

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyzikální chemie



Bioakumulace nanočástic stříbra v rostlinách

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:
Studijní program:
Studijní obor:
Forma studia:

Jakub Vlček
B1407 - Chemie
Ekochemie
Prezenční

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Olomouc 2010

OBSAH

Úvod	8
Teoretická část	9
1 Disperzní soustavy	10
1.1 Rozdělení disperzních soustav	10
2 Koloidní soustavy	11
2.1 Kinetické vlastnosti koloidních soustav	12
2.1.1 Brownův pohyb	12
2.1.2 Difúze	13
2.1.3 Osmóza	13
2.1.4. Sedimentace	14
2.2. Elektrické vlastnosti koloidních soustav	15
2.3. Optické vlastnosti koloidních soustav	16
2.3.1. Absorpce elektromagnetického záření	16
2.3.2. Rozptyl elektromagnetického záření	17
2.4 Stabilita koloidních soustav	18
3 Koloidní Ag	19
3.1 Příprava koloidního Ag	20
3.1.1 Kondenzační metody přípravy koloidního Ag	20
3.2 Využití koloidního Ag	22
3.2.1 Antibakteriální účinky SNPs	23
4 Toxikologie	23
4.2 Ekotoxicita nanočástic a nanomateriálů	25
4.3 Toxicita Ag	25
4.3.1 Ekotoxicita Ag	26
4.3.2 Toxicita Ag pro vodní organismy	27
4.3.3 Fytotoxicita Ag	27
5 Charakteristika testovaného organismu <i>Pisum sativum</i>	30
6 Průběh pokusné práce	32

6.1 Použité chemikálie a materiál.....	32
6.2 Příprava koloidního Ag	33
6.3 Zakoncentrování koloidního Ag.....	33
6.4 Testy toxicity	34
6.4.1 Test klíčivosti semen s následným pozorováním růstu	34
6.4.2 Test růstu 10 denních rostlin po jednorázové aplikaci Ag	35
6.5 Mineralizace rostlin a stanovení množství Ag metodou AAS	36
6.6 Kritéria vyhodnocení	36
7 Výsledky	37
7.1 Test klíčivosti s následným pozorováním růstu rostliny	37
7.1.1 vliv Ag na klíčivost semen	37
7.1.2 Vliv Ag na délku a hmotnost kořene a stonku.....	37
7.1.3 Stanovení množství stříbra v 0,1 g sušiny kořene a stonku.....	41
7.1.4 Pozorování dalších růstových anomálií.....	41
7.2 Test růstu 10 denních rostlin po jednorázové aplikaci Ag	45
7.2.1 Vliv Ag na délku a hmotnost celé rostliny, kořene a stonku.....	45
7.2.2 Stanovení množství stříbra v 0,1 g sušiny kořene a stonku.....	49
8 Diskuze.....	50
8.1 Test klíčivosti semen s následným sledováním růstu	50
8.2 Test růstu 10 denních rostlin po jednorázové aplikaci Ag	51
9 Závěr	52
10 Summary	53
11 Použitá literatura	55

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Aleše Panáčka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem uvedl v seznamu literatury. Práce byla vypracována na Katedře fyzikální chemie PřF Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 13. května 2010

.....

