

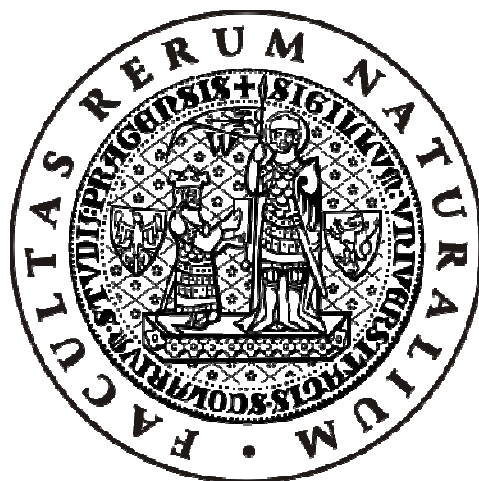
**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Ústav pro životní prostředí**

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



**TOXICITA NANOMATERIÁLŮ VŮČI VODNÍM KORÝŠŮM**

**Toxicity of nanomaterials to aquatic crustaceans**

Bakalářská práce

Zpracovala: Kateřina Novotná

Školitel: Doc. Ing. Vladimír Kočí, Ph.D.

Květen 2012

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného akademického titulu. Verze odevzdané v tištěné a v elektronické podobě jsou totožné.

V Praze dne 29. 5. 2012

Kateřina Novotná

Ráda bych poděkovala svému konzultantovi Ing. Ondřeji Pařízkovi za cenné rady a pomoc v laboratoři a svému školiteli Doc. Ing. Vladimíru Kočímu, Ph.D. za inspiraci a možnost uskutečnit tuto bakalářskou práci. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu během studia.

## Souhrn

Nanomateriály jsou v poslední době díky svým specifickým vlastnostem hojně využívány pro různé aplikace, stávají se součástí mnoha produktů a jejich výroba stále roste. Zvyšuje se tak i pravděpodobnost jejich výskytu v prostředí a tedy i možného kontaktu s mnoha organismy, je proto žádoucí provádět testy prověřující možné negativní působení nanočástic. Jejich chování je však často ovlivněno okolními faktory a navíc množství různých druhů nanomateriálů s odlišnými vlastnostmi je velké.

V této práci jsou shrnuty základní poznatky o nanomateriálech a jejich možné toxicitě. Pozornost je věnována hlavně výsledkům studií prováděných na vodním korýši *Daphnia magna*. V experimentální části jsou pak na tomto druhu testovány účinky nanoformy nulvalentního železa, které se používá pro odstraňování škodlivých látek a je tedy cíleně aplikováno přímo do prostředí. Byly testovány koncentrace  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $2,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  dvou produktů lišících se typem stabilizace částic. Pro NANOFER 25S (se speciální povrchovou modifikací) nebylo možné stanovit hodnotu  $EC_{50}$ , protože při testovaných koncentracích dosáhla imobilizace nejvýše 30 %. Pro NANOFER 25 (bez této povrchové modifikace) činí hodnota  $EC_{50}$   $0,94 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tyto výsledky potvrzují, že je potřebné každý nanomateriál posuzovat samostatně, a tato problematika tak poskytuje velký prostor pro další výzkum.

## Klíčová slova

Nanomateriály, toxicita, nZVI, *Daphnia magna*

## **Abstract**

Nowadays, nanomaterials are broadly used for many purposes thanks to their unique properties. The production of nanoscale materials is growing rapidly. Consequently, it means a high probability of their release into the environment and there are concerns about their possible negative effects on organisms. Furthermore, the behaviour of nanomaterials might be strongly influenced by many factors and there are many different types of them, so there is still a big information gap in this field.

The aim of this work is to summarize basic facts about nanomaterials and their possible toxicity, especially to the fresh-water crustacean *Daphnia magna*. An impact of nanoscale zero-valent iron particles is tested on this species. This material is used for remediation so it is injected directly into the environment. Concentrations of 0,1 g·l<sup>-1</sup>, 0,5 g·l<sup>-1</sup>, 1 g·l<sup>-1</sup> and 2,5 g·l<sup>-1</sup> of two products with different surface modifications were tested. It was found that the toxicity depends on the type of stabilization. EC<sub>50</sub> was not established for NANOFER 25S (with a special surface modification) due to the maximum immobilization rate of only 30 % for the concentrations tested. However, the EC<sub>50</sub> value for NANOFER 25 (without the special surface modification) is 0,94 g·l<sup>-1</sup>. These results confirm that it is necessary to evaluate possible effects of every nanomaterial being commonly used.

## **Keywords**

Nanomaterials, toxicity, nZVI, *Daphnia magna*

## Seznam zkratk

CMC-nZVI	nulvalentní nanoželezo stabilizované karboxymethyl celulórou
CNTs	uhlíkové nanotrubičky
EC <sub>50</sub>	hodnota počáteční koncentrace dané látky, která v daném časovém úseku imobilizuje 50 % jedinců
GA-QD	kvantové tečky s obalovým materiálem obsahujícím arabskou gumou
LC <sub>50</sub>	hodnota počáteční koncentrace dané látky, která v daném časovém úseku způsobí úhyn 50 % jedinců
MPA-QD	kvantové tečky obalené kyselinou 3-merkaptopropionovou
NM	nanomateriály
NP	nanočástice
nZVI	nanoforma nulvalentního železa
ROS	reaktivní forma kyslíku
TEM	transmisní elektronový mikroskop
QD	kvantové tečky

# Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.2 Nanomateriály .....	9
2.1.1 Rozdělení nanomateriálů .....	9
2.1.2 Využití nanomateriálů.....	10
2.1.3 Chování NP v prostředí.....	11
2.1.4 Nanomateriály jako odpad a složka odpadních vod .....	11
2.2 Toxicita nanomateriálů .....	12
2.2.1 Vstup NP do organismu a mechanismy toxického působení.....	12
2.2.2 Metody pro testování toxicity .....	13
2.2.3 Faktory ovlivňující toxicitu.....	14
2.2.4 Toxicita nanomateriálů vůči <i>Daphnia magna</i> .....	14
2.3 Nanoforma nulvalentního železa .....	17
2.3.1 Vlastnosti nZVI.....	17
2.3.2 Aplikace nZVI .....	17
2.3.3 Možná rizika využívání nZVI.....	18
2.3.4. Vliv nZVI na organismy .....	19
3. Experimentální část .....	20
3.1 Materiál a metody .....	20
3.1.1 Testovací organismus.....	20
3.1.2 Materiál a pomůcky .....	20
3.1.3 Testované látky .....	21
3.1.4 Princip testu .....	22
3.1.5 Podmínky a průběh testu.....	23
3.2 Pracovní postup .....	23
4. Výsledky.....	25
5. Diskuse .....	28
6. Závěr.....	30
7. Seznam použité literatury .....	31
8. Přílohy .....	35

# 1. Úvod

Nanomateriály patří v současné době mezi velmi aktuální témata. Díky svým specifickým vlastnostem nacházejí uplatnění v celé řadě spotřebních produktů a v některých případech jsou aplikovány i přímo do prostředí za účelem odstraňování škodlivin. Produkce nanomateriálů (NM) stále roste a podobný vývoj se dá očekávat i do budoucna. V souvislosti s tím se tedy zvyšuje i pravděpodobnost jejich výskytu v prostředí, a to jak záměrně, tak nechtěně. Díky tomu se s nimi následně může setkávat celá řada organismů.

Ve srovnání s běžnými formami látek mohou mít nanočástice (NP) při stejném chemickém složení odlišné vlastnosti. Poznatky o toxicitě mnohých materiálů tak nemusí být pro jejich nanoformy odpovídající, je tedy zapotřebí pro jednotlivé nanomateriály provádět nové toxikologické studie. Jelikož je produkováno velké množství různých druhů NP, přičemž jejich vlastnosti se mohou lišit i na základě způsobu výroby nebo v souvislosti s povrchovými úpravami, je studium účinků NP stále potřebnější. Nanočástice navíc mohou podléhat četným modifikacím v závislosti na okolním prostředí.

Cílem této práce je podat základní informace o vlastnostech a využití nanomateriálů, nastínit jejich chování v přírodním prostředí a také shrnout výsledky dosud provedených studií zaměřených na toxicitu NM vůči vodním korýšům, konkrétně hrotnatce velké (*Daphnia magna*). Podrobněji se pak práce zabývá nanoformou nulvalentního železa. To je využíváno pro odstraňování škodlivin z půdy či vody a je tedy aplikováno do prostředí přímo, což výrazně zvyšuje pravděpodobnost expozice mnohých organismů. V experimentální části budou testovány účinky různých koncentrací této látky na *Daphnia magna*.



## 2. Teoretická část

### 2.1 Nanomateriály

Základním rysem nanomateriálů je velikost nepřesahující 100 nm nejméně v jednom rozměru (Nowack et Bucheli, 2007). Díky tomu mají ve srovnání s konvenčními formami látek větší povrch, což může zapříčínovat odlišné vlastnosti (Stone et al., 2010). Ty jsou však kromě rozměrů a plochy povrchu determinovány i dalšími faktory (Lee et al., 2009), jako je např. tvar, který může být kulovitý, trubicovitý nebo též nepravidelný (Nowack et Bucheli, 2007), a náboj (Lee et al., 2009).

