice, biosensing, systémy doručující léčiva

## **Abstract**

Diatoms and chrysophytes are single-celled organisms who have mastered the ability of controlling the biomineralization process. By incorporating silicon into their cell walls diatoms are able to create elaborate 3D silica structures with hierarchically ordered patterns and pores at the nano- to millimetre scale. In nature, diatoms inhabit almost all aquatic and aeroterrestrial environments. They play an important role in the global biogeochemical silicon cycle and contribute significantly to oceanic primary production. The morphology of diatom cell walls (frustules) is species specific and the frustules exhibit unique photonic, optical and mechanical properties. There are more than 12 000 diatom species on earth, which represents the vast diversity of silica frustule shapes, applicable in nanotechnologies. However, only a few species have been used in experimental praxis so far. The cells of silicifying chrysophytes are covered with scales composed of the same material as the diatom frustules. The potential use of chrysophyte silica scales in nanotechnologies is in the early stages of investigation. The aim of this bachelor's thesis is to recapitulate the findings on diatom and chrysophyte silica structures use in emerging nanotechnology applications, and to summarize published information on frustule use in biosensing. The application of frustules in drug and gene delivery systems seems to be very promising and suggests their further use as tools in biomedicine.

**Key words:** diatoms, silica-scaled chrysophytes, nanotechnology, nanoparticles, biosensing, drug delivery systems

## Obsah:

1.	Úvod.....	1
2.	Rozsivky a chrysofyta.....	2
3.	Biominalizace.....	3
4.	Struktura křemičitých obalů a jejich biogeneze.....	5
4.1.	Frustula.....	5
4.2.	Biogeneze frustuly.....	7
4.3.	Křemičité šupiny a jejich biogeneze.....	8
4.4.	Křemičité cysty a jejich biogeneze.....	10
5.	Nanotechnologie.....	11
5.1.	Biofotonické vlastnosti frustul.....	11
5.2.	Fotoluminiscence – využití frustul jako biosenzorů.....	13
5.3.	Syntéza nanočástic a biosorpce.....	15
5.4.	Křemičité struktury jako nošice léčiv a genů.....	18
6.	Závěr.....	21
7.	Seznam Literatury.....	22

## 1 Úvod

Rozsivky jsou fotosyntetizující jednobuňčná eukaryota obývající téměř všechna vodní a aeroterestrická prostředí na světě. Díky jejich schopnosti tvořit vysoce strukturované křemičité schránky, takzvané frustuly, se spolu s chrysomonádami staly zajímavými organismy pro využití v nových biotechnologických metodách, nanotechnologii a výrobě biomateriálů. Jsou to významní primární producenti, kteří se množí exponenciálně a procesem biosilifikace tvoří velká množství využitelného materiálu (Kröger and Poulsen 2008). Kromě rozsivek pěstovaných v jednodruhových kulturách *in vitro* lze využít také fosilní schránky, neboli křemelinu. Křemelina se používá například ve filtračních systémech nebo jako insekticid k ochraně skladovaných obilnin (Vayias et al. 2009). Díky obrovské diverzitě tvarů frustul jednotlivých druhů rozsivek jsou tyto řasy ideálními modely pro výzkum souvislostí mezi genotypem a trojrozměrnou strukturou fenotypu živého organismu.

Studium rozsivek bylo až do roku 1930 považováno za koníček amatérských vědců, kteří obdivovali krásu a rozmanitost jejich schránek. Takto roku 1874 vznikl zásluhou Adolfa Schmidta velký Schmidtův Atlas rozsivek, a belgičan Henri van Heurck investoval své vlastní peníze do výroby speciálního imerzního objektivu (Gordon et al. 2009). S nástupem molekulárních technik byl výzkum zaměřen na vnitřní struktury rozsivek, jejich ekologický význam jako fixátorů oxidu uhličitého, a způsob ukládání křemíku. Počátkem 21. století se vědci opět začali zajímat o frustuly těchto řas, které mají zajímavé mechanické a chemické vlastnosti. Jejich pozoruhodné kvality vyvolaly spolupráci biologů, chemiků a techniků, kteří na základě nových vědeckých poznatků zkoumají možnosti využití rozsivek v moderních technologiích.

Cílem této práce je shrnout dosavadní znalosti o využití křemičitých struktur (frustul rozsivek a křemičitých šupin chrysomonád) v nanotechnologiích, které jim mohou otevřít široké pole působnosti v medicíně, technice, zemědělství a dalších oborech.

## 2 Rozsivky a chrysofyta

Rozsivky (*Bacillariophyceae*) jsou jednobuňčné řasy jejichž plastidy pravděpodobně vznikly sekundární endosymbiózou rozsivek s rudouchou. Tvoří monofyletickou vývojovou větev v rámci fotosyntetizujících stramenopil. Stramenopila zahrnují jak řasy tvořící křemičité struktury (např. chrysofyta, diktyochy, rozsivky) tak nemineralizující řasy (např. chaluhy, bolidofyta). Rozsivky mají redukovaný bičíkový aparát (penátním druhům chybí úplně), a jejich blízká příbuznost s nemineralizujícími *Bolidophyceae* naznačuje, že vývoj biosilifikace mohl proběhnout u více tříd heterokontních řas nezávisle na sobě (Yang et al. 2012). Zatímco stáří rozsivek bylo odhadnuto na 165 – 240 milionů let, záznamy o jejich zkamenělých frustulách jsou staré teprve 185 milionů let (Kooistra and Medlin 1996). Výhodou křemičitých schránek oproti schránkám organickým je nižší spotřeba energie na tvorbu křemičitých frustul. Tato úspora energie by mohla být příčinou ekologické úspěšnosti rozsivek a jejich obrovské diverzity. Silifikace schránek zvyšuje hustotu buněk, zatímco regulací obsahu vakuoly lze průměrnou hustotu buňky naopak snížit. Takto mohou planktonní druhy rozsivek ovlivňovat svou polohu ve vodním sloupci. V nepříznivých růstových podmínkách rozsivky klesají do větší hloubky, kde se nachází více živin. Další možnou úlohou této taktiky je odstranění infikovaných buněk, které ztratily schopnost regulace hustoty buňky, od zbytku kolonie (Raven and Waite 2004). Frustula je u živých rozsivek obalena organickou vrstvou specifických proteinů a polysacharidů, které schránku chrání před vlivy vnějšího prostředí (Hecky et al. 1973).

Mořské rozsivky jsou nejpočetnější organismy fytoplanktonu a jsou zodpovědné za více než 40% čisté primární produkce oceánů. To je pro představu více než produkují všechny tropické pralesy dohromady. Celkově rozsivky bez aeroterestických a sladkovodních druhů produkují 20% atmosférického kyslíku (Field 1998; Mann 1999). Dále se významně podílejí na řízení globálního biogeochemického cyklu křemíku, jelikož většina Si v oceánech je fixována ve formě biopolymerů právě ve schránkách biosilifikujících organismů (Conley 2002).

Chrysofyta jsou monofyletická skupina heterokontních řas. Podobně jako rozsivky to jsou fotosyntetizující stramenopila se sekundárními plastidy (Yang et al. 2012). *Synurales* a *Paraphysomonadaceae* tvoří druhově specifické křemičité šupiny, na jejichž morfologii je z velké části založena taxonomie silifikujících chrysofyt (Škaloud 2013). Na rozdíl od rozsivek je většina chrysofyt sladkovodních a některé druhy mají zachovalé bičíky. V nepříznivých podmínkách a po pohlavním rozmnožování tvoří křemičité cysty neboli statospory s organickou zátkou. *Synurales* mají zpravidla systematičtěji uspořádané křemičité šupiny a také tvoří propracovanější cysty než ostatní zástupci *Chrysophyceae*. Zásobní látkou je u chrysofyt stejně jako u rozsivek chrysolaminaran, skladovaný v cytoplasmě nebo ve vakuolách (Lee 2008).



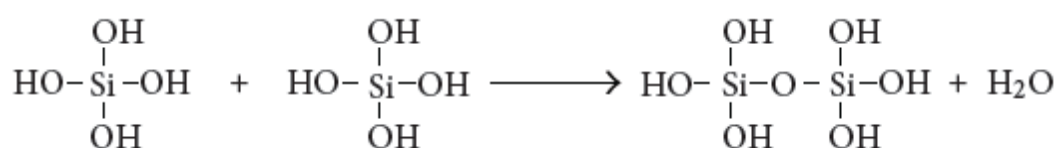
### 3 Biomineralizace

Zhruba před 3500 miliony lety, v prekambriu, se vyvinuly první organismy se schopností využívat anorganické materiály k tvorbě minerálů. Na rozdíl od mineralizace abiotické je biomineralizace kontrolovaný proces, při kterém vznikají kompozitní materiály složené z anorganických látek a organických molekul. Nazývají se biominerály a jejich vlastnosti se často velmi liší od anorganicky vzniklých minerálů stejného složení. Schopnost biomineralizace se v evoluci vyvinula mnohokrát a plní specifické funkce u mnoha různých skupin organismů (Weiner 2003).

Nejčastěji zabudovávaným prvkem je vápník (Ca), a to v podobě uhličitanu vápenatého [CaCO<sub>3</sub>], který se vyskytuje v různých formách. Kalcitem jsou tvořeny například schránky kokolitek a korálnatců, krunýře korýšů, ostny ostnokožců nebo cystolity rostlin. Aragonit se vyskytuje ve schránkách měkkýšů. Spolu s vateritem jsou tyto tři formy krystalické a jsou tvořeny čistým uhličitanem vápenatým. Amorfni uhličitan vápenatý (angl. amorphous calcium carbonate, ACC) se vyskytuje ve stabilní formě, kdy je hydratovaný molekulou vody a jsou jím vyztužovány krunýře korýšů. Bezvodý ACC u larev ostnokožců a korýšů slouží jako přechodný prekurzor pro tvorbu kalcitu nebo aragonitu a je pravděpodobné, že stejnou funkci bude mít také u dalších zástupců kalcifikujících organismů (Addadi et al. 2003; Lowenstam and Weiner 1989). Organismy jsou schopny velmi přesné genetické kontroly nad precipitací určité formy uhličitanu vápenatého a porozumění mechanismům této kontroly je jeden z velkých cílů oboru biomineralizace. Kalcifikací vznikají také fosfáty. Jedním z nich je biominerál dahllit neboli karbonát hydroxylapatitu [Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>,CO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(OH)], anorganická součást kostí a zubů obratlovců (Weiner 2003).

Dalším důležitým biomineralizačním prvkem je železo (Fe), ze kterého si magnetotaktické bakterie tvoří nanokrystaly magnetitu [Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>], díky kterým se orientují v geomagnetickém poli (Lowenstam and Weiner 1989).

