

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyzikální chemie



Studium toxických účinků nanočástic stříbra vůči organismu

Eisenia foetida

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:

Veronika Urbanová

Studijní program / obor:

B1407 Chemie / Ekochemie

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

V Olomouci 2012

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 14. 5. 2012

Veronika Urbanová

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D., za odborné vedení bakalářské práce, poskytování rad a materiálových podkladů k práci. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Robertu Pruckovi, Ph.D. za pomoc při přípravě disperze nanočástic stříbra a Bc. Janu Kolaříkovi za pomoc při stanovování obsahu stříbra metodou atomové absorpční spektroskopie.

Bibliografická identifikace

Autor	Veronika Urbanová
Název práce	Studium toxických účinků nanočástic stříbra vůči organismu <i>Eisenia foetida</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012

Abstrakt

Vzhledem k rostoucí komercializaci produktů obsahujících nanočástice stříbra se zvyšuje riziko interakce těchto látek s životním prostředím, tudíž i s organismy v něm žijícími. Cílem bakalářské práce bylo stanovit toxicitu nanočástic stříbra vůči půdnímu organismu *Eisenia foetida* (Žížala hnojní). Nanočástice stříbra byly připraveny pomocí Tollensovy metody, redukcí amoniakálního komplexu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou a redukcí AgNO_3 tetrahydridoboritanem sodným. Hodnocen byl toxický účinek stříbrných nanočástic na úmrtnost organismu, dále pak vliv na hmotnost a schopnost akumulace stříbra v těle *Eisenia foetida*.

Klíčová slova	nanočástice stříbra, ekotoxicita, Žížala hnojní
Počet stran	43
Jazyk	Český

Bibliographic identification

Author	Veronika Urbanová
Title	Study of the Toxic Effects of Silver Nanoparticles to <i>Eisenia Foetida</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
The year of presentation	2012

Abstract Due to the increasing commercialization of products containing silver nanoparticles increases the risk of these substances interact with the environment, so with organisms living in it. The aim of this thesis was to determine toxicity of silver nanoparticles to the organism *Eisenia foetida*. Silver nanoparticles were prepared by the modified Tollens process, by a reduction of ammonia complex $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ with a maltose as a reduction agent and by a reduction of AgNO_3 with a sodium borohydride as a reduction agent. The toxic effect of silver nanoparticles to the mortality and weight of *Eisenia foetida* were evaluated. The ability of silver accumulation in the mentioned organism was also determined.

Keywords	silver nanoparticles, ecotoxicity, <i>Eisenia foetida</i>
Number of pages	43
Language	Czech

Obsah

Úvod	8
Teoretická část	9
1 Disperzní soustavy	10
2 Koloidní soustavy	11
2.1 Kinetické vlastnosti koloidních soustav	11
2.1.1 Tepelný pohyb	11
2.1.2 Difúze	12
2.1.3 Osmóza	12
2.1.4 Sedimentace	13
2.2 Optické vlastnosti koloidních soustav	14
2.2.1 Rozptyl světla	14
2.2.2 Absorpce světla	16
3 Elektrické vlastnosti koloidních soustav	16
3.1 Elektrická dvojvrstva	16
3.2 Stabilita koloidních částic	17
4 Koloidní stříbro	18
4.1 Příprava koloidních soustav	18
4.1.1 Dispergační metody	19
4.1.2 Kondenzační metody	19
4.2 Využití nanočástic stříbra	20
5 Toxikologie	21
5.1 Ekotoxikologie	21
5.2 Toxicita stříbra	22
5.3 Ekotoxicita stříbra	23
5.4 Ekotoxicita vůči půdním organismům	23
Experimentální část	25
6 Experimentální část	26
6.1 Chemikálie	26
6.2 Přístrojové vybavení	26
6.3 Příprava a zkoncentrování koloidního stříbra	27

6.4 Testování akutní toxicity	27
6.5 Bioakumulace stříbra v testovaném organismu	29
7 Výsledky a diskuse	29
7.1 Příprava a zkoncentrování koloidního stříbra	29
7.2 Test akutní toxicity na umělé půdě vůči organismu <i>Eisenia foetida</i>	32
7.2.1 Vliv koloidního stříbra na mortalitu organismu	32
7.2.2 Vliv koloidního stříbra na hmotnost organismu	34
7.2.3 Bioakumulace stříbra v organismu <i>Eisenia foetida</i>	36
8 Závěr	38
9 Summary	40
10 Literatura	42

Úvod

Nanotechnologie je skupina rozvíjejících se technologií, které pracují s částicemi v měřítku řádově nanometrů. Nanotechnologie je úzce spjata s koloidní chemií. První zmínky o koloidních částicích jsou datovány do pátého století př. n. l. V tehdejší době bylo v Egyptě a Číně objeveno tzv. rozpustné zlato, které se používalo pro estetické a lékařské účely. V dnešní době je využití nanočástic stříbra daleko rozsáhlejší. Nachází uplatnění v mnoha odvětvích průmyslu, neméně ve zdravotnictví a životním prostředí. Díky svým antibakteriálním vlastnostem se stává součástí textilních vláken, deodorantů, pracích prášků, mýdel, dezinfekčních přípravků aj¹. Aktuální je studium baktericidních vlastností nanomateriálů zejména kvůli nárůstu rezistentních kmenů bakterií vůči nejsilnějším antibiotikům. Jejich baktericidní účinky závisejí na velikosti nanočástic². V nedávné době bylo odhaleno, že stříbrné nanočástice by byly schopny ochránit zdravé buňky od buněk napadených virem HIV. Rovněž byly testovány keramické filtry impregnované koloidním stříbrem. Tyto filtry slouží k domácí úpravě vody a jsou považovány za efektivní technologii v čištění vod³.

V současné době není přesně známo účinků nanočástic stříbra vůči organismům a životnímu prostředí. A rovněž vzhledem k rostoucímu používání produktů nanotechnologie se provádějí ekotoxikologické testy na různorodých organismech, živočišných i rostlinných. Ekotoxikologie umožňuje sledovat a předvídat nepříznivé vlivy látek na živé organismy a ekosystémy. Testování případných nepříznivých účinků látek je důležité nejen z pohledu ochrany životního prostředí, ale také z pohledu hospodářského. Cílem této práce bylo prokázat vliv nanočástic stříbra na Žížalu hnojní (*Eisenia foetida*) pomocí testu akutní toxicity, který se hodnotil po 7 a 14-ti dnech. Tento druh organismu byl vybrán pro svůj rychlý růst a reprodukci⁴. Je velmi pravděpodobné, že komerční produkty obsahující nanočástice stříbra nebudou speciálně likvidovány a dostanou se na veřejné skládky, čímž dojde k interakci s půdou. Z toho důvodu byl pro experiment zvolen půdní organismus.

Teoretická část

1 Disperzní soustavy

Soustavy tvořené minimálně dvěma různými látkami či fázemi se nazývají disperzní soustavy. Jedna z látek vždy tvoří základní spojité prostředí – disperzní prostředí, v němž je rozptýlena látka druhá – disperzní fáze. Takovou soustavu, která má tyto dvě fáze, nazýváme soustavou heterogenní. Částice heterogenní soustavy lze pozorovat buď optickým, nebo elektronovým mikroskopem. Obsahuje-li disperzní soustava dvě složky a jednu fázi, pak jde o soustavu homogenní⁵.

Rozdělení disperzních soustav

Povahu disperzní soustavy ovlivňuje více faktorů. Především je to velikost a tvar částic, skupenství disperzního prostředí a disperzní fáze. Podle velikosti částic rozdělujeme disperzní soustavy na tři typy¹.

Soustavy s nejmenšími částicemi (do 10^{-9} m) se nazývají analytické disperzní soustavy, protože nejsou viditelné ani elektronovým mikroskopem a jsou prokazatelné pouze chemickou analýzou. Vznikají samovolným rozpouštěním a jsou stálé.

Soustavy s velkými částicemi se nazývají hrubé disperzní soustavy. Ty se dále dělí na makrodisperzní – částice jsou viditelné pouhým okem (větší než 50 μm) a mikrodisperzní – částice jsou viditelné optickým mikroskopem (do 10^{-6} m). Vznikají dispergováním nebo srážením a zanikají samovolně, jelikož jsou nestálé. Gely tvoří jen výjimečně.

Koloidní disperzní soustavy tvoří částice velikosti mezi 10^{-9} m a 10^{-6} m a lze je pozorovat elektronovým mikroskopem. Velikost částic disperzní soustavy se vyjadřuje tzv. stupněm disperzity, což je převrácená hodnota lineárního rozměru. S rostoucím stupněm disperzity klesá velikost částic a stoupá plocha povrchu vůči objemu⁵. Na rozdíl od analytických soustav je pro koloidy charakteristická tvorba gelů.

Podle tvaru dispergovaných částic, který ovlivňuje optické a mechanické vlastnosti, se soustavy dělí na globulárně, fibrilárně a laminárně disperzní. Dále lze rozdělit soustavy podle velikosti částic v nich obsažené. Monodisperzní (uniformní) soustavy obsahují částice o stejné velikosti, ale jsou poměrně vzácné. Disperzní systémy jsou většinou polydisperzní (neuniformní), jsou tvořeny částicemi různých velikostí. Homodisperzní soustavy jsou charakteristické obsahem částic stejného tvaru, naopak heterodisperzní soustavy obsahují částice různých tvarů⁶.

2 Koloidní soustavy

Koloidní chemie se zabývá studiem vlastností, možností přípravy a využití soustav, ve kterých je jedna látka velmi jemně (koloidně) rozptýlena ve druhé. Takové soustavy netvoří ani homogenní směsi, ale ani řádně se chovající vícefázové soustavy¹.

Koloidní soustavy lze rozčlenit do mnoha kategorií podle různých parametrů. Avšak je účelné rozdělit je do tří skupin a to na soustavy: lyofobní a lyofilní a asociativní koloidní soustavy. Lyofobní soustavy obsahují disperzní prostředí a disperzní podíl, které jsou ostře odděleny fázovým rozhraním, jenž výrazně ovlivňuje jejich vlastnosti. Vznikají umělým dispergováním. Disperzní podíl dává přednost kompaktnímu stavu před rozptýlením v disperzním prostředí. Z tohoto důvodu jsou pojmenovány lyofobní, tzn. „jevící strach před rozpouštědlem“^{6c}. Lyofilní soustavy tvoří disperzní prostředí a disperzní podíl, které spolu tvoří jednu fázi. Vznikají samovolným rozpouštěním, které je podmíněno afinitou makromolekul k disperznímu prostředí. Proto jsou tyto soustavy označovány jako lyofilní, tzn. „jevící náklonnost k rozpouštědлу“^{6c}. Třetí skupinu tvoří asociativní koloidní soustavy vznikající samovolným reverzibilním spojováním molekul povrchově aktivních látek v pravém roztoku. Tyto soustavy nemají pevně definované fázové rozhraní, protože se v nich neustále ustavuje rovnováha. Charakteristickou vlastností koloidních soustav je tvorba gelů, což je přechod z kapalného do pevného stavu. Částice se spojují za účelem tvorby pevné trojrozměrné síťovité struktury¹.