Právě unikátní vlastnosti činí nanomateriály komerčně zajímavými a umožňují jejich široké využití (Auffan et al., 2009), např. ve farmaceutickém průmyslu, kosmetice, elektronice, při úpravě pitné vody (Shaw et Handy, 2011) nebo pro odstraňování škodlivin z prostředí (Grieger et al., 2010). Produkce NP tak stále stoupá a stejný vývoj se dá očekávat i do budoucna. V prostředí jsou ale nanočástice vystaveny působení řady faktorů, např. světlu, oxidaci či mikroorganismům, a pro posouzení jejich potenciálního vlivu je kromě možné toxicity zapotřebí znát také jejich mobilitu a tendenci agregovat či reagovat s jinými látkami (Nowack et Bucheli, 2007).

#### 2.1.1 Rozdělení nanomateriálů

Kromě cíleně vyráběných nanomateriálů se vyskytují i NP přirozeného původu, vznikající při biogenních, atmosférických či geologických dějích, a NP produkované člověkem nezáměrně, zejména při spalovacích procesech (Nowack et Bucheli, 2007).

Podle složení pak lze nanočástice rozdělit na ty obsahující uhlík a na anorganické NP. Do první skupiny patří zejména fullereny a uhlíkové nanotrubičky, do druhé hlavně kovy a oxidy kovů (Nowack et Bucheli, 2007) a také kvantové tečky (Kim et al., 2010).

Z uhlíkatých nanomateriálů byl nejdříve objeven kulovitý fullerén  $C_{60}$ , později od něj byly odvozeny jeho cylindrické deriváty – uhlíkové nanotrubičky (CNTs). Jejich průměr i velikost mohou být různé a lze je dále dělit na jednostěnné a vícestěnné. Ačkoli jsou fullereny a CNTs stejného složení, jejich vlastnosti a tedy i chování v přírodním prostředí mohou být výrazně odlišné. Zvláštní formou uhlíku je pak grafen. Jedná se o materiál zhotovený pouze z jedné vrstvy atomů uspořádaných do tvaru včelí plástve (Farré et al., 2011).

Nanoformy oxidů kovů patří mezi nejvyžívanější NM, jedná se např. o oxid titaničitý ( $\text{TiO}_2$ ), oxid zinečnatý ( $\text{ZnO}$ ) nebo oxid hlinitý ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Produkovány jsou také binární oxidy. Z nulvalentních kovů se nejvíce uplatňují nanoformy železa, stříbra a zlata (Farré et al., 2011).

Kvantové tečky jsou polovodičové nanokrystaly, obsahující chalcogeny a těžké kovy (Kim et al., 2010). Skládají se z reaktivního jádra, které může tvořit např. selenid kademnatý ( $\text{CdSe}$ ), telurid kademnatý ( $\text{CdTe}$ ) či selenid zinečnatý ( $\text{ZnSe}$ ), a z pláště. Ten může být zhotoven např. z oxidu křemičitého ( $\text{SiO}_2$ ) nebo sulfidu zinečnatého ( $\text{ZnS}$ ) a jeho úkolem je mimo jiné chránit jádro proti oxidaci (Farré et al., 2011).

### 2.1.2 Využití nanomateriálů

Nanomateriály nacházejí uplatnění v celé řadě produktů, např. v kosmetice, oděvech, hračkách, elektronice, kuchyňském vybavení, nátěrových hmotách (Consumer Products Inventory of Nanotechnology Products, 2012) nebo jako aditiva v palivech (Musee, 2011).

Uhlíkaté NM jsou používány hlavně v mikroelektronice, kondenzátorech, bateriích nebo při katalýze. Zejména vícestěnné CNTs totiž vynikají velkou tepelnou a elektrickou vodivostí. Unikátní vlastnosti má také grafen. Díky jeho extrémní pevnosti a vysoké vodivosti má potenciál pro využití v elektronice a fotonice (Farré et al., 2011).

Široce aplikovatelné jsou nanoformy oxidů kovů. Například u  $\text{TiO}_2$  a  $\text{ZnO}$  se využívá jejich schopnosti blokovat UV záření, a tak jsou obsaženy v kosmetice (zejména v prostředcích na opalování) nebo v obalových materiálech.  $\text{Al}_2\text{O}_3$  může sloužit kupříkladu pro úpravu mechanických vlastností některých látek (Farré et al., 2011).

Z nulvalentních forem kovů má ve spotřebních produktech největší zastoupení nanostříbro. Díky jeho antibakteriálním vlastnostem se stává součástí kosmetických produktů, textilií apod. U zlatých NP se využívá jejich katalytických vlastností, potenciál mají také pro aplikaci v medicíně (Farré et al., 2011).

Nanomateriály jsou rovněž využívány pro sanace znečištěného, zejména vodního, prostředí. Jejich unikátní vlastnosti umožňují degradovat celou řadu polutantů, přičemž mohou být modifikovány tak, aby selektivně zachytávaly určité molekuly. Používají se např. pro odstraňování kovů, dusíku či fosforu, předmětem zájmu je také možná aplikace pro odstraňování perzistentních organických látek (Sánchez et al., 2011). V této sféře nachází uplatnění zejména nanoforma nulvalentního železa (nZVI) (Griegr et al., 2010).

Další možné využití NP je v medicíně. Fungovat zde mohou např. jako transportní média pro léčiva (Nowack et Bucheli, 2007) nebo jako kontrastní látky v diagnostice (Casals et al., 2008). Pro tento účel mohou sloužit např. některé kvantové tečky. Ty se uplatňují také ve fotovoltice či fotonice (Farré et al., 2011).

### **2.1.3 Chování NP v prostředí**

Kromě cílené aplikace NP je třeba počítat i s jejich možným únikem do prostředí v důsledku neoptimální manipulace či v souvislosti s odpadovým hospodářstvím. Díky specifickým vlastnostem a jejich schopnosti interagovat s okolím je pak jejich další chování v přírodě určeno nejen původními vlastnostmi, ale i možnými fyzikálně-chemickými modifikacemi (Sánchez et al., 2011).

U mnoha NP může snadno docházet ke slučování s jinými látkami, změně vlastností či k rozkladu (Casals et al., 2008). Různá může být i stabilita povrchových úprav. Ty přitom často mají na vlastnosti nanomateriálů zásadní vliv (Arschberger et al., 2011). Škodlivé účinky mohou mít také látky, které z původních NP nově vznikají po jejich vstupu do prostředí (Casals et al., 2008). U rozpustných kovů a jejich oxidů hrozí uvolňování kovových iontů, které jsou v některých případech spojovány s možnou toxicitou. Mezi dobře rozpustné NM patří např. oxid zinečnatý (Arschberger et al., 2011).

Velký význam může mít agregace částic do větších útvarů. K tomuto jevu dochází díky gravitaci, Brownovu pohybu částic, pohybu kapalin apod. (Nowack et Bucheli, 2007), uplatňují se také faktory prostředí jako pH nebo iontová síla. Zásadní vliv mají samozřejmě i vlastnosti samotných NP, například povrchový náboj (Arschberger et al., 2011). Agregované částice pak mají větší tendenci sedimentovat. I tak ale může být jejich působení vystavena celá řada organismů (Nowack et Bucheli, 2007).

### **2.1.4 Nanomateriály jako odpad a složka odpadních vod**

U mnoha využívaných nanomateriálů, zejména u kosmetických produktů, se dá očekávat jejich přechod do odpadních vod. Je otázkou, zda jsou současné technologie schopné NP efektivně odstraňovat či zda nanomateriály nemohou nepříznivě ovlivňovat některé čistírenské procesy (Musee, 2011). Hrozí například útlum činnosti mikroorganismů v sekundárních čistících procesech nebo zanášení membrán (Yang et al., 2010).

Část nanomateriálů může být zachycována díky adhezi, ale tento proces probíhá v závislosti na individuálních vlastnostech NP, mnohdy pozměněných stabilizačními úpravami (Musee, 2011). Některé NP zřejmě čistícím zařízením procházejí a mohou tak pronikat dále do prostředí (Yang et al., 2010).

V případě efektivního zachycení NP může být problematický jejich obsah v čistírenském kalu, uvažujeme-li jeho další využití, zejména v zemědělství (Yang et al., 2010). Například velký obsah nanostříbra by mohl způsobit nevyužitelnost některých, jinak vhodných, kalů pro kompostování kvůli antibakteriálním vlastnostem potlačujícím žádoucí mikrobiální činnost (Musee, 2011).

Diskutabilní je také skládkování odpadních NP, které je uplatňováno například pro nekvalitní část materiálů z výroby (Musee, 2011).

## **2.2 Toxicita nanomateriálů**

Některé nanomateriály mohou mít silnější toxické účinky než látky stejného složení, které nemají nano-strukturu. Nejedná se však o pravidlo (Karlsson et al., 2009), a je tedy žádoucí posuzovat jednotlivé nanomateriály daných charakteristik samostatně (Shaw et Handy, 2011). Ideální je testovat možnou rizikovost látek před jejich využitím a tedy potenciálním průnikem do prostředí (Kahru et Dubourguier, 2010). To však může znesnadňovat značná finanční a časová náročnost testů (Sánchez et al., 2011).

### **2.2.1 Vstup NP do organismu a mechanismy toxického působení**

Do těl vyšších živočichů mohou nanočástice vstupovat různými cestami – vdechnutím, pozřením nebo přes kůži (Casals et al., 2008). Pro drobné vodní organismy má význam zejména příjem NP s potravou nebo jejich průnik přes žábry či tělní stěnu. U rostlin mohou zřejmě NP působit prostřednictvím adsorpce na povrch kořenů s následným začleněním do buněčné stěny a vstupem do buňky (Nowack et Bucheli, 2007).