Křemík (Si) je po kyslíku (O<sub>2</sub>) druhým nejběžnějším prvkem zemské kůry. V oceánech se vyskytuje převážně rozpuštěný jako kyselina orthokřemičitá [H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>], jejíž průměrná koncentrace v oceánech je za posledních 10 000 let konstatní, zhruba 70 μM (Tréguer et al. 1995). K biosilifikaci dochází kondenzací kyseliny orthokřemičité na dlouhé polymery hydratovaného oxidu křemičitého neboli amorfni siliky [SiO<sub>2</sub>·nH<sub>2</sub>O] za vytěsnění vody podle následující chemické rovnice:



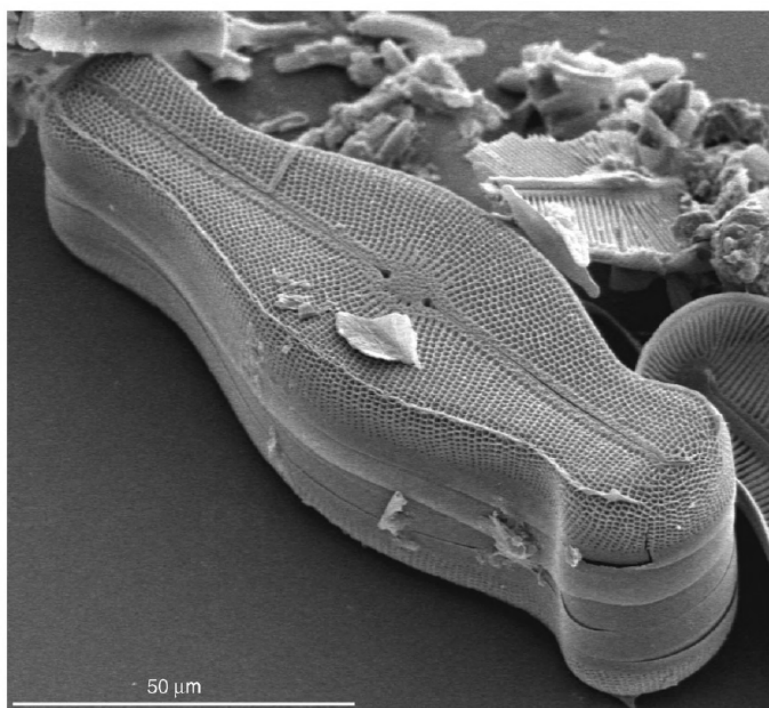
Biosilifikací si rozsivky, chrysofyta, další stramenopila a živočišné houby vytvářejí schránky a křemík ukládá také mnoho rostlin, včetně ruduch a glaukofyt (Lowenstam and Weiner 1989).

Biomineralizaci lze podle kontroly organismu nad daným procesem rozdělit na dva základní typy. Prvním je mineralizace "biologicky indukovaná" (Lowenstam 1981), kdy interakce biologické aktivity organismu s jeho okolím způsobuje precipitaci minerálů. Nukleačním místem je povrch buňky a povaha a složení takto vznikajících minerálů bývá velmi různorodá. Druhým, vyspělejším typem biomineralizace je mineralizace "biologicky kontrolovaná" (Mann 1983). V tomto případě je precipitace biominerálů řízena buňčnými pochody za pomoci organických molekul a dochází k ní téměř vždy v prostoru izolovaném od okolního prostředí. Biologicky kontrolovanou mineralizací tvoří organismy druhově specifické biominerály, zastávající speciální funkce. Dochází k ní extracelulárně (schránky dírkonošců a měkkýšů, zuby a kosti), itercelulárně (mezibuněčné prostory koloniálních jednobuněčných řas) nebo intracelulárně (schránky rozsivek a chrysofyt, spikuly ostnokožců, magnetosomy bakterií, Weiner 2003).

## 4 Struktura křemičitých obalů a jejich biogeneze

### 4.1 Frustula

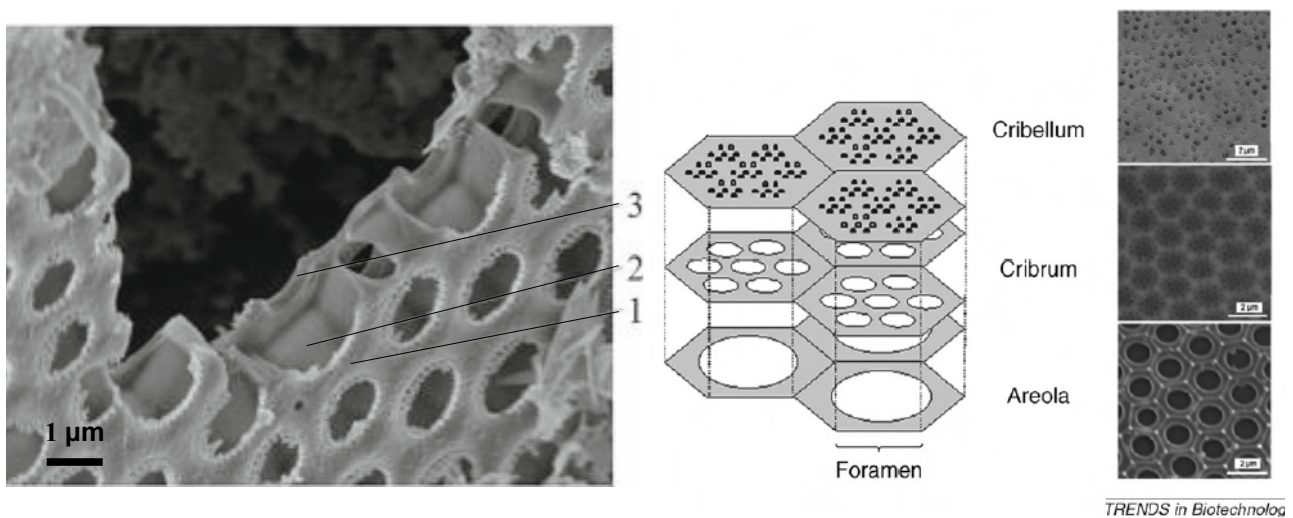
Silicifikovaná schránka rozsivek nazývaná frustula obklopuje protoplast buňky a skládá se ze dvou stejných částí, které do sebe pevně zapadají. Větší část schránky neboli epitéka překrývá menší hypotéku. Každou téku tvoří horní plochá část (angl. valve) s detailně propracovanou porézní strukturou na úrovni nanometrů až mikrometrů, podle jejíž morfologie a vzorování se rozeznávají jednotlivé druhy rozsivek, a několik překrývajících se bočních pásů (angl. girdle bands) s jednodušší a konformnější stavbou pórů. Na základě tvaru a symetrie frustuly lze rozsivky rozřadit na centrické a penátní. Centrické rozsivky jsou radiálně symetrické a střed jejich téky (angl. annulus) slouží jako nukleační centrum při biogenezi frustuly. Penátní druhy jsou bilaterálně symetrické a středem jejich schránky se táhne "nukleační" žebro (angl. sternum), které má u většiny penátních rozsivek rýhu zvanou raphe (Kröger and Poulsen 2008). Pomocí raphe rozsivky vylučují sliz složený z polysacharidů a proteoglykanů, který jim ve spolupráci s aktin-myosinovým aparátem umožňuje klouzat po povrchu a přilnout k němu. Pohyblivost rozsivek bez raphe je značně omezená (Edgar and Pickett-Heaps 1984; Poulsen et al. 1999).



TRENDS in Biotechnology

**Obr. 1.** Frustula penátní rozsivky *Didymosphenia geminata* zachycená skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM). Převzato z Gordon et al. (2009).

Stěna frustuly tvořená amorfním oxidem křemičitým [SiO<sub>2</sub>] se sládá ze tří hierarchicky uspořádaných vrstev, které se liší velikostí pórů. Vnitřní, základní vrstva obsahuje velké póry (angl. foramen), jejichž stěny tvoří komůrky zvané areoly, uspořádané podobně jako včelí plástve. Střechy areol tvoří druhá vrstva, cribrum, s menšími póry, kterou překrývá nejjemněji porézní třetí křemičitá vrstva nazývaná cribellum. Velikost pórů se u jednotlivých druhů rozsivek značně liší, ale obecně lze říci, že jejich poloměr lze měřit od jednotek nanometrů (póry v cribellu) po jednotky mikrometrů (foramen; Tesson and Hildebrand 2010). Vícevrstvá porézní struktura schránky snižuje její třecí koeficient a zvyšuje adsorpční kapacitu, čímž rozsivkám usnadňuje pohyb ve vodním prostředí a zvyšuje jejich odolnost vůči okolnímu tlaku (Meng et al. 2015).



**Obr. 2.** *Coscinodiscus* sp. průřez frustuly pod SEM (1) vnitřní vrstva schránky (2) stěny areol (3) vnější vrstvy schránky (cribrum a cribellum) převzato z Meng et al. (2015).

**Obr. 3.** Schematické zobrazení vrstev frustuly a odpovídající SEM obrázky *Coscinodiscus* sp.. Měřítko na fotografiích představuje 2 µm. Převzato z Gordon et al. (2009).

Rozsivky představují diversifikovanou skupinu. Bylo popsáno více jak 12 000 druhů, z nichž každý tvoří svou originální křemičitou schránku. Velikosti frustul se pohybují od 2 µm až po 3 mm (Finkel et al. 2005). K nepohlavnímu buněčnému dělení rozsivek dochází uvnitř frustuly. Po cytokinezi obě dceřiné buňky sdílejí jednu schránku a musí si dosyntetizovat její menší polovinu, což způsobuje postupné zmenšování populace. Při pohlavní reprodukci dojde ke splynutí gamet a tvorbě auxospory, která se rozpíná a maturuje. V té se vytvoří nová rozsivka s obnovenou původní velikosti schránky (Chepurnov et al. 2004). U některých druhů, např. *Thalassiosira pseudonana*, nedochází ke zmenšování populace a pohlavní stadia se objevují jen vzácně. Tyto rozsivky jsou schopné syntetizovat rozpínavé boční pásy (angl. girdle bands) a tak kompenzovat rozdíl velikosti hypotéky a epitéky, čímž se zachová původní velikost frustuly (Hildebrand et al. 2007).

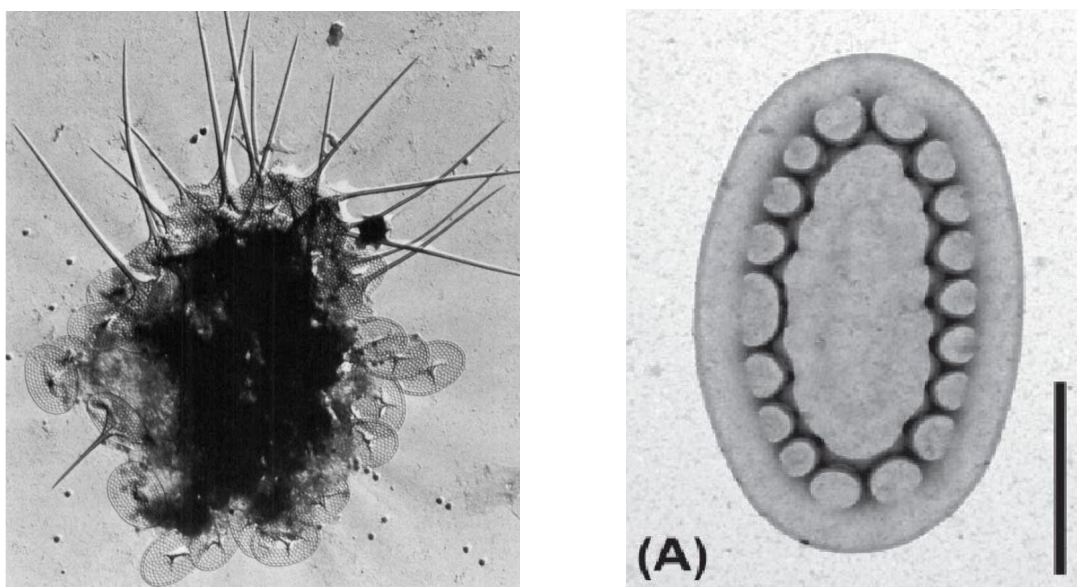
## 4.2 Biogeneze frustuly

K biosilifikaci frustuly u rozsivek dochází uvnitř buňky ve speciálních organelách, silikon-depozitních váčcích (angl. silicon deposition vesicle, SDV), jejichž dvouvrstvá lipidová membrána se nazývá silicalema a je 7 nm široká (Drum and Pankratz 1964). Křemík rozpuštěný ve vodě ve formě kyseliny orthokřemičité [ $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ] se do buňky dostává aktivním kotransportem s  $\text{Na}^+$  ionty přes Si transportéry (angl. silicic acid transporter proteins, SIT), kontrolované SIT geny (Hildebrand et al. 1997). V buňce se kyselina orthokřemičitá akumuluje ve vznikajících SDV váčcích, kde v důsledku jeho vysoké koncentrace a nízkého pH prostředí dochází k precipitaci na pevný oxid křemičitý. Tvar, ve kterém k biosilifikaci dochází na nanoúrovni je pravděpodobně regulován třemi skupinami organických makromolekul, pevně asociovanými s frustulou. Silafíny (angl. silaffins), vysoce modifikované fosfoproteiny s afinitou ke křemíku, katalyzují samotnou polymeraci křemíku. Spolu s polyaminy s dlouhými řetězci (angl. long chain polyamines, LCPAs) a kyselými proteiny silacidiny tvoří specifické šablony, podle kterých polymerací křemíku vzniká nanostruktura frustuly (Kröger et al. 2000). Regulace tvorby frustuly na vyšší úrovni je zajištěna aktinovým a mikrotubulárním cytoskeletem, který ovlivňuje polohu a tvar postupně rostoucích SDV váčků a silicalemy. Mikrotubuly předurčují místo tvorby SDV váčků. Aktinová filamenta váčky ohraničují a tvarují silicalemu, čímž tvoří vzor pro stavbu areol a mikrostruktur frustuly. Dále se účastní tvorby bočních pásů ték (Tesson and Hildebrand 2010). Každá část schránky (vrchní části téky, boční pásy), vzniká zvláště v samostatných SDV váčcích a po dokončení biosilifikace je splynutím silicalemy s plasmatickou membránou vysunuta na povrch buňky. Z membrány SDV váčku na vnitřní straně vzniklé silikové struktury se stane nová plasmatická membrána (Zurzolo and Bowler 2001). Těsně před externalizací je frustula obalena ochrannou organickou vrstvou polysacharidů a frustulinů, což jsou proteiny obsahující množství kyselých domén, bohatých na cystein (angl. acidic cystein rich domains, ACR). Tyto proteiny se neúčastní biosilifikace, nýbrž chrání schránku před vnějšími vlivy prostředí (Poll et al. 1999).