2.1 Kinetické vlastnosti koloidních soustav

2.1.1 Tepelný pohyb

Částice koloidního systému vykonávají chaotický termický pohyb. V důsledku srážek disperzní částice s molekulami disperzního prostředí se částice pohybují různými směry po velmi složité dráze. Tento pohyb je pojmenován po svém objeviteli jako Brownův pohyb (Robert Brown 1827) a je pozorovatelný mikroskopem nebo ultramikroskopem. Intenzita tepelného pohybu klesá s rostoucím rozměrem částic. U částic větších než 4

um již tepelný pohyb není pozorovatelný⁶. Brownův pohyb se projevuje jako difúze a je příčinou různých membránových jevů, např. osmózy.

2.1.2 Difúze

Difúzí dochází v soustavách s koncentračním gradientem k samovolnému vyrovnávání koncentrací. Stejně jako u tepelného pohybu, s rostoucím rozměrem částic rychlost difúze klesá. Lze ji vyjádřit difúzním tokem J_i ¹:

$$J_i = u_i \cdot c_i$$

kde u_i je střední rychlost toku částic a c_i jejich koncentrace.

Difúze se řídí I. Fickovým zákonem, podle kterého je difúzní tok při stacionární difúzi úměrný koncentračnímu gradientu¹:

$$J_i = -D_i \cdot \frac{dc_i}{dx}$$

Kde D_i je difúzní koeficient [$m^2 \cdot s^{-1}$] a dc/dx je koncentrační gradient, který se při stacionární difúzi s časem nemění.

Roku 1908 odvodil Einstein vztah mezi difúzním koeficientem, koeficientem tření a absolutní teplotou, tzv. Einsteinovu rovnici pro difúzní koeficient¹:

$$D_i = \frac{k_B T}{f_i}$$

Kde k_B je Boltzmanova konstanta, T je termodynamická teplota a f_i je koeficient tření, který závisí na teplotě, rozměrech částice a na vlastnostech disperzního prostředí.

2.1.3 Osmóza

Děj, při kterém jsou obě fáze, disperzní systém a disperzní prostředí, odděleny polopropustnou membránou, se nazývá osmóza. Membrána propouští pouze molekuly disperzního prostředí (rozpouštědla). Systém se snaží o vyrovnání koncentrací na obou stranách membrány, což vede k toku rozpouštědla směrem do roztoku. Přetlak, kterým membrána odděluje roztok od čistého rozpouštědla, se nazývá osmotický tlak π , pro nějž platí vztah označovaný jako van't Hoffova rovnice⁵:

$$\pi = c \cdot R \cdot T$$

kde c je látková koncentrace složky, která neprochází membránou a R je univerzální plynová konstanta.

U koloidních soustav se nejčastěji používají rovnice, kde je koncentrace vyjádřena buď jako počet disperzních částic v jednotce objemu v :

$$\pi = v \cdot \frac{R}{N_A} \cdot T = v \cdot k_B \cdot T$$

nebo pomocí hmotnostní koncentrace w :

$$\pi = \frac{w}{M} \cdot R \cdot T$$

kde N_A je Avogadrova konstanta a M je střední molární hmotnost.

Osmotický tlak závisí na počtu částic. S přibývajícím seskupováním částic tento tlak klesá a naopak. Lze ho měřit pomocí tzv. osmometru¹.

2.1.4 Sedimentace

Na koloidní částice působí silové pole (gravitační nebo odstředivé), které je uvádí do pohybu a nazývá se sedimentace. Odstředivé silové pole má větší účinek než gravitační. V gravitačním poli klesají částice ke dnu, jsou-li těžší než disperzní prostředí. Je-li tomu naopak, stoupají na povrch. V odstředivém poli probíhá sedimentace radiálním směrem⁵.

Rychlost sedimentace v gravitačním poli

Rychlost sedimentace koloidních částic v gravitačním poli je malá, často neměřitelná. Pro sedimentační rychlost, kterou lze použít ke stanovení velikosti částic, platí vztah¹:

$$u_{sed} = \frac{2}{9} \cdot \frac{(\rho_i - \rho_o)}{\eta_o} \cdot r_i^2 \cdot g$$

kde ρ_i je hustota sedimentující částice, ρ_o je hustota disperzního prostředí, η_o je viskozita prostředí, r_i je poloměr kulovité částice a g je gravitační zrychlení.

Rychlost sedimentace v odstředivém poli

Sedimentaci lze urychlit odstředováním, protože jeho silové pole je až 10^6 krát větší než zemská gravitace. Rychlost sedimentace v odstředivém poli je dána vztahem¹:

$$u_{sed} = \frac{v_i \cdot \omega^2 \cdot x}{f_i} \cdot (\rho_i - \rho_o)$$

kde $v_i = 4/3\pi r^3$ je objem sedimentující částice, ω je úhlová rychlost, x je vzdálenost od osy otáčení, f_i je koeficient tření.

Odstředivé zrychlení je dáno součinem $\omega^2 \cdot x$, je závislé na poloze částice x , a proto se rychlost sedimentačního pohybu částice v ustáleném stavu mění s polohou.

2.2 Optické vlastnosti koloidních soustav

Při průchodu světla koloidní soustavou dochází ke dvěma dějům a to k pravé absorpci a rozptylu světla. Tyto efekty jsou závislé na charakteru koloidní soustavy, velikosti a tvaru částic v soustavě.

2.2.1 Rozptyl světla

Při tomto jevu dochází k opětovné emisi záření ve formě světelné energie. Koloidní soustavy jsou v závislosti na velikosti částic proti světlu průhledné, ale rozptylují určitý podíl paprsků do stran, čímž získává paprsek po průchodu menší intenzitu. Tato intenzita roste s velikostí disperzních částic a lze ji měřit fotometricky. Právě větší rozměr disperzních částic se projeví viditelným rozptylem světla, opalescencí. Při bočním osvětlení se svazek paprsků procházející disperzním prostředím rozšíří a jeví se jako kužel. Tento efekt byl pojmenován po svém objeviteli jako Tyndallův. Na Tyndallovu jevu je založen princip ultramikroskopu⁵.

Rozptyl světla koloidními částicemi popsal roku 1871 Lord Rayleigh. Při šíření světla prostředím dochází k jeho polarizaci a molekuly získávají dipólový moment, které jsou zdrojem sekundárního vlnění. Ve stejnorodém prostředí se podle Huygensova principu světlo šíří ve směru primární světelné vlny. V nestejnorodém prostředí se jeho polarizovatelnost od polarizovatelnosti částice liší, a proto se světlo jeví jako rozptýlené, šíří se všemi směry a jeho intenzita je v různých směrech odlišná. Tato

úvaha byla vyjádřena vztahem pro intenzitu světla rozptýleného jednotkou objemu velmi zředěného disperzní soustavy pod úhlem α ¹:

$$I_{\alpha} = I_0 \frac{\pi^2 \cdot \alpha^2 \cdot \nu}{\epsilon_0^2 \cdot \lambda^4 \cdot r^2} \cdot \frac{(1 + \cos^2 \alpha)}{2}$$

kde I_0 je celková intenzita dopadajícího záření, ν je počet částic v jednotce objemu, ϵ_0 je permitivita vakua, λ je vlnová délka záření, r je vzdálenost detektoru od zdroje záření a α je úhel pozorování.

Rayleighova teorie je platná pouze pro velmi zředěné disperzní soustavy obsahující malé částice, přibližně kulovitého tvaru. Aby bylo dosaženo rozptylu světla, je nutná optická heterogenita soustavy. Při rozptylu světla nedochází ke změně vlnové délky a tento typ rozptylu je nazván jako elastický. Tímto je vysvětlen děj, kdy je barva opalescence⁸ totožná s barvou dopadajícího světla při ozáření soustavy monochromatickým světlem. Pokud projde soustavou bílé světlo kratších vlnových délek (modré), je mnohem více rozptýleno než světlo dlouhovlnné (červené). Proto se modré světlo používá k maskování a červené k signalizaci.

Rozptyl světla se měří pomocí nefelometrie nebo turbidimetrie. Rozdíl mezi nimi je v uspořádání detektoru. Při nefelometrii je detektor umístěn kolmo na disperzní systém, zatímco u turbidimetrie je rovnoběžně za ním. Pro zpracování experimentálních dat se zavádí tzv. Rayleighův poměr R_{θ} ¹, který umožňuje přepočítání intenzity naměřeného rozptýleného světla na intenzitu dopadajícího světla:

$$R_{\theta} = \frac{I_{\theta}}{I_0} \cdot \frac{r^2}{(1 + \cos^2 \theta)}$$

kde I_{θ} je naměřená intenzita rozptýleného světla pod úhlem θ , I_0 je intenzita dopadajícího světla, r je vzdálenost a θ úhel detektoru od kyvety.

Metoda, která je založena na registraci rozptylu světla na jednotlivých částicích, se nazývá ultramikroskopie a využívá tzv. Tyndallovu jevu⁷. Do objektivu ultramikroskopu vstupuje světlo rozptýlené disperzními částicemi, nikoliv primární paprsek. Jednotlivé částice se poté jeví jako zářící body na temném pozadí. Tímto uspořádáním ale nedojde ke zvětšení rozlišovací schopnosti ultramikroskopu, tudíž nelze přímo zjistit velikost a tvar částic. Lze ale odhadnout jejich střední velikost a tvar. Pokud jsou částice v ultramikroskopu viditelné jako stálé, neblíkající, jsou izometrické, v opačném případě anizometrické.

Problém s přímým studiem velikosti a tvaru koloidně disperzních částic byl vyřešen s objevem elektronové mikroskopie. Hlavní rozdíl je v použití svazku rychle letících elektronů namísto světelných paprsků.

2.2.2 Absorpce světla

Při tomto ději dochází k pohlcení záření, čímž se zvýší vnitřní energie molekul systému a přemění se v teplo. Absorpci světla A látkou popisuje zákon Lambert-Beerův⁵:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde I_0 je intenzita dopadajícího světla na látku, I je intenzita záření prošlého látkou, ε je molární absorpční koeficient, c je koncentrace látky a l tloušťka vrstvy, kterou paprsek prochází.