Jakub Vlček

Děkuji svému odbornému vedoucímu **RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D.** za cenné připomínky a podporu při vedení a vypracování této práce. Také děkuji **doc. Lence Luhové, Ph.D.** za pomoc při hydroponickém pěstování Hrachu setého.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Jakub Vlček
Název práce	Bioakumulace nanočástic stříbra v rostlinách
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	Rostoucí využívání materiálů na bázi stříbrných nanočástic je spojeno s rizikem uvolňováním stříbrných nanočástic do životního prostředí. Tento fakt může být v budoucnosti potencionálním rizikem pro přírodu. Hlavním cílem této bakalářské práce bylo stanovit toxicitu nanočástic stříbra na suchozemskou rostlinu <i>Pisum sativum</i> (Hrách setý). Stříbrné nanočástice byly připraveny Tollensovým procesem, redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou. Připravené částice vykazovaly průměrnou velikost 30 nm. Stanovován byl toxický vliv nanočástic stříbra na klíčivost a růst rostlin, následně pak bioakumulace stříbra v těle rostliny. Nanočástice stříbra ovlivňovaly především kořenovou část rostliny <i>Pisum sativum</i> , kde byl pozorován dlouhivý růst kořenů, inhibice růstu vlasových kořenů a ovlivnění gravitropické reakce rostliny.
Klíčová slova	Nanočástice stříbra, bioakumulace, ekotoxicita, Hrách setý.
Počet stran	55
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Jakub Vlček
Title	Bioaccumulation of Silver Nanoparticles in Plants
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
The year of presentation	2010
Abstract	The increased use of nano-sized silver materials is connected with potential release of these particles into the environment and this may pose a risk to the nature. The aim of the bachelor thesis was to determine the toxicity of silver nanoparticles to the terrestrial plant <i>Pisum sativa</i> . Silver nanoparticles were prepared by the Tollens process – by a reduction of $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ with a maltose as a reduction agent. The prepared particles had an average size around 30 nm. There were observed toxic effect of silver nanoparticles to the germination and plant growth and consequently the bioaccumulation of silver in the plants was determined. Silver nanoparticles had influenced especially the roots of plant <i>Pisum sativum</i> where the root elongation, growth inhibition of hairy roots and affection of the gravitropism reaction were observed.
Keywords	Silver nanoparticles, bioaccumulation, plants, ecotoxicology, <i>Pisum sativa</i> .
Number of pages	55
Number of appendices	0
Language	Czech

Úvod

Nanotechnologie je v současnosti jeden z nejvíce se rozvíjejících oborů, odhaduje se, že se bude v příštích 10 letech investovat do tohoto oboru přes 1 bilion dolarů.¹

Nanočástice stříbra (SNPs - silver nanoparticles) jsou hojně využívány pro jejich specifické fyzikálně-chemické vlastnosti. Zatímco v minulosti se používaly převážně při výrobě detektorů, elektrotechniky, nebo pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii (SERS),² v dnešní době se díky značným antibakteriálním účinkům dostávají na komerční trh ve formě antiseptických a desinfekčních přípravků. SNPs se již běžně přidávají do deodorantů, oblečení, bandáží, zubních kartáčků, čistících prostředků apod.³ S nárůstem komercializace obecně všech nanoproduktů včetně nanočástic stříbra stoupá riziko kontaminace životního prostředí při výrobě, nakládání či likvidaci těchto produktů. Proto je nutné provádět ekotoxikologické testy na celé řadě k tomu určených organismů včetně teratrálních rostlin

Cílem této práce bylo posoudit toxický vliv nanočástic stříbra na Hrách setý (*Pisum sativum*). Tato rostlina byla vybrána zejména pro její snadné a rychlé pěstování. Hrách setý byl exponován nanočásticím stříbra s různou koncentrací, přičemž se stanovoval vliv na klíčení a následně vliv na růst rostliny. Rovněž byla sledována akumulární schopnost nanočástic stříbra v kořenech a nadzemních částech testovaných rostlin.

Teoretická část

1. Disperzní soustavy

Disperzní soustava je takový systém, který je složen alespoň ze dvou, fázově nebo chemicky se lišících, druhů hmoty. Tato soustava je tedy tvořena alespoň 2 fázemi, které se mohou lišit složením. Jedna fáze (disperzím) je dispergovaná v druhé fázi (dispergens). Disperzum je také označován jako disperzní podíl, obdobně dispergens jako disperzní prostředí. Disperzní prostředí a disperzní podíl jsou od sebe odděleny fázovým rozhraním.⁴