### 4.3 Křemičité šupiny a jejich biogeneze

Křemičité šupiny jsou ploché struktury různých tvarů a velikostí, které tvoří schránky silifikujících chrysofyt. Mohou být různě ornamentované nebo perforované a často nesou trojrozměrné struktury různých tvarů (košiček, člun, korunka, věž či ostének). K některým typům šupin jsou připojeny křemičité ostny.

Zástupci skupiny *Paraphysomonadaceae* a jim nepřibuzný rod *Chrysosphaerella* mají radiálně nebo biradiálně symetrické šupiny, náhodně uspořádané kolem plasmatické membrány (Preisig 1994; Škaloud et al. 2013). Některé druhy mají šupiny jednoduché s rozličnými perforacemi (např. *Paraphysomonas circumvallata*, *P. vacuolata*) a další nesou trojrozměrné mřížové struktury (*P. coronata*) nebo ostnové šupiny (*P. takahashii*, *Chrysosphaerella* sp.). Na jedné buňce se mohou nacházet až tři typy šupin, většinou náhodně rozmístěné. Lze ale najít také uspořádané šupiny, například u *P. takahashii*, kde šupiny mají na flagellární straně buňky krátké ostny a dlouhé ostny na straně opačné, a koloniální druhy rodu *Chrysosphaerella* mají ostnové šupiny pouze zvenku kolonie. (Thomsen et al. 1981; Nicholls 1980).

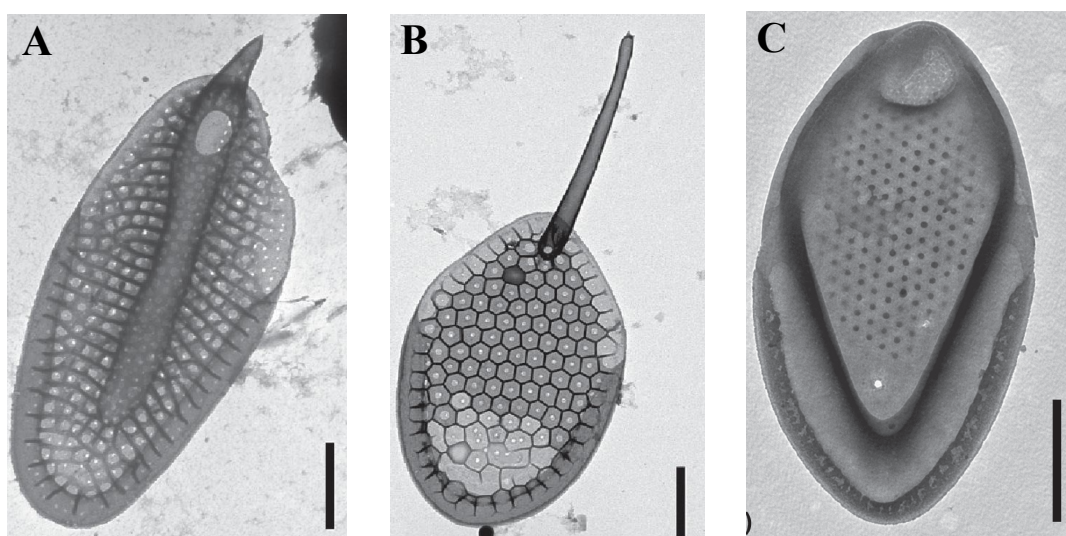


**Obr. 4.** *Paraphysomonas takahashii* buňka s odpadlými bičíky pod TEM, zvětšení  $\times 3500$ . Převzato z Thomsen et al. (1981).

**Obr. 5.** Plochá tělová šupina *Chrysosphaerella brevispina* pod TEM. Měřítko představuje 1  $\mu\text{m}$ . Převzato z Škaloud et al. (2013).

U *Synurales* tvoří všichni zástupci křemičité šupiny. Mají bilaterální symetrii a jsou systematicky uspořádané na povrchu buňky, kde se spirálovitě překrývají a tvoří pevný exoskeleton (angl. scale-case). Šupiny mohou obklopovat jednotlivé buňky, nebo celou kolonii jako u rodu

*Tesselaria* (Preisig 1994; Lavau and Wetherbee 1994). Buňky *Synurales* mohou nést jeden až čtyři typy šupin, které jsou rozdílné od šupin *Paraphysomonadaceae* specificky umístěné. Dokonce i u druhů s jedním typem šupin lze podle jejich morfologie rozlišit anteriorní a posteriorní šupiny (Kristiansen and Sandgren 1986). Šupiny rodu *Synura* mají perforovaný bazální disk s kuželovitým kylem uprostřed (*S. petersenii*, *S. macracantha*), nebo s válcovitými osténky v anteriorní části (*S. mollispina*, *S. splendida*; Škaloud et al. 2013). Pro některé druhy rodu *Mallomonas* jsou typické šupiny se zesíleným žebrem ve tvaru V, ke kterým jsou často připojeny ostny (angl. bristles) vzniklé svinutím plochého útvaru v samostatném SDV. Díky volnému připojení k šupinám se ostny mohou pasivně pohybovat (Bourrely 1957). Kolonie rodu *Tesselaria* je pokryta několika vrstvami šupin nesoucích ostének (Pipes & Leedale 1992, Kristiansen and Sandgren 1986).



**Obr. 6.** Morfologie šupin zástupců *Synurales*. (A) *Synura macracantha* (B) *Synura mollispina* (C) *Mallomonas kalinae*. Fotografie z TEM, měřítko představuje 1  $\mu\text{m}$ . Převzato z Škaloud et al. (2013).

K biogenezi šupin chrysofyt dochází stejně jako u rozsivek uvnitř SDV váčků. Ty se u *Synurales* vyskytují v těsné blízkosti vnější strany chloroplastu, tzv. periplastidálního endoplasmatického retikula (PER, Lavau and Wetherbee 1994). Membrána PER se za pomoci aktinového a tubulárního cytoskeletu účastní tvarování SDV váčků do podoby budoucí šupiny, ve kterém až následně dochází k polymeraci siliky. Kontrola tvorby mikrostrukturální ornamentace šupin dosud není objasněna (Preisig 1994). SDV váček s hotovou šupinou se přesune k plasmatické membráně, silicalema splyne s plasmalemou a šupina je začleněna do schránky. Šupiny ve schránce do sebe zapadají a jsou spojeny vrstvou přilnavé organické hmoty (Lavau and Wetherbee 1994; Leadbeater 1990). Ostny rodu *Mallomonas* se tvoří zvláště (v samostatném SDV) a po vysunutí na

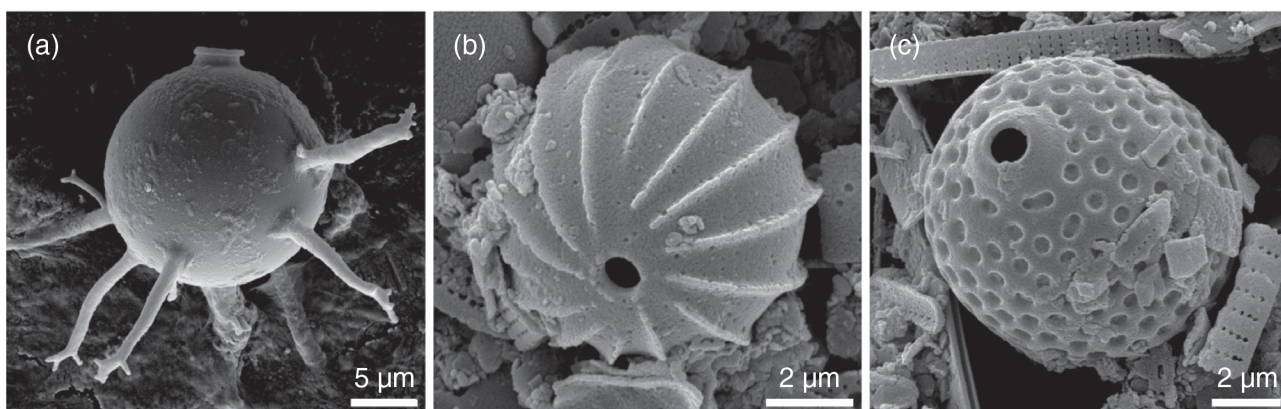
povrch buňky jsou připojovány k šupinám (Wee and Andersen 2010). U rodu *Tesselaria* SDV váčky tvaruje endoplasmické ER a cytoskelet (Pipes and Leedale 1992).

Šupiny *Paraphysomonadaceae* vznikají podobně jako u *Synurales*, ale SDV váčky tvaruje endoplasmické ER, které spolu s váčkem putuje k plasmatické membráně, kde se během tvorby šupiny zmenšuje a později úplně zmizí (Lee 1978).

#### 4.4 Křemičité cysty a jejich biogeneze

Křemičité cysty (statospory) chrysofyt jsou sférické, oválné nebo pyramidální duté struktury obsahující jeden pór, který může být ohraničen límečkem a u živých cyst je uzavřen organickou zátkou. Jejich velikost se pohybuje od 2  $\mu\text{m}$  do více jak 30  $\mu\text{m}$ . Povrch cyst může být hladký, nebo ornamentovaný různými strukturami (prohloubeniny, výstupky, ostny atd.). Vznikají při pohlavním rozmnožování nebo jako odpověď na nepříznivé podmínky. Nezávisle na ontogenezi se vždy vytvoří identická cysta, s morfologií specifickou pro daný druh (Duff, Zeeb, and Smol 1995).

Statospory se tvoří endogenně. V protoplastu se vytvoří SDV váček, který roste paralelně s plasmalemou a pomalu obklopuje protoplast. Teprve když má váček konečný hrubý tvar budoucí cysty, začíná polymerizace křemíku a dochází k postupné biosilifikaci (Preisig 1994). Jádro, ribosomy, chloroplasty, golgiho aparát, zásobní chrysolaminaranový váček, bazální tělíska a některé mitochondrie se přesunou do protoplastu uvnitř vznikající cysty. Zbytek protoplastu s kontraktilní vakuolou zůstane vně cysty. Při maturaci cysty dojde k dotvoření její vnější ornamentace a vznikne organická zátká, čímž dojde k oddělení protoplastu vně a uvnitř cysty. Z vnitřní membrány SDV váčku se stane nová plasmalema (Lee 2008, Sandgren 1983).