3 Elektrické vlastnosti koloidních soustav

Fázová rozhraní ve většině koloidních systémů s vodným prostředím nesou elektrický náboj, který je důležitý z hlediska stability těchto systémů. Tento náboj vzniká různými způsoby, např. ionizací povrchových vrstev, rozštěpením krystalu, preferenční adsorpcí jednoho druhu iontů aj.

3.1 Elektrická dvojrstva

Nabitý povrch přitahuje z roztoku ionty opačného znaménka, tzv. protiionty, které náboj povrchu neutralizují a vytvářejí tak útvar složený ze dvou opačně nabitých vrstev, elektrickou dvojrstvu. Mezi nabitým povrchem a roztokem je rozdíl elektrických potenciálů. Tento nejjednodušší model elektrické dvojrstvy, který lze chápat jako deskový kondenzátor, vypracoval roku 1879 Helmholtz. Jeho teorii však později doplnili Gouy, Chapman a Stern.

Gouy a Chapman vycházeli z předpokladu, že roztok iontů je ideální. Podle jejich teorie je k první vrstvě iontů poután pouze určitý počet protiiontů. Zvýšená koncentrace protiiontů je pak soustředěna v difúzní (tzv. Gouyově-Chapmanově) vrstvě a klesá co do velikosti koncentrace v objemu s rostoucí vzdáleností od povrchu. Naproti tomu koncentrace tzv. koiontů, mající souhlasný náboj jako povrch, je snížena a zvyšuje s rostoucí vzdáleností od povrchu. Gouyho-Chapmanova teorie selhávala, jelikož předpokládali, že ionty jsou elektricky nabitě body bez vlastních rozměrů⁸.

Konečné rozměry iontů do své teorie zahrnul Stern. Podle něj byla pojmenována těsně přiléhající plošná vrstva, tvořená ionty vázanými převážně adsorpčními silami, tzv. Sternova vrstva. Sousedí s povrchem nabitým ionty určujícími potenciál a tvoří tím vnitřní vrstvu. Vzdálenější protiionty jsou přitahovány elektrostatickými silami, tvoří součást difúzní vrstvy a ulpívají na povrchu tuhé látky. Naopak vnitřní vrstva iontů se vůči nepohyblivému disperznímu prostředí pohybuje. Potenciál na rozhraní přiléhající vrstvy a kapaliny se nazývá elektrokinetický⁷ nebo-li ξ -potenciál (zeta-potenciál). Je funkcí uspořádání fázového rozhraní, jeho znaménko je opačné než znaménko vnější vrstvy elektrické dvojvrstvy a je značně ovlivněn přídavkem elektrolytu, i v malých koncentracích, čímž dochází ke ztrátě stability koloidních částic⁵.

3.2 Stabilita koloidních částic

Vzhledem k velkému přebytku povrchové energie, který úzce souvisí s existencí velmi rozsáhlého fázového rozhraní disperzní fáze a disperzního prostředí, jsou soustavy termodynamicky nerovnovážné. Tento přebytek energie zapříčiňuje nestálost soustav, kde dochází k procesům, které vedou ke snížení stupně disperzity nebo až k destrukci soustavy. Rychlost destrukce a stabilita disperzních soustav je dána složením disperzní fáze a disperzního prostředí, stupněm disperzity a koncentrací disperzní fáze.

Stabilita je chápána jako vlastnost disperzní soustavy, která zabraňuje procesům vedoucím ke změně její struktury, stupně disperzity, objemu disperzního prostředí. Podle N. P. Peskova⁸ se stabilita disperzních soustav rozděluje na sedimentační a agregátní. Sedimentační stabilita představuje stálost, s jakou systém zachovává rozdělení koncentrace částic v gravitačním poli. Stálost, s jakou systém zachovává svůj stupeň disperzity, se nazývá agregátní stabilita. Sedimentační nestabilita se uplatňuje

zejména u soustav s velkými částicemi. S klesající velikostí a rostoucí koncentrací disperzní částice se více projevuje agregátní nestabilita.

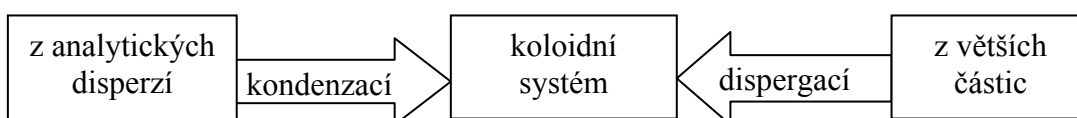
Na stabilitu koloidních soustav má velký vliv agregace, což je shlukování dispergovaných částic ve větší agregáty. V tomto případě se disperzní částice, vykonávající tepelný pohyb, vlivem coulombických a van der Waalsových sil přibližují a následně spojují. Tento děj vede k přechodu soustavy do stavu o nižší disperzitě a tedy i nižší energii. V případě, že neexistuje energetická bariéra, která by takovému přechodu bránila, je tento děj spontánní. Volba podmínek zajistí stabilitu soustavy a tedy i dostatečnou výšku bariéry. Zabránit agregaci lze stabilizací elektrickou dvojvrstvou.

4 Koloidní stříbro

První zmínky o používání stříbra spadají až do 7. století př. n. l., kdy byla v Číně vynalezena akupunktura pomocí jehliček se stříbrem. V Egyptě se stříbro používalo k výrobě mincí a dospěli i k tomu, že voda zůstane déle pitná, pokud se uchová ve stříbrných nádobách. V Římě ve 4. století n. l. bylo koloidní stříbro užíváno k barvení keramiky a skla. Teprve kolem roku 1857 poukázal Michael Faraday na rozptyl světla na částicích zlata. Tento jev však později studoval Tyndall. Ve 20. století se začala koloidní chemie rozvíjet díky novým metodám a přístrojům jako např. ultracentrifuga, elektronový mikroskop, metody rozptylu světla, rentgenová analýza aj.^{1,12}.

4.1 Příprava koloidních soustav

Obecně lze koloidní soustavy připravit dvěma způsoby a to kondenzací nebo dispergací. Dispergací se z látky větších rozměrů připraví látka koloidní velikosti. Naopak kondenzací se z analytických disperzí dosáhne látky koloidní^{5,7}.



4.1.1 Dispergační metody

Tato skupina zahrnuje přípravu koloidních soustav mechanickým nebo vibračním rozměňováním, k čemuž je potřeba vynaložit práci. Část z ní se uloží v soustavě jako Gibbsova energie fázového rozhraní a druhá část energie se přemění na teplo. Je však zapotřebí přidávat látky, které zpomalují nebo zabraňují agregaci. Takovéto malé částice nebo polymery se adsorbují na fázovém rozhraní a tvoří pak elektrostatickou nebo stérickou bariéru^{1,6,8}.

4.1.2 Kondenzační metody

Při tomto typu metod je nutno dosáhnout velkého přesycení, protože malé, nově vzniklé zárodky mají nižší stabilitu než velké částice té samé látky. Stupeň disperzity vznikajícího koloidní soustavy je ovlivněn dvěma ději, a to rychlostí vzniku zárodků (nukleací) a rychlostí růstu zárodků. Přesycení vzniká chemickými nebo fyzikálně-chemickými reakcemi.

Základem chemických metod je rozpuštění látky na jinou látku, která je v daném disperzním prostředí nerozpustná. Do této skupiny patří redoxní reakce, kterými lze získat např. koloidní zlato redukcí zlatité soli formaldehydem nebo koloidní síru ze sulfanu, obsaženého v hydrotermálních vodách, oxidací kyslíkem.

Fyzikálně-chemické metody využívají především změny teploty a tlaku (méně běžné) a změny složení rozpouštědla. Se změnou teploty je spojen zisk veškerých polykrystalických materiálů v metalurgii. Změnou složení rozpouštědla je dosaženo toho, že látka je v daném rozpouštědle nerozpustná, tudíž dojde k přesycení a látka je tímto z roztoku vyloučena^{1,6,8}.

Vybrané metody přípravy nanočástic stříbra

Metoda, při níž dochází k redukcí AgNO_3 silným redukčním činidlem NaBH_4 ve vodném prostředí, byla pojmenována podle Creightona, Blatchforda a Albrechta. Tímto postupem lze připravit částice stabilní až několik měsíců. Příprava je založena na

přidání 25 ml vodného roztoku AgNO_3 do 75 ml, ledem chlazeného, vodného roztoku NaBH_4 za intenzivního míchání. Mezi faktory ovlivňující redukci stříbrné soli patří např. teplota nebo přítomnost NaHCO_3 . Standardně lze připravit nanočástice o velikosti v řádech nanometrů, příprava větších částic je však obtížná.

Mírnějšího redukčního činidla, než tomu bylo v předchozí přípravě, využívá postup podle Lee a Meisela. Dochází zde k redukci pomocí citrátu sodného, jehož funkcí je i stabilizace nanočástic. Příprava spočívá v přidání 10 ml 1% citrátu sodného do 500 ml vodného roztoku obsahujícího 90 mg AgNO_3 . Reakční směs je nutno udržovat na bodu varu po dobu jedné hodiny. Tato metoda vede k přípravě větších částic, než tomu bylo u předešlého postupu. Velikost nanočástic se pohybuje v rozmezí 30 – 120 nm.

Tollensův způsob přípravy nanočástic je založen na redukci komplexu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ vhodnými redukujícími cukry, při čemž mezi nejvýznamnější patří glukosa, sacharosa a maltosa. Tímto procesem jsou připraveny nanočástice o požadované velikosti. Amonný komplex je stabilní a vyznačuje se silnou afinitou ke stříbrným iontům. Proto je koncentrace amoniaku důležitá z hlediska řízení velikosti nanočástic. Při nižší koncentraci amoniaku jsou připraveny nanočástice o menší velikosti. Rozsah velikosti nanočástic stříbra je 25-400 nm^{3,10,11}.

4.2 Využití nanočástic stříbra

Jak již bylo zmíněno výše (odst. 4), koloidní stříbro má bohatou historii, avšak k jeho rozmachu dochází až ve 20. století, díky svým antimikrobiálním vlastnostem⁸. Ve stejné době byl ale objeven penicilin, který se začal užívat jako prioritní antibiotikum. Jelikož se v poslední době zvyšuje odolnost bakterií vůči antibiotikům, přibývá také studií nanočástic stříbra jakožto nových forem antibiotik¹⁰.

Využití nanočástic stříbra je značné, velké zastoupení má především v medicíně. Aplikuje se do plastových katetrů, gáz na hojení popálenin, taktéž se používá v chirurgii při svorkování. Velký potenciál se klade na zlepšení mikrobiální kvality vody. Nedávno bylo rovněž testováno nanášení nanočástic stříbra na tzv. aktivovaná uhlíková vlákna (Activated carbon fiber), jejichž filtry se prokázaly jako účinné k eliminaci bioaerosolů, které mohou zapříčinit vznik akutních a chronických onemocnění³.