1.1 Rozdělení disperzních soustav

Disperzní soustavy se klasifikují dle různých hledisek, zejména se jedná o velikost dispergovaných částic, tvar dispergovaných částic a skupenství disperzního podílu a disperzního prostředí. Důležitou charakteristikou je také stupeň disperzity, který vyjadřuje převrácenou hodnotu rozměru disperzních částic

Podle velikosti dispergovaných částic částic

hrubě disperzní (částice větší než 1000 nm)

koloidně disperzní (částice o velikosti 1-1000 nm)

analyticky disperzní (částice menší než 1nm)⁴

Podle velikosti částic lze disperzní soustavy rozlišovat na monodisperzní a polydisperzní. Monodisperzní soustavy obsahují částice se stejnou velikostí, kdežto soustavy polydisperzní obsahují částice s různou velikostí.⁵

Podle tvaru dispergovaných částic

korpuskulární částice (izometrické)

laminární částice (destičky nebo lamely)

fibrilární částice (tyčinky nebo vlákna)⁴

Podle skupenství disperzního podílu a prostředí

U soustav s malým podílem disperzumu je skupenství shodné se skupenstvím dispergens. Jinak je tomu však u soustav koncentrovanějších, kdy se na skupenství podílí disperzum i dispergens.⁴

Tabulka 1: Rozdělení disperzních soustav podle skupenství disperzního podílu a prostředí⁴

skupenství		Disperzní soustava		
dispergens	disperzum	hrubě	koloidně	analyticky
(g)	(g)	-	-	
	(l)	děšť, mlha	aerosoly	např: páry vody ve vzduchu
	(s)	prach, dým	aerosoly	např: páry jodu ve vzduchu
(l)	(g)	bubliny, pěny	pěny	roztok plynu v kapalině
	(l)	emulze	lyosoly	směsi mísitelných kapalin
	(s)	suspenze	lyosoly	pravé roztoky tuhých látek
(s)	(g)	Tuhé pěny		Eutektika, slitiny, látky s krystalickou vodou
	(l)			
	(s)	tuhé směsi krystalů	tuhé soly	

2. Koloidní soustavy

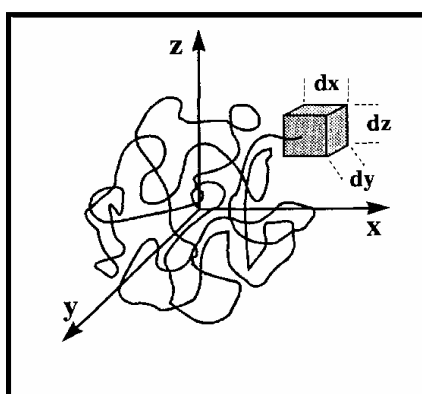
Koloidní soustavy jsou středem pozornosti zejména kvůli svým specifickým fyzikálně-chemickým vlastnostem. Tyto specifické vlastnosti souvisí s malým rozměrem koloidních částic a s tím spojenou velkou plochou fázového rozhraní mezi disperzní fází a disperzním prostředím, která se zvětšuje se zmenšujícím se velikosti částic.⁵

Nejčastěji se využívají koloidní soustavy, které jsou tvořeny pevnou disperzní fází a kapalným disperzním prostředím (lyosoly). Podle toho, jak ostře je vymezené fázové rozhraní, lze lyosoly rozdělit na lyofobní, lyofilní a asociativní. Soustavy lyofobní nevznikají samovolně a ve většině případů je nutná jejich stabilizace. Nejčastěji jsou tvořeny anorganickými látkami. Jinak je tomu u lyofilních soustav, které vznikají samovolně a jsou termodynamicky stálé. Lyofilní soustavy jsou většinou tvořeny látkami s velkou molekulovou hmotností. Pokud koloidní soustava vzniká asociací molekul povrchově aktivních látek, jedná se o soustavu asociativní. Lyofilní i lyofobní soustavy mohou tvořit gely. Gely se vyznačují tím, že mohou přecházet z kapalně formy do pevné.⁵