Prokaryotické organismy mohou být před působením NP do jisté míry chráněny díky tomu, že nedisponují mechanismy sloužícími pro přenos koloidních částic skrz buněčnou stěnu. Eukaryotické organismy jsou však pro buněčný transport látek o velikostech v řádech nanometrů a mikrometrů lépe uzpůsobeny. Částice mohou být buňkami přijímány prostřednictvím endocytózy nebo fagocytózy (Nowack et Bucheli, 2007), přičemž některé NP mají schopnost

ovlivňovat propustnost buněčných membrán a zvyšovat tak pravděpodobnost průniku NP. Pozorována byla také perforace buněčné stěny. Nanočástice navíc mohou toxicky působit i extracelulárně (Kahru et Dubourguier, 2010).

Biologická aktivita NP pak závisí na celé řadě jejich vlastností, které mohou v organismech vyvolávat různé odpovědi. Vliv může mít např. velikost a tvar částic, jejich chemismus, náboj či porosita, účinky závisí také na přijaté množství NP (Casals et al., 2008). Tyto faktory dále ovlivňují přechod NP k dalším orgánům, lokalizaci částic v buněčných organelách, možnost navazovat se na proteiny či receptory apod. Různá je také schopnost NP způsobovat oxidativní stres, který je zřejmě jedním z klíčových mechanismů toxicity nanomateriálů. Reaktivní formy kyslíku (ROS) při něm zapříčiní poškození proteinů, lipidů či nukleových kyselin (Karlsson et al., 2009).

Některé rozpustné látky (např. CuO, ZnO) mohou působit toxicky prostřednictvím vznikajících iontů ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) (Kahru et Dubourguier, 2010). Předmětem studií je také možný vliv NP na toxicitu jiných látek (Fan et al., 2011).

## 2.2.2 Metody pro testování toxicity

Různé studie testují potenciální toxicitu nanomateriálů odlišnými způsoby. Využívají se jak metody *in vitro*, typicky na savčích buňkách (Lee et al., 2009), tak metody *in vivo*, např. působení při expozici nanomateriálů vdechováním (prováděno zejména na hlodavcích) (Kahru et Dubourguier, 2010) či testy na vodních organismech. Vhodnými jsou např. vodní korýš *Daphnia magna* či larva pakomára *Chironomus riparius*, a to díky jejich pozorovatelným odezvám na různé polutanty, nenáročnosti na chov a krátkému životnímu cyklu. Zároveň mají důležité postavení v potravním řetězci a mohou zprostředkovávat nahlédnutí do působení nanomateriálů na vodní ekosystémy (Lee et al., 2009). Prováděny jsou ale také testy na rybách, např. na druhu dánío pruhované (*Danio rerio*), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) (Shaw et Handy, 2011) či medaka japonská (*Oryzias latipes*) (Chen et al., 2011). Dalšími možnostmi jsou pokusy s klíčivostí rostlin (Recillas et al., 2011) nebo bioluminiscenční testy využívající vlastností mořské bakterie *Vibrio fischeri* (Sánchez et al., 2011).

### 2.2.3 Faktory ovlivňující toxicitu

U klasických forem kovů je známo, že jejich biologické účinky často vykazují výrazné odlišnosti v závislosti na stupni oxidace, vazbách se specifickými ligandy apod., velký význam má také rozpustnost (Auffan et al., 2009). Na příjem kovů organismy a jejich možnou toxicitu pak mají vliv faktory, jako je pH či tvrdost vody. Ačkoli působení těchto parametrů na nanočástice může někdy působit zdánlivě shodně, vlastní podstata je mnohdy zcela odlišná (Shaw et Handy, 2011). U nanomateriálů je zapotřebí zaměřit se i na jejich další fyzikální vlastnosti (Lee et al., 2009), důležitý je povrch NP, který může zásadně ovlivňovat chování částic jako koloidních suspenzí a jejich schopnost agregovat se do větších útvarů (Kahru et Dubourguier, 2010).

Pro zhodnocení biodostupnosti je pak kromě vlastností sledované látky a okolního prostředí nutné znát také chování cílového organismu, zejména to, zda dané NP přijímá s potravou. Zde se může uplatňovat právě agregování částic, jehož možným důsledkem je snížení dostupnosti určitého podílu přítomné látky pro některé organismy (Kahru et Dubourguier, 2010).

### 2.2.4 Toxicita nanomateriálů vůči *Daphnia magna*

Hrotnatka velká neboli *Daphnia magna* je drobný sladkovodní korýš. Pro monitorování toxicity vodního prostředí je tento organismus vhodný, jelikož reaguje na řadu polutantů, má krátký životní cyklus a přitom je významnou složkou potravního řetězce (Lee et al., 2009).

#### Uhlíkaté NP

Mezi hojně využívané uhlíkaté nanomateriály patří fullereny (Tao et al., 2009). Ukázalo se, že na toxicitu fullerenu C<sub>60</sub> může mít velký vliv způsob jeho přípravy. Pro *Daphnia magna* byly zjištěny různé hodnoty LC<sub>50</sub> pro 48 hodin v závislosti na metodě, jakou byla látka rozpouštěna. Jedná se o 0,8 ppm pro fulleren rozpouštěný za využití tetrahydrofuranu a více než 35 ppm pro fulleren rozpouštěný pouze ve vodě. Příčinou tohoto výrazného rozdílu je zřejmě možný obsah zbytkového tetrahydrofuranu ve vznikajících agregátech (Zhu et al., 2006).

Za povšimnutí stojí i působení subletálních koncentrací fullerenu C<sub>60</sub>. Pozorovanými důsledky byly snížená reprodukční schopnost a akumulace NP v organismu. Maximální obsah fullerenu v tělech *Daphnia magna* dosahoval až 0,7 % hmotnosti jedinců, a to u plodů po 12 hodinách expozice (Tao et al., 2009).

Předpokládá se také, že fullerén C<sub>60</sub> by mohl působit na toxicitu a bioakumulaci ostatních látek, obdobně jako např. rozpuštěná organická hmota. Například u fluoranthenu, který patří mezi polycyklické aromatické uhlovodíky a za přítomnosti UV záření má toxické účinky, byla pozorována v důsledku interakce těchto látek nižší akutní toxicita fluoranthenu. Při dlouhodobější expozici (21 dní) bylo ale pozorováno poškození organismů na buněčné úrovni (Yang et al., 2010).

Byl také zaznamenán negativní vliv víceštěnných uhlíkových nanotrubic na jedince *Daphnia magna*. Při koncentracích 5 mg·l<sup>-1</sup> a 10 mg·l<sup>-1</sup> docházelo k omezení růstu přibližně o 20 %. Dalším efektem bylo snížení reprodukce, a to kolem 50 % pro koncentrace 0,25 mg·l<sup>-1</sup>, 0,5 mg·l<sup>-1</sup> a 1 mg·l<sup>-1</sup>. Pravděpodobným mechanismem působení je zde nedostatečný přísun živin v důsledku narušeného příjmu potravy (Alloy et Roberts, 2011).

Prováděny byly také testy zjišťující toxicitu diamantových nanočástic. U koncentrací převyšujících 12,5 mg·l<sup>-1</sup> byla pozorována stoprocentní mortalita, u koncentrací nad 1,3 mg·l<sup>-1</sup> pak poruchy reprodukce (Mendonca et al., 2011).

## **Kovy a oxidy kovů**

Ukazuje se, že toxicita nanoforem některých oxidů kovů je výrazně vyšší než toxicita jejich klasické formy. Významný rozdíl v koncentracích LC<sub>50</sub> pro *Daphnia magna* (po 48 hodinách působení) byl pozorován například pro oxid měďnatý (CuO). Hodnota činila 164,8 mg·l<sup>-1</sup> pro klasickou formu látky, zatímco pro nanoformu pouhých 3,2 mg·l<sup>-1</sup>. Méně výrazná odlišnost byla pozorována u oxidu zinečnatého (ZnO). Koncentrace LC<sub>50</sub> pro 48 hodin dosáhly 8,8 mg·l<sup>-1</sup> resp. 3,2 mg·l<sup>-1</sup> pro klasickou resp. nanoformu (Heinlaan et al., 2008). Velká senzitivita *Daphnia magna* byla pozorována také vůči NP oxidu železitého (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), a to ačkoli je obecně považován za netoxický. V tělech mrtvých jedinců se nacházely viditelné černé agregáty (García et al., 2011).

Naopak pro oxid titaničitý (TiO<sub>2</sub>) nebyly při testech prováděných na *Daphnia magna* zjištěny žádné toxické účinky, což však může souviset s tím, že při pokusu nebylo uplatněno UV záření, které může být pro toxicitu TiO<sub>2</sub> zásadní (Lee et al., 2009). U organismů vystavených koncentracím 80 a 250 mg·l<sup>-1</sup> ale byly zaznamenány pomalejší reakce a kumulace částic TiO<sub>2</sub> v trávicím ústrojí (Strigul et al., 2009).

TiO<sub>2</sub> může také ovlivňovat působení ostatních látek. Při koncentraci TiO<sub>2</sub> 2 mg·l<sup>-1</sup> byla pozorována zvýšená akumulace mědi v organismu, a to o 18-31 %, díky adsorpci měďnatých iontů na NP. Akumulované částice TiO<sub>2</sub> spolu s mědí byly zjištěny ve střevech. Jelikož zvýšené koncentrace tohoto komplexu jsou toxické stejně jako samotné měďnaté ionty, byla v souvislosti

s kumulací látky v organismu pozorována zvýšená mortalita jedinců. Současně byl zaznamenán útlum detoxifikačních mechanismů, sloužících k vyrovnání se zvýšenou koncentrací kovů (Fan et al., 2011).