5 Toxikologie

Toxikologie je nauka o jedech. Za jednoho z jejich zakladatelů je považován Paracelsus, který v 16. století vyslovil myšlenku: „Všechny látky jsou jedy, je to jen dávkou, když nějaká látka přestává být jedem.“ Látky lze dělit podle toxického účinku na organismus na: prakticky netoxické, málo toxické, mírně toxické, silně toxické, extrémně toxické a supertoxické¹³. Toxicita látek bývá testována převážně na zvířatech. Rozděluje se na toxicitu akutní a chronickou. V prvním případě se jedná o účinek, který se projeví ihned po expozici a je závislý na intenzitě působení. Chronická toxicita se značí tím, že její účinky jsou dlouhodobé, tudíž se může projevit až po delší době. Do této skupiny se řadí např. mutagenita. Existuje řada faktorů, které ovlivňují toxicitu látek. Mezi nejvýznamnější patří koncentrace, rozpustnost, struktura, doba a způsob expozice. Nutným předpokladem pro působení látky je její vstřebání do oběhové soustavy organismu. Cizorodá látka se pak naváže na specifické místo, tzv. receptor. Následně dochází k přenosu látky do celého organismu a metabolickým přeměnám, jinak řečeno biotransformacím. Tyto reakce mají za následek vznik metabolitů, které jsou ve většině případů méně toxické než výchozí látky. Posledním krokem je vylučování neboli exkrece. Většina látek se vylučuje hlavně močí, dále stolicí, vydechováním a v menší míře potem a slinami. Toxikologie se člení na mnoho odvětví, a to především toxikologie: popisná, predikční, klinická, průmyslová, toxikologie psychotropních a omamných látek, potravin a aditiv, agrochemikálií, ekotoxikologie, soudní lékařství¹³⁻¹⁵.

5.1 Ekotoxikologie

Věda, zabývající se studiem vlivu látek na živé organismy a jejich ekosystémy, se nazývá ekotoxikologie. Tento pojem zavedl roku 1969 francouzský vědec René Truhaut¹⁶. Jedním z cílů tohoto vědního oboru je ochrana živých organismů před chemickým znečištěním¹⁴. Nejčastěji jsou prováděny testy, které sledují toxické účinky látek. Ekotoxikita je výsledkem působení tří složek: organismu, toxické látky a prostředí a zjišťuje se pomocí ekotoxikologických biotestů. Tyto testy sledují, působí-li testovaná látka toxicky na organismy v jejich ekosystémech, a zda může dané ekosystémy narušit.

Biotesty je nutno provádět za přesně definovaných podmínek. Mezi nejrozšířenější testování patří testy s vodními organismy – akvatické, nejčastěji prováděny na rybách, koryšících, vodních rostlinách, řasách a bakteriích. Terestické testy jsou zaměřeny na půdní ekosystémy a sledují toxicitu půd a sedimentů. Pro testování jsou vhodné následující organismy: žížaly, roupice, chvostoskoci, bakterie, jednoděložné a dvouděložné rostliny. Půda je komplexní médium vyznačující se heterogenitou a její úrodnost zajišťují žížaly. Toxické látky vstřebávají pokožkou nebo z potravy. Mezi testy prováděné na žížalách patří akutní na filtračním papíře, akutní v půdním vzorku a chronické v půdním vzorku¹⁴.

V experimentu bylo postupováno v souladu s normou OECD 207, která zahrnuje papírový a půdní test. Doporučeným organismem pro testování je *Eisenia foetida*. Papírový test spočívá v tom, že organismus, položený na vlhkém filtračním papíře, je vystaven testovaným látkám s cílem identifikace potenciálně toxických látek. Pro experiment byl vybrán test půdní, jelikož poskytuje reprezentativnější údaje ohledně toxicity látek díky přirozenému půdnímu médiu. Bylo použito pět koncentrací, z nichž jedna vedla k nulové úmrtnosti a jedna k celkové úmrtnosti. Mortalita byla hodnocena 7 a 14 dní po aplikaci testované látky¹⁷.

5.2 Toxicita stříbra

Vzhledem k narůstající komercializaci produktů obsahujících nanočástice stříbra, je důležité studovat jejich toxicitu či ekotoxicitu. Při interakci stříbra s organismem dochází k uvolňování stříbrných iontů, které vyvolávají tvorbu reaktivních forem kyslíku. Následkem může být poškození DNA, membránových proteinů až buněčná smrt (apoptóza). Působení nanočástic v lidském organismu se však může měnit podle množství. Experimenty ukázaly, že v případě nanomateriálů se mohou nanočástice dostat inhalací až do mozku, následně vést k cytotoxicitě^{18,19}. Na možné řešení poukázali vědci ze švýcarského federálního institutu vodní vědy a techniky, kteří použili ligandy cysteinu k navázání volného stříbra, aby separovali zbývající nanostříbro nebo volné ionty²⁰. Ačkoli žádná ze studií neprokázala bezprostřední vliv na lidské zdraví, měla by být na používání nanočástic kladena jistá opatrnost¹⁸.

Toxicita nanočástic stříbra byla testována na mnoha organismech, jedním z nich byly krysy. Zvířata byla umístěna do inhalační komory, kde byla vystavena nanočásticím stříbra 6 hodin denně, 5 dní v týdnu, po dobu 13 týdnů. Výsledky ukázaly, že hlavními orgány pro akumulaci nanočástic stříbra jsou plíce a játra. Dále bylo zjištěno, že se tyto nanočástice více hromadí v čichových buňkách než v mozku. Také prokázala, že v závislosti na dávce stoupá koncentrace nanočástic stříbra v krvi, což naznačuje distribuci nanočástic krevním řečištěm. Jedním z omezení bylo, že vědci nedokázali změnit množství stříbra obsaženého v krvi²¹.

Další experiment byl proveden na embryích střevle potoční, kde byla toxicita nanočástic stříbra potvrzena²².

5.3 Ekotoxicita stříbra

Ekotoxicita nanočástic stříbra byla testována na mnoha organismech, jedním z nich byly hlístice (*Caenorhabditis elegans*). V rámci testu byla sledována mortalita, růst, reprodukce. Největší vliv byl pozorován na reprodukční potenciál a to výrazný pokles. Výsledky naznačily, že oxidativní stres by mohl být důležitým mechanismem z hlediska toxicity nanočástic stříbra²³.

Jelikož bylo provedeno málo studií ekotoxicity nanočástic na vodní organismy, byli pro experiment vybráni sladkovodní korýši *Daphia magna*. Tento organismus byl zvolen především pro svoji malou velikost a důležitost ve vodním potravinovém řetězci. Bylo prokázáno, že se zvyšující se koncentrací roste úmrtnost organismu²⁴.

5.4 Ekotoxicita vůči půdním organismům

Eisenia foetida byla testována vzhledem k typu půdy. V experimentu byla použita jednak přirozená písčité půda, jednak standardizovaná umělá půda. Organismus byl vystaven účinkům AgNO₃ a stříbrným nanočásticím. Výsledky ukázaly, že žížaly v sobě akumulovaly více stříbra, pokud byly pěstovány v písčité půdě. Akumulace stříbra rovněž stoupala, byl-li testovaný organismus v expozici s AgNO₃ než s nanočásticemi

stříbra. Výsledky prokázaly, že půdní typ je důležitější z hlediska akumulace nanočástic stříbra než jejich velikost²⁵.

Vůči žížale hnojní bylo testováno mnoho látek. Při testování toxicity nanočástic TiO₂ a ZnO bylo prokázáno, že pokud jsou koncentrace testovaných látek vyšší než 1,0 g/kg, dochází ke značnému poškození organismu. Dále bylo zjištěno, že jsou oba typy nanočástic bioakumulativní, především pak ZnO. Studie prokázala, že jsou nanočástice ZnO vůči organismu *Eisenia Foetida* více toxické než nanočástice TiO₂ (cit.²⁶).

Vliv toxicity těžkých kovů na produkci a líhnutí kokonů byl testován u tří druhů žížal: *Eudrilus eugeniae*, *Perionyx excavatus*, *Eisenia foetida*. Tyto druhy žížal byly vystaveny účinkům dusičnanu olovnatého, sulfidu kademnatého a sulfidu zinečnatého. Bylo zjištěno, že největší vliv na líhnutí kokonů, u všech tří druhů, má dusičnan olovnatý. Úspěšnost vylíhnutí zámotků vystavených dusičnanu olovnatému byla třetinová, v případě sulfidu olovnatého a zinečnatého byla poloviční. Nejvíce kokonů bylo vyprodukováno v půdě obsahující sulfid kademnatý, nejméně pak v substrátu obsahujícím sulfid zinečnatý²⁷.

Při osmítýdenním experimentu, kdy byl organismus *Eisenia foetida* vystaven účinkům kadmia, mědi, olova a zinku, bylo zjištěno, že tyto těžké kovy nemají vliv na jeho růst. U kadmia navíc nebyla zjištěna žádná významná mortalita ani při nejvyšších zkušebních koncentracích. Ze zbývajících tří kovů byla nejtoxičtější měď. Za nejméně toxické bylo považováno olovo²⁸.

Experimentální část

6 Experimentální část

6.1 Chemikálie

Na přípravu koloidního stříbra byly použity následující chemikálie: dusičnan stříbrný (p.a., Tamsa), amoniak (p.a., vodný roztok, min 25% (v/v), Lachema), hydroxid sodný (p.a., Lachner), D(+)-maltosa monohydrát (p.a., Sigma-Aldrich), sodná sůl polyakrylové kyseliny s molekulovou hmotností 1200 (45 % vodný roztok, p.a., Sigma-Aldrich), tetrahydridoboritan sodný (98,5%, Sigma-Aldrich).

Pro zkoncentrování disperze nanočástic stříbra připravených redukcí amoniakálního komplexu stříbrných iontů maltosou byl použit dialyzační membrány (Sigma-Aldrich) a sorbent polyakrylát–polyalkohol (Sigma-Aldrich).

K přípravě mineralizační směsi byla použita kyselina dusičná (p.a., vodný roztok, min. 65% (v/v), Lachner) a peroxid vodíku (p.a., vodný roztok, min. 30% (v/v), Penta).

Umělá půda byla připravena z rašeliny (bez viditelných rostlinných zbytků), jílu (obsah kaolinitu nad 30 %), písku (jemný, průmyslový křemenný) a kaolinu.

6.2 Přístrojové vybavení

Velikost částic stříbra byla sledována přístrojem pracujícím na dynamickém rozptylu světla (DLS) - Zeta Potential Analyzer Zeta Plus (Brookhaven Instruments Corporation, USA). UV/Vis absorpční spektra disperze nanočástic stříbra byla zaznamenávána spektrofotometrem Specord S 600 (Analytik Jena AG, Německo). Velikost a morfologie částic byla ověřena pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) na přístroji JEM 2010 (Jeol, Japonsko) s urychlovacím napětím 160 kV.