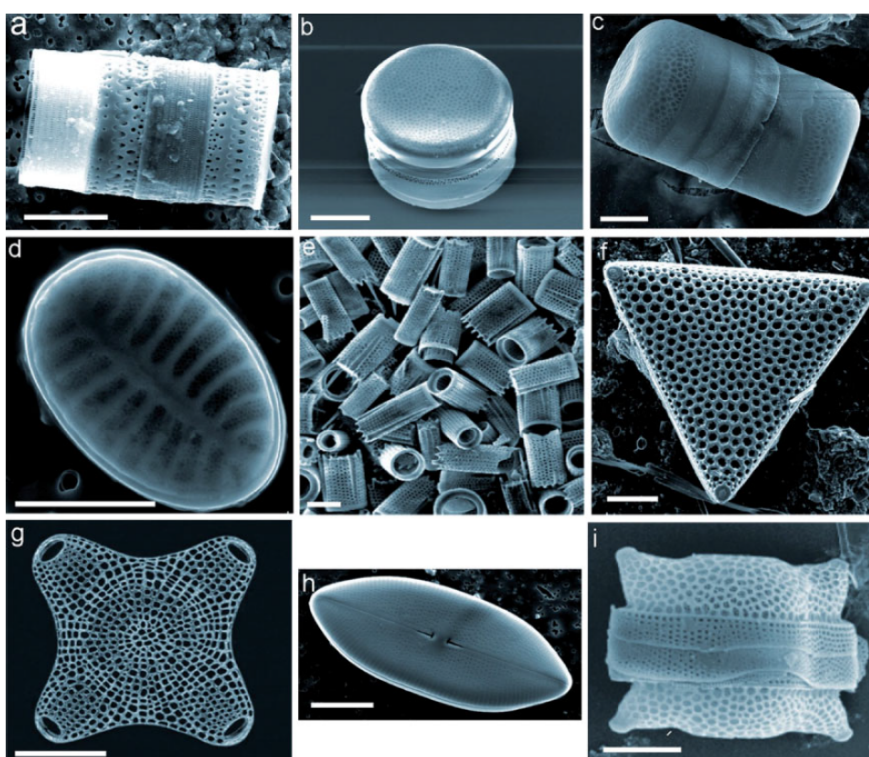


**Obr. 7.** Morfologie křemičitých statospor pod SEM. **(a)** statospora *Ochromonas tuberculata* **(b,c)** statospory dvou neidentifikovaných druhů chrysofyt. Převzato z Kratošová et al. (2013).



## 5 Nanotechnologie

Cílem rozvíjejícího se oboru zvaného nanotechnologie je ovládnout techniky výroby a využití struktur v měřítku nanometrů, kde se chování hmoty řídí pravidly kvantové fyziky (Wolf 2006). Křemík a oxid křemičitý (silika) jsou hojně využívány v elektronice, optice a k výrobě strukturovaných materiálů. Současné metody výroby nanomateriálů jsou pomalé a drahé. Díky své schopnosti tvořit vysoce strukturované 3D silikové frustuly s hierarchicky uspořádanými póry od nanometrů po mikrometry, mají rozsivky potenciál pro využití v nanotechnologiích. Velkou výhodou je také jejich cenová dostupnost a exponenciální růst živé kultury (Losic et al. 2009; Parkinson and Gordon 1999).

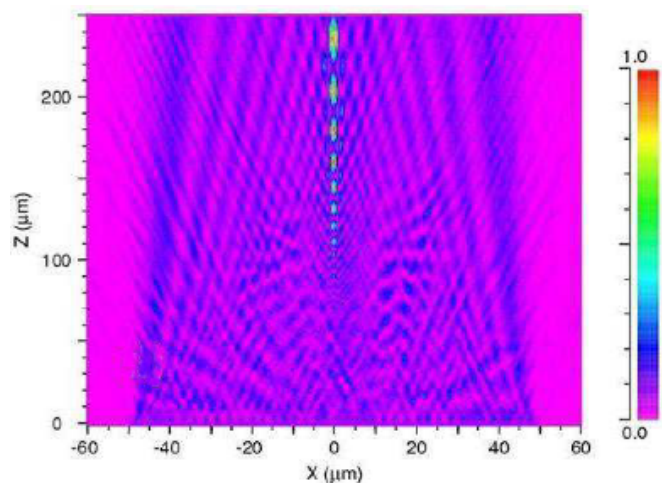
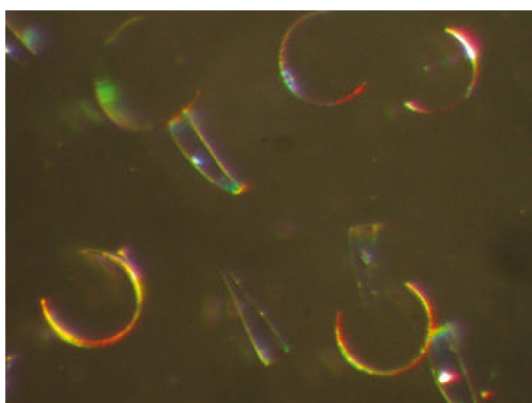


**Obr. 8.** Rozmanitost morfologie frustul rozsivek. **(a-d),(f-i)** Různé druhy mořských rozsivek zachycené SEM. **(e)** SEM snímek vzorku křemeliny z křemelinového lomu v Austrálii. Měřítko představuje 10  $\mu\text{m}$ . Převzato z Losic et al. (2009).

### 5.1 Biofotonické vlastnosti frustul

Frustuly rozsivek mají optické vlastnosti podobné opálům. Při dopadu světla na jejich vícevrstevný porézní povrch dochází k fázovým posunům a interferencím, čímž dojde k zesílení nebo zeslabení určitých frekvencí odraženého světla. To můžeme pozorovat jako hru barev při

pozorování rozsivek pod různými úhly (viz obr. 9, Gordon et al. 2009). Mnoho dalších organismů, například motýli, brouci, ryby nebo ptáci, také tvoří fotonické nanostruktury na svých tělech, které mohou způsobovat změny a zvýraznění barev, nebo zmenšují refrakční index povrchu a způsobují jeho částečné zprůhlednění (křídla můry *Cephonodes hylas*, Parker and Townley 2007; Yoshida et al. 1997). Díky periodickým, směrově uspořádaným strukturám schránky byly rozsivky označeny jako žijící fotonické krystaly – materiály se schopností kontrolovat šíření světla tím, že propouštějí pouze některé vlnové délky (Fuhrmann and Landwehr 2004; Ozin and Hall 2003). Dále bylo zjištěno, že frustula centrické rozsivky *Coscinodiscus walesii* dokáže soustředit světlo o určitých vlnových délkách. Tento jev byl pozorován pomocí světla z laserového zdroje a je způsoben difrakcí světla v pórech frustuly (viz obr. 10, De Stefano et al. 2007). V dalších pokusech bylo potvrzeno, že podobné vlastnosti má frustula i ve vodě a v cytoplasmě, a tak rozsivky tento efekt mohou využívat *in vivo*. Nejúčinněji frustula soustředí světlo viditelného spektra a blízké infračervené světlo (spektra která jsou využitelná pro fotosyntézu). Naopak k soustředění světla krátkých vlnových délek jako je UV záření, které je pro organismy škodlivé a může způsobovat genové mutace, téměř nedochází. Tato vlastnost frustuly by mohla představovat evoluční výhodou rozsivek, napomáhající fotosyntéze a chránící protoplast před UV zářením (Di Caprio et al. 2014; Ferrara et al. 2014; Tommasi et al. 2010). Díky svým multifunkčním fotonickým vlastnostem mají rozsivky potenciální široké využití ve výrobě mikro-opto-elektromechanických systémů (MEMS), jako mikročochky, fotonické krystaly nebo modely pro výrobu biomimetických součástí (materiály napodobující přírodní struktury, De Stefano et al. 2007; Tommasi et al. 2010).

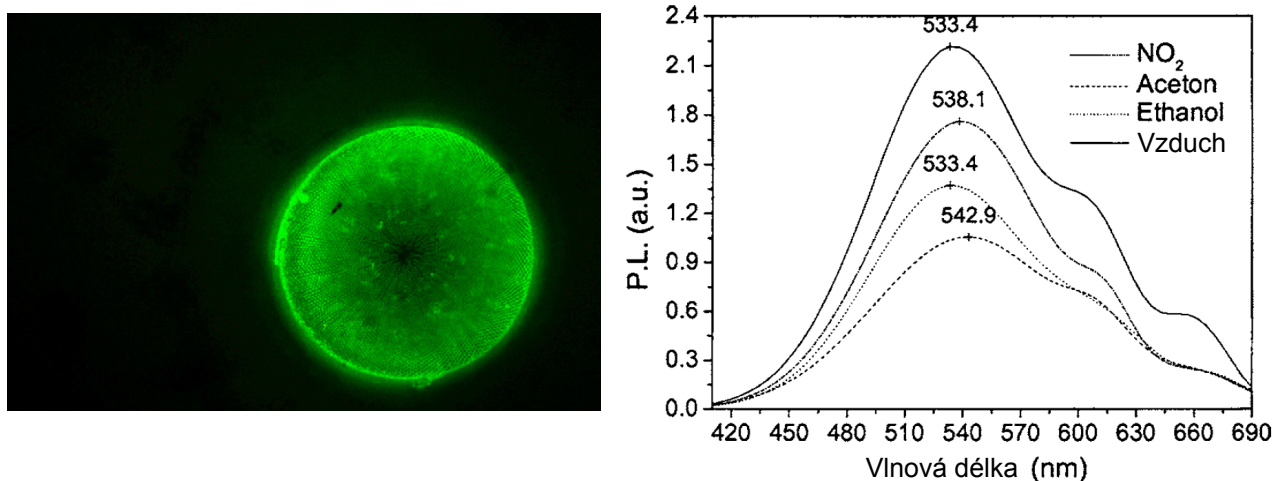


**Obr. 9.** Optický efekt hry barev na oddělených bočních pásech frustuly rozsivky *Coscinodiscus granii* pod mikroskopem s clonou pro tmavé pole. Převzato z Parker and Townley (2007).

**Obr. 10.** Prostorová distribuce světla propuštěného tékou rozsivky *Coscinodiscus walesii* pro  $\lambda = 1\mu\text{m}$ . Téka leží ve vzálenosti  $z = -0.6\mu\text{m} - 0.4\mu\text{m}$ . Převzato z Tommasi et al. (2010).

## 5.2 Fotoluminiscence – využití frustul jako biosenzorů

Další zajímavou vlastností frustul je luminiscence (viz obr. 11, Butcher et al. 2003). První výzkumy se zajímaly o katodoluminiscenci (luminiscence vyvolaná proudem elektronů) a fotoluminiscenci (luminiscence vyvolaná elektromagnetickým zářením) rozsivek z jednodruhových kultur a také přírodních vzorků. Po ozáření laserovým paprskem o vlnové délce  $\lambda = 325$  nm vykazovaly vzorky silnou fotoluminiscenci viditelnou okem, s píky v modrém a žlutém spektru. Poloha píků u jednodruhových vzorků rozsivek byla téměř totožná s fotoluminiscencí křemenného skla. U vzorků rozsivek nasbíraných v přírodě byl pozorován výraznější pík ve žlutém spektru a nový pík v červeném spektru. Tyto rozdíly mohou způsobit nečistoty nebo také menší rozměr pórů a silněji silifikované frustuly přírodních vzorků (Butcher et al. 2005). Látky různé povahy mohou značně ovlivnit spektrum luminiscence křemičitých frustul. Po vystavení frustuly prostředí plynných látek elektrofilní povahy, které od ní odtáhnou elektrony (např.  $\text{NO}_2$ , aceton, ethanol), dojde k tlumení fotoluminiscence (viz obr. 12). Naopak nukleofilní látky (xylen, pyridin) intenzitu fotoluminiscence frustuly mnohonásobně zvýší. V obou případech dochází také k mírnému bathochromnímu posunu (posun k delším vlnovým délkám) způsobeného adsorpcí přítomných látek do pórů frustuly. Rozsivky by se tak mohly využívat jako detektory plynných látek fungující na základě změny jejich optických vlastností (Stefano and Rendina 2005).