U hliníkových nanočástic bylo zjištěno rozdílné toxické působení v závislosti na povrchových úpravách. Testovány byly NP pokryté oxidem hlinitým resp. NP s karboxylovým ligandem. Hodnoty LD<sub>50</sub> po 48 hodinách byly stanoveny na 7,483 mg·l<sup>-1</sup> resp. 107,588 mg·l<sup>-1</sup>. Vliv zde pravděpodobně má hydrofobní charakter NP s karboxylovým ligandem, což znemožňuje přípravu homogenní suspenze (Strigul et al., 2009).

Další látkou, pro kterou bylo zjištěno negativní působení na *Daphnia magna*, je oxid ceričitý (CeO<sub>2</sub>). Hodnota LC<sub>50</sub> byla stanovena na 12 mg·l<sup>-1</sup> (García et al., 2011). V jiné studii pak byla pozorována mírně zvýšená mortalita již při koncentraci 1 mg·l<sup>-1</sup>, zřejmě v souvislosti s genotoxickými účinky (Lee et al., 2009).

### **Kvantové tečky**

Na toxicitu kvantových teček (QD) může mít vliv stabilita pláště, který obaluje jádro obsahující kovy, jako je např. kadmium nebo olovo. Uplatňuje se zde také přítomnost UV záření (Kim et al., 2010). Při testech s kadmium obsahujícími kvantovými tečkami s různými obaly – kyselinou 3-merkaptopropionovou (MPA) resp. materiálem obsahujícím arabskou gumu (GA) byly po 48 hodinách pozorovány různé koncentrace uvolněných iontů Cd<sup>2+</sup> v závislosti na osvětlení. Pod vlivem UVB záření byly hodnoty výrazně vyšší pro MPA-QD. U GA-QD byl pak při působení UVB záření zjištěn vzestup akutní toxicity korelující s rostoucím množstvím uvolněného kadmia. Hodnota EC<sub>50</sub> poklesla s působením UVB z 95,9 μg·l<sup>-1</sup> na 58,5 μg·l<sup>-1</sup>. Koncentrace Cd<sup>2+</sup> však nebyla natolik vysoká, aby sama o sobě toxicitu zapříčinila. U MPA-QD pak nebyl pozorován žádný nárůst toxicity, zřejmě díky snížené biodostupnosti v důsledku agregace částic (Kim et al., 2010).

### **Polokovy a jejich oxidy**

Škodlivé účinky v testech prováděných na *Daphnia magna* byly zjištěny pro nanoformu boru. Při koncentracích nad 80 mg·l<sup>-1</sup> byla pozorována stoprocentní úmrtnost během 24 hodin. Hodnota LD<sub>50</sub> pro 24 hodin byla pak stanovena na 19,5 mg·l<sup>-1</sup> a pro 48 hodin na 6,7 mg·l<sup>-1</sup>. Navíc již při koncentraci 8 mg·l<sup>-1</sup> byla po 24 hodinách působení pozorována snížená aktivita zvířat a také obsah částic boru v jejich trávicím ústrojí (Strigul et al., 2009). Mírně zvýšená úmrtnost byla pozorována také u jedinců *Daphnia magna* vystavených působení oxidu křemičitého SiO<sub>2</sub> (Lee et al., 2009).



## 2.3 Nanoforma nulvalentního železa

Nanoforma nulvalentního železa (nZVI) se využívá pro sanaci znečištěné půdy či podzemní vody. Dokáže degradovat celou řadu polutantů, přičemž rychlost tohoto procesu je ve srovnání s použitím klasické formy látky vyšší. Důvodem je větší povrchová, a tedy i reakční, plocha. Navíc je možné uplatnit různé povrchové modifikace, díky nimž lze ovlivňovat reaktivitu a mobilitu (Grieger et al., 2010).

### 2.3.1 Vlastnosti nZVI

Na nZVI mají však poměrně velký vliv okolní podmínky. Za přítomnosti kyslíku má  $\text{Fe}^0$  velkou tendenci oxidovat se, stabilní je pouze v redukčním prostředí. nZVI bez povrchových úprav má navíc velkou tendenci agregovat a tvořit tak částičky dosahující velikostí v řádu mikrometrů, čímž se snižuje reaktivita a mobilita v prostředí. K agregaci může docházet prostřednictvím vícero mechanismů. Velký význam má zřejmě koncentrace částic a uplatňují se i další faktory, jako např. přítomnost huminových kyselin (Grieger et al., 2010, Grieger et al., 2011).

Pro ovlivnění zmiňovaných vlastností nZVI se tedy často využívají různé povrchové modifikace. Vzniká tak tzv. stabilizované nanoželezo. Pro tyto úpravy slouží např. škrob, kyselina polyakrylová, polyaspartát či xanthanová guma, životnost těchto materiálů však často není známa (Grieger et al., 2010).

Mezi další modifikace nZVI patří jeho kombinace s ušlechtilými kovy, čímž může být zvyšována jeho reaktivita. Využívá se paladium, nikl, platina nebo stříbro (Grieger et al., 2010).

### 2.3.2 Aplikace nZVI

nZVI je využíváno pro odstraňování škodlivin *in situ*. Jeho výhodou oproti ostatním metodám je možná aplikace v obtížně dosažitelných místech, např. pod stávající infrastrukturou (Grieger et al., 2010), a to ve formě řídké směsi prostřednictvím vrtů (Grieger et al., 2011). Jako nejnižší účinná koncentrace se uvádí  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , nejobvyklejší hodnoty se ale pohybují kolem  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a užity byly i koncentrace  $0,75\text{-}1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Životnost nZVI v prostředí bývá odhadována

na 4-8 týdnů, závisí však na konkrétních vlastnostech použitých částic a také na faktorech prostředí, jako je např. pH (Grieger et al., 2010).

Hlavními funkčními mechanismy degradace polutantů jsou redukční a sorpční procesy. Mezi látky, pro jejichž odstraňování se nZVI používá, patří např. pesticidy, těžké kovy, halogenované organické látky, polycyklické aromatické uhlovodíky a chlorovaná rozpouštědla (Grieger et al., 2010). Prováděny jsou také testy pro možnou degradaci antibiotik (Ghauch et al., 2009). Výhodami nanoželeza oproti jeho klasické formě je kromě rychlejší degradace také potřeba menších zásahů do krajiny. Vznikají navíc méně škodlivé meziprodukty (Grieger et al., 2010).

### **2.3.3 Možná rizika využívání nZVI**

Ačkoli aplikace nZVI je celkově chápána jako pro prostředí výhodný zásah, objevují se také obavy ohledně potenciální rizikovosti nanoželeza. Jeho chování v přírodě a možná toxicita totiž nejsou, stejně jako je tomu u mnoha dalších NP, dostatečně prozkoumány (Grieger et al., 2010).

Zatímco předpokládaný pohyb neupraveného nZVI v prostředí je v řádu centimetrů, stabilizované nanoželezo má často mobilitu výrazně vyšší, přičemž jeho chování v přírodě se může značně lišit od prováděných laboratorních pokusů (Grieger et al., 2010). Uplatňovat se může také přirozený pohyb podzemní vody (Grieger et al., 2011). Navíc vysoce reaktivní nZVI může v důsledku působení řady biotických a abiotických faktorů podléhat neočekávaným transformacím (Grieger et al., 2010).

Potenciálně ohrožené mohou být zejména organismy žijící v půdě a ve vodě, např. bezobratlí živočichové, houby či mikroorganismy. Ovlivňovány mohou být i řasy a vyšší rostliny, a to prostřednictvím kořenového systému (Grieger et al., 2011). Nanoželezo se následně může dostávat dále do potravního řetězce. Není navíc snadné určit pravděpodobné koncentrace, kterým mohou být organismy exponovány po interakcích nZVI s okolním prostředím (Grieger et al., 2010).

### 2.3.4. Vliv nZVI na organismy

Konkrétní účinky nanoželeza zřejmě závisí na způsobu příjmu nZVI (aktivní, pasivní) a na jeho následném transportu, metabolismu a případné akumulaci v organismu, přičemž citlivost vůči nZVI může být různá a vliv má také přítomnost dalších stresových faktorů. Předpokládanými mechanismy případných škodlivých účinků jsou pak hlavně oxidativní stres a cytotoxicita (Grieger et al., 2011).

Studován byl například vliv nulvalentního železa na říční (Barnes et al., 2010) a půdní mikrobiální komunitu (Fajardo et al., 2012). V prvním případě došlo při koncentraci nZVI  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  krátce po aplikaci k prudkému výkyvu v obsahu rozpuštěného kyslíku, a to z  $8,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  na  $0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Postupně se ale původní hodnota obnovila. Dočasná změna byla pozorována také pro druhovou bohatost mikroorganismů. Počáteční snížení ale bylo s postupem času vyrovnáno. Z dlouhodobějšího hlediska (36 dní působení) byl zaznamenán pokles pH a početnost životaschopných bakteriálních buněk vzrostla, což dokazuje aktivitu mikrobiálního společenství, přičemž celková struktura nebyla změněna (Barnes et al., 2010). Studie prováděná na půdní mikrobiální komunitě při použití  $34 \text{ mg}$  nZVI na  $1 \text{ g}$  půdy však ukázala, že některé druhy bakterií jsou vůči této látce výrazně citlivější než druhy jiné. Zatímco některé skupiny prakticky vymizely, další se výrazně rozvinuly (Fajardo et al., 2012). Zdá se tedy, že toxicita nZVI vůči bakteriím je silně druhově individuální a závisí také na koncentraci látky a na okolních podmínkách (Barnes et al., 2010). Mikrobiální činnost přitom může mít vliv na procesy degradace polutantů (Fajardo et al., 2012).

