

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Environmentální vědy



Toxicita nulamocného nanoželeza a jeho osud v životním prostředí

Toxicity and environmental fate of nanoscale zerovalent iron

Disertační práce

Praha 2019

Mgr. Jaroslav Semerád

Tato disertační práce byla vytvořena za podpory Centra kompetence TE01020218 Technologické agentury ČR a částečné podpory Centra dynamiky geosféry UNCE/SCI/006.

Disertační práce byla vypracována ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem Akademie věd České republiky, v.v.i.

Školitel: Prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.
Ústav pro životní prostředí
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

Prohlášení:

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

V Praze, červenec 2019

Mgr. Jaroslav Semerád

Tato disertační práce je založena na následujících publikacích, které jsou součástí přílohy:

1. Publikace

Semerád, J., Cajthaml, T. (2016). Ecotoxicity and environmental safety related to nano-scale zerovalent iron remediation applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (23), 9809–9819.

2. Publikace

Semerád, J., Čvančarová, M., Filip, J., Kašlík, J., Zlotá, J., Soukupová, J., Cajthaml, T. (2018). Novel assay for the toxicity evaluation of nanoscale zero-valent iron and derived nanomaterials based on lipid peroxidation in bacterial species. *Chemosphere*, 213, 568–577.

3. Publikace

Semerád, J., Moeder, M., Filip, J., Pivokonský, M., Cajthaml, T. (2019). Oxidative stress in microbes after exposition to iron nanoparticles: the analysis of aldehydes as oxidative damage products of lipids and proteins. *Environmental Science and Pollution Research* (odesláno ve formě manuskriptu).

4. Publikace

Semerád, J., Filip, J., Ševců, A., Brumovský, M., Nguyen, N., Mikšíček, J., Lederer, T., Filipová, A., Holecová, J., Pivokonský, M., Cajthaml, T. (2019). Environmental fate of sulfidated nZVI particles: interplay of nanoparticle corrosion and toxicity during the aging. *Environmental Science: Nano* (odesláno ve formě manuskriptu).

5. Publikace

Wu, S.-L., Cajthaml, T., Semerád, J., Filipová, A., Klementová, M., Skála, R., Vítková, M., Michálková, Z., Teodoro, M., Wu, Z., Martínez-Fernández, D., Komárek, M. (2019). Nano zero-valent iron aging interacts with soil microbial community: a microcosm study. *Environmental Science: Nano*. 6, 1189–1206.

6. Publikace

Semerád, J., Pivokoňský, M., Cajthaml, T. (2019) Nano-bioremediation: nZVI for inorganic and organic contamination. *Springer* (kapitola v knize *Advanced Nano-Bio Technologies for Water and Soil Treatment*; v recenzním řízení).

Deklarace spolupráce na odborných publikacích:

Jménem dalších spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Jaroslav Semerád významně podílel na vzniku publikace 1 (jeho podíl 50%). Jeho účast byla následující: Příprava podkladů a manuskriptu.

Jménem dalších spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Jaroslav Semerád významně podílel na vzniku publikace 2 (jeho podíl 70%). Jeho účast byla následující: Podíl na experimentální práci, vyhodnocení dat a příprava manuskriptu.

Jménem dalších spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Jaroslav Semerád významně podílel na vzniku publikace 3 (jeho podíl 70%). Jeho účast byla následující: Podíl na experimentální práci, vyhodnocení dat a příprava manuskriptu.

Jménem dalších spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Jaroslav Semerád významně podílel na vzniku publikace 4 (jeho podíl 60%). Jeho účast byla následující: Podíl na experimentální práci, vyhodnocení dat a příprava manuskriptu.

Jménem dalších spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Jaroslav Semerád významně podílel na vzniku publikace 5 (jeho podíl 20%). Jeho účast byla následující: Podíl na vyhodnocování dat.

Jménem dalších spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Jaroslav Semerád významně podílel na vzniku publikace 6 (jeho podíl 70%). Jeho účast byla následující: Příprava podkladů a manuskriptu.

V Praze, červen 2019

Prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Abstrakt

Elementární nanoželezo označované jako nulamocné nanoželezo (nanoscale zerovalent iron - nZVI) patří dnes již k běžně používaným materiálům v sanační praxi. Přestože celosvětové aplikace ukazují jeho vysokou efektivitu při degradaci a imobilizaci různých organických i anorganických polutantů, potenciálně negativní vliv nZVI na exponované organismy nebyl doposud dostatečně prozkoumán. Pro zhodnocení environmentálního rizika spojeného s aplikací tohoto materiálu je nutné především porozumět mechanismům jeho toxicity a celkovému vlivu na rezidentní mikrobiální společenstva. Tato práce se věnuje sumarizaci dosavadních znalostí o toxicitě nZVI a vývoji nových testů pro *in vitro* srovnávání akutní toxicity nově vyvíjených derivátů tohoto materiálu. Dále je v rámci této práce hodnoceno i riziko těchto materiálů spojené s vývojem toxicity v průběhu času – stárnutí nZVI. V poslední části je sledován a hodnocen vliv různých modifikací nZVI na mikrobiální společenstva v reálně kontaminované půdě s uměle vytvořenými mikrokosmy. Zároveň je v této části dále hodnocen potenciál materiálů na bázi nZVI pro využití v kombinaci s biostimulačním krokem při nanobioremediacích.

Abstract

Nowadays, nanoscale zerovalent iron (nZVI) is a nanomaterial commonly used in remediation practice. Although worldwide applications of nZVI have shown its effectiveness in degradation and immobilization of a wide range of organic and inorganic pollutants, potential negative effects of nZVI on exposed organisms have not been sufficiently explored. To avoid possible environmental risks, understanding of the mechanism of nZVI toxicity and its overall effects on microbial populations indigenous to remediation sites is needed. The presented thesis summarizes current knowledge of nZVI toxicity, and, moreover, deals with the development and application of a new test for *in vitro* evaluation of acute toxicity caused by newly developed nZVI-based materials. Additionally, in this thesis, the risk associated with changes in the toxicity of the aforementioned materials during the aging process was examined. In the last part, the effect of several nZVI-based materials on microbial communities of a real contaminated soil was monitored and evaluated using artificial microcosms. In addition, in this part, the potential of nZVI and its derived materials in combination with a biostimulation step during nanobioremediation is outlined.

Obsah

1. Seznam zkratk	8
2. Úvod	9
3. Nulamocné nanoželezo	11
3.1. Reaktivita nZVI	11
3.2. Syntéza nZVI	12
3.3. Modifikace nZVI	13
3.4. Metody charakterizace	14
4. Osud nZVI v životním prostředí	16
4.1. Vstup do ŽP – Aplikace nZVI a odvozených materiálů	16
4.2. Pilotní a celoplošné aplikace	17
4.3. Transformace v životním prostředí	18
5. Toxicita nZVI	20
5.3. Testování toxicity nanočástic	22
5.4. Mechanismus toxicity nZVI	23
5.5. Testování toxicity nZVI <i>in vitro</i>	24
5.6. Vliv na mikrobiální společenstva	27
6. Cíle disertační práce	30
7. Závěry	31
Literatura	33
Poděkování	43
Přílohy	44

1. Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GSH	glutathion
GSSG	dimer glutathionu
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HR-TEM	transmisní elektronový mikroskop s vysokým rozlišením (z angl. high-resolution transmission electron microscope)
HS-SPME-GC-MS	mikroextrakci tuhou fází spojená s plynovou chromatografií a hmotnostní detekcí (z angl. „headspace–solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry“)
LD ₅₀	dávka způsobící smrt 50 % jedinců
LPO	peroxidace lipidů (z angl. „lipid peroxidation“)
MDA	malondialdehyd
NGS	sekvenování nové generace (z angl. „next generation sequencing“)
nZVI	nulamocné nanoželezo (z angl. „nanoscale zerovalent iron“)
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (z angl. „Organisation for Economic Co-operation and Development“)
ORP	oxidačně-redukční potenciál
OS	oxidativní stres
PCE	perchlorethylen
PLFA	fosfolipidové mastné kyseliny
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. „reactive oxygen species“)
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (z angl. „real-time polymerase chain reaction“)
TEM	transmisní elektronový mikroskop
UV-VIS	oblast ultrafialového a viditelného spektra
ŽP	životní prostředí

2. Úvod

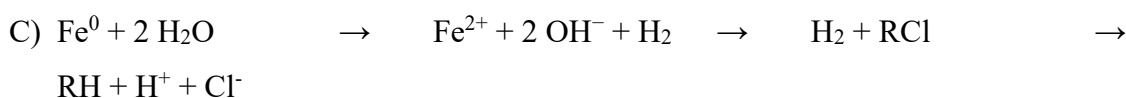
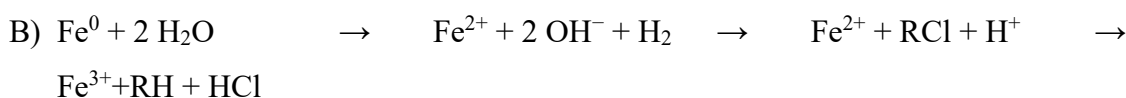
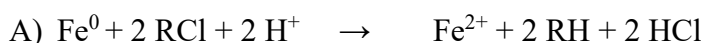
Nanotechnologie zaznamenaly v posledních dvou dekádách obrovský rozmach a v současnosti je jejich potenciál využíván prakticky ve všech odvětvích. S velikostí v řádech nanometrů (1–100 nm, dle definice nanočástice v doporučení Evropské komise (European Commission, 2011)) se pojí i zvětšená plocha povrchu a s ním i zvýšená reaktivita. Díky této jedinečné vlastnosti nanomateriály našly uplatnění i v sanační praxi. Při remediačních aplikacích je v současnosti používáno mnoho druhů nanočástic, včetně elementárních, tzv. nula-valenčních kovů. V současnosti je nejvíce používaným nanomateriálem v remediační praxi nulamocné nanoželezo (nZVI, z angl. nanoscale zerovalent iron). Tento reaktivní nanomateriál je využíván při odstraňování mnohých organických i anorganických antropogenních látek z kontaminovaných lokalit. Vysoká reaktivita nZVI spočívá v jeho silné redukční schopnosti, a umožňuje tak degradaci či imobilizaci celé řady vysoce toxických, často persistentních polutantů, které ve vysokých koncentracích nelze snadno odstranit běžnými sanačními technologiemi. Účinnost dekontaminačních technologií založených na použití nZVI dokumentuje řada pilotních i celoplošných aplikací provedených v minulých letech, kdy byl tento materiál aplikován ve vysokých dávkách (až 50 g/l) pomocí injektážních vrtů tak, aby odstranil kontaminaci či zabránil jejímu dalšímu šíření. Tato cesta je velmi pravděpodobně tou hlavní, prostřednictvím níž nZVI vstupuje do životního prostředí (ŽP) (Lefevre et al., 2016). Z tohoto důvodu je patrné, že bude prioritně docházet k expozici mikroorganismů vyskytujících se v půdě a podzemní vodě na sanované lokalitě. Stejně jako v případě mnohých dalších nanočástic je rovněž pravděpodobné, že při výrobě a aplikaci může být tomuto nanomateriálu vystaven i člověk. Samotná velikost v řádech nanometrů zároveň zvyšuje biodostupnost a vysoká reaktivita, způsobená velkým reakčním povrchem, může různými způsoby vyvolávat nežádoucí efekt (Lewinski et al., 2008). Nespecifická reaktivita spojená s nanorozměrem a vysoké aplikační dávky tohoto materiálu představují možné riziko pro ŽP. Z tohoto důvodu je nutné studovat jeho potenciálně negativní účinky na exponované organismy, ať už z pohledu jednotlivých mikrobiálních druhů, či vlivu nZVI na celá mikrobiální společenstva v místě jeho aplikace. Dosavadní znalosti o toxickém účinku nZVI nejsou kompletní a přesné mechanismy jeho toxicity nebyly doposud dostatečně popsány, stejně jako vliv tohoto materiálu na celé mikrobiální populace. Rovněž nebyly doposud dostatečně hodnoceny změny samotné nanočástice z pohledu toxicity a její struktura v průběhu delšího časového úseku, kdy dochází k oxidaci (stárnutí) nZVI a snížení reaktivity. Stárnutí nZVI ovlivňuje mnoho faktorů, které mají

zásadní vliv na reaktivitu i toxicitu, a je tedy mimo jiné nutné porozumět i vývoji samotného materiálu v prostředí o různém složení. V posledních několika letech je vyvíjeno mnoho různých modifikací a kompozitních materiálů na bázi nZVI pro zvýšení degradační účinnosti (např. vyšší selektivní reaktivita, vyšší mobilita). Z tohoto důvodu je nezbytné vyvinout metody pro jednoduché porovnávání toxicity těchto materiálů před jejich samotnou aplikací v reálných podmínkách. Porozumění mechanismům toxicity, změnám fyzikálně-chemických vlastností a s nimi spojené reaktivitě a mobilitě nanomateriálů na bázi nZVI v průběhu času pomůže k odhadnutí rizika spojeného s jejich budoucí aplikací.