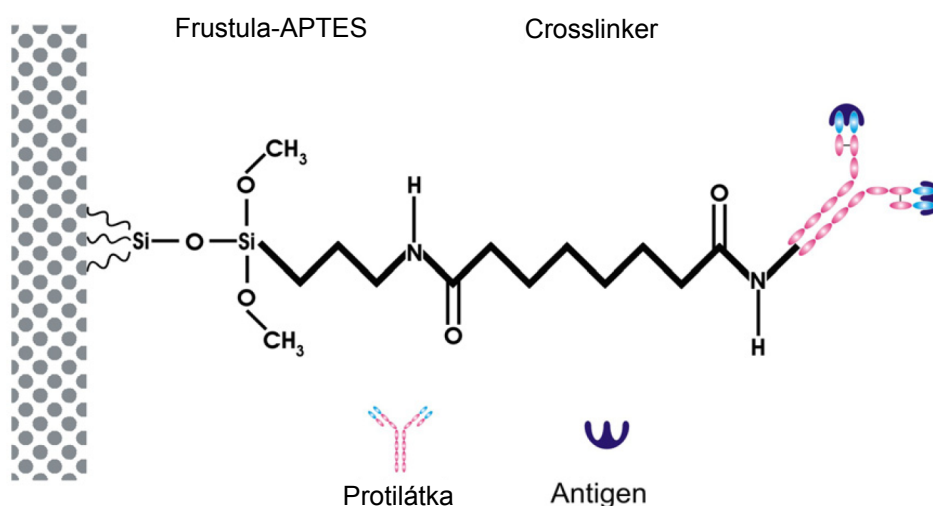
**Obr. 11.** Fosforeskující frustula rozsivky *Coscinodiscus concinnus* Stefano and Rotiroti (2009).

**Obr. 12.** Grafické zobrazení tlumícího efektu některých plynů na fotoluminiscenční spektrum silikových frustul. Osa y označuje intenzitu fotoluminiscence v arbitrárních jednotkách (angl. arbitrary units, a.u.). Převzato z Stefano and Rendina (2005).

V následujících pokusech byla prokázána vysoká citlivost této detekční schopnosti. Intenzita fotoluminiscence a její změna v reakci na přítomnost chemických látek je druhově specifická, a

závisí na nanostruktuře pórů silikových frustul (větší plocha obsahuje vyšší množství Si–OH vazeb, které přispívají k zesílení intenzity fotoluminiscence; Arteaga-Larios et al. 2014). K detekci oxidu dusičitého (NO<sub>2</sub>) frustulou rozsivky *Thalassiosira rotula* stačí jeho subpikomolární koncentrace. Při koncentraci [NO<sub>2</sub>] = 10 ppm dojde k saturaci tlumícího efektu. U frustuly *Coscinodiscus wailesii* je tato saturační koncentrace dvojnásobně vyšší (Lettieri and Setaro 2008). Tímto způsobem lze detekovat pouze čisté látky. Různé látky ve směsi plynů mohou vyvolané signály (změny fosfoluminiscence) navzájem rušit, a tudíž je detekovat nelze. Aby se frustuly rozsivek mohly využívat jako účinné biosenzory, musí specificky reagovat na analyty (Stefano and Rotiroti 2009).

Křemičité frustuly lze díky jejich povrchu s reaktivními Si –OH skupinami chemicky modifikovat aminopropyltriethoxysilanem (APTES) a glutaraldehydem (GA), a vytvořit tak nová vazebná místa pro navázání různých biologických sond (např. jednovláknovou DNA, proteiny, enzymy nebo protilátky), které můžeme vybrat podle specifity k analyzovaným látkám (viz obr. 13). Tímto krokem dojde v důsledku zániku OH skupin k tlumení fotoluminiscence (vyvolané laserovým paprskem,  $\lambda = 325$  nm). Stefano et al. (2008) na modifikovanou frustulu přes Protein A (molekula zajišťující pevnou vazbu sondy k modifikované frustule a její správnou orientaci) navázali monoklonální myši protilátku UN1. Analytem byl protein G23, který imituje epitop antigenu rozpoznávaného touto protilátkou. Bylo prokázáno, že navázaná protilátka spolehlivně rozpozná svůj antigen. V důsledku interakce protilátky s antigenem byla pozorována zvýšená intenzita fotoluminiscence, která byla víceméně lineárně závislá na množství antigenu. Tyto experimenty potvrdily možné využití rozsivek jako univerzální analytické nástroje pro biosensing (Gale and Gutu 2009; De Stefano et al. 2008; Stefano and Rotiroti 2009).

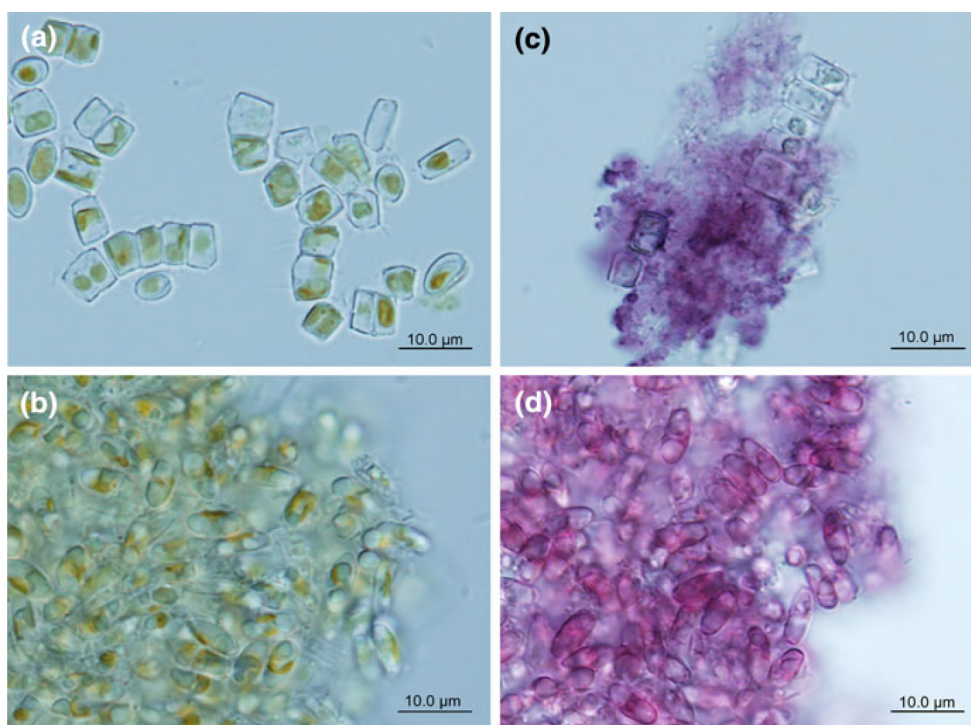


**Obr. 13.** Schématické zobrazení funkcionalizace silikových frustul, v tomto případě se znázorněným imunokomplexem. Crosslinker je molekula propojující modifikovanou frustulu s biosenzorem (v popsaných experimentech glutaraldehyd). Převzato z Dolatabadi and De la Guardia (2011).

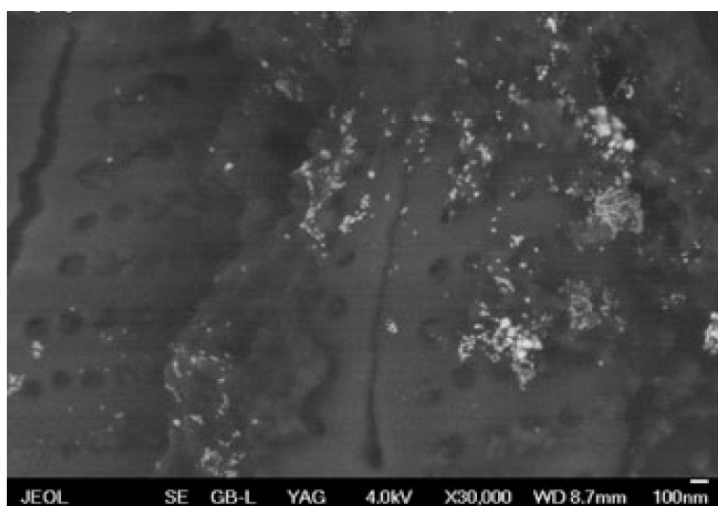
### 5.3 Syntéza nanočástic a biosorpce

Cenné kovy jsou efektivní katalyzátory používané v chemických reakcích a dalších průmyslových postupech. V podobě nanočástic, které mají mnohem větší poměr povrchu ku objemu, lze jejich katalyzační vlastnosti lépe využít. Nedávno vědci objevili ekologicky šetrný a levný způsob výroby kovových nanočástic a nanokompozitů, využívající schopnost organismů tvořit anorganické materiály. Tato technika spolu s biosorpční schopností některých organismů napovídá, že redukce kovových solí pravděpodobně úzce souvisí s tvorbou kovových nanočástic (Kratošová et al. 2013; Volesky and Holan 1995). Nevýhoda samotných nanočástic je, že často aglomerují a snižuje se jejich katalyticky aktivní povrch. Také je složité použité nanočástice ze vzorku recyklovat, proto je důležitá jejich imobilizace na nosič. Chemicky a mechanicky stabilní křemičité schránky rozsivek a šupiny chrysomonád jsou pro tento účel ideální materiály. Na povrchu mají reaktivní OH skupiny díky kterým lze frustuly a šupiny mnoha způsoby modifikovat podle požadované funkce (Skebo et al. 2007; De Stefano et al. 2008).

Pomocí dvou druhů živých rozsivek (*Diadesmis gallica*, *Navicula atomus*) byly úspěšně syntetizovány zlaté nanočástice. Ke kulturám rozsivek byl přidán roztok kyseliny tetrachlorozlatité [HAuCl<sub>4</sub>] a během následné inkubace za laboratorních podmínek došlo k precipitaci zlatých nanočástic na silikové frustule rozsivek a také na jejich extracelulárních polysacharidech (EPS, viz obr. 14,15). Nanočástice navázané na EPS byly zhruba o polovinu menší než nanočástice vázané přímo na frustulu. Bylo potvrzeno, že po měsíci jsou vzniklé nanokompozity stále stabilní (Schröfel et al. 2011). Stejným postupem se podařila také biosyntéza stříbrných nanočástic inkubací rozsivek s dusičnanem stříbrným [AgNO<sub>3</sub>]. Bionanokompozity byly následně magnetizovány precipitací magnetitu a maghemitu na frustulu, což umožňuje jejich jednoduché "posbírání" pomocí magnetu a opakované použití (viz obr. 16, Schröfel 2012). Stříbrné nanočástice lze také precipitovat na frustuly zbavené organické hmoty a funkcionalizované polydiallyldimethylamonium (PDDA) cholridem. Ten vytvoří kladně nabitý povrch, na který se záporně nabitě stříbrné nanočástice pevně vážou. Bylo potvrzeno že takto připravené Ag-nanokompozity jsou silně antimikrobiální a mohly by se používat k desinfekci vod (Panáček et al. 2013). V jiných studiích se podařilo inkubací rozsivek *Nitzchia frustulum* a *Stauroneis* sp. v médiu obohaceném o germanium vytvořit nanokompozity siliky s oxidem germaničitým. Při vyšším poměru germania ku křemíku v růstovém médiu ale vznikají defektní frustuly (Ali et al. 2011; Gutu et al. 2005). Kovové nanokompozity byly syntetizovány také pomocí chrysofytní řasy *Mallomonas kalinae*, u které k precipitaci nanočástic dochází na jejich křemičitých šupinách. Pomocí rozsivek a chrysofyt tak lze snadno a levně vyrobit stabilní nanokompozity s kovovými nanočásticemi, které lze využít jako katalyzátory chemických reakcí, antimikrobiální částice a obecně jako nástroje s širokým využitím v moderních bionanotechnologických metodách (Asmathunisha and Kathiresan 2013; Kratošová et al. 2013).