Obsah stříbra v zkoncentrované disperzi byl stanoven pomocí atomového absorpčního spektrometru s plamennou atomizací FA-AAS ContrAA[®] 300 (AnalytikJena AG, Germany) s kontinuálním zdrojem záření (xenonová lampa) a vybaveným Echelle dvojitým monochromátorem s rozlišením 2 pm. Absorpční vlnová délka pro stříbro byla 328,068 nm.

6.3 Příprava a zkoncentrování koloidního stříbra

Disperze nanočástic stříbra byla připravena modifikovanou Tollensovou metodou spočívající v redukci amoniakálního komplexu stříbrných iontů maltosou v alkalickém prostředí. Jednotlivé zásobní roztoky byly smíchány v tomto pořadí: 500 ml AgNO_3 o koncentraci 0,004 mol/l, 500 ml NH_3 o koncentraci 0,020 mol/l, 500 ml NaOH o koncentraci 0,038 mol/l, 500 ml maltózy o koncentraci 0,040 mol/l. Tímto postupem bylo připraveno dvakrát dva litry koloidního stříbra s koncentrací 108 mg/L. Reakce probíhala za neustálého míchání na magnetické míchačce po dobu několika minut. Takto připravená disperze koloidního stříbra byla zkoncentrována dialyzační metodou. Do celkem 40 dialyzačních trubic bylo odváženo po 1 g polyakrylát–polyalkoholu, trubice byly uzavřeny a vloženy do 4000 ml disperze nanočástic stříbra. Z původního objemu disperze 4 000 ml došlo ke zkoncentrování na objem 540 ml. Po zkoncentrování byla změřena velikost částic metodou DLS a výsledná koncentrace stříbra v disperzi byla následně určena pomocí metody AAS.

Dále byla pro testování toxicity připravena koloidní disperze nanočástic stříbra s koncentrací stříbra 3000 mg/L. Tato disperze byla připravena redukcí dusičnanu stříbrného tetrahydridoboritanem sodným v přítomnosti sodné soli polyakrylové kyseliny. Do kádinky o objemu 2000 ml bylo naváženo 4,722 g AgNO_3 a poté bylo přidáno 880 ml deionizované vody. Roztok byl míchán elektrickým míchadlem a po rozpuštění dusičnanu stříbrného bylo do roztoku přidáno 6 ml amoniaku (28% v/v) a následně 15 ml 45% roztoku sodné soli polyakrylové kyseliny s molekulovou hmotností 1200. Poté bylo do reakčního systému přidáváno za intenzivního míchání 100 ml roztoku NaBH_4 (navážka 200 mg do 100 ml).

6.4 Testování akutní toxicity

Při testování akutní toxicity na organismus *Eisenia foetida* se vycházelo z normy OECD č. 207 pro testování akutní toxicity látek vůči půdním červům. Zkouška spočívá ve sledování vlivu testované látky na žížaly v umělé půdě. Experiment trvá 14 dní, přičemž v 7. a 14. dnu se hodnotí mortalita jedinců, úbytek hmotnosti a morfologické změny. Nejprve byla připravena umělá půda. Umělá půda byla složena ze 70 % pískem,

17 % jílem, 10 % rašelinou a 3 % kaolinem. Celková hmotnost půdy pro jednotlivou koncentraci byla 650 g, tzn. bylo odváženo 455 g písku, 110,5 g jílu, 65 g rašeliny a 19,5 g kaolinu. Jednotlivé složky půdy byly nejdříve vysušeny v sušárně při 105 °C. Následně byly přesypány do šesti plastových nádob o objemu 5 litrů a v suchém stavu byly jednotlivé složky půdy důkladně promíseny. Žížaly bylo nutno adaptovat na umělou půdu, tudíž byly po dobu 24 hodin ponechány v připravené půdě, k níž byla přidána destilovaná voda. Po adaptaci na půdu bylo zahájeno testování akutní toxicity. Byly testovány dvě koncentrační řady, z nichž každá obsahovala pět koncentrací, celkem tedy bylo testováno deset koncentrací. Ze zásobní disperze koloidních částic stříbra s koncentrací 690 mg/l byla připravena první koncentrační řada: 10, 20, 40, 80, 160 mg/kg. V dalším experimentu pak byla tato koncentrační řada rozšířena za použití disperze částic stříbra o koncentraci 3000 mg/l o těchto konečných koncentrací: 100, 150, 225, 338, 506 mg/kg. Stříbro se přidávalo do půdy v různých objemech tak, aby byla dosažena testovaná koncentrace a daný objem disperze se vždy doplnil destilovanou vodou na konečný objem 150 ml. Disperze nanočástic stříbra byla přidávána do nádob s půdou po 50 ml a po každém přidavku byla umělá půda důkladně promísena s disperzí koloidního stříbra po dobu 5 minut. Součástí testu byla i negativní kontrola, kdy byly žížaly chovány na půdě s obsahem destilované vody bez přítomnosti nanočástic stříbra.

Po přípravě půdy s obsahem nanočástic stříbra byly žížaly nejprve omyty a po 10 kusech vloženy na povrch půdy do jednotlivých nádob. Nádoby byly přikryty perforovanými víky kvůli zabránění vysoušení a udržení zkušebních podmínek. Testování se provádělo při kontinuálním světle, aby bylo zajištěno, že testované organismy zůstanou ve zkušebním médiu po celou dobu trvání zkoušky a nebudou vylézat na povrch půdy, čímž by se mohli vyhýbat kontaktu s půdou s obsahem testované látky. Experiment trval 14 dní, přičemž byla mortalita hodnocena v 7. a 14. dnu. Půda byla z nádob přesypána na větší táč a žížaly, které nereagovaly na mechanické podněty na předním konci těla, byly považovány za uhynulé. Hlavním z kritérií testu bylo sledování vlivu koloidního stříbra na mortalitu testovaného organismu. Dále byla zaznamenávána hmotnost organismů na začátku a na konci testu, životnost organismů a jejich reakce na mechanické podněty.

6.5 Bioakumulace stříbra v testovaném organismu

Po testu akutní toxicity byli přeživší jedinci vyjmuti z umělé půdy a pečlivě omyti. Podle koncentrací, které na ně byly testovány, byly vloženy do skleněných lahvíček obsahujících ethanol a opatřených zátkou. Následující den byly žížaly vyjmuty a po skupinách přemístěny na Petriho misky a vloženy do sušárny. Sušení probíhalo při 105 °C po dobu jedné hodiny. Sušina byla před samotnou mineralizací zvážena.

Do varné baňky byly odpipetovány 3 ml HNO_3 a 2 ml H_2O_2 . Do stejné baňky byl přidán vysušený živočišný materiál. Baňky byly následně vloženy do mineralizátoru KSMA Behrlabor-technic GmSH, kde celý proces trval tři hodiny. Analýza mineralizovaných vzorků probíhala na přístroji AAS. Pomocí atomové absorpční spektroskopie (AAS) bylo změřeno a vypočteno množství koloidního stříbra, které žížaly vstřebaly. Měření probíhalo celkem třikrát a to ihned po ukončení testu akutní toxicity, dále 7 a 14 dní po ukončení testu akutní toxicity, kdy byl organismus chován v umělé půdě bez testované látky, a bylo sledováno, zda stříbro přetrvává v organismu anebo je z organismu vylučováno.

7 Výsledky a diskuse

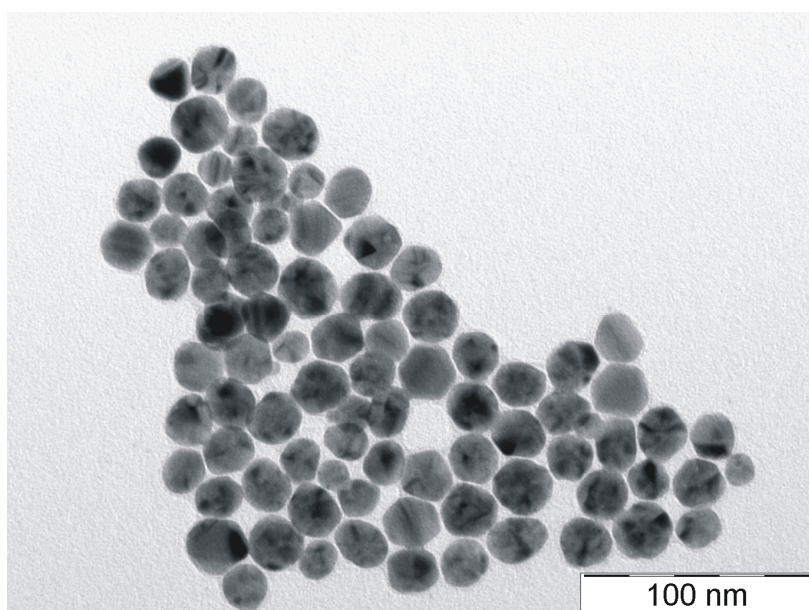
7.1 Příprava a zkoncentrování koloidního stříbra

Pro testování toxicity byly používány dva typy disperze nanočástic stříbra lišících se velikostí přítomných nanočástic stříbra.

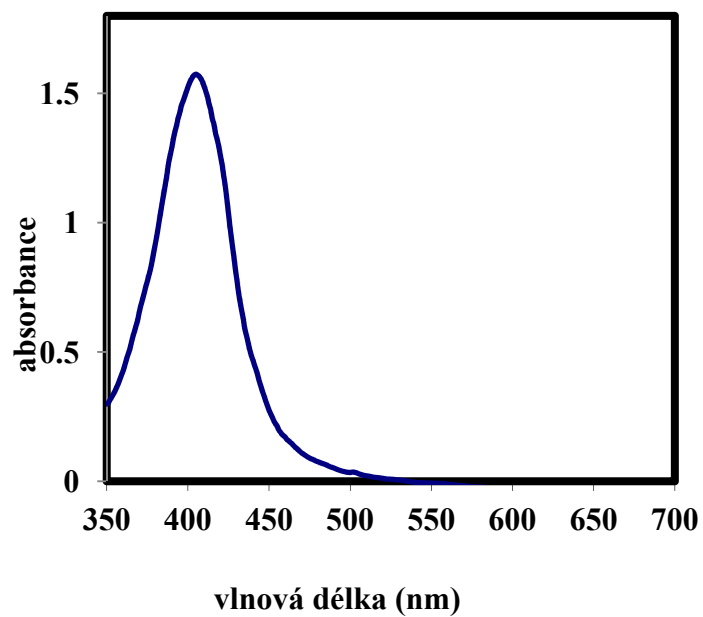
První typ disperze nanočástic stříbra byl připraven pomocí modifikované Tollensovy metody, spočívající v redukci amoniakálního komplexu stříbrných iontů maltosou. Tímto postupem byly připraveny 4 000 ml koloidní disperze s finální koncentrací stříbra 108 mg/l. Pomocí metody DLS byla změřena velikost částic, její hodnota činila 27 nm. Morfologie a velikost částic byla ověřena pomocí transmisní elektronové spektroskopie (obr. 1). Absorpční spektrum připravené disperze nanočástic stříbra (po 10-ti násobném naředění původní disperze) je uvedeno na obrázku 2, poloha absorpčního maxima se nachází při 406 nm. Jelikož uvedená koncentrace stříbra přítomného v disperzi byla nedostačující pro následné testování, byla původní disperze nanočástic stříbra zkoncentrována. V průběhu koncentračního/dialyzačního procesu za

využití dialyzačních membrán došlo ke změně původního objemu 4 000 ml na 540 ml. Přesná koncentrace stříbra v zkoncentrované disperzi byla následně stanovena pomocí metody AAS, hodnota koncentrace stříbra činila 690 mg/l.