3. Nulamocné nanoželezo

3.1. Reaktivita nZVI

Reaktivita, a tedy i remediační účinnost nZVI, spočívá v jednoduché reakci, kdy samotný nanomateriál podléhá oxidaci za současné redukce jiné látky. Touto látkou může být cílený polutant, ale také celá řada jiných necílených molekul, jako jsou například kyslík obsažený ve vzduchu či molekula vody (Lu et al., 2016). Typický příklad redukce chlorovaného polutantu na povrchu nZVI je zobrazený níže (Reakce 1 A). Kromě přímé redukce kontaminantu na povrchu nanočástice se do redukce různých polutantů může zapojovat i oxidací nZVI vzniklý železnatý kationt (Reakce 1 B). Při reakci nZVI s vodou dochází ke generaci plynného vodíku, který za určitých podmínek může rovněž katalyzovat redukci polutantu (Reakce 1 C). Za přítomnosti kyslíku může docházet i ke vzniku volných radikálů takzvanými Fentonovými procesy (Reakce 1 D). Spontánními reakcemi vznikající radikály mohou následně rovněž interagovat s cílenými polutanty a nepřímo napomáhat v jejich degradaci či transformaci. Mnoho studií v posledních letech navrhlo mechanismus a ukázalo využití nZVI jakožto katalyzátoru při Fentonových degradacích různých organických polutantů (Yang et al., 2015; Boussahel et al., 2007; Yan et al., 2017).



Reakce 1: Příklady typických reakcí nZVI

Mnoho studií v posledních letech ukazuje vysokou účinnost nZVI při odstraňování anorganických kontaminantů, a to především iontů těžkých kovů jako As^{3+} , As^{5+} , Cr^{6+} nebo Pb^{2+} (Zou et al., 2016). Laboratorní studie rovněž popisují mechanismus adsorpce

těchto iontů na povrchu nanomateriálu a vliv různých modifikací na účinnost nanomateriálů na bázi nZVI při redukcí a imobilizaci těchto anorganických polutantů.

Nanomateriály na bázi nZVI jsou rovněž vysoce účinné při degradaci mnoha halogenovaných organických, často i persistentních polutantů, jako je například hexachlorocyklohexan (Lindan), DDT (1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan), či chlorovaná rozpouštědla (Singh et al., 2011; El-Temsah et al., 2016). V posledních letech některé studie prokazují i potenciál nZVI v degradaci i těch nejvíce persistentních polutantů, jako jsou polychlorované bifenyly nebo bromované či perfluorované látky (Ševců et al., 2017; Zhuang et al., 2011; Liu and Zhang, 2010; Arvaniti et al., 2015; Zhang et al., 2018a).

3.2. Syntéza nZVI

Tento nanomateriál může být produkován jak chemickou, tak mechanickou cestou. Mezi nejběžněji používané chemické metody výroby nZVI patří borhydridová redukce. Tato chemická syntéza je založená na redukcí Fe^{2+} a Fe^{3+} iontů v roztoku se silným redukčním činidlem $NaBH_4$ (Zhao et al., 2016). Tato metoda je hojně využívána při laboratorním testování nanočástic nZVI, je však vysoce nákladná a neumožňuje produkci dostatečného množství materiálu pro aplikační účely. Při této syntéze rovněž vzniká množství toxických vedlejších produktů, které by mohly vést k sekundárnímu znečištění ŽP (Lu et al., 2016). Alternativou k tomuto procesu je další příklad chemické syntézy nZVI, a to metoda „Green synthesis“. Tímto procesem je, kromě jiných nanočástic, možné relativně levně vyrábět vysoce reaktivní nZVI bez tvorby vedlejších produktů (Wang et al., 2019). Při této metodě jsou k redukcí zdroje Fe^{3+} iontů (nejběžněji $Fe(NO_3)_3$) používána silná přírodní redukční činidla, jako například polyfenoly či kofein z listů čajovníku. Přestože je tato metoda nízkonákladová a environmentálně více přijatelná, částice syntetizované touto cestou obsahují velké zbytkové množství nezredukovaných iontů železa (Lu et al., 2016).

Mechanické metody přípravy nZVI jsou ve většině případů energeticky i přístrojově náročnější, avšak poskytují možnost automatizace a jednodušší separace výsledného produktu. Nejběžnější mechanický způsob přípravy je obdobný jako u většiny kovových nanočástic, kdy mletím větších částic dochází ke zmenšení jejich velikosti až do cíleného nanorozměru. Tato metoda je sice velice jednoduchá a snadno automatizovatelná, avšak poskytuje částice s výraznou tendencí k agregaci (Crane and Scott, 2012).

Posledním příkladem metod používaných při výrobě nZVI je metoda suché termické redukce, kdy v atmosféře zahřáté směsi plynů dochází k redukci prekurzorů obsahujících železo (např. hematit, magnetit) (Zbořil et al., 2012; Filip et al., 2014). Touto metodou lze získat prakticky čisté elementární nanoželezo a regulací jednotlivých složek v plynné atmosféře lze zároveň i kontrolovaně modifikovat jednotlivé nanočástice (Zbořil et al., 2012). I když je tento postup značně energeticky náročný, je dnes touto metodou komerčně vyráběno již velké množství nZVI pro environmentální aplikace. Právě testováním takto připravovaných nanomateriálů na bázi nZVI se zabývá předkládaná práce.

3.3. Modifikace nZVI

Vysoká a nespecifická reaktivita nZVI komplikuje nejen jeho přepravu ale i samotnou aplikaci (Kocur et al., 2013). Čisté nZVI je pyroforické a na vzduchu podléhá prudké exotermické oxidaci (Sohn et al., 2006). Z tohoto důvodu je nutné tento materiál skladovat buď v atmosféře inertního plynu (nejběžněji N₂) nebo ve vodě. Skladování ve vodě je jednoduché a ekonomické řešení, které je používáno v běžné praxi. Jak již bylo zmíněno, díky interakcím s vodou dochází v relativně krátké době k oxidaci nZVI a agregaci, a tedy snížení remediační účinnosti. Nutno zmínit, že při tomto způsobu přepravy narůstá v nemalé míře i tlak v přepravních kontejnerech vzniklý generovaným vodíkem. Takto vzniklé změny ve struktuře nZVI rovněž komplikují migraci nZVI v místě aplikace – v horninovém prostředí. Rychlá oxidace způsobuje agregaci a sedimentaci nanočástic vedoucí ke snížení mobility nZVI v kontaminované lokalitě (Kašlík et al., 2018).

Pro odstranění či zmírnění těchto nežádoucích vlastností nZVI jsou využívány různé modifikace (Stefaniuk et al., 2016; Lu et al., 2016; Li et al., 2016a). Mezi modifikace vedoucí ke zvýšení mobility v horninovém prostředí a sloužící jako prevence proti agregaci patří modifikace nanočástice různými organickými surfaktanty, mezi něž lze zařadit například polysorbát (Tween) či dodecylsírán sodný (Zhang et al., 2011). Další modifikací vedoucí ke snížení agregace a ke zvýšení koloidní stability nanočástice je navázání polymeru na povrchu nZVI. Polyethylenglykol nebo polyakrylát z řad syntetických polymerů, guarová nebo xanthanová guma či karboxymethylcelulóza z řad biopolymerů představují efektivní a levnou možnost, jak vylepšit degradační účinnost nZVI při sanačních aplikacích (Vecchia et al., 2009; Tian et al., 2018). Další možností zvýšení reaktivity samotné nanočástice nZVI je modifikace pomocí takzvaného dopování dalšími kovy, jako jsou například měď, nikl či paladium (Yan et al., 2010; Hamid et al., 2015; Gao

et al., 2016; He et al., 2018). Mnohé z těchto kovů sice fungují jako katalyzátory (zvyšují degradační účinnost), avšak jejich příprava je nákladnější a z praktického hlediska nemají velký potenciál. Jiným příkladem je cílená povrchová oxidace nZVI, která vytvoří několik nanometrů tenkou vrstvu oxidu železa a stabilizuje tyto nanočástice (Kašlík et al., 2018). Takto připravené nanočástice, skládající se z jádra tvořeného nZVI a oxidické slupky, jsou na vzduchu výrazně stabilnější a v případě potřeby je lze před aplikací aktivovat ve vodné suspenzi s nižší ztrátou degradační účinnosti (Ribas et al., 2017). V neposlední řadě je přeprava na vzduchu stabilních částic mnohem jednodušší a levnější. Další alternativní modifikací je v posledních několika letech častěji studovaná sulfidace nZVI, kdy je redukcí anorganických sloučenin síry vytvořen sulfidický obal jádra z nZVI (Fan et al., 2017). Tato modifikace zvyšuje selektivitu nZVI vůči různým polutantům a naopak brání spontánním reakcím s molekulami vody (Fan et al., 2016a; Fan et al., 2016b). V neposlední řadě může i modifikace pomocí navázání nanočástice na nosič v některých případech snížit agregaci a zároveň zvýšit afinitu vůči cíleným polutantům. Například navázání nZVI na nanodeštičku z grafenu výrazně zvýší redukční účinnost vůči Cr^{6+} (Li et al., 2016b).

3.4. Metody charakterizace

Většina nanočástic si v ŽP uchová svoji velikost a s ní spojené vlastnosti pouze po velmi omezenou dobu. Mnoho studií popisuje proces, kdy po vstupu nanočástice do reálného prostředí dochází k její transformaci (Lowry et al., 2012), ať už chemickými procesy nebo shlukováním, tedy tvorbou větších agregátů. Větší agregáty nanočástic či částečně transformované nanočástice mají jiné vlastnosti, a tedy ve většině případů i odlišnou toxicitu (Phenrat et al., 2009). Z tohoto důvodu je nutné ke studiu toxicity nanočástic přistupovat jinak než u klasických látek. Rovněž narůstající množství různých modifikací nZVI s vysoce heterogenními vlastnostmi je nutné nějakým způsobem charakterizovat a sledovat jejich měnící se fyzikálně-chemické vlastnosti.

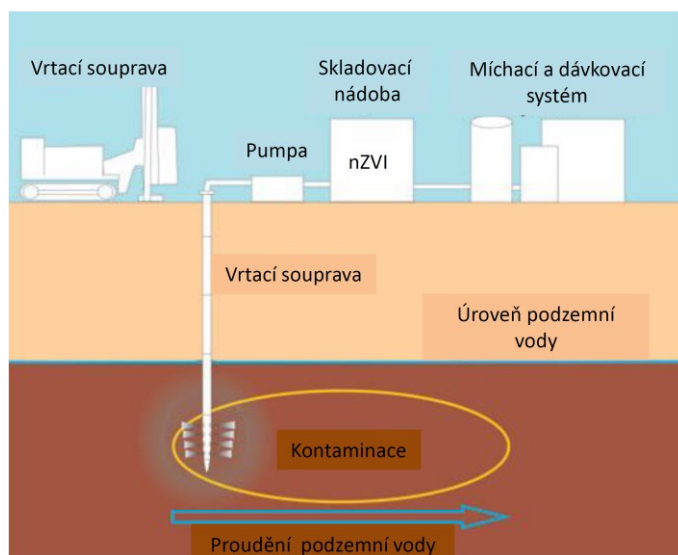
Měnící se strukturu a vývoj nanočástice v průběhu času je tedy nutné sledovat i v průběhu testování její toxicity pro přesnou interpretaci výsledku a správné určení environmentálních rizik spojených s jejich vstupem do ŽP (Hotze et al., 2010). V současné době je pro charakterizaci nanočástic využíváno mnoho technik materiálové analýzy, pomocí kterých je možné sledovat parametry jako jsou tvar, velikost, schopnost agregace a aglomerace, velikostní distribuce, specifický povrch a napětí a v neposlední řadě i krystalickou strukturu a modifikace. Základní vlastnosti se nejčastěji stanovují pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM), skenovacího elektronového mikroskopu

či UV-VIS spektroskopie. Pomocí TEM lze dále hodnotit i míru agregace či aglomerace. TEM s vysokým rozlišením (HR-TEM) může být dále použit pro studium strukturních defektů na povrchu nanomateriálu. Shlukování lze sledovat i pomocí analýzy dynamického rozptylu světla (dynamic light scattering), kdy je určena velikostní distribuce částic, či pomocí měření zeta potenciálu. Měřením zeta potenciálu a elektroforetické mobility je rovněž možné měřit povrchové napětí nanomateriálu. Neméně důležitá technika používaná při materiálové analýze nanomateriálu je rentgenová krystalografie, pomocí níž lze sledovat elementární/chemické složení materiálu, případně jeho různých modifikací v krystalické fázi.