Škodlivé působení bylo prokázáno na rybím druhu medaka japonská (*Oryzias latipes*). Jedinci staří 7 dní byli vystaveni účinkům nulvalentního nanoželeza stabilizovaného karboxymethyl celulórou (CMC-nZVI). Testované koncentrace byly v rozmezí  $1\text{-}100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pro všechny byla zaznamenána zvýšená mortalita, se stoupající koncentrací úmrtnost rostla. Při  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  dosahovala mortalita téměř 60 % (Chen et al., 2011).

### 3. Experimentální část

V experimentální části jsou testovány účinky různých koncentrací nanoformy nulvalentního železa na druhu *Daphnia magna*. Jako výchozí metodika je použita norma ČSN EN ISO 6341.

#### 3.1 Materiál a metody

##### 3.1.1 Testovací organismus

Testovacím organismem je hrotnatka velká, *Daphnia magna* (*Cladocera*, *Crustacea*). Pro test se využívají jedinci mladší 24 hodin pocházející z nejméně třetí generace získané acyklickou partenogenezí za stanovených chovných podmínek (ČSN EN ISO 6341). Složení použitého chovného média viz Přílohu č. 1, jako krmivo slouží zelená řasa *Desmodesmus subspicatus*. Pro tento test byli využiti jedinci z laboratorního chovu Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Morfologie *Daphnia magna* viz Přílohu č. 2.

##### 3.1.2 Materiál a pomůcky

Pro realizaci testu byly použity chemikálie a přístroje blíže specifikované v Tab. 1 a 2. Jako testovací nádoby sloužily skleněné kádinky o objemu 150 ml.

Tab. 1: Chemikálie použité pro přípravu testovacího média

Chemikálie		Výrobce
destilovaná voda	H <sub>2</sub> O	Destilovna VŠCHT
dihydrát chloridu vápenatého	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	PENTA
heptahydrát síranu hořečnatého	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	LACHEMA
hydrogenuhličitan sodný	NaHCO <sub>3</sub>	LACHEMA
chlorid draselný	KCl	LACHEMA

Tab. 2: Přístroje použité během testování

Přístroj	Výrobce	Typ
digitální váhy	Sartorius	BP 221S
pH metr	WTW	Multiline P4
kultivátor	WTW	TS 606 CZ – G/4 - VAR

### 3.1.3 Testované látky

Testovanými látkami byly produkty NANO FER 25 a NANO FER 25S vyráběné firmou NANO IRON s.r.o. Deklarovaný obsah železa je v rozmezí 80-90 hmotnostních procent, střední velikost částic je dle výrobce 50 nm a průměrná plocha povrchu je 20-25 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup> (NANOIRON Future Technology, 2012).

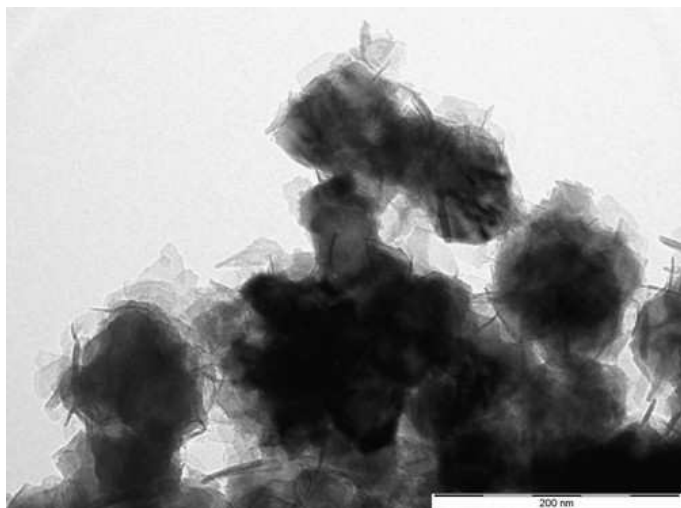
Název NANO FER 25 označuje vodnou disperzi nanočástic Fe<sup>0</sup> stabilizovaných výhradně anorganickým modifikátorem. Charakteristickou vlastností produktu je vysoká reaktivita, vykazovat má vyšší míru aglomerace a rychlejší sedimentaci (NANOIRON Future Technology, 2012).

NANO FER 25S je pak vodná disperze nanočástic Fe<sup>0</sup> se speciální povrchovou úpravou. Tato modifikace je založena na kombinaci biodegradovatelného organického a anorganického stabilizátoru. Díky tomu je omezena míra aglomerace za stále vysoké reaktivity. NANO FER 25S je tak určen zejména pro čištění kontaminovaných podzemních vod v reduktivních technologiích (NANOIRON Future Technology, 2012).

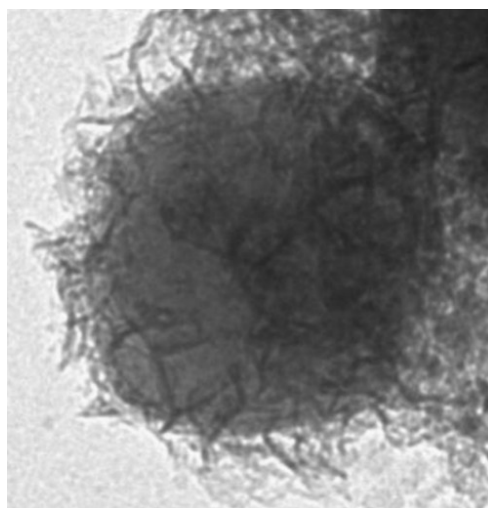
Přesné složení produktů je uvedeno níže v Tabulce 3. Obrázky 1-4 ukazují strukturu těchto látek na snímcích z transmisního elektronového mikroskopu (TEM).

Tab. 3: Složení produktů NANO FER 25 a NANO FER 25S v procentuálním vyjádření (NANOIRON Future Technology, 2012)

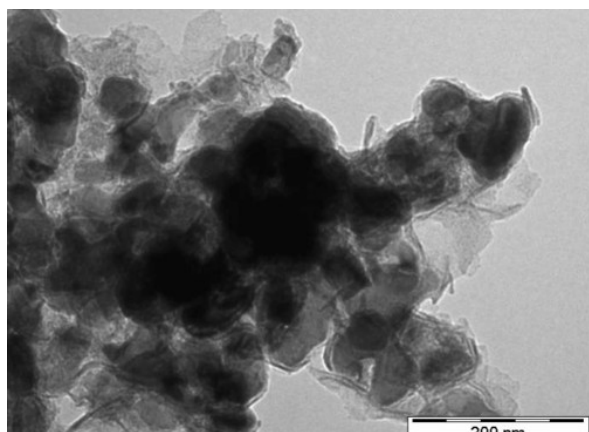
Produkt	Fe	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	C	H <sub>2</sub> O	Surfaktant
NANOFR 25	14-18 %	6-2 %	0-1 %	80 %	-
NANO FER 25S	14-18 %	6-2 %	0-1 %	70 %	3 %



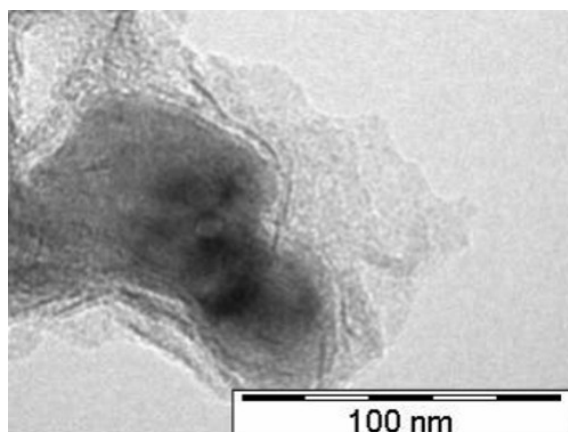
Obr. 1: TEM snímek nanočástic  
NANO FER 25  
(NANOIRON Future Technology, 2012)



Obr. 2: TEM snímek nanočástic  
NANO FER 25 (NANOIRON  
Future Technology, 2012)



Obr. 3: TEM snímek nanočástic  
NANO FER 25S  
(NANOIRON Future Technology, 2012)



Obr. 4: TEM snímek nanočástic  
NANO FER 25S  
(NANOIRON Future Technology, 2012)

### 3.1.4 Princip testu

Testování je založeno na sledování imobilizace jedinců *Daphnia magna* vystavených působení různých koncentrací zkoumané látky po dobu 48 hodin. Míra imobilizace je hodnocena po 24 a 48 hodinách. Účelem testu je stanovit hodnoty  $EC_{50}$  – tedy hodnoty počátečních koncentrací dané látky, které v daných časových úsecích imobilizují 50 % jedinců. Za

imobilizovaného jedince je přitom považován ten, který není schopen samostatného pohybu (nerozplave se ani do 15 s po mírném zamíchání roztoku), a to i v případě, že doposud pohybuje tykadly. Zaznamenávají se také jakékoli pozorované anomálie (ČSN EN ISO 6341).