2.1 Kinetické vlastnosti koloidních soustav

2.1.1 Brownův pohyb

Homogenní roztok v mikroskopickém měřítku podléhá kontinuálnímu proudění na molekulární úrovni. Proudění se projeví změnou hustoty molekul v jakémkoliv místě roztoku v závislosti na čase.⁶ Molekuly disperzního prostředí konají tepelný pohyb a narážejí do koloidních částic, které uvedou do pohybu. Intenzita tohoto pohybu roste s teplotou.⁵ Čím jsou částice menší, tím je pohyb intenzivnější. U větších částic zaznamenáme jen vibrace, u částic větších než 4 μm Brownův pohyb nezaznamenáme vůbec.⁷ Částice se může pohybovat do všech směrů a tento pohyb je zcela nahodilý.⁶



Obr. 1. Brownův pohyb ⁶

2.1.2 Difúze

Tento jev je projevem Brownova pohybu. Hnací silou difúze je koncentrační gradient. Systém se snaží o vyrovnání rozdílných koncentrací a to vždy ve směru z nižších koncentrací do koncentrací vyšších. Přesun hmoty se dá charakterizovat 1. Fickovým zákonem ⁵:

$$\frac{dn}{dt} = -SD \frac{dc}{dx} \quad (2)$$

kde dn/dt je látkové množství difundující v čase t , dc/dx je koncentrační gradient, D je difúzní tok a S představuje plochu kolmou na směr difúze. Difúzní tok ⁵, definovaný Einsteinem pomocí koeficientu tření a absolutní teploty :

$$D = \frac{kT}{B} \quad (3)$$

k je Boltzmanova konstanta, T je termodynamická teplota a B je koeficient tření.

2.1.3 Osmóza

Vede k vyrovnávání koncentrací v roztoku obdobně jako difúze, ale prostřednictvím semipermeabilní membrány, která odděluje disperzní systém od čistého disperzního prostředí. Tato membrána je nepropustná pro disperzní částice, protože póry membrány jsou menší než velikost těchto částic. Molekuly čistého rozpouštědla tedy pronikají přes membránu do disperzního systému dokud nedojde k vyrovnání koncentrací. Děj tedy probíhá opačným směrem než klasická difúze.⁴ Tento děj se dá zastavit působením tlaku proti čistému rozpouštědлу, hodnota tohoto přetlaku se nazývá osmotický tlak.⁸ Osmotický tlak klesá s rostoucí velikostí částic disperzního systému, a proto se osmotický tlak dá využít k zjištění velikostí dispergovaných částic. Osmotický tlak se označuje π a je určen vant Hoffovou rovnicí ⁵:

$$\pi = cRT \quad (4)$$

kde c značí molární koncentraci, R je univerzální plynová konstanta a T termodynamická teplota. Tento vztah je platný pro pravé roztoky. Pro koloidní systémy je

nutno tento vztah upravit. Jednou z možností je si vyjádřit koncentraci částic v jako podíl počtu dispergovaných částic v objemové jednotce. Další možnost je zavedením hmotnostní koncentrace w (hmota disperzního podílu v 1 l) ⁷, dosazením do vztahu (4) dostaneme upravené rovnice (5,6) :

$$\pi = v \frac{RT}{Na} \qquad \pi = \frac{w}{M} RT \qquad (5,6)$$

2.1.4. Sedimentace

Tento pohyb částic, který je konán ve směru působení síly, probíhá vlivem gravitačního nebo odstředivého silového pole, které na částice působí. V případě sedimentace se částice vlivem působení gravitační síly F_g pohybují směrem dolů ke dnu. Pohyb částice je závislý jak na vlastnostech částice (hmotnost, hustota a tvar), tak na vlastnostech prostředí. Proti sedimentaci působí síla vztlaková a síla viskozitního odporu. U hrubých disperzí na konci sedimentace budou všechny částice u dna nádoby, jinak je tomu u systémů s vyšším stupněm disperzity, kde některé částice zůstanou rozptýleny v roztoku. Tento děj se vysvětluje Brownovým pohybem, který působí proti sedimentaci.⁶ A to tak, že se systém snaží vyrovnat vzniklé koncentrační rozdíly a dochází k difúzi směrem opačným, tedy směrem vzhůru.⁷