4. Osud nZVI v životním prostředí

4.1. Vstup do ŽP – aplikace nZVI a odvozených materiálů

Při vstupu do ŽP nanomateriály, stejně jako např. chemické látky antropogenního původu, interagují s jeho jednotlivými biotickými a abiotickými složkami. Při těchto interakcích se (ať už chemické látky či nanomateriály) zapojují do environmentálních procesů a dochází k jejich postupným transformacím a případně i rozkladu. Nanomateriály na bázi nZVI jsou oproti jiným materiálům zaváděny cíleně do ŽP při remediačních aplikacích – nanoremediacích. V posledních dvou dekáдах byly celosvětově zaznamenány úspěšné pilotní aplikace elementárního nZVI či jeho různých modifikací při transformaci nebo degradaci mnoha anorganických i organických kontaminantů. Mezi nejznámější způsoby aplikace patří polopropustné reaktivní bariéry (permeable reactive barriers), kdy je nZVI například zaváděno do kontaminované lokality pomocí série injektážních vrtů metodou „direct-push“ ve směru proudění podzemní vody několik metrů od zdroje kontaminace. Takto vytvořená bariéra zabrání šíření polutantu a propouští dekontaminovanou podzemní vodu. Dalším způsobem remediace pomocí nZVI je přímá infiltrace nanočástic do ohniska kontaminace, nebo několik metrů od ohniska proti proudění podzemní vody (Obr. 1).



Obr. 1: Metoda přímé infiltrace nZVI do ohniska kontaminace pomocí techniky „direct-push“ (upraveno podle www.dekonta.cz)

Kromě pravděpodobně největšího využití nZVI při remediačních aplikacích roste i zájem o použití tohoto materiálu při jiných procesech, jako je například výroba methanu při anaerobní digesci či čištění odpadní vody (Liu et al., 2015c; Liu et al., 2015b; Zhang et al., 2018b). S narůstajícím zájmem o nové využití nZVI a jeho aplikaci přibývá i nových potenciálních vstupů do ŽP.

4.2. Pilotní a celoplošné aplikace

Z mnoha různých aspektů je nutné před samotnou celoplošnou aplikací provést důkladnou analýzu kontaminované lokality (zahrnující hydrogeologický a geochemický průzkum) a ověřit funkčnost/efektivitu technologie pomocí tzv. pilotního testu (Karn et al., 2011). Velkým milníkem v nanoremediacích byla první pilotní aplikace nZVI, která proběhla v roce 2000 v Trentonu (USA) za účelem odstranění kontaminace chlorovanými rozpouštědly (chloroform; tetrachlorethylen, PCE; trichlorethylen; vinylchlorid). Při této první reálné aplikaci bylo injektováno 2,5 kg nZVI ve formě suspenze bimetalických nanočástic Pd/nZVI (1 g/l). Již během prvních 4 týdnů bylo dosaženo 96,5% degradace chlorovaných rozpouštědel (Elliott and Zhang, 2001).

Od této doby bylo celosvětově provedeno mnoho úspěšných pilotních aplikací a v roce 2004 bylo nZVI poprvé použito v Evropě, v rámci pilotního testu na území České republiky v lokalitě firmy Spolchemie (Ústí nad Labem). V následujících letech (2005–2009) byly provedeny další pilotní aplikace jak na území ČR (Kuřívody, Uherský Brod, Rožmitál pod Třemšínem atd.), tak na území Německa (Gangeenau, Hannover, Thuringia atd.) a v neposlední řadě i na území Slovenska a Itálie (Mueller et al., 2012). Tyto pilotní aplikace byly provedeny převážně na lokalitách s kontaminací chlorovanými etheny.

V roce 2007 byla poprvé v Evropě provedena aplikace nZVI ve větším měřítku. Na lokalitě Bornheimu (Německo) kontaminované především PCE bylo ve velmi krátké době docíleno snížení koncentrace kontaminantu až o 90 %, s ještě větší degradací v průběhu dalších 2 let po aplikaci nZVI. V letech 2008 a 2009 bylo nZVI poprvé ve větším měřítku aplikováno i na území ČR, a to na lokalitách kontaminovaných chlorovanými etheny: Hořice a Písečná. Na lokalitě Hořice došlo k postupné aplikaci 600 kg nZVI a na lokalitě Písečná k injektáži 2 000 kg. Degradací účinnost při odstraňování chlorovaných ethenů dosahovala na těchto lokalitách 60–90 % (Stefaniuk et al., 2016).

V posledních několika letech bylo pozorováno i úspěšné spojení nano- a bioremediace, kdy byl po aplikaci nZVI zapojen i následný biostimulační krok. Při tomto procesu aplikace nZVI upraví podmínky prostředí (sníží původní kontaminaci, toxicitu,

oxidačně-redukční potenciál, ORP) a po jeho oxidaci – spotřebování – se zapojí biostimulační krok, kdy se po přidavku organického substrátu ožíví přirozená mikrobiota schopná pokračovat v efektivní degradaci reziduálních kontaminantů (Cecchin et al., 2017). Studie dokumentující tyto nanobioremediační aplikace demonstrují možnosti účinného spojení těchto dvou přístupů pro odstranění specifických druhů kontaminantů či jejich kombinací. Například práce autorů Němeček et al. (2014) demonstruje schopnost nZVI redukovat kontaminaci Cr^{6+} v reálných podmínkách a zároveň v navazující publikaci autoři ukazují efektivitu zapojení následného biostimulačního kroku (Němeček et al., 2014; Němeček et al., 2015). Po injektáži substrátu, v tomto případě syrovátky, autoři pozorovali další pokles Cr^{6+} a nárůst mikrobiální biomasy a koncentrace rozpuštěných iontů železa (Fe^{2+}). Pomocí pokročilých molekulárně-biologických metod autoři ukázali přítomnost železo a sulfát redukujících bakterií, které se velmi pravděpodobně podílely na redukcí Fe^{3+} (vzniklého oxidací nZVI) na Fe^{2+} , a tyto ionty dále pokračovaly v redukcí Cr^{6+} . Obdobný výsledek dokumentuje studie Němeček et al. (2016), kdy opakovaná injektáž nZVI snížila kontaminaci Cr^{6+} na jiné lokalitě. Na této lokalitě se nacházela kromě kontaminace Cr^{6+} i relativně vysoká koncentrace chlorovaných ethenů (Němeček et al., 2016). I po dvou injektážích suspenze nZVI byl zaznamenán pouze mírný pokles v koncentraci chlorovaných rozpouštědel. Po abiotické fázi, kterou zde zastupovala nanoremediace, byla přidavkem biologického substrátu navozena fáze biotická. Tato fáze byla provázena opět nárůstem mikrobiální biomasy, nárůstem koncentrace rozpuštěného železa a zároveň i úbytkem Cr^{6+} a chlorovaných rozpouštědel. Aplikace nanobioremediačního přístupu na této lokalitě potvrzuje mechanismy (biotické i abiotické) degradace/transformace navržené na předchozí lokalitě a zároveň ukazuje vhodnost tohoto přístupu při sanaci lokalit s kombinovaným znečištěním.

4.3. Transformace v životním prostředí

Nanomateriály se po vstupu do ŽP obecně mění, jak již bylo částečně zmíněno v předchozí kapitole. Vlivem různých faktorů dochází ke změně jejich struktury a s tím spojené změně vlastností. Nanomateriály mohou po vstupu do ŽP podléhat chemickým, fyzikálním a biologickým transformacím. Tyto faktory zásadně ovlivňují stabilitu nanomateriálů, reaktivitu, biodostupnost, metabolizaci a s tím spojenou toxicitu (Lowry et al., 2012). Mezi nejdůležitější transformace z hlediska osudu nZVI v ŽP pravděpodobně patří oxidačně-redukční reakce a agregace. Čisté pyroforické nZVI má vysokou tendenci k oxidaci a s ní spojené agregaci (Phenrat et al., 2007). Tento jev způsobuje relativně

nízkou mobilitu nanomateriálu, a limituje tedy jeho pohyb v ŽP. Modifikacemi nanočástic pro zvýšení jejich stability a mobility se zvyšuje i jejich migrace v ŽP. Přesto se však nepředpokládá, že by se částice nZVI šířily dále než do vzdálenosti 100 m od místa aplikace (Saleh et al., 2005). Při vývoji nových nanomateriálů na bázi nZVI je nutné brát zřetel i na jejich osud v ŽP, a před samotnou aplikací materiálu tedy zhodnotit i tyto kritické faktory ovlivňující riziko spojené s jeho cíleným zaváděním.

V průběhu času dochází vlivem oxidace nZVI k jeho strukturním změnám a přeměně na méně reaktivní oxidační produkty. Mezi typické oxidační produkty pyroforického železa vzniklé reakcí s rozpuštěným kyslíkem či vodou patří například magnetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), goethit ($\alpha\text{-FeOOH}$), akaganeit ($\beta\text{-FeOOH}$), či lepidokrokrit ($\gamma\text{-FeOOH}$) (Shi et al., 2015; Liu et al., 2014). Dále se mohou tvořit i další produkty vzniklé redukcí jiných sloučenin, jako například sulfid železnatý a siderit (FeCO_3) (Dong et al., 2019). Tento proces je nazýván stárnutím a je ovlivňován mnoha faktory, mezi něž patří například obsah rozpuštěného kyslíku, rozpuštěného organického uhlíku a pH (Reinsch et al., 2010; Li et al., 2010; Phenrat et al., 2009). Rovněž přítomnost rozpuštěných anorganických iontů v podzemní vodě může mít vliv na rychlost oxidace pyroforického železa v materiálech na bázi nZVI. Při simulacích stárnutí nZVI ve vodě nasycené kyslíkem dochází k velice rychlé (< 24 h) oxidaci pyroforického železa na magnetit a maghemit, zatímco rozpuštěné dusičnany (NO_3^-) naopak pasivují povrch nanočástice, a tím prodlouží jeho životnost natolik, že i po 6 měsících je obsah pyroforického železa obdobný původnímu materiálu (Reinsch et al., 2010). Vliv pH je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících reakce spojené s nZVI, a tedy i jeho oxidaci. Při vyšších hodnotách pH byla pozorována snížená degradační účinnost vůči chlorovaným rozpouštědlům (Freyria et al., 2017). Pravděpodobně při tomto pokusu došlo k částečné pasivaci povrchu nZVI vedoucí ke snížení reaktivity. Při vysokých hodnotách pH (8–9) dochází k precipitaci hydroxidu železnatého na povrchu nanočástice nZVI a naopak při nižších hodnotách pH (6–7) dochází k rozpouštění pasivační vrstvy a zvýšení reaktivity (Bae and Hanna, 2015).

5. Toxicita nZVI

5.1. Toxicita nanočástic

Nanočástice se vyskytují v ŽP i přirozeně, v různých formách jsou tvořeny během každodenních procesů, jako je například lámání vln v oceánech, při erozi půdy nebo se vyskytují ve formě rozpuštěných koloidů ve vodě; exponované organismy jsou těmito přirozeným látkám přizpůsobené (Handy et al., 2008). Během posledních několika tisíců let se do ŽP dostávají nové nanočástice, ať už jako cíleně vyrobené nanomateriály, nebo jako vedlejší produkty antropogenní činnosti. S enormně narůstajícím zájmem o nanotechnologie během posledních 20 let a při současném použití nanočástic prakticky ve všech odvětvích se do ŽP dostávají nové částice, které mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti a často i cíleně zvýšenou reaktivitu (Lewinski et al., 2008). Toxicitu nanočástic může tedy ovlivnit jejich rozměr (velikostní distribuce částic, plocha povrchu), chemické složení (např. čistota), struktura povrchu (reaktivita povrchu – povrchové skupiny a modifikace), rozpustnost, tvar a schopnost agregace (Nel et al., 2006). Právě tyto faktory způsobují odlišnou toxicitu nanočástic v porovnání s materiálem stejného složení a většího rozměru (Oberdörster et al., 2005). S klesající velikostí částice roste její specifický povrch, a roste tedy i počet atomů na povrchu, které se mohou potenciálně zapojit do katalýzy chemických reakcí nebo přímo do chemických reakcí. Rovněž biokinetika nanočástic je velmi odlišná a velikost v řádech nanometrů umožňuje některým dokonce vstup do buněčného cytosolu a následný vstup do dalších buněčných kompartmentů (Behzadi et al., 2017). Několikanásobně vyšší povrchová reaktivita předurčuje nanočástice k výraznější biologické aktivitě v porovnání s většími částicemi. Zvýšená biologická aktivita se může projevat jak na buněčné, tak na subbuněčné úrovni, a to jak pozitivním (antioxidační kapacita, transmembránové nosiče léčiv atd.) tak negativním efektem, či eventuálně jejich kombinací (Nel et al., 2006). Především negativním účinkům (toxicitě) uměle vyrobených nanočástic – nanomateriálů – se věnuje předkládaná práce.

Toxikologické studie *in vitro* i *in vivo* mnoha různorodých nanočástic a materiálů ukazují jednu společnou vlastnost nanočástic, a to schopnost indukovat produkci reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) (Oberdörster et al., 2005). Především expozice nanočástic přechodných kovů dalšímu faktoru, jako například světlu a UV-záření, způsobuje zvýšenou produkci ROS vlivem oxidační katalýzy (Akbari et al., 2018). Zároveň mohou některé nanočástice vstupem do buňky (případně mitochondrií)

a následnou reakcí s biotickým peroxidem vodíku a Fentonovými a pseudo-Fentonovými procesy tvořit ROS (Grzelak et al., 2018; Manke et al., 2013).