### 3.1.5 Podmínky a průběh testu

Roztoky testovaných látek o požadovaných koncentracích se připravují rozpouštěním určených hmotností chemikálií v ředící vodě, která splňuje stanovené parametry. Hodnota pH se musí pohybovat v rozmezí  $7,8 \pm 0,2$ , koncentrace rozpuštěného kyslíku je nad  $7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (ČSN EN ISO 6341).

Pro každou testovanou koncentraci se použije nejméně 20 jedinců *Daphnia magna*. Počet jedinců v jednotlivých zkušebních nádobách nesmí být více než 20, jejich hustota nesmí být vyšší než 5 jedinců na 10 ml roztoku (ČSN EN ISO 6341).

Pro každou sérii testů se připraví kontrolní nádoby, které obsahují pouze ředící vodu. Do nich je vnesen stejný počet jedinců *Daphnia magna*, jako byl použit pro testované koncentrace. Imobilizace těchto organismů nesmí přesáhnout 10 % (ČSN EN ISO 6341).

Testování probíhá během fotoperiody 16 hodin světla a 8 hodin tmy nebo ve tmě. Optimální teplota ovzduší je  $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Během průběhu zkoušky se organismy nekrmí (ČSN EN ISO 6341).

### 3.2 Pracovní postup

Základní podmínky pro provedenou zkoušku toxicity jsou shrnuty v Tabulce 4. Byly provedeny testy produktů NANOFER 25 a NANOFER 25S. Odpovídající hmotnosti těchto látek, vypočtené na základě požadovaných cílových koncentrací ( $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $2,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), byly rozpuštěny v testovacím médiu.

To bylo připraveno nadávkováním 50 ml z každého zásobního roztoku solí (složení zásobních roztoků je popsáno v Tabulce 5) do 0,5 l destilované vody a následným doplněním vodou do objemu 1 l. Pro přípravu zásobních roztoků i pro ředění byla použita destilovaná voda. Koncentrace solí v zásobních roztocích byla na základě empirických zkušeností upravena na dvojnásobnou oproti normě. Parametry testovacích roztoků (naměřené pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku a konduktivita) jsou uvedeny v Tabulce 6 (ačkoli nebylo u testovacích

roztoků dosaženo koncentrace rozpuštěného kyslíku dle normy, tato odchylka neměla vzhledem k nulové imobilizaci u kontrolních stanovení negativní vliv na vitalitu testovacího organismu).

Do testovacích nádob, obsahujících roztoky o koncentracích nanoželeza  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $2,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , bylo vneseno vždy po deseti jedincích druhu *Daphnia magna*. Pro každou koncentraci byla nasazena dvě paralelní stanovení s kontrolami, které neobsahovaly testovanou látku, ale pouze testovací roztok. Zkušební nádoby byly dále uchovávány za podmínek odpovídajících výše citované normě. Po 24 a 48 hodinách byl proveden záznam imobilizace, přičemž imobilizovaní jedinci byli z testovaných roztoků odstraněni.

Tab. 4: Podmínky testu toxicity na *Daphnia magna*

Testovací organismus:	hrotnatka velká ( <i>Daphnia magna</i> )
Stáří:	do 24 hodin
Sledovaná odezva:	imobilizace
Podmínky testu:	
doba expozice	24 a 48 hodin
objem testovaného roztoku	10 ml na jednoho jedince
počet jedinců v testované koncentraci	10
počet paralelních stanovení	2
teplota	$20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$
osvětlení (světelný režim světlo/tma)	16/8 hodin
jiné	bez krmení
Chemikálie:	testovaná látka, testovací médium
Pomůcky a zařízení:	kádinky 150 ml, odměrné baňky, odměrný válec, pipety, stříčka, digitální váhy, pH metr, kultivátor

Tab. 5: Složení zásobních roztoků (ZR) pro přípravu testovacího média

Zásobní roztok	Chemikálie	Koncentrace [ $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
ZR 1	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11,76
ZR 2	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,93
ZR 3	$\text{NaHCO}_3$	2,59
ZR 4	KCl	0,23



Tab. 6: Parametry testovacích roztoků

Měřená veličina	Testovací roztok 1 (pro NANOFER 25)	Testovací roztok 2 (pro NANOFER 25S)
pH	7,80	7,84
koncentrace kyslíku [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	5,97	6,46
konduktivita [ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ]	1096	1136

## 4. Výsledky

Pro obě zkoušené látky bylo zaznamenáno toxické působení na testovací organismus. Hodnota  $\text{EC}_{50}$  po 48 hodinách byla pro NANOFER 25 stanovena na  $0,94 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , pro NANOFER 25S zjištěna nebyla (nejvyšší míra imobilizace dosáhla 30 %, a to při koncentraci  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Jako toxičtější se v tomto testu tedy ukázal produkt NANOFER 25. Nejvyšší testovaná koncentrace ( $2,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) způsobila 100% imobilizaci jedinců již po 24 hodinách působení, znatelné účinky měla ale i koncentrace nejnižší ( $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), přičemž je patrný vzestup imobilizace souběžně s rostoucí koncentrací (viz Obr. 5 a 6). U produktu NANOFER 25S byla pozorována nejvyšší mortalita pro koncentrace  $0,1$  a  $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Konkrétní počty imobilizovaných jedinců pro testované látky jsou uvedeny v Tabulkách 7 a 8. Statistické vyhodnocení testu bylo provedeno pomocí programu GraphPad Prism 5 (GraphPad, 2007).

Tab. 7: Imobilizace jedinců *Daphnia magna* v různě koncentrovaných roztocích testovaného vzorku NANOFER 25 po 24 a 48 hodinách

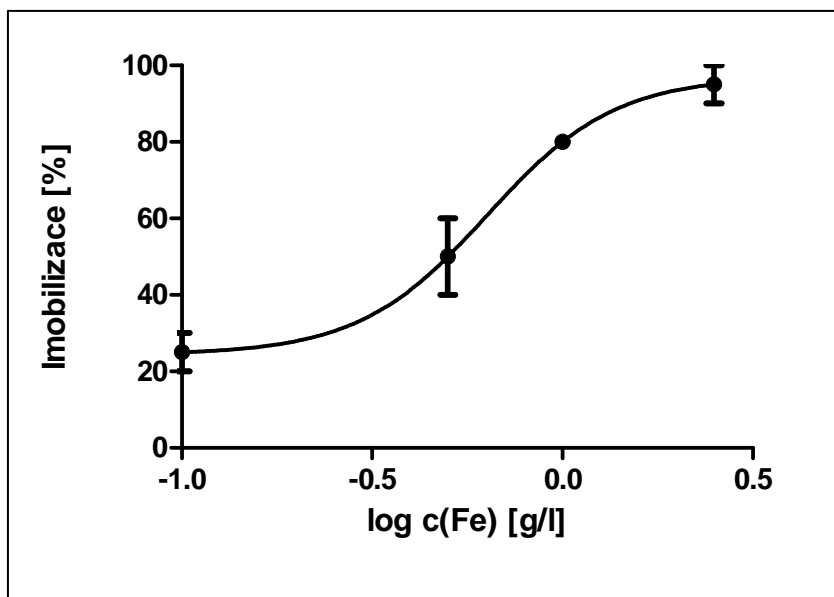
Doba expozice	24 hodin				48 hodin			
Koncentrace Fe [g·l <sup>-1</sup> ]	Počty imobilizovaných jedinců				Počty imobilizovaných jedinců			
	P1* [ks]	P2* [ks]	Průměr [ks]	Průměr [%]	P1* [ks]	P2* [ks]	Průměr [ks]	Průměr [%]
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	3	2	2,5	25	5	5	5	50
0,5	6	4	5	50	6	4	5	50
1	8	8	8	80	8	10	9	90
2,5	10	9	9,5	95	10	9	9,5	95

\*pozn.: P1 = paralelní stanovení 1, P2 = paralelní stanovení 2

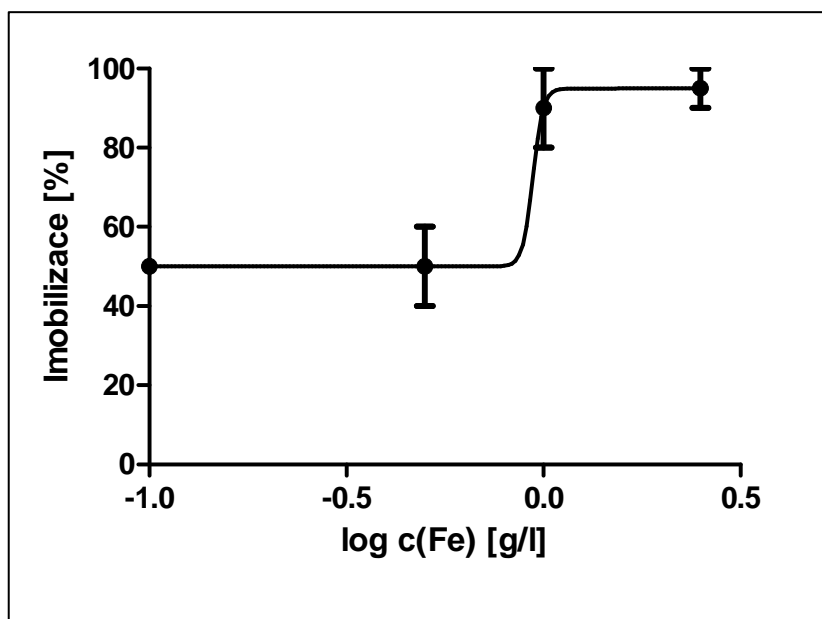
Tab. 8: Imobilizace jedinců *Daphnia magna* v různě koncentrovaných roztocích testovaného vzorku NANOFER 25S po 24 a 48 hodinách