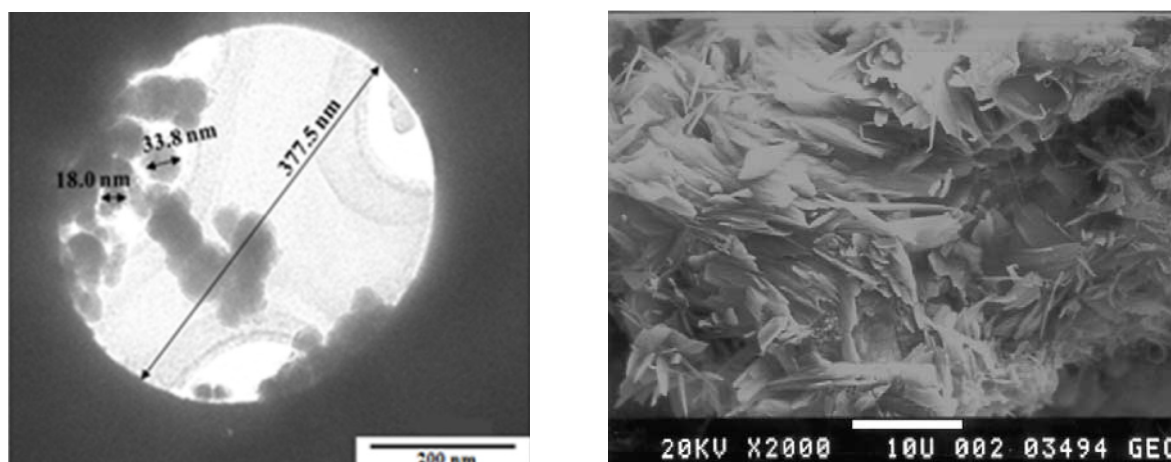
**Obr. 14.** Rozsivky ve světelném mikroskopu před (vlevo) a 12 hodin po přidání kyseliny tetrachlorzlatité do média (vpravo). **(a,c)** *Diadesmis gallica* **(b,d)** *Navicula atomus*. Převzato z Schröfel et al. (2011).



**Obr. 15.** Detail zlatých nanočástic precipitovaných na frustule a extracelulárních polysacharidech rozsivky *Navicula atomus*. Fotografie ze SEM. Převzato z Schröfel et al. (2011).

**Obr. 16.** Ukázka manipulace s magnetizovanými stříbrnými nanokompozity pomocí magnetu. Převzato z Kratošová et al. (2013).

Vysoká porozita a tím pádem i veliký povrch frustul rozsivek spolu s faktem, že na jejich povrchu dochází k samovolné precipitaci některých kovů, z nich dělá skvělé adsorbenty. Pomocí křemeliny byly úspěšně adsorbovány ionty těžkých kovů ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) z roztoku o  $\text{pH} = 4$ . Modifikací křemeliny oxidem manganičitým, který na jejím povrchu tvoří deskovité krystaly, se zvětší povrch a zvýší jeho negativní náboj, což výrazně zlepší adsorpční kapacitu materiálu (viz obr. 18, Khraisheh et al. 2004). Aby k adsorpci docházelo, musí mít adsorbent (v našem případě křemelina) opačný náboj než adsorbát (vychytávaná látka). Podle povahy adsorbátu se proto povrch křemeliny různě upravuje tak, aby se zvýšila efektivita adsorpce. Arsen je vysoce toxický kov, kterým jsou často znečištěné odpadní a podzemní vody. Rozpuštěný ve vodě tvoří anionty a k jeho vychytávání se používá křemelina modifikovaná železem (hydroxidem železnatým  $[\text{Fe}(\text{OH})_2]$ ; Danil de Namor et al. 2012; Pantoja et al. 2014). Jako účinnější adsorbent arsenu se osvědčila křemelina modifikovaná vodnatým oxidem železitým  $[(\text{Fe})_2\text{O}_3]$ , který na frustulu precipituje ve formě stabilních amorfních nanočástic (Jang et al. 2006). Modifikací nanočásticemi nulavalentního železa (angl. nanoscale zero valent iron, nZVI) lze z křemeliny vytvořit multifunkční kompozity schopné degradovat široké spektrum organických i anorganických polutantů. Sun et al. (2013) potvrdili, že nZVI modifikovanou křemelinu lze použít k efektivnímu rozkladu herbicidu simazinu ve vodě, a také zjistili, že změnou reakčních podmínek tvorby nanokompozitů ZVI lze ovlivnit velikost těchto nanočástic (viz obr. 17). Pomocí adsorpčních a filtračních vlastností křemeliny lze také odstranit radioaktivitu ze znečištěných odpadních vod. Během tří týdnů filtrace odpadní vody obsahující tři radionuklidy ( $\text{Cs-137}$ ,  $\text{Cs-134}$ ,  $\text{Co-60}$ ) přes čistou křemelinu, byla její radioaktivita snížena na 15% původní aktivity (z 2.6 Bq/ml na méně než 0.4 Bq/ml). Radioaktivní odpad tak lze koncentrovat do menšího objemu a do stabilnější a bezpečnější podoby (Osmanlioglu 2007).



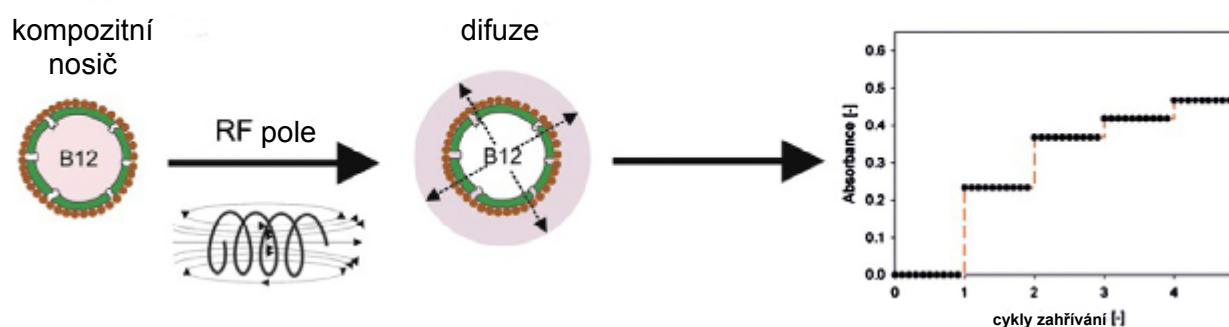
**Obr. 17.** Detail nanočástic nulavalentního železa přichycených na frustule zachycený TEM. V popředí foramen s vyznačeným průměrem, v pozadí je vidět cribrum. Převzato z Sun et al. (2013).

**Obr. 18.** Krystaly oxidu manganičitého na křemelině, TEM. Převzato z Khraisheh et al. (2004).

## 5.4 Křemičité struktury jako nosiče léčiv a genů

Nanotechnologie otevírá brány novým terapeutickým a diagnostickým metodám, které umožňují využití nestabilních nebo biologicky málo dostupných látek, a cílení léčiv do postižených tkání (Gordon et al. 2009). Využívá nano/mikronosičů které mohou chránit náklad před fyziologickým prostředím a zvýšit tak množství doručené drogy nebo látky na místo určení. Ovšem nároky na *in vivo* metody přenosu léčiv (drug delivery systems, DDS) jsou vysoké a jen málo nanonosičů se zatím dostalo do fáze klinického testování.

Synteticky vyrobené křemičité nanočástice se osvědčily jako efektivní DDS. Stejně jako organické nosiče jsou biokompatibilní a biodegradovatelné. Zároveň jsou velmi stabilní a jejich povrch lze chemicky modifikovat, podobně jako u nosičů anorganických (Mai and Meng 2013). Na povrch dutých, uměle vyrobených křemičitých nosičů se díky rozdílným nábojům podařilo navázat vrstvu superparamagnetických oxidů železa, které lze ovládat pomocí magnetického pole a vystavením radiofrekvenčnímu magnetickému poli také účinně zvyšovat jejich teplotu. Zvýšením teploty nanočástic vzroste propustnost křemičitých nosičů a dojde k urychlené difuzi nákladu (v tomto experimentu vitamín B12) z nosiče. Touto elegantní metodou lze dálkově ovládat a účinně kontrolovat dávkování léčiv a dalších bioaktivních látek (Kovačik et al. 2012; Kovačik et al. 2013).

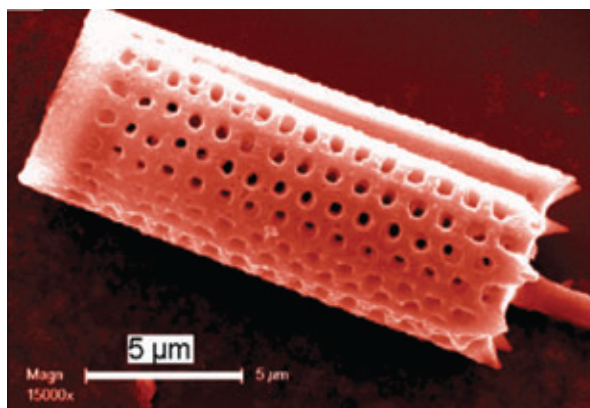
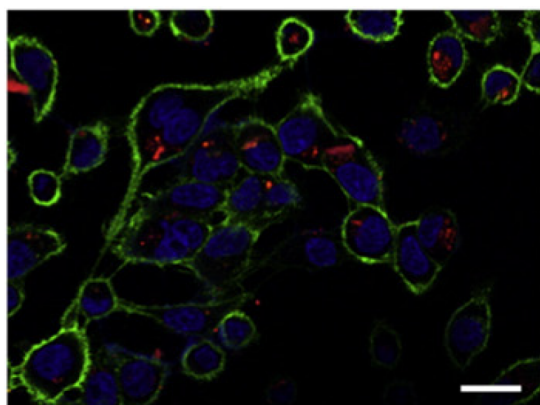


**Obr. 19.** Grafické zobrazení křemičitých kompozitů se superparamagnetickými nanočásticemi a demonstrace působení radiofrekvenčního (RF) magnetického pole na difuzi transportovaných látek (vitamín B12) z nosiče. Převzato z Kovačik et al. (2013).