5.2. Reaktivní formy kyslíku a oxidativní stres

Volné kyslíkové radikály neboli ROS jsou molekuly s velmi krátkým poločasem rozpadu vykazující vysokou reaktivitu. Mezi nejvýznamnější ROS patří například peroxylový ($\text{ROO}\cdot$), hydroperoxylový ($\cdot\text{HO}_2$) a hydroxylový radikál ($\text{HO}\cdot$) a superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$) (Betteridge, 2000). Za zmínku stojí i peroxid vodíku, který, ač není radikál, je i přesto často řazen mezi ROS, a to proto, že slouží jako prekurzor jejich vzniku. Tyto vysoce reaktivní látky vznikají během mnoha procesů, včetně některých biotických. Jak v eukaryotické, tak v prokaryotické buňce vznikají ROS během běžných metabolických procesů – především v mitochondriích, chloroplastech, peroxizomech či v cytosolu jako vedlejší produkt aerobní respirace (Ševců et al., 2011). Na obranu proti ROS nebo prevenci proti oxidativnímu poškození se u organismů vyvinul obranný antioxidační systém. Doposud byla z tohoto systému studována řada enzymů, které jsou schopné různými mechanismy detoxifikovat organismus a chránit homeostázu před ROS. Tento obranný systém zahrnuje například enzym superoxiddismutázu, která katalyzuje přeměnu $\cdot\text{O}_2^-$ na méně toxický H_2O_2 , a katalázu, která dále štěpí H_2O_2 na kyslík a vodu bez dalšího vzniku ROS (Scandalios, 2005). Dalším velmi důležitým mechanismem, který slouží k odstraňování ROS, je intracelulární tripeptid glutathion (GSH). Tato látka dokáže redukovat ROS a současně podléhat oxidaci. Dvě oxidované molekuly GSH následně tvoří disulfidický dimer (GSSG). Tyto detoxifikační reakce jsou katalyzovány dalšími enzymy například z řady glutathionperoxidáz (přeměna H_2O_2 na H_2O za současné přeměny GSH na GSSG). Vzniklý GSSG se následně opět redukuje na GSH, kdy tuto přeměnu katalyzuje enzym glutathion reductáza (Ševčíková et al., 2011). Při nadprodukci ROS či narušení detoxifikačního metabolismu dochází v buňce k jejich kumulaci a nežádoucímu stavu nazývanému oxidativní stres (OS). Při tomto abiotickém ději dochází k interakcím vzniklých radikálů s buněčnými biomolekulami za vzniku reaktivních, častokrát i toxických a mutagenních degradačních produktů (Betteridge, 2000; Finkel and Holbrook, 2000).

Jednou z nejvíce studovaných interakcí ROS s buněčnými biomolekulami je oxidační poškození – peroxidace – lipidů (LPO). Při interakcích ROS s polynenasycenými mastnými kyselinami dochází ke vzniku peroxy radikálů, které jsou buď schopny iniciovat

další reakce LPO, nebo se rozpadají na krátké, vysoce reaktivní karbonylové sloučeniny (Esterbauer et al., 1991). Mezi tyto produkty LPO patří například 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), malondialdehyd (MDA), akrolein, alkany, epoxidy a lipidové alkoxy radikály (Esterbauer et al., 1991). Vlivem LPO dochází primárně k narušení buněčné membrány – zvýšení její fluidity a permeability. Dále mohou vzniklé degradační produkty rozpadu lipidů způsobovat sekundární toxicitu (Esterbauer, 1993). Mnoho studií popisuje schopnost těchto látek (HNE, MDA a akrolein) interagovat s proteiny a nukleovými kyselinami. Při interakcích s proteiny dochází například k navázání produktu LPO na aminokyseliny v jeho struktuře, vedoucímu často k proteinové disfunkci (Uchida, 2015; Liu et al., 2015a). Stejně tak může docházet k interkalaci produktů LPO do DNA, přesněji navázání na DNA báze vedoucí ke vzniku exocyklických mutagenních aduktů, jako je například etheno-deoxyadenin a etheno-deoxycytosin (Blair, 2008; Nair et al., 1998). Kromě adukce, navázání produktů LPO, může docházet i k přímé oxidaci proteinů a DNA. Přímá oxidace proteinů vlivem ROS vede ke karboxylaci aminokyselin v jejich struktuře či k rozpadu peptidu (Baraibar et al., 2013; Cabisco et al., 2000). Obdobným způsobem dochází i k oxidaci bází ve struktuře nukleových kyselin vedoucí k tvorbě mutagenních produktů, jako je například 8-oxo-deoxyguanosin a 5-hydroxyuracil (Marnett, 2000).

5.3. Testování toxicity nanočástic

Komplexní a zcela odlišné chování nanočástic ve srovnání klasickými chemikáliemi komplikuje použití standardně zavedených toxikologických testů. Mezi kritické faktory ovlivňující výsledek toxikologických dat a správnou interpretaci patří velikost, tvar a složení nanomateriálu před testem a jeho změna v průběhu expozice, agregace materiálu a použití dispergačních metod před testem (Sovová a Kočí, 2012; Tournebize et al., 2013). Zvýšená reaktivita nanomateriálů dále rovněž ovlivňuje jednotlivé složky expozičních medií, a může mít tedy i vliv na výsledek toxikologických testů. Tento děj může probíhat i opačně. Nanočástice jsou ovlivňovány složením média a mohou mít tendenci tvořit agregáty či se naopak rozpadat (rozpouštět) na menší částice. Například i jednoduchý fyziologický roztok hojně používaný při mikrobiologických testech může způsobovat agregaci mnoha nanočástic. Agregací vznikají z nanočástic větší částice, a dochází tedy k redukci vlastností spojených s nanorozměrem provázené změnou (ve většině případů poklesem) toxicity (Kah, 2013). Z tohoto důvodu je pro správnou interpretaci nanotoxikologických dat nutné detailně studovat samotný materiál pomocí metod materiálové analýzy (viz kapitola 3.4.). Diskutabilní je rovněž dispergace nanomateriálů

před testem, kdy se pomocí intenzivního míchání přidávkem dispergační látky či sonikací docílí rozpadu větších agregátů na nanočástice. Tato úprava testovaného materiálů může způsobovat i falešně pozitivní toxickou odpověď (zvýšení produkce ROS po sonikaci) a nereprezentuje chování nanomateriálů v ŽP, kde mají nanočástice tendenci k agregaci. Na druhou stranu je tímto procesem docíleno určité homogenity nanomateriálů před testem a lze dále studovat mechanismus účinku přímo nanočástic oproti jejich větším agregátům (Sovová a Kočí, 2012).

Z výše zmíněných důvodů se ukázalo, že je nezbytné vyvinout a přizpůsobit nové přístupy testování (eko)toxicity těmto nově se objevujícím polutantům. Během posledních deseti let se problematikou nanomateriálů začaly postupně zabývat i mezinárodní organizace (např. Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, OECD) a byly sestaveny směrnice pro testování nanomateriálů a stanovení jejich environmentálního rizika. V posledních letech byly pro testování nanomateriálů přizpůsobené i některé ze standardizovaných OECD testů (Hund-Rinke et al., 2016).

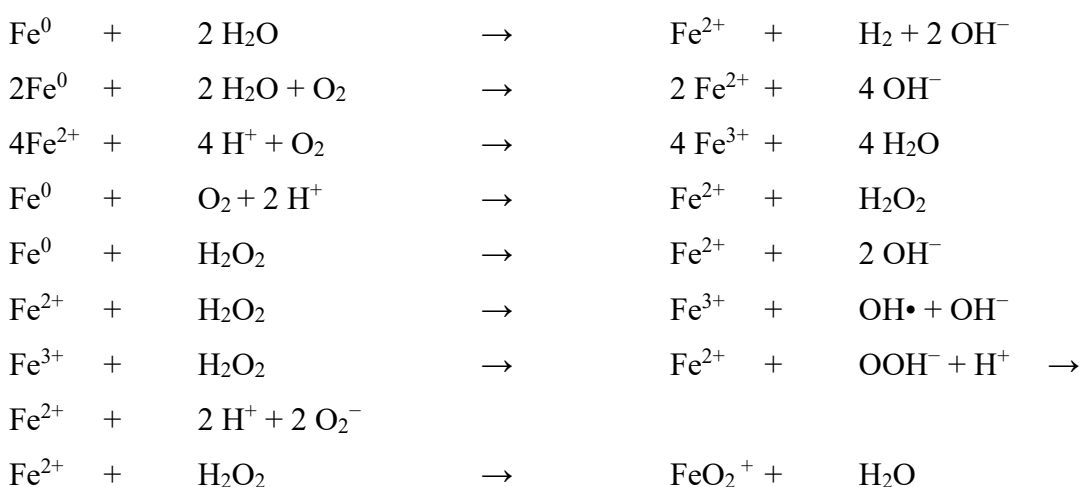
Testování toxicity nZVI rovněž výrazně ovlivňuje jeho vysoká reaktivita a nestabilita na vzduchu. Při kontaktu se vzduchem i při resuspendaci částic ve vodě dochází k oxidaci, tedy k výraznému snížení obsahu elementárního železa – kapacity nZVI. Při expozici nanočástic nZVI v jednotlivých médiích používaných při standardních ekotoxikologických testech dochází k různé oxidaci pyroforického železa (v závislosti na délce expozice a komplexnosti média), a je tedy nemožné tyto výsledky porovnávat. Vysoký redukční potenciál nanomateriálů na bázi nZVI vede k redukci rozpuštěného O₂ ve vodném prostředí a rychlému nastolení anaerobních podmínek v expozičním médiu. Nedostatek kyslíku může sekundárně ovlivnit výsledky ekotoxikologických testů prováděných na vodních organismech.

5.4. Mechanismus toxicity nZVI

Nanomateriály na bázi nulavocného železa mohou působit na živé buňky přímo či nepřímo. Za přímé působení lze označit adhezi či přímý vstup do buňky kde dochází k přímému ovlivnění – poškození biomolekul samotným nulavocným železem. Mnoho studií demonstrovalo pomocí elektronové mikroskopie precipitaci nZVI či jeho oxidačních produktů na buněčné stěně i uvnitř samotné buňky, stejně jako narušení integrity buněčné membrány. Naopak při nepřímém působení dochází k poškození buňky přes sekundární produkty nZVI, jako jsou již zmíněné ROS či oxidační produkty železa (Reakce 2).

Obzvláště ionty Fe^{2+} a Fe^{3+} jsou známé svou cytotoxicitou a předpokládá se, že především rozpustné, méně stabilní ionty Fe^{2+} se mohou uvnitř buňky zapojovat do Fentonových reakcí a v mitochondriích generovat volné radikály (ROS) při reakcích s biotickým peroxidem vodíku, a tak způsobovat OS (Reakce 2).

Většina studií uvádí právě vznik Fe^{2+} a kyslíkových radikálů jako hlavní mechanismus toxického působení nZVI. Současné studie nasvědčují synergii přímého a nepřímého působení, kdy redukční síla nZVI nejprve naruší integritu membrány (degradace lipopolysacharidu a membránových transportérů), a následně tak umožní vstup toxických Fe^{2+} iontů a samotných nanočástic do buňky, kde dochází k jejich přímému působení.