Doba expozice	24 hodin				48 hodin			
Koncentrace Fe [g·l <sup>-1</sup> ]	Počty imobilizovaných jedinců				Počty imobilizovaných jedinců			
	P1* [ks]	P2* [ks]	Průměr [ks]	Průměr [%]	P1* [ks]	P2* [ks]	Průměr [ks]	Průměr [%]
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	3	3	3	30
0,5	0	1	0,5	5	4	1	2,5	25
1	0	0	0	0	1	1	1	10
2,5	0	0	0	0	1	1	1	10

\*pozn.: P1 = paralelní stanovení 1, P2 = paralelní stanovení 2



Obr. 5: Graf immobilizace *Daphnia magna* po 24 hodinách působení různých koncentrací NANO FER 25



Obr. 6: Graf immobilizace *Daphnia magna* po 48 hodinách působení různých koncentrací NANO FER 25

## 5. Diskuse

U obou testovaných látek (NANOFER 25 a NANOFER 25S) bylo pozorováno jejich nepříznivé působení na testovací organismus – hrotnatku druhu *Daphnia magna*. Výraznější toxicita byla zaznamenána pro nZVI stabilizované výhradně anorganickým modifikátorem (tedy produkt NANOFER 25) oproti nZVI se speciální povrchovou úpravou založenou na kombinaci organického a anorganického stabilizátoru (NANOFER 25S). Tento výsledek je poměrně překvapivý, protože u NANOFER 25 výrobce uvádí větší tendenci aglomerovat a sedimentovat, což by mohlo učinit látku pro organismy méně dostupnou. Další vlastností tohoto produktu je ale extrémně vysoká reaktivita. Může tak docházet nejen k přímému toxickému působení na daný organismus, ale také ke změnám v parametrech prostředí (testovacího roztoku). Vyšší reaktivita je tak zřejmě důležitější než rychlost aglomerace částic.

Hodnota  $EC_{50}$  pro NANOFER 25 byla stanovena na  $0,94 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , přitom standardní koncentrací nZVI pro odstraňování škodlivin je  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (Grieger et al., 2010). Z výsledků je navíc patrné, že procento imobilizace stoupá úměrně se zvyšující se koncentrací nZVI. Ve srovnání s tímto testem výrazně odlišná hodnota  $EC_{50}$  ( $55,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) je uváděna výrobcem produktu (NANOIRON Future Technology, 2012). Bohužel nebyla nalezena žádná další studie zabývající se toxicitou nZVI vůči druhu *Daphnia magna*, která by poskytovala porovnatelné výsledky. Vliv na rozdílné hodnoty  $EC_{50}$  by mohlo mít například nasazení testu v různých fázích sedimentace částic.

Ačkoli u produktu NANOFER 25S výrobce uvádí nižší tendenci k aglomeraci, byla pozorována u obou testovaných forem. Zatímco těsně po rozpuštění v testovacím roztoku vytvořily látky rovnoměrně zakalený roztok v celém objemu vzorku, s postupem času docházelo ke vzniku agregátů. Ty pak sedimentovaly na dnech testovacích nádob, viz Přílohu č. 3. Tento jev je problematickým, protože může mít dopad na příjem nZVI testovacím organismem. Rychlost aglomerace může být tedy příčinou toho, že při testu s reaktivnějším NANOFER 25 byly pozorovány menší změny v počtu imobilizovaných jedinců (mezi hodnocením po 24 a 48 hodinách) oproti stabilnějšímu NANOFER 25S.

Pro podrobnější zhodnocení vlivu aglomerace a sedimentace nanoželeza na jeho toxicitu by tedy bylo vhodné rozšířit podmínky testování tak, aby lépe odpovídaly reálnému prostředí. Rozhodujícím faktorem by mohlo být například promíchávání testovaných roztoků při průběhu zkoušky. Další možností by bylo nasazení testu v rozdílných stádiích aglomerace železa. V přírodních podmínkách se totiž organismy mohou s touto látkou setkat v různých časových

intervalech po její aplikaci. Je tedy zapotřebí širší výzkum, který by zohledňoval vlastnosti testované látky.

## 6. Závěr

Ačkoli jsou nanomateriály v současné době hojně využívány a jejich produkce stoupá, poznatky o jejich potenciálních účincích jsou stále nedostatečné. Výsledky doposud prováděných studií přitom naznačují, že účinky nanomateriálů se mohou lišit od působení chemicky totožných látek s odlišnou fyzikální strukturou, přičemž toxicita NM je v některých případech až několikanásobně vyšší.

Pilotní studie, která je součástí této práce a jejímž cílem bylo otestovat účinky nanoformy nulvalentního železa na hrotnatce druhu *Daphnia magna*, naznačuje, že tato látka má na daný organismus negativní vliv. Byly testovány dva produkty se stejným obsahem nanoželeza, ale lišící se typem stabilizace. Vyšší toxicita byla zaznamenána pro NANOFER 25, tedy variantu stabilizovanou výhradně anorganickým modifikátorem bez speciálních povrchových úprav. Hodnota  $EC_{50}$  byla stanovena na  $0,94 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pro nejvyšší testovanou koncentraci ( $2,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) dosáhla imobilizace téměř 100 %. U druhého testovaného produktu (NANOFER 25S - se zvláštní stabilizační povrchovou modifikací) nebylo možné  $EC_{50}$  stanovit, protože maximální hodnota imobilizace činila 30 % (při koncentraci  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Výsledky provedeného testu tedy potvrzují, že účinky NP mohou být ovlivněny i jejich technologickými úpravami. Bylo by tedy vhodné hodnotit účinky každého konkrétního nanomateriálu uváděného do oběhu, ideálně za podmínek simulujících přirozené prostředí. Je také otázkou, zda jsou standardně využívané metody pro testování toxicity vhodné i pro látky s nanostrukturou.

## 7. Seznam použité literatury

- Alloy, M. M., Roberts, A. P. (2011): Effects of suspended multi-walled carbon nanotubes on daphnid growth and reproduction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1839–1843.
- Arschberger, K., Micheletti, CH., Sokull-Klüttgen, B., Christensen, F. M. (2011): Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health - Lessons learned from four case studies. *Environment International* 37, 1143–1156.
- Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M. R., Bottero, J. (2009): Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environmental Pollution* 157, 1127–1133.
- Barnes, R. J., Gast, Ch. J. van der, Riba, O., Lehtovirta, L. E., Prosser, J. I., Dobson, P. J., Thompson, I. P. (2011): The impact of zero-valent iron nanoparticles on a river water bacterial community. *Journal of Hazardous Materials* 184, 73-80.
- Casals, E., Vázquez-Campos, S., Bastús, N. G., Puentes, V. (2008): Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 672-683.
- Consumer Products Inventory of Nanotechnology Products. [online]. [cit. 2012-03-14]. Dostupné z: <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/browse/>
- ČSN EN ISO 6341. Jakost vod - Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) - Zkouška akutní toxicity. Český normalizační institut, 1997.
- Fan, W., Cui, M., Liu, H., Wang, Ch., Shi, Z., Tan, Ch., Yang, X. (2011): Nano-TiO<sub>2</sub> enhances the toxicity of copper in natural water to *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 159, 729-734.
- Fajardo, C., Ortíz, L. T., Rodríguez-Membibre M. L., Nande, M., Lobo, M. C., Martin, M. (2012): Assessing the impact of zero-valent iron (ZVI) nanotechnology on soil microbial structure and functionality: A molecular approach. *Chemosphere* 86, 802-808.
- Farré, M., Sanchís, J., Barceló, D. (2011): Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *Trends in Analytical Chemistry* 30, 517-527.

- García, A., Espinosa, R., Delgado, L., Casals, E., González, E., Puentes, V., Barata, C., Font, X., Sánchez, A. (2011): Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. *Desalination* 269, 136–141.
- Ghauch, A., Tugan, A., Assi, H. A. (2009): Antibiotic removal from water: Elimination of amoxicillin and ampicillin by microscale and nanoscale iron particles. *Environmental Pollution* 157, 1626–1635.
- GraphPad (2007): Prism 5 for Windows. GraphPad Software, Inc., San Diego CA.
- Grieger, K. D., Fjordbøge, A., Hartmann, N. B., Eriksson, E., Bjerg, P. L., Baun, A. (2010): Environmental benefits and risks of zero-valent iron nanoparticles (nZVI) for in situ remediation: Risk mitigation or trade-off? *Journal of Contaminant Hydrology* 118, 165–183.
- Grieger, K. D., Hansen, S. F., Sørensen, P. B., Baun, A. (2011): Conceptual modeling for identification of worst case conditions in environmental risk assessment of nanomaterials using nZVI and C60 as case studies. *Science of the Total Environment* 409, 4109–4124.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dobourguier, H.-C., Kahru, A. (2008): Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71, 1308–1316.
- Chen, P.-J., Su, Ch.-H., Tseng, Ch.-Y., Tan, S.-W., Cheng, CH.-H. (2011): Toxicity assessments of nanoscale zerovalent iron and its oxidation products in medaka (*Oryzias latipes*) fish. *Marine Pollution Bulletin* 63, 339-346.
- Kahru, A., Dubourguier, H.-C. (2010): From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology* 269, 105–119.
- Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P., Möller, L. (2009): Size-dependent toxicity of metal oxide particles — A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters* 188, 112-118.
- Kim, J., Park, Y., Yoon, T. H., Yoon, C. S., Choi, K. (2010): Phototoxicity of CdSe/ZnSe quantum dots with surface coatings of 3-mercaptopropionic acid or tri-n-octylphosphine oxide/gum arabic in *Daphnia magna* under environmentally relevant UV-B light. *Aquatic Toxicology* 97, 116–124.
- Lee, S., Kim, S., Choi, J. (2009): Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to green the ecological risk of nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28, 86–91.