Tyto syntetické nanokompozity byly v průměru 26  $\mu\text{m}$  velké, a proto nevhodné pro případné nitrožilní využití. Je ale velmi pravděpodobné že stejné vlastnosti by mohly mít nanokompozity vytvořené z křemičitých frustul rozsivek, jejichž velikosti se pohybují od 2  $\mu\text{m}$  do 3  $\mu\text{m}$  a velikost frustuly by se mohla vybrat podle požadované funkce nosiče (Finkel et al. 2005; Gordon et al. 2009). Bylo potvrzeno, že rozdrčené fragmenty frustul (menší než 300 nm) mohou tvořit nanonosiče o velikostech umožňujících jejich endocytózu cílovými buňkami. Křemičité fragmenty frustul byly zbaeny organické hmoty a funkcionalizovány aminopropyltriethoxysilanem (APTES),

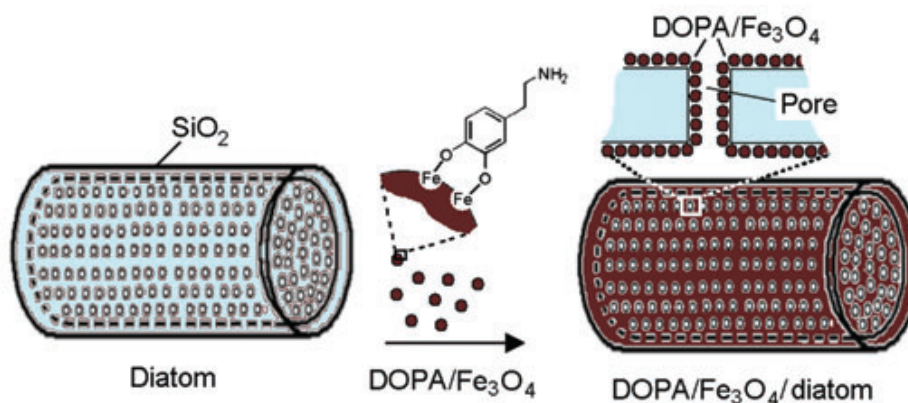


který vytvořením kladně nabitých aminových skupin na povrchu nosičů umožnil jejich následné označení fluorescenční sondou. Takto upravené nanokompozity byly inkubovány s plicními rakovinnými buňkami a pomocí konfokální mikroskopie bylo potvrzeno hromadění nanonosičů v buňkách i v jejich jádrech (viz obr. 20). Tento objev poukazuje na využitelnost křemičitých frustul rozsivek jako účinné DDS v biomedicině (Ruggiero et al. 2014) a představuje řešení pro *in vivo* transport malých interferenčních ribonukleových kyselin (small interfering RNA, siRNA), molekul umožňujících specifickou inhibici genové exprese. SiRNA lze využívat pro terapeutické účely u všech nemocí způsobených aktivitou jednoho nebo několika genů (autoimunitní nemoci, virové infekce, rakovina, některé genetické poruchy). Kvůli svému zápornému náboji a velikosti ale siRNA neprostupuje membránami (Aagaard and Rossi 2007). Funkcionalizací křemičitých nanočástic (z frustul rozsivek) se povedlo vytvořit stabilní nosiče pro transport siRNA do lidských rakovinných buňek (viz obr. 20) přičemž byla potvrzena terapeutická aktivita transportované molekuly při tomto způsobu dopravy do místa účinku. Zároveň byla vyhodnocena nízká cytotoxicita a naopak vysoká biokompatibilita těchto nosičů (Rea et al. 2014). Jako nosiče je možné použít také celé uzavřené frustuly, které tvoří "kapsli" pro transportovanou látku. Byla demonstrována jejich funkcionalizace nanočásticemi oxidů železa modifikovanými dopaminem. Zatímco železité nanočástice umožňují ovládnutí kapslí pomocí magnetického pole, navázaný dopamin tvoří stabilní kotvu na kterou díky volné aminové skupině mohou být imobilizovány funkční molekuly (fluorescenční barvy, targetovací molekuly atd., viz obr. 21, 22, Losic et al. 2010).



**Obr. 20.** Konfokální mikroskopie rakovinných buňek ošetřených siRNA navázanou na funkcionalizované křemičité nanočástice. Jádra (modrá), membrány (zelená) a siRNA (černá) byly označeny fluorescenčními barvami. Měřítko představuje 20  $\mu\text{m}$ . Převzato z Rea et al. (2014).

**Obr. 21.** SEM fotografie frustuly rozsivky *Aulacoseira* sp. funkcionalizované nanočásticemi oxidů železa s navázaným dopaminem. Převzato z Losic et al. (2010)



**Obr. 22.** Schématické znázornění funkcionalizace frustuly. Navázání dopaminem (DOPA) modifikovaných nanočástic oxidů železa na křemičitou schránku. Modelem je frustula rozsivky *Aulacoseira* sp.. Převzato z Losic et al. (2010).

Pro terapeutické účely DDS jsou nejvhodnější nosiče v podobě celých uzavřených frustul, jelikož mají velikou adsorpční a absorpční kapacitu, a díky tvaru "kapslí" dochází k dlouhotrvajícímu uvolňování drogy. Po počáteční rychlé difuzi z povrchu frustuly a jejích pórů se uvolňování ustálí na velmi nízkou hodnotu, a může trvat i několik týdnů. Modifikací povrchu frustul různými hydrofobními a hydrofilními skupinami lze ovlivnit rychlost difuze transportovaných látek. Tento efekt byl zkoumán na dvou modelových látkách. Hydrofobní indomethacin se uvolňoval nejpomaleji z nosičů modifikovaných látkami nesoucí hydrofilní skupiny (APTES nebo kys. 2-karboxyethyl fosforečná, 2-CEPA), jelikož byl díky opačnému náboji elektrostaticky přitahován k frustule. Naopak hydrofilní gentamicin vykazoval nejpomalejší uvolňování u nosičů modifikovaných látkami s hydrofobními skupinami. Tyto experimenty ukázaly jak lze chemickou modifikací silikových frustul zdokonalit jejich vlastnosti potřebné pro funkci nosičů v DDS, a poukázaly na jejich potenciál pro využití v moderní biomedicíně (Bariana, Aw, and Losic 2013; Bariana et al. 2013).

## 6 Závěr

S příchodem moderních nanotechnologií začali vědci hledat nové metody výroby materiálů využitelných pro práci v takto malém měřítku. Tam, kde současné znalosti techniky nestačí, mohla by pomoci příroda.

Rozsivky jsou fotosyntetizující eukaryota a nejvýznamnější primární producenti organické hmoty v oceánech. Tvoří křemičité schránky (frustuly) s vysoce uspořádanou trojrozměrnou porézní strukturou o velikosti pórů od nanometrů až po mikrometry. Frustuly mají množství obdivuhodných vlastností, které je předurčují k potenciálnímu využití v mikro-opto-elektromechanických systémech (MEMS), v biosensingu a monitoraci znečištění životního prostředí, ve výrobě nanočástic, a také v medicíně jako nosiče terapeutických látek (angl. drug delivery systems, DDS). Křemičité šupiny chrysofyt mají stejné chemické složení jako frustuly rozsivek a byly úspěšně využity k syntéze katalyticky aktivních nanokompozitů.

Chrysofyt tvoří také duté křemičité cysty, které se díky svému kulovitému tvaru jeví jako ideální struktury pro DDS. Cysty chrysofyt se však tvoří pouze při pohlavním rozmnožování nebo za stresových podmínek. Dá se tedy předpokládat, že bioprodukce cyst nebude tak účinná jako produkce frustul rozsivek, které vznikají při vegetativním rozmnožování, což je hlavní způsob rozmnožování rozsivek.

Vzhledem k tomu, že syntetická výroba křemičitých nanostruktur je komplikovaná a drahá, lze očekávat, že strukturně pokročilejší materiály vzniklé biosilifikací rozsivek a chrysofyt se budou v nanotechnologiích využívat stále častěji.

## 7 Seznam literatury

- Aagaard L, Rossi JJ. 2007.** RNAi Therapeutics: Principles, Prospects and Challenges. *Advanced drug delivery reviews*, **59**: 75–86.
- Addadi L, Raz S, Weiner S. 2003.** Taking Advantage of Disorder: Amorphous Calcium Carbonate and Its Roles in Biomineralization. *Advanced Materials* **15**: 959–70.
- Arteaga-Larios NV, Nahmad Y, Navarro-Contreras HR, Encinas A, García-Meza JV. 2014.** Photoluminescence Shift in Frustules of Two Pennate Diatoms and Nanostructural Changes to Their Pores. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence* **29**: 969–76.
- Asmathunisha N, Kathiresan K. 2013.** A Review on Biosynthesis of Nanoparticles by Marine Organisms. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **103**: 283–87.
- Bariana M, Aw MS, Kurkuri M, Losic D. 2013.** Tuning Drug Loading and Release Properties of Diatom Silica Microparticles by Surface Modifications. *International Journal of Pharmaceutics* **443**: 230–41.
- Bariana M, Aw MS, Losic D. 2013.** Tailoring Morphological and Interfacial Properties of Diatom Silica Microparticles for Drug Delivery Applications. *Advanced Powder Technology* **24**: 757–63.
- Bourelly P. 1957.** Algues d'eau douce du Soudan Français, région du Macina (AOF). *Bulletin IFAN* **19**: 1047-1102.
- Butcher KSA, Ferris JM, Phillips MR, Wintrebert-Fouquet M, Jong W, Jovanovic N, Vyverman W, Chepurinov VA. 2005.** A Luminescence Study of Porous Diatoms. *Materials Science and Engineering: C* **25**: 658–63.
- Butcher KSA, Ferris JM, Phillips MR. 2003.** Photoluminescence and Cathodoluminescence Studies of Diatoms - Nature's Own Nano-Porous Silica Structures. *The International Nuclear Information System (INIS)* **35**. Dostupné z: [http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig\\_q=RN:35020249](http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:35020249) [cit. 5.5.2015]
- Di Caprio G, Coppola G, De Stefano L, De Stefano M, Antonucci A, Congestri R, De Tommasi E. 2014.** Shedding Light on Diatom Photonics by Means of Digital Holography. *Journal of biophotonics* **7**: 341–50.
- Conley DJ. 2002.** Terrestrial Ecosystems and the Global Biogeochemical Silica Cycle. *Global Biogeochemical Cycles* **16**: 681–88.
- Danil de Namor AF, El Gamouz A, Frangie S, Martinez V, Valiente L, Webb O. 2012.** Turning the Volume down on Heavy Metals Using Tuned Diatomite. A Review of Diatomite and Modified Diatomite for the Extraction of Heavy Metals from Water. *Journal of Hazardous Materials* **241-242**: 14–31.
- De Stefano L, Lamberti A, Rotiroti L, De Stefano M. 2008.** Interfacing the Nanostructured Biosilica Microshells of the Marine Diatom *Coscinodiscus Wailesii* with Biological Matter. *Acta biomaterialia* **4**: 126–30.
- De Stefano L, Rea I, Rendina I, De Stefano M, Moretti L. 2007.** Lensless Light Focusing with the Centric Marine Diatom *Coscinodiscus Wailesii*. *Optics Express* **15**: 18082.
- De Stefano L, Rendina I. 2005.** Marine Diatoms as Optical Chemical Sensors. *Applied Physics Letters* **87**: 233902.
- De Stefano L, Rotiroti L. 2009.** Marine Diatoms as Optical Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **24**: 1580-84

- Dolatabadi JEN, De la Guardia M. 2011.** Applications of Diatoms and Silica Nanotechnology in Biosensing, Drug and Gene Delivery, and Formation of Complex Metal Nanostructures. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **30**: 1538–48.
- Drum RW, Pankratz HS. 1964.** Post Mitotic Fine Structure of Gomphonema Parvulum. *Journal of ultrastructure research* **10**: 217–23.
- Duff KE, Zeeb BA, Smol JP. 1995.** *Atlas of Chrysophycean Cysts*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Ferrara MA, Dardano P, De Stefano L, Rea I, Coppola G, Rendina I, Congestri R, Antonucci A, De Stefano M, De Tommasi E. 2014.** Optical Properties of Diatom Nanostructured Biosilica in Arachnoidiscus Sp: Micro-Optics from Mother Nature. *PLoS one* **9**: e103750. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103750> [cit. 20.4.2015]
- Field CB. 1998.** Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* **281**: 237–40.
- Finkel ZV, Miriam EK, James DW, Oscar MES, Falkowski PG. 2005.** Climatically Driven Macroevolutionary Patterns in the Size of Marine Diatoms over the Cenozoic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8927–32.
- Fuhrmann T, Landwehr S. 2004.** Diatoms as Living Photonic Crystals. *Applied Physics B*. **78**: 257-60.
- Gale DK, Gutu T. 2009.** Detection of Immunocomplex Formation by Enhanced Photoluminescence of Antibody-Functionalized Diatom Biosilica. *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series* **7321**. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1117/12.819153> [cit. 3.5.2015]
- Gordon R Dusan L, Tiffany MA, Nagy SS, Sterrenburg FS. 2009.** The Glass Menagerie: Diatoms for Novel Applications in Nanotechnology. *Trends in Biotechnology* **27**: 116–27.
- Gutu T, Dong L, Jiao J, Rorrer GL. 2005.** Characterization of Silicon-Germanium Oxide Nanocomposites Fabricated by the Marine Diatom Nitzschia Frustulum. *Microscopy and Microanalysis* **11**: 1958–59.
- Hecky RE, Mopper K, Kilham P, Degens ET. 1973.** The Amino Acid and Sugar Composition of Diatom Cell-Walls. *Marine Biology* **19**: 323–31.
- Hildebrand M, Volcani BE, Gassmann W, Schroeder JI. 1997.** A Gene Family of Silicon Transporters. *Nature* **385**: 688–89.
- Hildebrand M, Frigeri LG, Davis AK. 2007.** Synchronised Growth of Thalassiosira Pseudonana (Bacillariophyceae) provides Novel Insights into Cell Wall Synthesis Processes in Relation to the Cell Cycle 1. *Journal of Phycology* **43**: 730–40.
- Chepurnov VA, Mann DG, Sabbe K, Vyverman W. 2004.** Experimental Studies on Sexual Reproduction in Diatoms. *International review of cytology* **237**: 91–154.
- Jang M, Min S, Kim T, Park JK. 2006.** Removal of Arsenite and Arsenate Using Hydrous Ferric Oxide Incorporated into Naturally Occurring Porous Diatomite. *Environmental science & technology* **40**: 1636–43.
- Khraisheh M, Al-degs YS, Mcminn WM. 2004.** Remediation of Wastewater Containing Heavy Metals Using Raw and Modified Diatomite. *Chemical Engineering Journal* **99**: 177–84.
- Kooistra WH, Medlin LK. 1996.** Evolution of the Diatoms (Bacillariophyta). IV. A Reconstruction of Their Age from Small Subunit rRNA Coding Regions and the Fossil Record. *Molecular phylogenetics and evolution* **6**: 391–407.