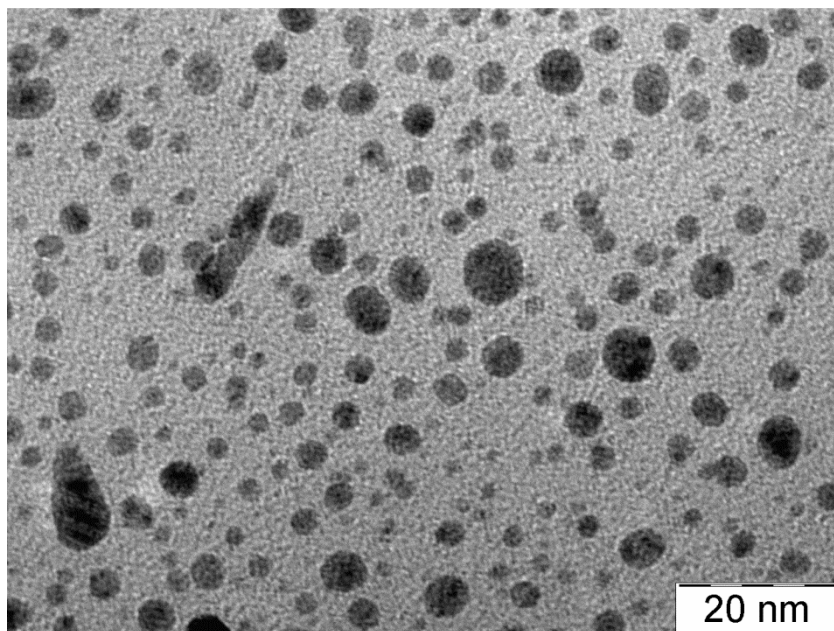
Jelikož ani zkoncentrovaná disperze nanočástic stříbra nebyla dostačující pro dosažení toxických koncentrací stříbra, byla v dalších experimentech používána disperze nanočástic stříbra připravených jiným postupem, který umožňoval dosažení vyšších koncentrací stříbra v disperzi. Redukcí dusičnanu stříbrného tetrahydridboritanem sodným v přítomnosti sodné soli polyakrylové kyseliny byla připravena disperze nanočástic stříbra o koncentraci 3000 mg/l. Průměrná velikost nanočástic stříbra připravených tímto postupem byla pomocí metody DLS stanovena na 10 nm. Morfologie a velikost částic byla ověřena pomocí transmisní elektronové spektroskopie (obr. 3). Absorpční spektrum této disperze je uvedeno na obr. č. 4, poloha absorpčního maxima se nacházela při 395 nm.



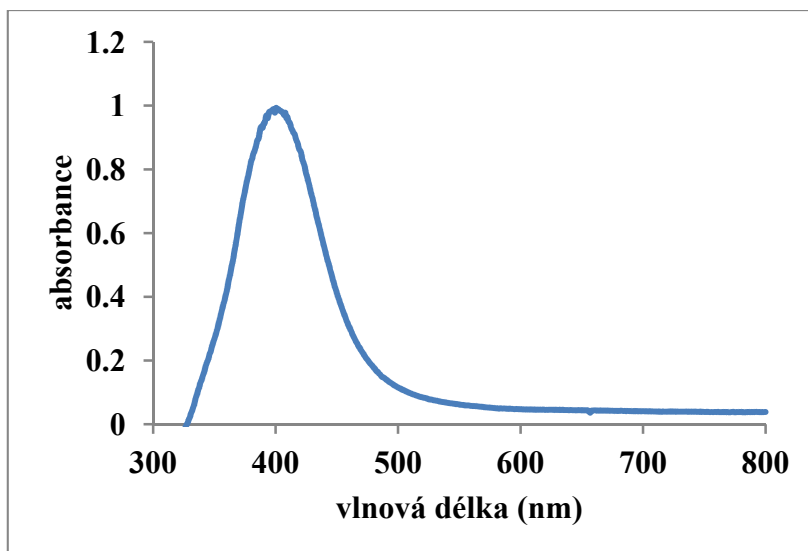
Obr. č. 1: Snímek nanočástic stříbra připravený redukcí amoniakálního komplexu stříbrných iontů maltosou pořízený transmisním elektronovým mikroskopem.



Obr. č. 2: Absorpční spektrum koloidního stříbra připraveného redukcí amoniakálního komplexu stříbrných iontů maltosou.



Obr. č. 3: Snímek nanočástic stříbra připraveného redukcí dusičnanu stříbrného tetrahydridoboritanem sodným.



Obr. č. 4: Absorpční spektrum koloidního stříbra připraveného redukcí dusičnanu stříbrného tetrahydridoboritanem sodným.

7.2 Test akutní toxicity na umělé půdě vůči organismu *Eisenia foetida*

7.2.1 Vliv koloidního stříbra na mortalitu organismu

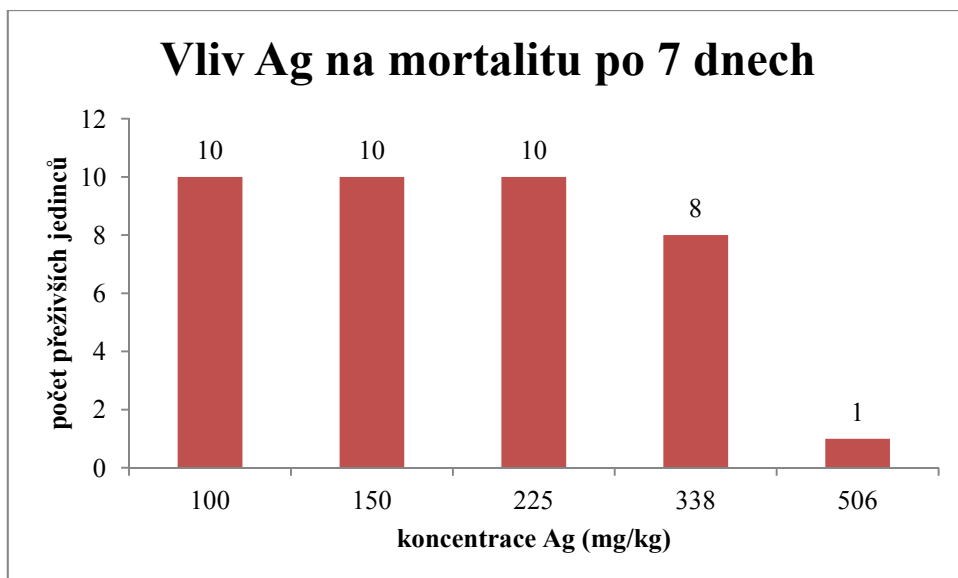
Vůči organismu *Eisenia foetida* (obr. č. 5) byl proveden test akutní toxicity nanočástic stříbra aplikací koncentrací v rozmezí 10 – 506 mg Ag na 1 kg půdy (dále jen mg/kg). Byly prováděny experimenty s různým koncentračním rozsahem stříbrných nanočástic. První z nich zahrnovala koncentrace nanočástic stříbra 10, 20, 40, 80, a 160 mg/kg. Druhá koncentrační řada sestávala z koncentrací 100, 150, 225, 338 a 506 mg/kg. Uvedeným různým koncentracím stříbra byly žížaly vystaveny po dobu 14 dní.

Bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací nanočástic stříbra se zvyšuje úmrtnost jedinců. Při aplikaci koncentrační řady 10, 20, 40, 80, 160 mg/kg nedošlo během 14-ti denního testování k úhynu žádného organismu. Proto pro následné testování byla použita nová disperze nanočástic s vyšší koncentrací stříbra. U koncentrací 100, 150, 225, 338, 506 mg/kg byla prokázána mortalita již v sedmý den testování (graf č. 1), následně poté i na konci experimentu (graf č. 2). Při hodnocení v polovině testu nebyl pokles přeživších jedinců natolik markantní jako na konci testu. Při aplikaci prvních tří koncentrací, tj. 100, 150 a 225 mg/kg, přežili po sedmi dnech všichni jedinci. Při koncentracích 338 a 506 mg/kg došlo k výraznému nárůstu úmrtnosti, kdy při

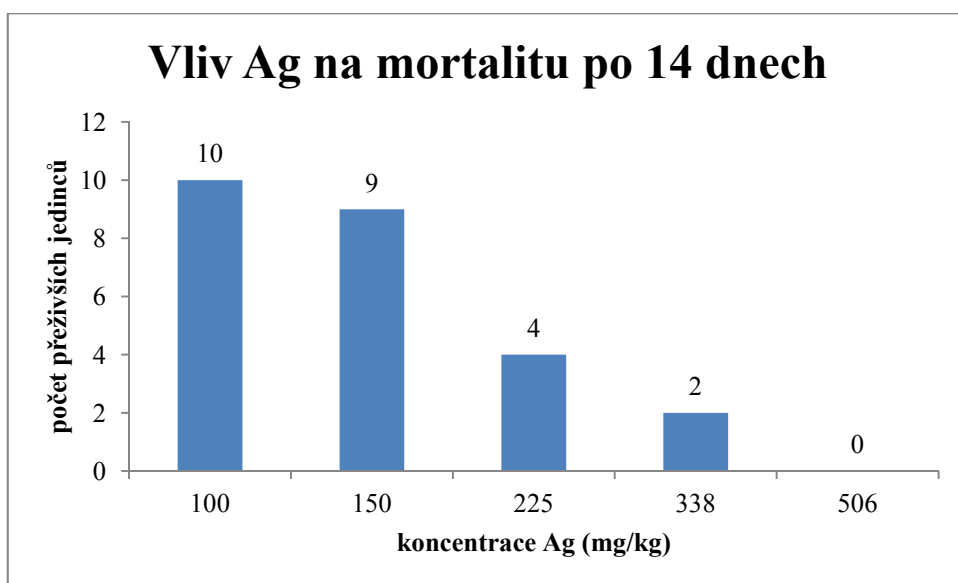
koncentraci 338 mg/kg přežilo 8 jedinců a při 506 mg/kg přežil pouze 1 jedinec. Po dvoutýdenní aplikaci testovaných nanočástic stříbra přežilo všech 10 jedinců pouze při jediné koncentraci a to 100 mg/kg. Mezi koncentracemi 150 a 225 mg/kg byl zaznamenán vyšší nárůst uhynulých jedinců. Aplikace nejvyšší koncentrace, která byla 506 mg/kg způsobila úhyn všech jedinců, tudíž byla označena jako letální dávka, při které zahynulo 100 % testovaných organismů, tedy LD₁₀₀. Ze závislosti počtu přeživších jedinců na koncentraci testované látky, byla koncentrace 210 mg/kg, určena jako střední letální dávka LD₅₀, při které zahynulo 50 % testovaných organismů. Z grafu č. 3 je zřejmé, že nejvyšší přípustná dávka, nezpůsobující žádný toxický účinek, označována jako NOAEL, byla 100 mg/kg.