Reakce 2: Teoretické reakce vzniku ROS indukované nZVI (Alena Ševců et al., 2011; Auffan et al., 2008; El-Temsah and Joner, 2013)

5.5. Testování toxicity nZVI *in vitro*

Jak již bylo zmíněno, vysoká reaktivita materiálů na bázi nZVI předurčuje tyto nanočástice k toxicitě. Z míst reálných aplikací (sanace kontaminovaných lokalit a podzemní vody) a dalších potenciálních využití nZVI (např. čištění odpadní vody) vyplývá, že nejvíce exponovanými organismy budou právě mikroorganismy. Pravděpodobně proto bylo doposud nejvíce studií zabývajících se nežádoucími účinky nZVI provedeno právě na mikrobiálních kulturách (Lefevre et al., 2016; Jang et al., 2014). Při těchto *in vitro* studiích se především sledují základní parametry organismu, jako je buněčná viabilita, rychlost růstu, buněčná a membránová integrita či biologická aktivita. Výsledky i průběh toxikologických studií se liší jak základními parametry (například dávkou nZVI: 1 – 10 000 mg/l; časem expozice: od 5 min do 42 dní), tak exponovaným organismem, ale i testovaným materiálem na bázi nZVI. Odlišný design experimentu

a různé formy nZVI způsobují odlišnou toxickou odpověď a znemožňují srovnání výsledků jednotlivých materiálů napříč různými studiemi (Crist et al., 2012). Mnoho studií z posledních let ukazuje, že nZVI může prokazatelně negativně ovlivňovat mikroorganismy, a především některé druhy bakterií. Nejvíce exponovaným (mikro)organismem, na kterém byla doposud provedena velká většina studií, je Gram negativní bakterie *Escherichia coli*. Mezi negativními efekty nejčastěji pozorované u této bakterie patří pokles buněčné viability a integrity způsobené pravděpodobně OS a narušením buněčné membrány (Chaithawiwat et al., 2016; Auffan et al., 2008; Chen et al., 2011a). Rovněž se při experimentech s touto fakultativně anaerobní bakterií ukázalo prohloubení negativních efektů a zvýšení toxicity při anaerobních/deaerovaných podmínkách (Kim et al., 2010; Lee et al., 2008). Dalšími často používanými bakteriemi při hodnocení toxického účinku nZVI jsou bakterie z rodu *Bacillus*. Při krátkodobé expozici *Bacillus subtilis* (5 min – 4 h) byl například pozorován silný baktericidní účinek nZVI, cytotoxicita a lýza buněk (Chen et al., 2013b; Diao and Yao, 2009). U dalšího druhu *Bacillus cereus* byla detekována dřívější sporulace, zvýšení produkce proteinů spojených s OS a snížení produkce proteinů spojovaných s motilitou a buněčnou stěnou po 48h expozici (Fajardo et al., 2013). Dále byla detekována redukce metabolické aktivity u dalšího zástupce tohoto rodu *Bacillus nealsonii* (Fajardo et al., 2012). Dalším příkladem Gram negativního bakteriálního rodu používaného při hodnocení toxicity je rod *Pseudomonas*, jehož někteří zástupci přirozeně osidlují půdu i vodu. I bakterie tohoto rodu jsou často izolovány z kontaminovaných lokalit, a lze tedy logicky předpokládat případnou expozici těchto zástupců při reálných aplikacích nZVI. Při relativně krátkodobé expozici (0,2 – 48 h) bakterie *Pseudomonas stutzeri* vysokým dávkám nZVI (1000 – 10 000 mg/l) byla pozorována mírná toxicita pouze při nejkratším čase expozice, ale i zde v tomto případě došlo ke zvýšení OS a k ovlivnění proteosyntézy proteinů spojených s OS a proteinů spojovaných s buněčnou stěnou (Saccà et al., 2014a). Naopak u dalšího zástupce tohoto rodu *Pseudomonas fluorescens* došlo ke kompletní inaktivaci buňky, a to ve všech testovaných koncentracích (100 – 10 000 mg/l) již po pětiminutové expozici (Diao and Yao, 2009). Kromě klasického měření viability byl v několika studiích sledován i vliv nZVI na odstraňování dusičnanů (aerobní denitrifikaci) pomocí Gram negativních bakterií *Parococcus YF1* (Jiang et al., 2015; Jiang et al., 2013). Ve všech těchto studiích byla pozorována (částečná) inhibice denitrifikace při vyšších dávkách nZVI a dále počáteční inhibice buněčného růstu.

Na druhou stranu, některé studie nepozorovaly ani v nejvyšších testovaných koncentracích (10 000 mg/l) žádný negativní/toxický efekt u Gram negativních bakterií *Klebsiella oxytoca* a *Klebsiella planticola* (Fajardo et al., 2012; Saccà et al., 2013). V dalších studiích vykazovaly některé z dalších bakteriálních kmenů – izolátů schopných biodegradace xenobiotik (*Dehalococcoides CBDBI*) – dlouhodobou (30 dní) resistenci vůči negativnímu účinku nZVI (Xu et al., 2014).

Další studie dokumentují i biostimulační působení nZVI, kdy například přidavek 100 mg/l nZVI povzbudil bakteriální růst a zvýšil biodegradaci residuálního fenolu bakteriálním izolátem z aktivovaného kalu (*Paracoccus* sp.); přidavek 50–500 mg/l nZVI urychlil růst a biodegradaci dusičnanů pomocí dalšího izolátu (*Bacillus fusiformis*) ze stejné matrice (Jiang et al., 2015; Kuang et al., 2013).

K dalším mikroorganismům, které projevily vysokou resistenci vůči nZVI, patří některé druhy hub. Některé studie například ukazují, že ani při nejvyšších testovaných koncentracích (10 000 mg/l), nedochází k ovlivnění růstu houby *Aspergillus versicolor* (Diao and Yao, 2009). U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo sice pozorováno snížení biologické spotřeby kyslíku v přítomnosti nZVI, ale změna ve viabilitě zaznamenána nebyla (Otero-González et al., 2013). Další studie provedená rovněž na kvasinkách, včetně *S. cerevisiae*, dále navíc ukázala zvýšenou produkci lipidů při expozici mikroorganismu nízkým dávkám nZVI (9–13 mg/l) (Pádrová et al., 2015). Z řad zástupců mořského a sladkovodního fytoplanktonu bylo několik studií provedeno i na řasách a bičíkovcích (Keller et al., 2012; Kadar et al., 2012). Rovněž i zde byla pozorována selektivní toxicita, kdy u všech testovaných řas byla zaznamenána inhibice růstu, a naopak u bičíkovce *Isochrysis galbana* nebyl detekován žádný významný negativní účinek. V dalších studiích byl naopak prokázán biostimulační účinek nZVI, kdy nízké dávky nanomateriálu (5,1 mg/l) podpořily růst a akumulaci lipidů u různých druhů sladkovodních řas (Pádrová et al., 2014).

Kromě mikrobiálních kultur bylo v menší míře provedeno i několik *in vitro* studií využívajících lidské tkáňové kultury, zabývajících se především účinkem nižších koncentrací nZVI a mechanismem jeho účinku (Ma et al., 2014; Keenan et al., 2009). Dále byly minoritně provedeny i testy na vyšších vodních i půdních organismech. Například u půdních bezobratlých byla sledována mortalita a LD₅₀ (dávka způsobící smrt 50 % jedinců). U žížaly *Eisenia fetida* byla LD₅₀ stanovena na 399 mg/l a u *Lumbricus rubellus* na 447–866 mg/l (El-Temsah and Joner, 2012). Dále byla z řad půdních bezobratlých toxicita nZVI testována rovněž u hlístic, lasturnatek a chvostokoků (El-Temsah et al.,

2016; El-Temsah and Joner, 2013). Dále bylo pozorováno výrazné ovlivnění přežití zástupce vodních bezobratlých *Daphnia magna* po expozici různým formám nZVI (Keller et al., 2012). Několik studií bylo rovněž provedeno na rybách jakožto zástupci vyšších organismů z řad vodních obratlovců, a to především na různých stádiích medaky japonské. Při těchto experimentech byl pozorován pokles v koncentraci rozpuštěného kyslíku a zvýšení markerů/indukci OS (narušení v antioxidačním obranném systému, nárůst ROS) (Chen et al., 2011b; Chen et al., 2013a; Li et al., 2009).

5.6. Vliv na mikrobiální společenstva

Studium toxicity v *in vitro* podmínkách (kultivační/expoziční médium, použití jednodruhové mikrobiální kultury) přesně nereprezentuje chování materiálu za reálných podmínek. Dále i selektivní citlivost různých bakteriálních druhů vůči nZVI vede k zavádějícím závěrům ohledně toxického účinku těchto materiálů. Na druhou stranu, tyto testy poskytují cenné informace o mechanismu toxického účinku a pomocí některých z nich lze i částečně porovnávat toxicitu nově vyvíjených materiálů před jejich samotnou aplikací do ŽP. Pro přiblížení se co nejvíce reálnému prostředí mnoho autorů v současnosti studuje vliv nanomateriálů na bázi nZVI přímo na celé mikrobiální populace, ať už uměle vytvořené, či rezidentní z míst aplikace těchto materiálů.

Při aplikacích nZVI dochází k výraznému ovlivnění prostředí. Vysoká reaktivita tohoto materiálu způsobí například téměř okamžité nastolení anoxických podmínek, zvýší pH a sníží ORP prostředí. Kromě tohoto zásadního narušení rovnováhy v systému dokáže nZVI nesespecificky redukovat i další anorganické či organické molekuly. Je logické, že takto vzniklé podmínky budou způsobovat i změny v mikrobiálních populacích ve prospěch anaerobních, železo redukujících či metalotolerantních mikroorganismů. Snížení celkové toxicity způsobené odstraněním kontaminace může rovněž zapříčinit oživení mikroorganismů sensitivních na daný typ kontaminace, a naopak selektivní toxicita nZVI na úrovni druhů či kmenů může inhibovat růst některých jiných organismů.

Mnoho studií v posledních několika letech pozorovalo výraznou změnu ve složení rezidentních mikrobiálních populací z různých typů matric. Pomocí tradičních molekulárně-biologických metod (např. fluorescenční *in situ* hybridizace, FISH; charakterizace fosfolipidových mastných kyselin, PLFA analýza; sekvenování nové generace, NGS; kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase, RT-qPCR) byly při relativně vysokých expozičních koncentracích (0,27 – 100 g/kg) detekovány

zásadní změny v populacích (Lefevre et al., 2016). Na druhou stranu, existují i studie, kdy nebyla pozorována žádná změna v půdních mikrobiálních populacích ani při koncentraci 17 g/kg (Saccà et al., 2014b). Tyto studie byly provedeny v půdách o odlišném mineralogickém složení. Mírná či žádná změna v populacích nebyla pozorována v experimentech s půdou s vysokým obsahem jílu. Naopak ve studiích využívajících půdu s vyšším obsahem písku byly prokazatelně pozorovány větší a zásadní změny v zastoupení jednotlivých mikroorganismů (Fajardo et al., 2012; Fajardo et al., 2015). Výsledky všech těchto studií dokumentují určitý trend závislosti efektu nZVI na složení a obsahu organických složek v jednotlivých půdách. Další studie detailně monitorující celý proces dvou pilotních aplikací nZVI na území ČR a ukazuje pozitivní ovlivnění půdních mikroorganismů (Němeček et al., 2015; Němeček et al., 2016).

Několik dalších autorů se dále zabývalo i vlivem nZVI na mikroorganismy vodního sedimentu. I při výrazně nižších koncentracích (0,5–3 g/l) než byly použity při experimentech s půdní mikroflórou, byly pozorovány změny ve struktuře mikrobiálních společenstev (Kumar et al., 2014). Pozorované změny byly zaznamenány i při dlouhodobější expozici a v některých případech přetrvávaly i po 250 dnech. Výsledky těchto studií poukazují na dlouhodobé ovlivnění mikroorganismů, kdy efekt nZVI přetrvává i několik měsíců po jeho aplikaci. Další studie rovněž ukázaly ovlivnění reálného fytoplanktonu odebraného z nádrže a exponovaného nízkým koncentracím nZVI (100 mg/l). Při tomto experimentu bylo pozorováno negativní ovlivnění růstu řas způsobené nZVI již po 7 dnech (hodnocen počet buněk) a naopak nebyl pozorován žádný vliv na počet sinic, ani po třítydenní expozici. Dále byl v této studii pozorován výrazný nárůst v počtu kultivovatelných bakterií již po 3 dnech expozice nanočásticemi (Nguyen et al., 2018).

Z hlediska potenciálního využití nanomateriálů na bázi nZVI při dekontaminaci odpadní vody je mnoho studií provedeno i na rezidentních bakteriích z aktivovaného kalu. Při těchto studiích byla mikrobiální komunita vystavována nízkým dávkám nZVI (0,1 – 200 mg/l) a nebyl pozorován žádný zásadní vliv na strukturu komunity. Přestože nebyl pozorován žádný zásadní vliv z hlediska mikrobiálních populací, autoři pozorovali negativní účinky jako úbytek v koncentraci adenosintrifosfátu (ATP) a nárůst ROS, v závislosti na rostoucí koncentraci nZVI (Wu et al., 2013; Ma et al., 2015).