- Kovačik P, Kremláčková Z, Štěpánek F. 2012.** Investigation of Radiofrequency Induced Release Kinetics from Magnetic Hollow Silica Microspheres. *Microporous and Mesoporous Materials* **159**: 119–25.
- Kovačik P, Singh M, Štěpánek F. 2013.** Remote Control of Diffusion from Magnetic Hollow Silica Microspheres. *Chemical Engineering Journal* **232**: 591–98.
- Kratošová G, Vávra I, Horská K, Životský O, Němcová Y, Bohunická M, Slabotinský J, Rosenbergová K, Kadilak A, Schröfel A. 2013.** Synthesis of metallic nanoparticles by diatoms and chrysophytes - prospects and applications. In: Rai M, Posten C. eds.: *Green biosynthesis of nanoparticles: mechanisms and applications*, CABI Publishing. 61-78.
- Kristiansen J, Sandgren CD. 1986.** The Ultrastructural Bases of Chrysophyte Systematics and Phylogeny. *Critical reviews in plant sciences* **4**: 149–211.
- Kröger N, Deutzmann R, Bergsdorf C, Sumper M. 2000.** Species-Specific Polyamines from Diatoms Control Silica Morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 14133–38.
- Kröger N, Poulsen N. 2008.** Diatoms-from Cell Wall Biogenesis to Nanotechnology. *Annual review of genetics* **42**: 83–107.
- Lavau S, Wetherbee R. 1994.** Structure and Development of the Scale Case of *Mallomonas Adamas* (Synurophyceae). *Protoplasma* **181**: 259–68.
- Leadbeater BSC. 1990.** Ultrastructure and Assembly of the Scale Case in *Synura* (Synurophyceae Andersen). *British Phycological Journal* **25**: 117-32.
- Lee RE. 1978.** Formation of Scales in *Paraphysomonas Vestita* and the Inhibition of Growth by Germanium Dioxide\*. *The Journal of Protozoology* **25**: 163–66.
- Lee RE. 2008.** *Phycology*. Cambridge University Press.
- Lettieri S, Setaro A. 2008.** The Gas Detection Properties of Light-Emitting Diatoms. *Advanced Functional Materials* **18**: 1257-64.
- Losic D, Yu Y, Aw MS, Simovic S, Thierry B, Addai-Mensah J. 2010.** Surface Functionalisation of Diatoms with Dopamine Modified Iron-Oxide Nanoparticles: Toward Magnetically Guided Drug Microcarriers with Biologically Derived Morphologies. *Chemical communications (Cambridge, England)* **46**: 6323–25.
- Losic D, Mitchell JG, Voelcker NH. 2009.** Diatomaceous Lessons in Nanotechnology and Advanced Materials. *Advanced Materials* **21**: 2947–58.
- Lowenstam HA. 1981.** Minerals Formed by Organisms. *Science (New York, N.Y.)* **211**: 1126–31.
- Lowenstam HA, Weiner S. 1989.** *On Biomineralization*. Oxford University Press.
- Mai WX, Meng H. 2013.** Mesoporous Silica Nanoparticles: A Multifunctional Nano Therapeutic System. *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro* **5**: 19–28.
- Mann DG. 1999.** The Species Concept in Diatoms. *Phycologia* **38**: 437–95.
- Mann S. 1983.** Mineralization in Biological Systems. *Structure and Bonding* **54**: 125–74.
- Meng F, Gao G, Jia Z. 2015.** Study on Tribological Mechanism for Multi-Layer Porous Structure of Diatom Frustule. *Microbial ecology* **69**: 45–58.
- Mubarak A, Divya C, Gunasekaran M, Thajuddin N. 2011.** Biosynthesis and Characterization of Silicon-Germanium Oxide Nanocomposites Using Diatom. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **6**: 117–20.

- Nicholls KH. 1980.** A Reassessment of *Chrysosphaerella Longispina* and *C. Multispina*, and a Revised Key to Related Genera in the Synuraceae (Chrysophyceae). *Plant Systematics and Evolution* **135**: 95–106.
- Osmanlioglu AE. 2007.** Natural Diatomite Process for Removal of Radioactivity from Liquid Waste. *Applied Radiation and Isotopes* **65**: 17–20.
- Ozin G, Hall N. 2003.** The Photonic Opal - the Jewel in the Crown of Optical Information Processing. *Chemical communications (Cambridge, England)* **21**: 2639–43.
- Panáček A, Balzerová A, Pucek R, Ranc V, Večeřová R, Husičková V, Pechoušek J, Filip J, Zbořil R, Kvítek L. 2013.** Preparation, Characterization and Antimicrobial Efficiency of Ag/PDDA-Diatomite Nanocomposite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **110**: 191–98.
- Pantoja ML, Jones H, Garelick H, Mohamedbaker HG, Burkitbayev M. 2014.** The Removal of Arsenate from Water Using Iron-Modified Diatomite (D-Fe): Isotherm and Column Experiments. *Environmental Science and Pollution Research* **21**: 495–506.
- Parker AR, Townley HE. 2007.** Biomimetics of Photonic Nanostructures. *Nature Nanotechnology* **2**: 347–53.
- Parkinson J, Gordon R. 1999.** Beyond Micromachining: The Potential of Diatoms. *Trends in biotechnology* **17**: 190–96.
- Pipes LD, Leedale GF. 1992.** Scale formation in *Tessellaria volvocina* (Synurophyceae). *British Phycological Journal* **27**: 11–19.
- Poll WH, Vrieling EG, Gieskes WWC. 1999.** Location and Expression of Frustulins in the Pennate Diatoms *Cylindrotheca Fusiformis*, *Navicula Pelliculosa*, and *Navicula Salinarum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **35**: 1044–53.
- Poulsen NC, Spector I, Spurck TP, Schultz TF, Wetherbee R. 1999.** Diatom Gliding Is the Result of an Actin-Myosin Motility System. *Cell motility and the cytoskeleton* **44**: 23–33.
- Preisig HR. 1994.** Siliceous Structures and Silicification in Flagellated Protists. *Protoplasma* **181**: 29–42.
- Raven J, Waite M. 2004.** The Evolution of Silicification in Diatoms: Inescapable Sinking and Sinking as Escape? *New Phytologist* **162**: 45–61.
- Rea I, Martucci NM, De Stefano L, Ruggiero I, Terracciano M, Dardano P, Migliaccio N, Arcari P, Tatè R, Rendina I, Lamberti A. 2014.** Diatomite Biosilica Nanocarriers for siRNA Transport inside Cancer Cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1840**: 3393–403.
- Ruggiero I, Terracciano M, Martucci NM, De Stefano L, Migliaccio N, Tatè R. 2014.** Diatomite Silica Nanoparticles for Drug Delivery. *Nanoscale Research Letters* **9**: 329.
- Sandgren CD. 1983.** Survival Strategies of Chrysophycean Flagellates: Reproduction and the Formation of Resistant Resting Cysts. In: Fryxel GA ed., *Survival Strategies of the Algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 23–48.
- Schröfel A. 2012.** Biosyntéza kovových nanočástic a jejich aplikace. Disertační práce. Depon. In: Fakulta metalurgie a materiálního inženýrství, Technická univerzita Ostrava
- Schröfel A, Kratošová G, Bohunická M, Dobročka E, Vávra I. 2011.** Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using Diatoms-Silica-Gold and EPS-Gold Bionanocomposite Formation. *Journal of Nanoparticle Research* **13**: 3207–16.
- Skebo JE, Grabinski CM, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. 2007.** Assessment of Metal Nanoparticle Agglomeration, Uptake, and Interaction Using High-Illuminating System. *International journal of toxicology* **26**: 135–41.

- Sun Z, Zheng S, Ayoko G, Frost RL, Xi Y. 2013.** Degradation of Simazine from Aqueous Solutions by Diatomite-Supported Nanosized Zero-Valent Iron Composite Materials. *Journal of Hazardous Materials* **263**: 768–77.
- Škaloud P, Kristiansen J, Škaloudová M. 2013.** Developments in the Taxonomy of Silica-Scaled Chrysophytes - From Morphological and Ultrastructural to Molecular Approaches. *Nordic Journal of Botany* **31**: 385–402.
- Tesson B, Hildebrand M. 2010.** Extensive and Intimate Association of the Cytoskeleton with Forming Silica in Diatoms: Control over Patterning on the Meso- and Micro-Scale. *PloS one* **5**: e14300. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0014300> [cit. 20.4.2015]
- Thomsen HA, Zimmermann B, Moestrup Ø, Kristiansen J. 1981.** Some New Freshwater Species of Paraphysomonas (Chrysophyceae). *Nordic Journal of Botany* **1**: 559–81.
- Tommasi E, Rea I, Mocella V. 2010.** Multi-Wavelength Study of Light Transmitted through a Single Marine Centric Diatom. *Optics express* **18**: 12203–12
- Tréguer P, Nelson DM, Van Bennekom AJ, Demaster DJ, Leynaert A, Quéguiner B. 1995.** The Silica Balance in the World Ocean: A Reestimate. *Science (New York, N.Y.)* **268**: 375–79.
- Vayias BJ, Athanassiou CG, Korunic Z, Rozman V. 2009.** Evaluation of Natural Diatomaceous Earth Deposits from South-Eastern Europe for Stored-Grain Protection: The Effect of Particle Size. *Pest Management Science* **65**: 1118–23.
- Volesky B, Holan ZR. 1995.** Biosorption of Heavy Metals. *Biotechnology progress* **11**: 235–50.
- Wee JL, Andersen RA. 2010.** Scale Biogenesis in Synurophycean Protists: Phylogenetic Implications. *Critical reviews in plant sciences* **16**: 497–534.
- Weiner S. 2003.** An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **54**: 1–29.
- Wolf EL. 2006.** *Nanophysics and Nanotechnology*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Yang EC, Boo GH, Kim HJ, Cho SM, Boo SM, Andersen R, Yoon HS. 2012.** Supermatrix Data Highlight the Phylogenetic Relationships of Photosynthetic Stramenopiles. *Protist* **163**: 217–31.
- Yoshida A, Motoyama M, Kosaku A, Miyamoto K. 1997.** Antireflective Nanoprotuberance Array in the Transparent Wing of a Hawkmoth, *Cephonodes Hylas*. *Zoological Science* **14**: 737–41.
- Zurzolo C, Bowler C. 2001.** Exploring Bioinorganic Pattern Formation in Diatoms. A Story of Polarized Trafficking. *Plant Physiology* **127**: 1339–45.