Pokud částici vystavíme působení odstředivého pole, dochází k sedimentaci v radiálním směru. Na částici působí síla odstředivého pole $F_{\text{odstř}}^6$ podle vztahu :

$$F_{\text{odstř.}} = mx\omega \qquad (7)$$

kde ω značí úhlovou rychlost a x vzdálenost od středu otáčení. Tato síla je větší než gravitační, a proto se částice pohybuje daleko rychleji a rovněž sedimentují i nejmenší částice. K tomuto účelu se používají odstředivky nebo ultracentrifugy.⁵

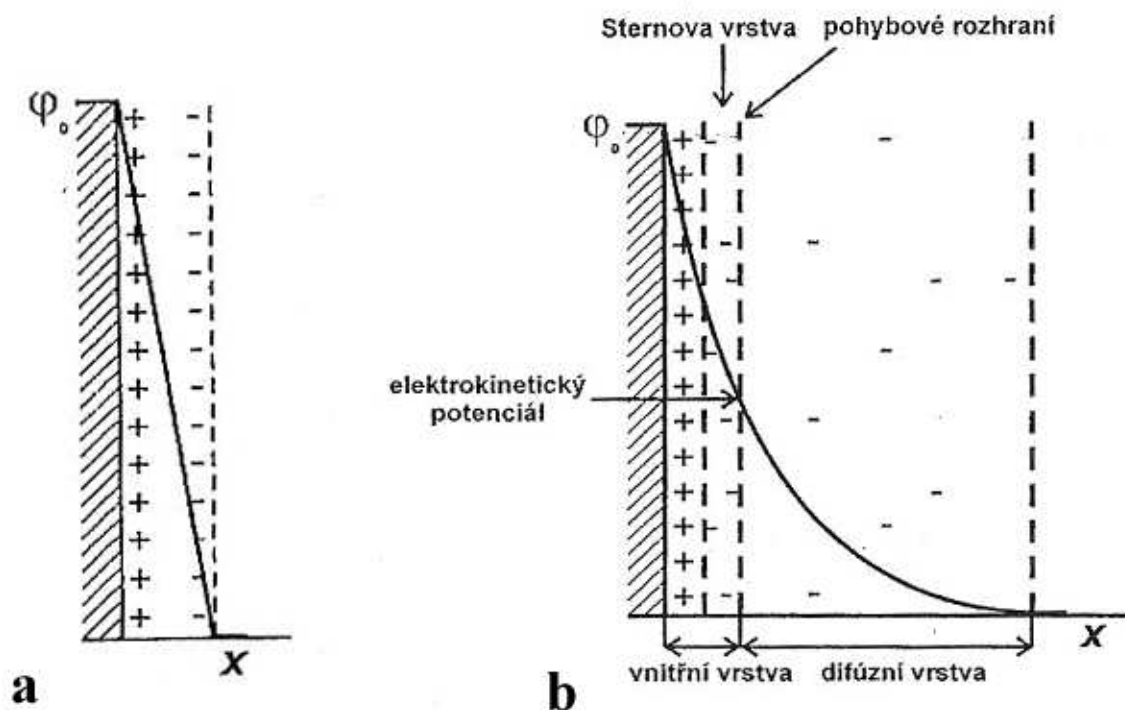
2.2. Elektrické vlastnosti koloidních soustav

První zmínky o elektrických vlastnostech disperzních soustav pocházejí z Moskvy z roku 1880 od profesora F.F. Rejsse, který vyzoroval dva důležité děje a sice elektroosmózu a elektroforézu.⁹ Tyto elektrokinetické děje jsou založeny na pohybu elektricky nabitých částic v elektrickém poli. Později byly objeveny další elektrokinetické děje a to potenciál proudění a sedimentační potenciál. Tyto děje se od elektroosmózy a elektroforézy liší tím, že elektrickému poli systém nevystavujeme, ale elektrické pole vzniká působením mechanických sil na elektricky nabitě částice, je to tedy jev opačný.⁵