Mikroorganismy hrají zásadní roli v globálním ekosystému a v koloběhu živin, a proto je nutné věnovat velkou pozornost interakcím cizorodých látek s mikrobiálními populacemi. Ovlivnění prostředí nZVI může způsobit i ztrátu určitých vlastností

jednotlivých bakteriálních druhů, aniž by byla zároveň ovlivněna struktura mikrobiálního společenstva. Nastolení anoxických podmínek, nízkého ORP či zvýšení pH může vést k narušení biologických procesů odehrávajících se v přírodních ekosystémech či specifičtěji i v čistírnách odpadních vod (Oprěkal et al., 2017). Mezi tyto procesy, jejichž potenciální ovlivnění bylo sledováno po expozici nZVI, patří methanogeneze, redukce síranů, denitrifikace a dehalogenace (Lefevre et al., 2016). Výsledky těchto studií ukazují i již zmíněné pozitivní aspekty nZVI, kde nízké koncentrace (50 mg/l) dokáží stimulovat denitrifikační bakterie, a tak podporovat biologickou denitrifikaci (Jiang et al., 2013; Liu et al., 2015c). Předpokládá se, že tyto bakterie dokáží využívat vodík tvořený při anaerobní redukci vody nZVI. Takto generovaný vodík využívají i hydrogenotrofní methanogenní bakterie při anaerobní digesci, kdy je vodík a oxid uhličitý přeměňován na methan při methanogenezi. Jsou dokumentovány studie, kdy nízké koncentrace nZVI dokázaly zvýšit produkci methanu o desítky procent (Carpenter et al., 2015; Su et al., 2013). Generovaný H₂ může být využíván některými dalšími bakteriemi jako donor elektronů a tyto bakterie, jako jsou například síru redukující nebo haloferující bakterie, mohou vstupovat do dekontaminačních procesů. Názorným důkazem je například již zmíněný proces pro *in situ* degradaci - nanobioremediace. Při tomto procesu vede aplikace nZVI nebo jiného materiálu ke snížení kontaminace (spojeného častokrát i se snížením celkové toxicity prostředí) a k nastolení podmínek vhodných pro růst specifických mikroorganismů schopných biodegradovat reziduální kontaminaci. V rámci kapitoly 4.2. jsou detailně popsány dvě pilotní aplikace na území ČR, při kterých došlo k ověření funkčnosti této sanační metody a s využitím molekulárně-genetických technik byl navrhnut mechanismus, pomocí kterého se mikroorganismy zapojují do „recyklace“ kompletně zoxidovaného nZVI.

6. Cíle disertační práce

Tato práce se věnuje sumarizaci a rozšíření dosavadních znalostí o toxicitě nZVI a potenciálních environmentálních rizicích spojených s jeho aplikací. První část této práce je věnována vývoji nových testů a jejich aplikaci při posuzování toxicity nově vyvíjených nanomateriálů na bázi nZVI. Další část práce se zabývá studiem strukturních změn těchto materiálů a vývojem jejich toxicity v časovém horizontu několika měsíců. Rovněž je v této části studován vliv různých materiálů na bázi nZVI na mikrobiální populace v uměle vytvořených mikrokosmech. V poslední části se tato práce zabývá hodnocením možností využití při nanobioremediačních aplikacích.

Dílními cíli práce byly:

1. Syntetický přehled literatury zabývající se toxicitou nZVI
2. Vývoj a optimalizace nového jednoduchého protokolu pro testování toxicity nanomateriálů na bázi nZVI vůči bakteriálním druhům
3. Vývoj testu pro hodnocení oxidativního poškození biomolekul u různých mikroorganismů po expozici nanomateriálem (nZVI)
4. Studium změny toxicity a struktury sulfidické modifikace nZVI v průběhu stárnutí po dobu 2 měsíců
5. Zhodnocení využití kombinace nanoremediace a biostimulace v sanačních aplikacích
6. Studium vlivu nZVI na půdní mikroorganismy v uměle vytvořených mikrokosmech

7. Závěry

Předkládaná práce komplexním způsobem hodnotí toxicitu materiálů na bázi nZVI – nejvíce používaného nanomateriálu v remediační praxi. Toxicita je hodnocena jak vůči jednotlivým druhům, tak vůči celým mikrobiálním společenstvům. V rámci této práce bylo vyvinuto několik nových přístupů k hodnocení toxicity nanomateriálů na bázi nZVI. Následnou aplikací v kombinaci s materiálovou analýzou a pokročilými molekulárně-genetickými metodami bylo studováno několik nových materiálů před jejich samotnou aplikací do ŽP.

- Souborná publikace č. 1 shrnuje současné poznatky o vlivu nZVI na mikroorganismy. Kromě hodnocení rizik spojených s aplikací nZVI (negativních účinků – toxicity) tato publikace rovněž poskytuje aktuální informace o biostimulačním efektu tohoto materiálu. (Publikace č. 1)
- S použitím kapalinové chromatografie a optimalizovaného postupu kultivace při expozici čistých bakteriálních druhů byl vytvořen test, pomocí kterého je nyní možné hodnotit toxicitu nově vyvíjených materiálů na bázi nZVI. Pomocí tohoto protokolu byla stanovena toxicita nZVI a jeho 3 modifikací lišící se obsahem pyroforického železa a tloušťkou oxidické slupky. Detekovaný trend v poklesu toxicity se vzrůstající tloušťkou oxidické slupky byl následně pozorován u čistých mikrobiálních kultur tří zástupců Gram pozitivních a tří Gram negativních bakteriálních druhů. (Publikace č. 2)
- Pomocí pokročilých metod analytické chemie byla prokázána oxidace jak lipidů, tak proteinů u tří odlišných mikrobiálních druhů (u hub, řas a bakterií) po expozici nZVI stabilizovaného 3 nm tenkou oxidickou slupkou. Vyvinutý test založený na mikroextrakci tuhou fází spojený s plynovou chromatografií a hmotnostní detekcí (SPME-HS-GC-MS) byl použit pro detekci karbonylů, jakožto markerů oxidativního poškození biomolekul. (Publikace č. 3)
- Aplikací vyvinutého protokolu byla stanovena toxicita 3 sulfidických modifikací nZVI lišících se pouze hmotnostním procentem síry obsažené v jednotlivých částicích. Byl pozorován klesající trend akutní toxicity v závislosti na rostoucím obsahu síry v nanočástici S-nZVI. Během dlouhodobého experimentu byl zaznamenán nárůst toxicity u sulfidických modifikací v prvním týdnu expozice a následný pokles v průběhu času. Čisté pyroforické nZVI si udrželo svojí akutní

toxicitu první týden a následně byl pozorovaný pokles toxicity v průběhu stárnutí. (Publikace č. 4)

- V rámci této disertační práce byl rovněž sledován a hodnocen vliv nZVI a jeho modifikací na celé mikrobiální společenstvo. V *in vitro* podmínkách byly během několika různých experimentů pozorovány změny v zastoupení mikrobiálních populací způsobené těmito nanočásticemi v prostředí reálně kontaminované půdy. Dále byl pozorován vliv postupného stárnutí materiálů na bázi nZVI v reálných podmínkách a jeho následný vliv na zastoupení jednotlivých mikrobiálních tříd. (Publikace č. 5)
- V rámci této práce byl zhodnocen i nanobioremediační potenciál nanomateriálů na bázi nZVI při pilotních aplikacích na území ČR. (Publikace č. 6)

Literatura

Akbari, A., Amini, M., Tarassoli, A., Eftekhari-Sis, B., Ghasemian, N., Jabbari, E. (2018). Transition metal oxide nanoparticles as efficient catalysts in oxidation reactions. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 14, 19-48. doi: 10.1016/j.nanoso.2018.01.006

Arvaniti, O., Hwang, Y., Andersen, H., Stasinakis, A., Thomaidis, N., Aloupi, M. (2015). Reductive degradation of perfluorinated compounds in water using Mg-aminoclay coated nanoscale zero valent iron. *Chemical Engineering Journal*, 262, 133-139. doi: 10.1016/j.cej.2014.09.079

Auffan, M., Achouak, W., Rose, J., Roncato, M., Chanéac, C., Waite, D. (2008). Relation between the Redox State of Iron-Based Nanoparticles and Their Cytotoxicity toward *Escherichia coli*. *Environmental Science & Technology*, 42(17), 6730-6735. doi: 10.1021/es800086f

Bae, S., Hanna, K. (2015). Reactivity of Nanoscale Zero-Valent Iron in Unbuffered Systems: Effect of pH and Fe(II) Dissolution. *Environmental Science & Technology*, 49(17), 10536-10543. doi: 10.1021/acs.est.5b01298

Baraibar, M., Ladouce, R., Friguet, B. (2013). Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *Journal Of Proteomics*, 92, 63-70. doi: 10.1016/j.jprot.2013.05.008

Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M., Alkawareek, M., Dreaden, E. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4218-4244. doi: 10.1039/c6cs00636a

Betteridge, D. (2000). What is oxidative stress?. *Metabolism*, 49(2), 3-8. doi: 10.1016/s0026-0495(00)80077-3

Blair, I. (2008). DNA Adducts with Lipid Peroxidation Products. *Journal Of Biological Chemistry*, 283(23), 15545-15549. doi: 10.1074/jbc.r700051200

Boussahel, R., Harik, D., Mammar, M., Lamara-Mohamed, S. (2007). Degradation of obsolete DDT by Fenton oxidation with zero-valent iron. *Desalination*, 206(1-3), 369-372. doi: 10.1016/j.desal.2006.04.059

Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 3(1), 3-8.

Carpenter, A., Laughton, S., Wiesner, M. (2015). Enhanced Biogas Production from Nanoscale Zero Valent Iron-Amended Anaerobic Bioreactors. *Environmental Engineering Science*, 32(8), 647-655. doi: 10.1089/ees.2014.0560

Cecchin, I., Reddy, K., Thomé, A., Tessaro, E., Schnaid, F. (2017). Nanobioremediation: Integration of nanoparticles and bioremediation for sustainable remediation of chlorinated organic contaminants in soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 419-428. doi: 10.1016/j.ibiod.2016.09.027

Chaithawiwat, K., Vangnai, A., McEvoy, J., Pruess, B., Krajangpan, S., Khan, E. (2016). Role of oxidative stress in inactivation of *Escherichia coli* BW25113 by nanoscale zero-valent iron. *Science Of The Total Environment*, 565, 857-862. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.191

Chen, J., Xiu, Z., Lowry, G., Alvarez, P. (2011a). Effect of natural organic matter on toxicity and reactivity of nano-scale zero-valent iron. *Water Research*, 45(5), 1995-2001. doi: 10.1016/j.watres.2010.11.036

Chen, P., Su, C., Tseng, C., Tan, S., Cheng, C. (2011b). Toxicity assessments of nanoscale zerovalent iron and its oxidation products in medaka (*Oryzias latipes*) fish. *Marine Pollution Bulletin*, 63(5-12), 339-346. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.02.045

Chen, P., Wu, W., Wu, K. (2013a). The zerovalent iron nanoparticle causes higher developmental toxicity than its oxidation products in early life stages of medaka fish. *Water Research*, 47(12), 3899-3909. doi: 10.1016/j.watres.2012.12.043

Chen, Q., Li, J., Wu, Y., Shen, F., Yao, M. (2013b). Biological responses of Gram-positive and Gram-negative bacteria to nZVI (Fe⁰), Fe²⁺ and Fe³⁺. *RSC Advances*, 3(33), 13835. doi: 10.1039/c3ra40570b

Crane, A., Scott, T. B. (2012). Nanoscale zero-valent iron: Future prospects for an emerging water treatment technology. *Journal of Hazardous Materials*, 211-212, 112-125, doi:10.1016/j.jhazmat.2011.11.073.

Crist, R., Grossman, J., Patri, A., Stern, S., Dobrovolskaia, M., Adisheshaiah, P. (2012). Common pitfalls in nanotechnology: lessons learned from NCI's Nanotechnology Characterization Laboratory. *Integrative Biology*, 5(1), 66-73. doi: 10.1039/c2ib20117h

Vecchia, E., Luna, M., Sethi, R. (2009). Transport in Porous Media of Highly Concentrated Iron Micro- and Nanoparticles in the Presence of Xanthan Gum. *Environmental Science & Technology*, 43(23), 8942-8947. doi: 10.1021/es901897d

Diao, M., & Yao, M. (2009). Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes. *Water Research*, 43(20), 5243-5251. doi: 10.1016/j.watres.2009.08.051

Dong, H., Li, L., Lu, Y., Cheng, Y., Wang, Y., Ning, (2019). Integration of nanoscale zero-valent iron and functional anaerobic bacteria for groundwater remediation: A review. *Environment International*, 124, 265-277. doi: 10.1016/j.envint.2019.01.030

El-Temseh, Y., Joner, E. (2012). Ecotoxicological effects on earthworms of fresh and aged nano-sized zero-valent iron (nZVI) in soil. *Chemosphere*, 89(1), 76-82. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.04.020

El-Temseh, Y., Joner, E. (2013). Effects of nano-sized zero-valent iron (nZVI) on DDT degradation in soil and its toxicity to collembola and ostracods. *Chemosphere*, 92(1), 131-137. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.02.039

El-Temseh, Y., Ševců, A., Bobčíková, K., Černík, M., Joner, E. (2016). DDT degradation efficiency and ecotoxicological effects of two types of nano-sized zero-valent iron (nZVI) in water and soil. *Chemosphere*, 144, 2221-2228. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.122

Elliott, D., Zhang, W. (2001). Field Assessment of Nanoscale Bimetallic Particles for Groundwater Treatment. *Environmental Science & Technology*, 35(24), 4922-4926. doi: 10.1021/es0108584

Esterbauer, H. (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, 57(5), 779S-786S. doi: 10.1093/ajcn/57.5.779s

Esterbauer, H., Schaur, R., Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology And Medicine*, 11(1), 81-128. doi: 10.1016/0891-5849(91)90192-6

European Commission (2011). Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. Retrieved from: <http://data.europa.eu/eli/reco/2011/696/oj>