- Mendonca, E., Diniz, M., Silva, L., Peres, I., Castro, L., Correia, J. B., Picado, A. (2011): Effects of diamond nanoparticle exposure on the internal structure and reproduction of *Daphnia magna*. *Journal of Hazardous Materials* 186, 265–271.
- Musee, N. (2011): Nanowastes and the environment: Potential new waste management paradigm. *Environment International* 37, 112–128.
- NANOIRON Future Technology [online]. NANOIRON, © 2008 - 2010 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.nanoiron.cz/cs>
- Nowack, B., Bucheli, T. D. (2007): Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150, 5-22.
- Recillas, S., Garcia, A., González, E., Casals, E., Puentes, V., Sánchez, A., Font, X. (2011): Use of CeO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for the removal of lead from water: Toxicity of nanoparticles and derived compounds. *Desalination* 277, 213-220.
- Sánchez, A., Recillas, S., Font, X., Casals, E., González, E., Puentes, V. (2011): Ecotoxicity of, and remediation with, engineered inorganic nanoparticles in the environment. *Trends in Analytical Chemistry* 30, 507-516.
- Shaw, B. J., Handy, R. D. (2011): Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. *Environment International* 37, 1083-1097.
- Stone, V., Nowack, B., Baun, A., Brink, N. van den, Kammer, F. von der, Dusinska, M., Handy, R., Hankin, S., Hasselöv, M., Joner, E., Fernandes, T. F. (2010): Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of Total Environment* 408, 1745-1754.
- Strigul, N., Vaccari, L., Galdun, C., Wazne, M., Liu, X., Christodoulatos, Ch., Jasinkiewicz, K. (2009): Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Desalination* 248, 771–782.
- Tao, X., Fortner, J. D., Zhang, B., Yiliang, H., Chen, Y., Hughes, J. B. (2009): Effects of aqueous stable fullerene nanocrystals (nC60) on *Daphnia magna*: Evaluation of sub-lethal reproductive responses and accumulation. *Chemosphere* 77, 1482–1487.
- Veselá, Š.: Perloočka – nový modelový organismus v experimentální toxikologii. *Toxicology - Prof. RNDr. Jiří Patočka, DrSc* [online]. 2007 [cit. 2012-05-19]. Dostupné z: <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=93>
- Veselá, Š.: Jak úspěšně chovat perloočky (médiá pro laboratorní chov perlooček). In: *Ekotoxikologické biotesty IV: Sborník pracovní konference*. Chrudim: Vodní zdroje EKOMONITOR, 2004, s. 35. ISBN 80-86832-03-1.

- Zhu, S., Oberdörster, E., Haasch, M. L. (2006): Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow. *Marine Environmental Research* 62, 5-9.
- Yang, X. Y., Edelmanna, R. E., Orisa, J. T. (2010): Suspended C60 nanoparticles protect against short-term UV and fluoranthene. *Aquatic Toxicology* 100, 202–210.

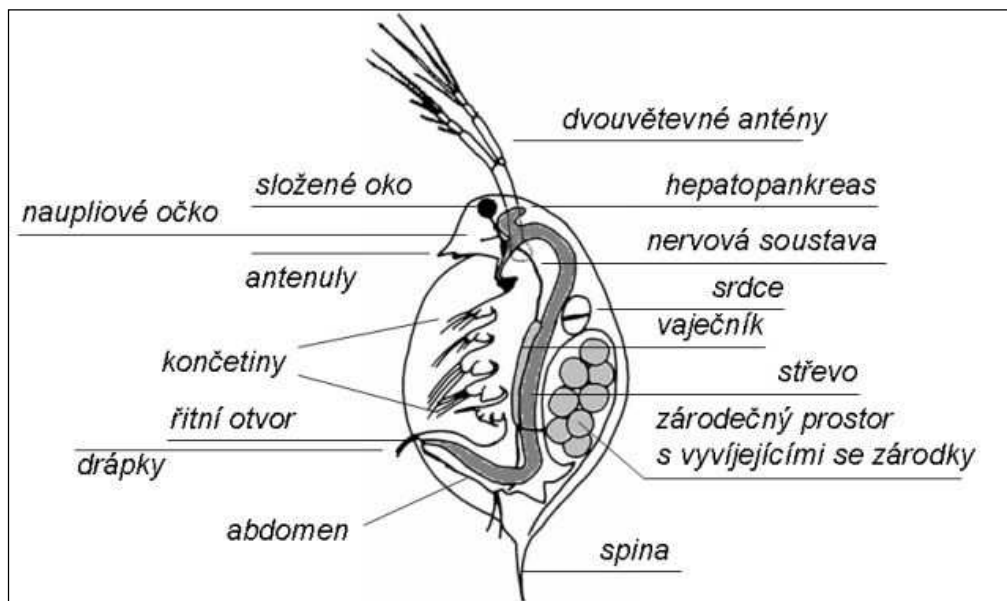
## 8. Přílohy

### Příloha č. 1

Tabulka I: Rozpis přípravy chovného média pro *Daphnia magna* (Veselá, 2004)

Zásobní roztoky (ZR)	Chemické složení	mg v 1 litru hotového média	mg·l <sup>-1</sup> pro přípravu ZR	ml ZR pro přípravu 1l média
1	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	2,5	5000	0,5
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,995	1991	
2	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,85	5719	0,5
3	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,36	721	0,5
4	LiCl	0,31	612	0,5
5	RbCl	0,07	142	0,5
6	SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,15	304	0,5
7	NaBr	0,016	32	0,5
8	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,063	126	0,5
9	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,017	33	0,5
10	ZnCl <sub>2</sub>	0,013	26	0,5
11	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,01	20	0,5
12	KI	0,0033	6,5	0,5
13	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,0022	4,38	0,5
14	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,0006	1,15	0,5
15	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	293,8	29 380	10
16	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	123,3	12 330	10
17	KCl	0,58	580	10
18	NaHCO <sub>3</sub>	64,8	6480	10
19	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	10	1000	10
20	NaNO <sub>3</sub>	0,274	27,4	10
21	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,143	14,3	10
22	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,184	18,4	10
23	Thiamin HCl	0,0075	75	10
24	B <sub>12</sub>	0,001	1	10
25	Biotin	0,00075	0,75	10

## Příloha č. 2



Obr. I: Zjednodušená morfologie *Daphnia magna* (Veselá, 2007)

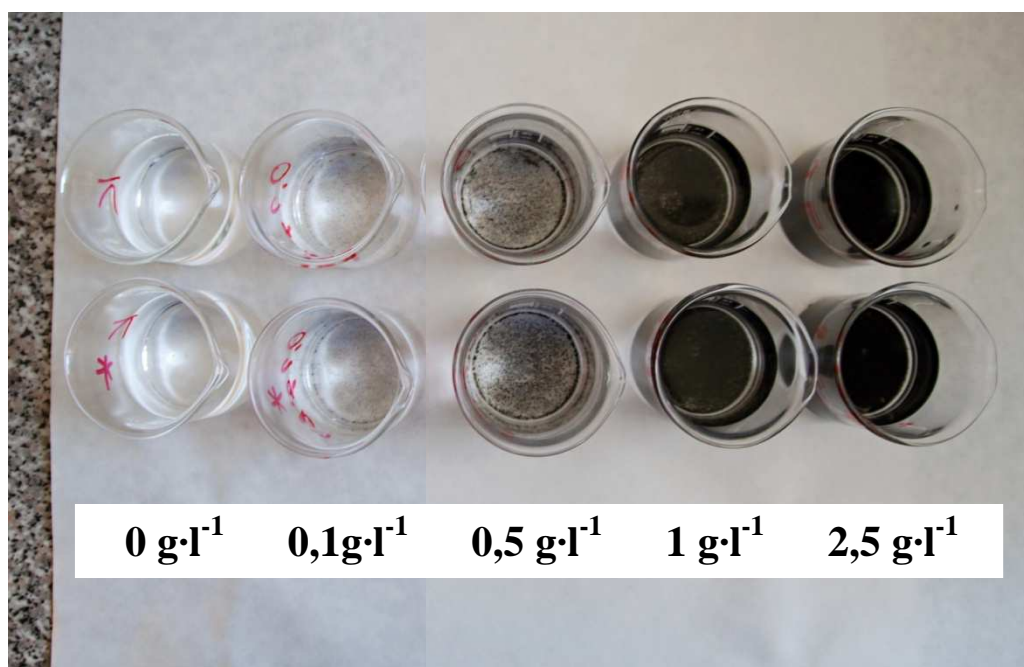


Obr. II: Dospělý jedinec *Daphnia magna* (vlastní fotodokumentace)

### Příloha č. 3



Obr. III: NANO FER 25 o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  bezprostředně po naředění (vlastní fotodokumentace)



Obr. IV: Patrná sedimentace agregovaného nanoželeza v různě koncentrovaných roztocích produktu NANO FER 25 (vlastní fotodokumentace)