Výskyt elektroforetických dějů spočívá v tvorbě elektrického náboje na fázovém rozhraní mezi disperzní fází a disperzním prostředím. Tento náboj indukuje tvorbu elektrické dvojvrstvy.³ Tato dvojvrstva je popsána několika modely, tím prvním a jednodušším je model Helmholtzův, vysvětlený pomocí deskového kondenzátoru. Ten je složen ze dvou rovnoběžných desek oddělených vrstvou disperzního prostředí. První desku představují ionty ukotvené přímo na povrchu disperzních částic (vnitřní vrstva) a druhou desku představují protionty v disperzním prostředí (vnější vrstva). Mezi těmito dvěma fázemi se pak utvoří rozdílný elektrický potenciál $\Delta\phi$.⁹ V reálné disperzní soustavě ovšem tento model selhává, protože nebere v úvahu tepelný pohyb a jiné neelektrické interakce iontů a z toho vyplývající fakt, že protionty nemůžou ekvivalentně pokrýt ionty zakotvené na povrchu.⁵

Model, který již tepelný pohyb a jiné interakce iontů zohledňuje, vytvořili Gouy, Chapman a později doplnil Stern. Tento model je založen na rozdělení vrstev protiontů, a to na vrstvu vnitřní (Sternovu) a vrstvu vnější (difúzní). Vnitřní vrstva je tvořena protionty v těsné blízkosti iontů zakotvených na povrchu, ke kterým se poutají adsorpčními silami. Na ionty adsorbované na povrchu částice se mohou adsorbovat i ionty nabitě stejně jako povrch částice, takové ionty se pak nazývají kointy.⁹ Druhá vrstva vnější (difúzní), je tvořena protionty, které jsou vlivem tepelného pohybu rozptýlené v prostředí a jsou ve větší vzdálenosti od nabitého povrchu částice, ke kterému jsou poutány elektrostatickými silami.^{5,10} V této vrstvě se také mohou nacházet kointy, jejichž koncentrace roste spolu s rostoucí vzdáleností od stejně nabitého povrchu částice.⁹ Po připojení elektrického pole se vnitřní vrstva začne pohybovat s částicí oproti disperznímu prostředí, difúzní vrstva se nepohybuje. Rozhraní mezi těmito vrstvami znázorňuje tzv. pohybové rozhraní. Potenciál dvojvrstvy ϕ nejprve prudce klesá až se vyrovná potenciálu Sternovy vrstvy, dále již klesá pozvolna.

Velikost φ souvisí se stabilitou disperzních částic, např. přidavkem elektrolytu se značně snižuje, což vede k menší stabilitě systému.^{5,10}



Obr. 2. Modely elektrické dvojvrstvy: a) Helmholtzův deskový model b) Sternův model ⁵

2.3. Optické vlastnosti koloidních soustav

Disperzní soustavy mají charakteristické optické vlastnosti dané velikostí disperzních částic, která je menší nebo srovnatelná s vlnovou délkou viditelného elektromagnetického záření.⁹ Elektromagnetické záření, které dopadá na koloidní disperzní soustavu, se absorbuje a rozptýlí. Dochází tedy k pravé absorpci a rozptylu dopadajícího záření. Jeden z těchto dějů vždy převládá.⁵