Fajardo, C., Gil-Díaz, M., Costa, G., Alonso, J., Guerrero, A., Nande, M. (2015). Residual impact of aged nZVI on heavy metal-polluted soils. *Science Of The Total Environment*, 535, 79-84. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.067

Fajardo, C., Ortíz, L., Rodríguez-Membibre, M., Nande, M., Lobo, M., Martín, M. (2012). Assessing the impact of zero-valent iron (ZVI) nanotechnology on soil microbial structure and functionality: A molecular approach. *Chemosphere*, 86(8), 802-808. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.11.041

Fajardo, C., Saccà, M., Martínez-Gomariz, M., Costa, G., Nande, M., Martín, M. (2013). Transcriptional and proteomic stress responses of a soil bacterium *Bacillus cereus* to nanosized zero-valent iron (nZVI) particles. *Chemosphere*, 93(6), 1077-1083. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.082

Fan, D., O'Carroll, D., Elliott, D., Xiong, Z., Tratnyek, P., Johnson, R., Garcia, A. (2016a). Selectivity of Nano Zerovalent Iron in In Situ Chemical Reduction: Challenges and Improvements. *Remediation Journal*, 26(4), 27-40. doi: 10.1002/rem.21481

Fan, D., O'Brien Johnson, G., Tratnyek, P., Johnson, R. (2016b). Sulfidation of Nano Zerovalent Iron (nZVI) for Improved Selectivity During In-Situ Chemical Reduction (ISCR). *Environmental Science & Technology*, 50(17), 9558-9565. doi: 10.1021/acs.est.6b02170

Fan, D., Lan, Y., Tratnyek, P., Johnson, R., Filip, J., O'Carroll, D. et al. (2017). Sulfidation of Iron-Based Materials: A Review of Processes and Implications for Water Treatment and Remediation. *Environmental Science & Technology*, 51(22), 13070-13085. doi: 10.1021/acs.est.7b04177

Filip, J., Karlický, F., Marušák, Z., Lazar, P., Černík, M., Otyepka, M., Zbořil, R. (2014). Anaerobic Reaction of Nanoscale Zerovalent Iron with Water: Mechanism and Kinetics. *The Journal Of Physical Chemistry C*, 118(25), 13817-13825. doi: 10.1021/jp501846f

Finkel, T., Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247. doi: 10.1038/35041687

Freyria, F., Esposito, S., Armandi, M., Deorsola, F., Garrone, E., Bonelli, B. (2017). Role of pH in the Aqueous Phase Reactivity of Zerovalent Iron Nanoparticles with Acid Orange 7, a Model Molecule of Azo Dyes. *Journal Of Nanomaterials*, 2017, 1-13. doi: 10.1155/2017/2749575

Gao, Y., Wang, F., Wu, Y., Naidu, R., Chen, Z. (2016). Comparison of degradation mechanisms of microcystin-LR using nanoscale zero-valent iron (nZVI) and bimetallic Fe/Ni and Fe/Pd nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 285, 459-466. doi: 10.1016/j.cej.2015.09.078

Grzelak, A., Wojewódzka, M., Meczynska-Wielgosz, S., Zuberek, M., Wojciechowska, D., Kruszewski, M. (2018). Crucial role of chelatable iron in silver nanoparticles induced DNA damage and cytotoxicity. *Redox Biology*, 15, 435-440. doi: 10.1016/j.redox.2018.01.006

Hamid, S., Bae, S., Lee, W., Amin, M., Alazba, A. (2015). Catalytic Nitrate Removal in Continuous Bimetallic Cu-Pd/Nanoscale Zerovalent Iron System. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54(24), 6247-6257. doi: 10.1021/acs.iecr.5b01127

Handy, R., von der Kammer, F., Lead, J., Hassellöv, M., Owen, R., Crane, M. (2008). The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17(4), 287-314. doi: 10.1007/s10646-008-0199-8

He, F., Li, Z., Shi, S., Xu, W., Sheng, H., Gu, Y. (2018). Dechlorination of Excess Trichloroethene by Bimetallic and Sulfidated Nanoscale Zero-Valent Iron. *Environmental Science & Technology*, 52(15), 8627-8637. doi: 10.1021/acs.est.8b01735

Hotze, E., Phenrat, T., Lowry, G. (2010). Nanoparticle Aggregation: Challenges to Understanding Transport and Reactivity in the Environment. *Journal Of Environment Quality*, 39(6), 1909. doi: 10.2134/jeq2009.0462

Hund-Rinke, K., Baun, A., Cupi, D., Fernandes, T., Handy, R., Kinross, J. et al. (2016). Regulatory ecotoxicity testing of nanomaterials – proposed modifications of OECD test guidelines based on laboratory experience with silver and titanium dioxide nanoparticles. *Nanotoxicology*, 10(10), 1442-1447. doi: 10.1080/17435390.2016.1229517

Jang, M., Lim, M., Hwang, Y. (2014). Potential environmental implications of nanoscale zero-valent iron particles for environmental remediation. *Environmental Health And Toxicology*, 29, e2014022. doi: 10.5620/eh.t.e2014022

Jiang, C., Liu, Y., Chen, Z., Megharaj, M., Naidu, R. (2013). Impact of iron-based nanoparticles on microbial denitrification by *Paracoccus* sp. strain YF1. *Aquatic Toxicology*, 142-143, 329-335. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.09.005

Jiang, C., Xu, X., Megharaj, M., Naidu, R., Chen, Z. (2015). Inhibition or promotion of biodegradation of nitrate by *Paracoccus* sp. in the presence of nanoscale zero-valent iron. *Science Of The Total Environment*, 530-531, 241-246. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.05.044

Kadar, E., Rooks, P., Lakey, C., White, D. (2012). The effect of engineered iron nanoparticles on growth and metabolic status of marine microalgae cultures. *Science Of The Total Environment*, 439, 8-17. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.09.010

Kah, J. (2013). Stability and Aggregation Assays of Nanoparticles in Biological Media. *Nanomaterial Interfaces In Biology*, 119-126. doi: 10.1007/978-1-62703-462-3_9

Karn, B., Kuiken, T., Otto, M. (2011). Nanotechnology and in situ remediation: a review of the benefits and potential risks. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(1), 165-178. doi: 10.1590/s1413-81232011000100020

Kašlík, J., Kolařík, J., Filip, J., Medřík, I., Tomanec, O., Petr, M. (2018). Nanoarchitecture of advanced core-shell zero-valent iron particles with controlled reactivity for contaminant removal. *Chemical Engineering Journal*, 354, 335-345. doi: 10.1016/j.cej.2018.08.015

Keenan, C., Goth-Goldstein, R., Lucas, D., Sedlak, D. (2009). Oxidative Stress Induced by Zero-Valent Iron Nanoparticles and Fe(II) in Human Bronchial Epithelial Cells. *Environmental Science & Technology*, 43(12), 4555-4560. doi: 10.1021/es9006383

Keller, A., Garner, K., Miller, R., Lenihan, H. (2012). Toxicity of Nano-Zero Valent Iron to Freshwater and Marine Organisms. *Plos ONE*, 7(8), e43983. doi: 10.1371/journal.pone.0043983

Kim, J., Park, H., Lee, C., Nelson, K., Sedlak, D., Yoon, J. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by Nanoparticulate Zerovalent Iron and Ferrous Ion. *Applied And Environmental Microbiology*, 76(22), 7668-7670. doi: 10.1128/aem.01009-10

Kocur, C., O'Carroll, D., Sleep, B. (2013). Impact of nZVI stability on mobility in porous media. *Journal Of Contaminant Hydrology*, 145, 17-25. doi: 10.1016/j.jconhyd.2012.11.001

Kuang, Y., Zhou, Y., Chen, Z., Megharaj, M., Naidu, R. (2013). Impact of Fe and Ni/Fe nanoparticles on biodegradation of phenol by the strain *Bacillus fusiformis* (BFN) at various pH values. *Bioresource Technology*, 136, 588-594. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.018

Kumar, N., Omoregie, E., Rose, J., Masion, A., Lloyd, J., Diels, L., Bastiaens, L. (2014). Inhibition of sulfate reducing bacteria in aquifer sediment by iron nanoparticles. *Water Research*, 51, 64-72. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.042

Lee, C., Kim, J., Lee, W., Nelson, K., Yoon, J., Sedlak, D. (2008). Bactericidal Effect of Zero-Valent Iron Nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environmental Science & Technology*, 42(13), 4927-4933. doi: 10.1021/es800408u

Lefevre, E., Bossa, N., Wiesner, M., Gunsch, C. (2016). A review of the environmental implications of in situ remediation by nanoscale zero valent iron (nZVI): Behavior, transport and impacts on microbial communities. *Science Of The Total Environment*, 565, 889-901. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.003

Lewinski, N., Colvin, V., Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small*, 4(1), 26-49. doi: 10.1002/sml.200700595

Li, H., Zhou, Q., Wu, Y., Fu, J., Wang, T., Jiang, G. (2009). Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): Antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 72(3), 684-692. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.09.027

Li, L., Hu, J., Shi, X., Fan, M., Luo, J., Wei, X. (2016a). Nanoscale zero-valent metals: a review of synthesis, characterization, and applications to environmental remediation. *Environmental Science And Pollution Research*, 23(18), 17880-17900. doi: 10.1007/s11356-016-6626-0

Li, X., Ai, L., Jiang, J. (2016b). Nanoscale zerovalent iron decorated on graphene nanosheets for Cr(VI) removal from aqueous solution: Surface corrosion retard induced the enhanced performance. *Chemical Engineering Journal*, 288, 789-797. doi: 10.1016/j.cej.2015.12.022

Li, Z., Greden, K., Alvarez, P., Gregory, K., Lowry, G. (2010). Adsorbed Polymer and NOM Limits Adhesion and Toxicity of Nano Scale Zerovalent Iron to *E. coli*. *Environmental Science & Technology*, 44(9), 3462-3467. doi: 10.1021/es9031198

Liu, A., Liu, J., Pan, B., Zhang, W. (2014). Formation of lepidocrocite (γ -FeOOH) from oxidation of nanoscale zero-valent iron (nZVI) in oxygenated water. *RSC Adv.*, 4(101), 57377-57382. doi: 10.1039/c4ra08988j

Liu, S., Hou, W., Qin, H., Wang, Y. (2015a). Oxidized LDL stimulates lipid peroxidation-derived DNA and protein adducts in human vascular endothelial and smooth muscle cells. *Journal Of Huazhong University Of Science And Technology [Medical Sciences]*, 35(2), 200-205. doi: 10.1007/s11596-015-1411-8

Liu, Y., Wang, Q., Zhang, Y., Ni, B. (2015b). Zero Valent Iron Significantly Enhances Methane Production from Waste Activated Sludge by Improving Biochemical Methane Potential Rather Than Hydrolysis Rate. *Scientific Reports*, 5(1). doi: 10.1038/srep08263

Liu, Y., Zhang, Y., Ni, B. (2015c). Zero valent iron simultaneously enhances methane production and sulfate reduction in anaerobic granular sludge reactors. *Water Research*, 75, 292-300. doi: 10.1016/j.watres.2015.02.056

Liu, Z., Zhang, F. (2010). Nano-zerovalent iron contained porous carbons developed from waste biomass for the adsorption and dechlorination of PCBs. *Bioresource Technology*, 101(7), 2562-2564. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.074

Lowry, G., Gregory, K., Apte, S., Lead, J. (2012). Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environmental Science & Technology*, 46(13), 6893-6899. doi: 10.1021/es300839e

Lu, H., Wang, J., Ferguson, S., Wang, T., Bao, Y., Hao, H. (2016). Mechanism, synthesis and modification of nano zerovalent iron in water treatment. *Nanoscale*, 8(19), 9962-9975. doi: 10.1039/c6nr00740f

Ma, Y., Elankumaran, S., Marr, L., Vejerano, E., Pruden, A. (2014). Toxicity of engineered nanomaterials and their transformation products following wastewater treatment on A549 human lung epithelial cells. *Toxicology Reports*, 1, 871-876. doi: 10.1016/j.toxrep.2014.08.017

Ma, Y., Metch, J., Vejerano, E., Miller, I., Leon, E., Marr, L. et al. (2015). Microbial community response of nitrifying sequencing batch reactors to silver, zero-valent iron, titanium dioxide and cerium dioxide nanomaterials. *Water Research*, 68, 87-97. doi: 10.1016/j.watres.2014.09.008

Manke, A., Wang, L., Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Biomed Research International*, 2013, 1-15. doi: 10.1155/2013/942916

Marnett, L. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), 361-370. doi: 10.1093/carcin/21.3.361

Mueller, N., Braun, J., Bruns, J., Černík, M., Rissing, P., Rickerby, D., Nowack, B. (2011). Application of nanoscale zero valent iron (NZVI) for groundwater remediation in Europe. *Environmental Science And Pollution Research*, 19(2), 550-558. doi: 10.1007/s11356-011-0576-3

Nair, J., Carmichael, P. L., Fernando, R. C., Phillips, D. H., Strain, A. J., Bartsch, H. (1998). Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in the liver of patients with the genetic metal storage disorders Wilson's disease and primary hemochromatosis. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 7(5), 435-440.