Obr. č. 5: Testovaný organismus *Eisenia foetida*



Graf č. 1: Vliv koncentrace Ag na mortalitu *Eisenia foetida* po 7 dnech při aplikaci disperze nanočástic stříbra s průměrnou velikostí 10 nm.



Graf č. 2: Vliv koncentrace Ag na mortalitu *Eisenia foetida* po 14 dnech při aplikaci disperze nanočástic stříbra s průměrnou velikostí 10 nm.

7.2.2 Vliv koloidního stříbra na hmotnost organismu

Experimentem bylo prokázáno, že s rostoucí koncentrací se zvyšuje úbytek hmotnosti organismu (tab. č. 1 a 2). Žížaly nebyly po celou dobu testu krmeny, potravu pro ně představoval substrát s testovanou látkou nebo destilovanou vodou v případě kontroly.

Z tabulek je zřejmé, že k úbytku hmotnosti jedinců došlo v každé skupině. Nejmenší úbytek byl zaznamenán v případě kontroly, kdy umělý substrát obsahoval destilovanou vodu. Při aplikaci nižší koncentrační řady se úbytek hmotnosti pohyboval okolo 10 %. Aplikací druhé koncentrační řady došlo k výraznějšímu poklesu hmotnosti, který dosáhl hodnoty až 36 %. Rovněž v kontrolní skupině byl zaznamenán nejnižší úbytek hmotnosti. Z výsledků lze prokázat, že při aplikaci vyšších koncentrací nanočástic stříbra, žížaly nepřijímají tolik potravy z půdy, tudíž ztrácejí více na své hmotnosti.

Při koncentraci 506 mg/kg nemohla být stanovena hmotnost skupiny na konci testu, tudíž ani úbytek hmotnosti, jelikož došlo k 100 % úhynu organismů.

Tabulka č. 1: Vliv koncentrace Ag na hmotnost Eisenia foetida při aplikaci disperze nanočástic stříbra s průměrnou velikostí 25 nm.

Koncentrace Ag [mg/kg]	Hmotnost skupiny před testem [g]	Hmotnost skupiny po testu [g]	Úbytek hmotnosti [g]	Úbytek hmotnosti [%]
0	3,16	3,04	-0,12	-3,79
10	2,72	2,49	-0,23	-8,46
20	2,64	2,33	-0,31	-11,74
40	2,76	2,43	-0,33	-11,97
80	2,87	2,51	-0,36	-12,54
160	2,66	2,40	-0,26	-9,77

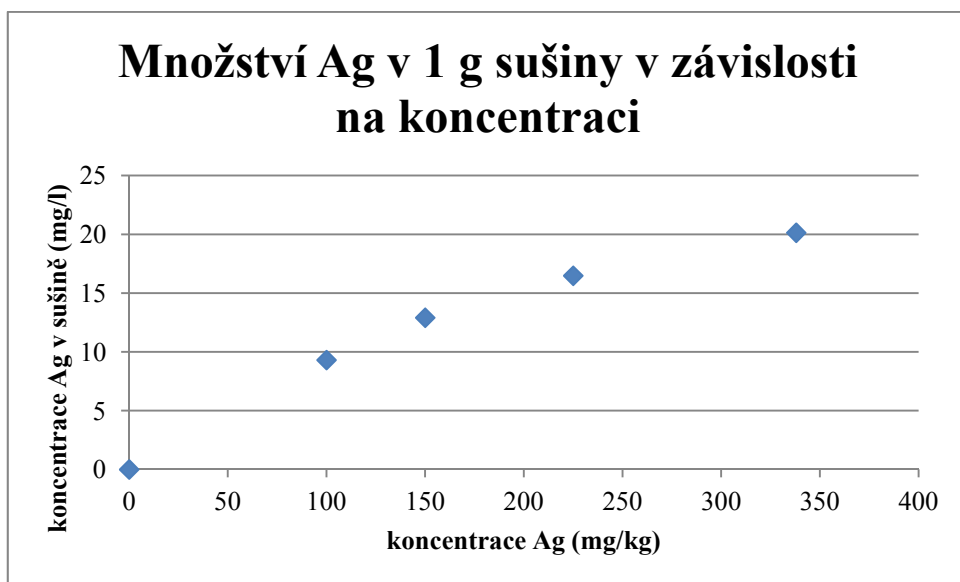
Tabulka č. 2: Vliv koncentrace Ag na hmotnost Eisenia foetida při aplikaci disperze nanočástic stříbra s průměrnou velikostí 10 nm.

Koncentrace Ag [mg/kg]	Hmotnost skupiny před testem [g]	Hmotnost skupiny po testu [g]	Úbytek hmotnosti [g]	Úbytek hmotnosti [%]
0	5,21	4,84	-0,37	-7,10
100	5,68	4,10	-1,58	-27,82
150	4,98	3,18	-1,80	-36,14
225	5,15	3,55	-1,60	-31,07
338	5,61	4,15	-1,46	-26,02
506	5,03	-	-	-

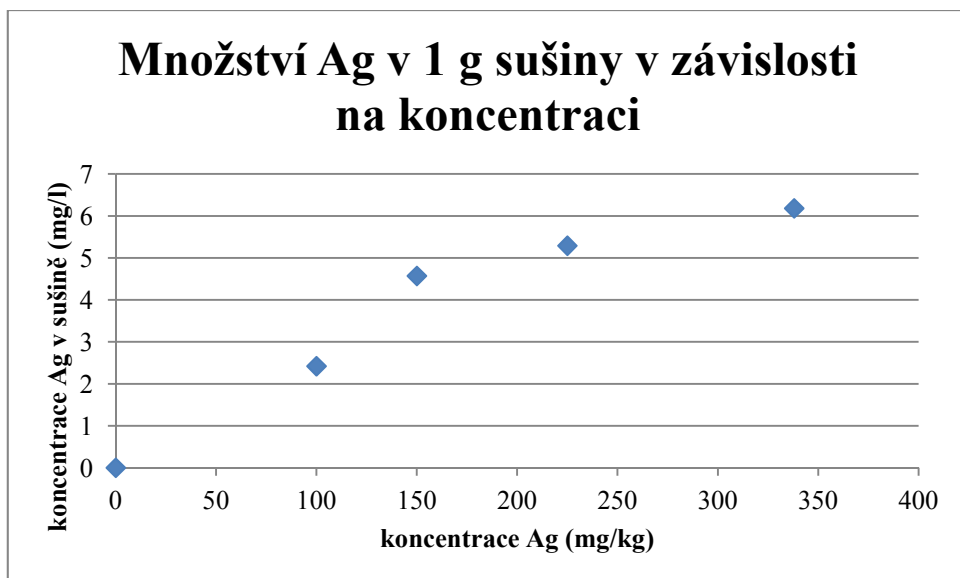
7.2.3 Bioakumulace stříbra v organismu *Eisenia foetida*

Měření probíhalo celkem třikrát. První z nich bylo provedeno ihned po skončení dvoutýdenního testu akutní toxicity (graf č. 3), další byla provedena po týdenní a dvoutýdenní expozici organismu v umělé půdě bez koloidního stříbra (graf č. 4 a 5). Výsledky prokázaly, že s rostoucí koncentrací koloidního stříbra roste koncentrace Ag v organismu žížal. Z tabulek je patrné, že při prvním stanovení bylo naměřené množství koloidního stříbra nejvyšší, při zbylých dvou měřeních pak bylo zhruba třetinové.

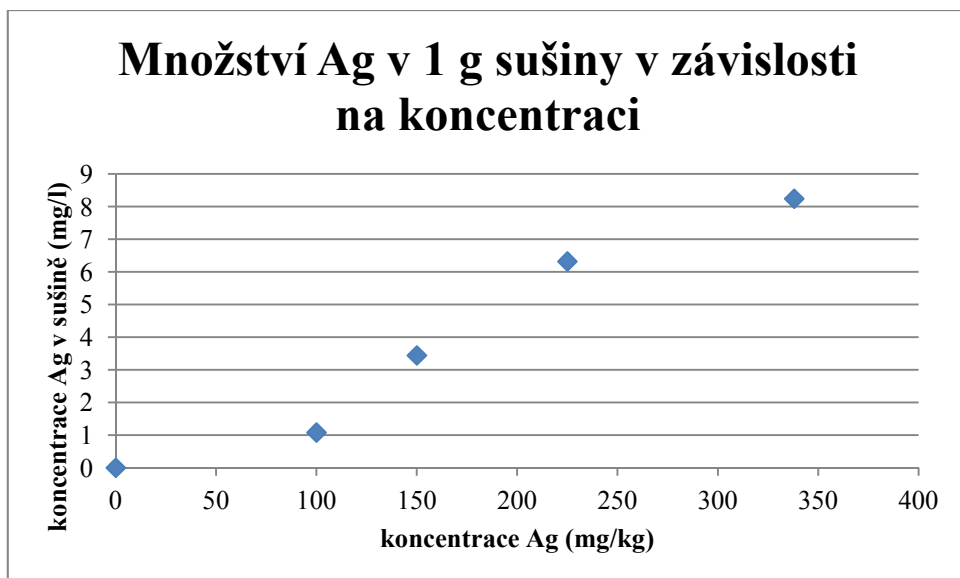
Z grafů je zřejmý markantní rozdíl v množství Ag v 1 g sušiny při koncentraci 100 mg/kg koloidního stříbra. Zatímco bezprostředně po experimentu byla tato hodnota 9,31 mg/l, po týdenním vystavení organismu v umělé půdě činila tato hodnota 2,42 mg/l. Po dvoutýdenní expozici již rozdíl hodnot nebyl tolik výrazný, bylo naměřeno 1,08 mg/l Ag. Nejvýraznější rozdíly mezi naměřenými hodnotami koncentrací Ag v sušině byly pozorovány bezprostředně po experimentu. Z výsledků lze usoudit, že testovaný organismus vstřebané stříbro postupně vylučoval, byť v menších koncentracích, než tomu bylo ihned po testu. Žížaly vystavené koncentraci 506 mg/kg nemohly být mineralizovány, neboť tato dávka pro ně byla letální LD₁₀₀.