Nel, A. (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, 311(5761), 622-627. doi: 10.1126/science.1114397

Němeček, J., Lhotský, O., Cajthaml, T. (2014). Nanoscale zero-valent iron application for in situ reduction of hexavalent chromium and its effects on indigenous microorganism populations. *Science Of The Total Environment*, 485-486, 739-747. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.105

Němeček, J., Pokorný, P., Lacinová, L., Černík, M., Masopustová, Z., Lhotský, O. et al. (2015). Combined abiotic and biotic in-situ reduction of hexavalent chromium in groundwater using nZVI and whey: A remedial pilot test. *Journal Of Hazardous Materials*, 300, 670-679. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.07.056

Němeček, J., Pokorný, P., Lhotský, O., Knytl, V., Najmanová, P., Steinová, J. et al. (2016). Combined nano-biotechnology for in-situ remediation of mixed contamination of groundwater by hexavalent chromium and chlorinated solvents. *Science Of The Total Environment*, 563-564, 822-834. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.019

Nguyen, N., Špánek, R., Kasalický, V., Ribas, D., Vlková, D., Řeháková, H. et al. (2018). Different effects of nano-scale and micro-scale zero-valent iron particles on

planktonic microorganisms from natural reservoir water. *Environmental Science: Nano*, 5(5), 1117-1129. doi: 10.1039/c7en01120b

Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823-839. doi: 10.1289/ehp.7339

Oprčkal, P., Mladenovič, A., Vidmar, J., Mauko Pranjić, A., Milačić, R., Ščančar, J. (2017). Critical evaluation of the use of different nanoscale zero-valent iron particles for the treatment of effluent water from a small biological wastewater treatment plant. *Chemical Engineering Journal*, 321, 20-30. doi: 10.1016/j.cej.2017.03.104

Otero-González, L., García-Saucedo, C., Field, J., Sierra-Álvarez, R. (2013). Toxicity of TiO₂, ZrO₂, Fe₀, Fe₂O₃, and Mn₂O₃ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere*, 93(6), 1201-1206. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.075

Pádrová, K., Lukavský, J., Nedbalová, L., Čejková, A., Cajthaml, T., Sigler, K. (2014). Trace concentrations of iron nanoparticles cause overproduction of biomass and lipids during cultivation of cyanobacteria and microalgae. *Journal Of Applied Phycology*, 27(4), 1443-1451. doi: 10.1007/s10811-014-0477-1

Phenrat, T., Long, T., Lowry, G., Veronesi, B. (2009). Partial Oxidation (“Aging”) and Surface Modification Decrease the Toxicity of Nanosized Zerovalent Iron. *Environmental Science & Technology*, 43(1), 195-200. doi: 10.1021/es801955n

Phenrat, T., Saleh, N., Sirk, K., Tilton, R., Lowry, G. (2007). Aggregation and Sedimentation of Aqueous Nanoscale Zerovalent Iron Dispersions. *Environmental Science & Technology*, 41(1), 284-290. doi: 10.1021/es061349a

Pádrová, K., Čejková, A., Cajthaml, T., Kolouchová, I., Vítová, M., Sigler, K., Řezanka, T. (2015). Enhancing the lipid productivity of yeasts with trace concentrations of iron nanoparticles. *Folia Microbiologica*, 61(4), 329-335. doi: 10.1007/s12223-015-0442-7

Reinsch, B., Forsberg, B., Penn, R., Kim, C., Lowry, G. (2010). Chemical Transformations during Aging of Zerovalent Iron Nanoparticles in the Presence of Common Groundwater Dissolved Constituents. *Environmental Science & Technology*, 44(9), 3455-3461. doi: 10.1021/es902924h

Ribas, D., Černík, M., Benito, J., Filip, J., Marti, V. (2017). Activation process of air stable nanoscale zero-valent iron particles. *Chemical Engineering Journal*, 320, 290-299. doi: 10.1016/j.cej.2017.03.056

Saccà, M., Fajardo, C., Martinez-Gomariz, M., Costa, G., Nande, M., Martin, M. (2014a). Molecular Stress Responses to Nano-Sized Zero-Valent Iron (nZVI) Particles in the Soil Bacterium *Pseudomonas stutzeri*. *Plos ONE*, 9(2), e89677. doi: 10.1371/journal.pone.0089677

Saccà, M., Fajardo, C., Costa, G., Lobo, C., Nande, M., Martin, M. (2014b). Integrating classical and molecular approaches to evaluate the impact of nanosized zero-valent iron (nZVI) on soil organisms. *Chemosphere*, 104, 184-189. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.11.013

Saccà, M., Fajardo, C., Nande, M., Martín, M. (2013). Effects of Nano Zero-Valent Iron on *Klebsiella oxytoca* and Stress Response. *Microbial Ecology*, 66(4), 806-812. doi: 10.1007/s00248-013-0269-1

- Saleh, N., Phenrat, T., Sirk, K., Dufour, B., Ok, J., Sarbu, T. (2005). Adsorbed Triblock Copolymers Deliver Reactive Iron Nanoparticles to the Oil/Water Interface. *Nano Letters*, 5(12), 2489-2494. doi: 10.1021/nl0518268
- Scandalios, J. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, 38(7), 995-1014. doi: 10.1590/s0100-879x2005000700003
- Ševčíková, M., Modrá, H., Slaninová, A., Svobodová, Z. (2011). Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Veterinární Medicína*, 56(No. 11), 537-546. doi: 10.17221/4272-vetmed
- Ševců, A., El-Temsah, Y., Joner, E., Černík, M. (2011). Oxidative Stress Induced in Microorganisms by Zero-valent Iron Nanoparticles. *Microbes And Environments*, 26(4), 271-281. doi: 10.1264/jsme2.me11126
- Ševců, A., El-Temsah, Y., Filip, J., Joner, E., Bobčíková, K., Černík, M. (2017). Zero-valent iron particles for PCB degradation and an evaluation of their effects on bacteria, plants, and soil organisms. *Environmental Science And Pollution Research*, 24(26), 21191-21202. doi: 10.1007/s11356-017-9699-5
- Shi, Z., Fan, D., Johnson, R., Tratnyek, P., Nurmi, J., Wu, Y., Williams, K. (2015). Methods for characterizing the fate and effects of nano zerovalent iron during groundwater remediation. *Journal Of Contaminant Hydrology*, 181, 17-35. doi: 10.1016/j.jconhyd.2015.03.004
- Singh, R., Singh, A., Misra, V., Singh, R. (2011). Degradation of Lindane Contaminated Soil Using Zero-Valent Iron Nanoparticles. *Journal Of Biomedical Nanotechnology*, 7(1), 175-176. doi: 10.1166/jbn.2011.1256
- Sohn, K., Kang, S., Ahn, S., Woo, M., Yang, S. (2006). Fe(0) Nanoparticles for Nitrate Reduction: Stability, Reactivity, and Transformation. *Environmental Science & Technology*, 40(17), 5514-5519. doi: 10.1021/es0525758
- Sovová, T., Kočí, V. (2012). Ecotoxicology of Nanomaterials. *Chemické Listy*, 106, 82-87
- Stefaniuk, M., Oleszczuk, P., Ok, Y. (2016). Review on nano zerovalent iron (nZVI): From synthesis to environmental applications. *Chemical Engineering Journal*, 287, 618-632. doi: 10.1016/j.cej.2015.11.046
- Su, L., Shi, X., Guo, G., Zhao, A., Zhao, Y. (2013). Stabilization of sewage sludge in the presence of nanoscale zero-valent iron (nZVI): abatement of odor and improvement of biogas production. *Journal Of Material Cycles And Waste Management*, 15(4), 461-468. doi: 10.1007/s10163-013-0150-9
- Tian, H., Liang, Y., Zhu, T., Zeng, X., Sun, Y. (2018). Surfactant-enhanced PEG-4000-NZVI for remediating trichloroethylene-contaminated soil. *Chemosphere*, 195, 585-593. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.070
- Tournebize, J., Sapin-Minet, A., Bartosz, G., Leroy, P., Boudier, A. (2013). Pitfalls of assays devoted to evaluation of oxidative stress induced by inorganic nanoparticles. *Talanta*, 116, 753-763. doi: 10.1016/j.talanta.2013.07.077
- Uchida, K. (2015). Aldehyde adducts generated during lipid peroxidation modification of proteins. *Free Radical Research*, 49(7), 896-904. doi: 10.3109/10715762.2015.1036052

Wang, Y., O'Connor, D., Shen, Z., Lo, I., Tsang, D., Pehkonen, S. (2019). Green synthesis of nanoparticles for the remediation of contaminated waters and soils: Constituents, synthesizing methods, and influencing factors. *Journal Of Cleaner Production*, 226, 540-549. doi: 10.1016/j.jclepro.2019.04.128

Wu, D., Shen, Y., Ding, A., Mahmood, Q., Liu, S., Tu, Q. (2013). Effects of nanoscale zero-valent iron particles on biological nitrogen and phosphorus removal and microorganisms in activated sludge. *Journal Of Hazardous Materials*, 262, 649-655. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.09.038

Xu, G., Wang, J., Lu, M. (2014). Complete debromination of decabromodiphenyl ether using the integration of Dehalococcoides sp. strain CBDB1 and zero-valent iron. *Chemosphere*, 117, 455-461. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.07.077

Yan, J., Qian, L., Gao, W., Chen, Y., Ouyang, D., Chen, M. (2017). Enhanced Fenton-like Degradation of Trichloroethylene by Hydrogen Peroxide Activated with Nanoscale Zero Valent Iron Loaded on Biochar. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/srep43051

Yan, W., Herzing, A., Li, X., Kiely, C., Zhang, W. (2010). Structural Evolution of Pd-Doped Nanoscale Zero-Valent Iron (nZVI) in Aqueous Media and Implications for Particle Aging and Reactivity. *Environmental Science & Technology*, 44(11), 4288-4294. doi: 10.1021/es100051q

Yang, B., Tian, Z., Zhang, L., Guo, Y., Yan, S. (2015). Enhanced heterogeneous Fenton degradation of Methylene Blue by nanoscale zero valent iron (nZVI) assembled on magnetic Fe₃O₄/reduced graphene oxide. *Journal Of Water Process Engineering*, 5, 101-111. doi: 10.1016/j.jwpe.2015.01.006

Zbořil, R., Andrlé, M., Oplustil, F., Machala, L., Tuček, J., Filip, J. et al. (2012). Treatment of chemical warfare agents by zero-valent iron nanoparticles and ferrate(VI)/(III) composite. *Journal Of Hazardous Materials*, 211-212, 126-130. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.10.094

Zhang, M., He, F., Zhao, D., Hao, X. (2011). Degradation of soil-sorbed trichloroethylene by stabilized zero valent iron nanoparticles: Effects of sorption, surfactants, and natural organic matter. *Water Research*, 45(7), 2401-2414. doi: 10.1016/j.watres.2011.01.028

Zhang, Y., Zhi, Y., Liu, J., Ghoshal, S. (2018a). Sorption of Perfluoroalkyl Acids to Fresh and Aged Nanoscale Zerovalent Iron Particles. *Environmental Science & Technology*, 52(11), 6300-6308. doi: 10.1021/acs.est.8b00487

Zhang, Z., Gao, P., Cheng, J., Liu, G., Zhang, X., Feng, Y. (2018b). Enhancing anaerobic digestion and methane production of tetracycline wastewater in EGSB reactor with GAC/NZVI mediator. *Water Research*, 136, 54-63. doi: 10.1016/j.watres.2018.02.025

Zhao, X., Liu, W., Cai, Z., Han, B., Qian, T., Zhao, D. (2016). An overview of preparation and applications of stabilized zero-valent iron nanoparticles for soil and groundwater remediation. *Water Research*, 100, 245-266. doi: 10.1016/j.watres.2016.05.019

Zhuang, Y., Ahn, S., Seyfferth, A., Masue-Slowey, Y., Fendorf, S., Luthy, R. (2011). Dehalogenation of Polybrominated Diphenyl Ethers and Polychlorinated Biphenyl by Bimetallic, Impregnated, and Nanoscale Zerovalent Iron. *Environmental Science & Technology*, 45(11), 4896-4903. doi: 10.1021/es104312h

Zou, Y., Wang, X., Khan, A., Wang, P., Liu, Y., Alsaedi, A. (2016). Environmental Remediation and Application of Nanoscale Zero-Valent Iron and Its Composites for the Removal of Heavy Metal Ions: A Review. *Environmental Science & Technology*, 50(14), 7290-7304. doi: 10.1021/acs.est.6b01897

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli prof. RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, Ph.D. za odborné vedení a podporu v průběhu celého doktorského studia. Rovněž bych chtěl poděkovat své rodině a kolegům z Laboratoře environmentální biotechnologie za podporu a pomoc při experimentální práci.

Přílohy

Publikace 1	45
Publikace 2	56
Publikace 3	66
Publikace 4	87
Publikace 5	100
Publikace 6	118