Graf č. 3: Množství Ag v sušině v závislosti na koncentraci bezprostředně po testu.



Graf č. 4: Množství Ag v sušině při týdenní expozici v umělé půdě bez Ag.



Graf č. 5: Množství Ag v sušině po dvoutýdenní expozici v umělé půdě bez Ag.

8 Závěr

Záměrem této bakalářské práce bylo studium vlivu nanočástic stříbra na půdní organismus *Eisenia foetida*. Hlavním cílem bylo zjistit, zda mají nanočástice stříbra na testovaný organismus toxický účinek. Pro tento experiment byl zvolen test akutní toxicity na umělé půdě, přičemž mortalita byla hodnocena v 7. a 14. den po aplikaci nanočástic stříbra. Testování bylo prováděno dvakrát. U každé použité koncentrace stříbra byl testován počet 10-ti jedinců. Nejdříve byly použity finální koncentrace nanočástic stříbra 10, 20, 40, 80 a 160 mg/kg. Tyto koncentrace nanočástic stříbra nevykazovaly na testovaný organismus toxický účinek. V případě druhého testování, kdy byly použity koncentrace nanočástic stříbra 100, 150, 225, 338 a 506 mg/kg, byla úmrtnost pozorovatelná již 7. den po aplikaci nanočástic. Na konci testu, tedy 14. den, byla mortalita taktéž vyhodnocena. Z výsledků bylo zjištěno, že při aplikaci postupně vyšších koncentrací, úměrně rostl počet uhynulých jedinců. Vliv nanočástic stříbra na úmrtnost testovaného organismu byl evidentní. Při aplikaci nižších koncentrací byla mortalita testovaného organismu v průběhu celého testu nulová. Při expozici žížal během druhého testování, byla v polovině experimentu zaznamenána úmrtnost při koncentracích 338 a 506 mg/kg. Po dvou týdnech byla mortalita vyhodnocena u všech koncentrací z druhé koncentrační řady, vyjma koncentrace 100 mg/kg, která byla tímto označena jako NOAEL, nejvyšší přípustná dávka nezpůsobující toxický účinek. Naproti tomu koncentrace 506 mg/kg, při které došlo k 100 % úhynu testovaných organismů, byla označena jako letální LD₁₀₀. Střední letální dávka LD₅₀, při které uhynulo 50 % testovaných organismů, byla vypočtena pro koncentraci 210 mg/kg stříbra.

Je zřejmé, že nanočástice stříbra měly na hmotnost organismu vliv. K úbytku hmotnosti došlo při všech aplikovaných koncentracích. Výraznější pokles hmotnosti byl zaznamenán při aplikaci druhé koncentrační řady. Úbytek váhy byl přibližně o 20 % větší ve srovnání s první koncentrační řadou. Expozicí testovaného organismu při použití koncentrací 10, 20, 40, 80 a 160 mg/kg byl pokles váhy přibližně 10 %. Při použití koncentrací 100, 150, 225, 338 a 506 mg/kg se úbytek váhy pohyboval v rozmezí 30 – 40 %, přičemž při koncentraci 506 mg/kg nemohl být stanoven z důvodu celkového úhynu organismů.

Bezprostředně po experimentu byla část přeživších jedinců zmineralizována a pomocí metody AAS bylo stanoveno množství stříbra v závislosti na koncentraci nanočástic stříbra, kterým byl testovaný organismus vystaven. Zbytek jedinců byl

ponechán v umělé půdě bez testované látky, pouze s destilovanou vodou a mineralizace byla provedena po 7 a 14 dnech. Při hodnocení bioakumulace stříbra v testovaných organismech byla prokázána závislost, kdy s rostoucí koncentrací koloidního stříbra bylo naměřeno zvyšující se množství stříbra v 1 g sušiny. Nejvyšší množství stříbra bylo stanoveno při prvním měření, které proběhlo ihned po ukončení experimentu. Při zbylých dvou měření se množství stanovovaného stříbra rovněž zvyšovalo spolu s koncentrací, avšak hodnoty byly přibližně třetinové ve srovnání s prvním měřením.

Dle výsledků bylo dosaženo závěru, že nanočástice stříbra vykazují při vyšších koncentracích toxické účinky na organismus *Eisenia foetida*.

9 Summary

In this work, the influence of silver nanoparticle concentration to the organism *Eisenia foetida* was studied. The main objective was to assess the toxic effect of silver nanoparticles on the test organism. For this purpose, the acute toxicity test was chosen and mortality was determined 7 and 14 days after application of silver nanoparticles. For each of tested silver nanoparticle concentration, the 10 organisms were used. At first, the concentrations 10, 20, 40, 80 and 160 mg/kg of silver nanoparticles were applied. For the mentioned concentrations of silver nanoparticles, any toxic effect to the earthworms was proved. So, the wider range of silver nanoparticle concentrations was applied. When the concentration of 100, 150, 225, 338 and 506 mg/kg of silver nanoparticles were used, the partial mortality was observed after 7 days from the addition of silver nanoparticles. The mortality of the tested organisms after 14 days, when the testing was terminated, was also determined. According to the achieved results, it can be concluded that the increased concentration of silver nanoparticles increases the mortality of the tested organism. The mortality of the tested organisms was not proved when using silver nanoparticle concentrations in the range 10 – 160 mg/kg. When the higher concentrations were used, the mortality was observed for the concentrations of 338 and 506 mg/kg after 7 days of testing. After two weeks, the mortality for all used concentrations of silver nanoparticles (except for a concentration of 100 mg/kg) was evaluated. The concentration of 100 mg/kg was marked as a NOAEL, the highest permissible non-toxic dose. In contrast, the concentration of 506 mg/kg, which has resulted in 100% mortality of tested organisms were identified as lethal dose LD₁₀₀. The median lethal dose LD₅₀ was estimated to 210 mg/kg of silver.

It is clear that silver nanoparticles have influence on the weight of the tested organisms. The weight loss occurred for all applied concentrations. Exposure of the tested organisms to the concentrations of 10, 20, 40, 80 and 160 mg/kg, caused the weight loss approximately 10%. When using concentrations of 100, 150, 225 and 338 mg/kg weight loss ranged from 30 to 40%.

For the evaluation of silver in the tested organisms, the organisms were treated (mineralized) and the concentrations of silver were determined by AAS method. The increased amount of silver in the tested organisms with increased concentration of silver nanoparticles present in the substrate was proved. When the organisms were transferred after the 14 days of testing (in the substrate with silver nanoparticles) to the pure

substrate, the decreased concentrations of bio accumulated silver were determined. This fact indicates that *Eisenia foetida* is able partially remove silver from its organism.

According to the mentioned results, it can be concluded that silver nanoparticles exhibit toxic effects to the organism *Eisenia foetida* at concentration higher than 200 mg/l.

10 Literatura

1. Bartovská L., Šišková M.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. VŠCHT, Praha 2005.
2. Morones J. R. et al: The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346-2353 (2005).
3. Sharma V. K., Yngard R. A., Lin Y.: Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* 145, 83-96 (2009).
4. Greig-Smith P. W., Becker H., Edwards P. J., Heimbach F.: *Ecotoxicology of earthworms*. Intercept Ltd., Hampshire, UK 1992.
5. Kvítek L., Panáček A.: *Základy koloidní chemie*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2007.
6. Pouchlý J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. VŠCHT, Praha 2008.
7. Fischer O.: *Fyzikální chemie*. Státní pedagogické nakladatelství, n. p., Praha 1984.
8. Ščukin E. D., Percov A., Amelinová E. A.: *Koloidní chemie*. Academia, Praha 1998.
9. Pavlíček Z.: *Ochrana přírodního prostředí: Fyzikální chemie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1982.
10. Pucek R., Kvítek L., Hrbáč J.: Silver colloids – methods of preparation and utilization. *Facultas rerum naturalium (2004): CHEMICA 46 (online)*. 2004, vol. 43 (cit. 2010-05-5).
11. Kvítek L., Pucek R., Panáček A., Soukupová J.: Nanočástice stříbra – příprava, vlastnosti a aplikace. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Rožnov pod Radhoštěm 2009, Nanocon 2009.
12. Kvítek L.: *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra*. Habilitační práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2008.
13. Linhart I.: *Toxikologie: Interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. VŠCHT, Praha 2012.
14. Kočí V., Mocová K.: *Ekotoxikologie pro chemiky*. VŠCHT, Praha 2009.
15. Horák J., Linhart I., Klusoň P.: *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. VŠCHT, Praha 2007.

16. Anděl P.: *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Evernia, Liberec 2011.
17. OECD (1984): Earthworm, acute toxicity tests. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 207.
18. Marambio-Jones C., Hoek E. M.: *Journal of Nanoparticle Research* 12, 1531-1554 (2010).
19. Ahamed M., Alsalhi M. S., Siddiqui M. K. J.: *Clinica Chimica Acta* 411, 1841 (2010).
20. Lubick N.: Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both? *Environmental Science and Technology* 42 (23), 8617-8617 (2008).
21. Sung J. H. et al: Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicological Sciences* 108 (2), 452-461 (2009).
22. Laban G. et al: The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology* 19, 185-195 (2010).
23. Roh J. et al: Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. *Environmental Science and Technology* 43, 3933-3940 (2009).
24. Park S. - Y., Choi J.: Geno- and ecotoxicity evaluation of silver nanoparticles in freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environmental English Research* 15 (1), 23-27 (2010).
25. Hu C. W. et al: Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 42 (4), 586-591 (2010).
26. Shoultz-Wilson W. A. et al: Role of particle size and soil type in toxicity of silver nanoparticles to earthworms. *Soil Science Society of American Journal* 75 (2), 365-377 (2010).
27. Reinecke A. J., Reinecke S. A., Maboeta M. S.: Cocoon production and viability as endpoints in toxicity testing of heavy metals with three earthworm species. *Pedobiologia* 45, 61-68 (2001).
28. Spurgeon D. J., Hopkin S. P., Jones D. T.: Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction, and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 84, 123-130 (1994).