2.3.1. Absorpce elektromagnetického záření

Absorpce elektromagnetického záření je spojena se změnou energetických stavů valenčních a vazebných elektronů. Tato změna je způsobena pohlcením kvanta

elektromagnetické záření, které na koloidně disperzní soustavu působí. Absorpci záření popisuje Lambert-Beerův zákon⁵ :

$$A = -\log \frac{I}{I_0} \quad (8)$$

I značí intenzitu prošlého záření látkou, I_0 je intenzita dopadajícího záření na látku, ε je molární absorpční koeficient, c je koncentrace látky a d je tloušťka vrstvy kterou paprsek záření prochází. Oproti pravým roztokům je Lambert-Beerův zákon u koloidních soustav komplikovanější, což je zapříčiněno závislostí absorpce na velikosti dispergovaných částic.⁵

2.3.2. Rozptyl elektromagnetického záření

Světlo, které dopadá na koloidně disperzní soustavu, je následně rozptýleno do všech směrů, přičemž vlnová délka ani kmitočet světla se nemění. Takový rozptyl se označuje jako elastický.⁸ Rozptyl záření je způsobený indukovaným dipólovým momentem částic, který vzniká vlivem jejich polarizace. Částice se polarizuje působením vektoru intenzity elektrického pole světelné vlny E , která na ní dopadá. Dipól moment molekul se rozkmitá na stejnou frekvenci jako má záření, které na molekuly dopadá⁹ :

$$\nu = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{c}{\lambda} \quad (9)$$

kde ω značí úhlovou frekvenci, λ vlnovou délku a c je rychlost světla v daném prostředí. Z elektrodynamických zákonů pak vyplývá, že kmitající dipól momenty molekul jsou zdrojem sekundárních vln, které mají shodnou frekvenci ω , ale šíří se i jinými směry než směr dopadající vlny. U stejnorodého prostředí, které má polarizaci α_0 , je směr šíření sekundárních vln vlivem jejich interference podle Huygensova-Fresnelova principu shodný se směrem vlny dopadající. Jinak je tomu u nestejnorodého prostředí, které obsahuje částice nebo jiné nehomogenní útvary s polarizovatelností α , která je odlišná od polarizovatelnosti prostředí α_0 . V takovém případě dochází k difrakci záření na nehomogenních složkách prostředí, tyto difrakce vedou ke vzniku tzv. Tyndalova jevu,⁹ který popisuje efekt, kdy se světelný paprsek po průchodu disperzním prostředím rozšiřuje do tvaru kužele. Tento kužel je viditelný z bočního pohledu a částice v něm jdou vidět jako světelné body.⁵

Velikost intenzity rozptýleného záření je nepřímo úměrná čtvrté mocnině λ , což platí pro malé částice vzhledem k vlnové délce dopadajícího záření. Touto skutečností se dá například zdůvodnit, proč je obloha přes den modrá a červená při západu slunce. Modrá složka světla se oproti červené rozptyluje s 15 x větší intenzitou. Při průchodu světla atmosférou dochází k jeho rozptylu na částicích atmosféry, intenzivnější rozptyl u menších λ způsobuje modrou barvu oblohy.⁸ Při západu slunce se dráha světla v atmosféře prodlouží a začne převládat rozptyl dlouhovlnné červené složky světla, která se šíří příměji než složka krátkovlnná, šířící se více do stran. Obloha se potom jeví jako červená.⁴

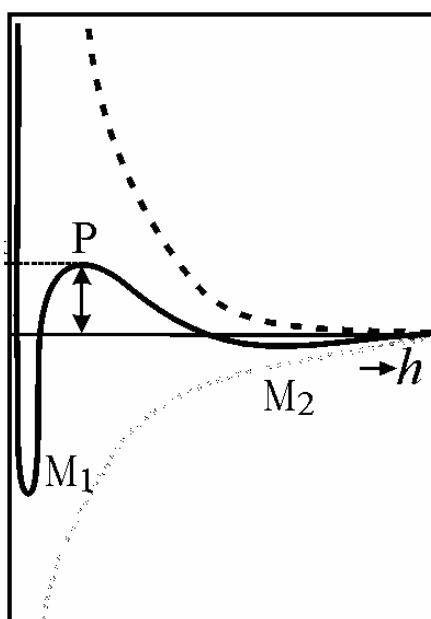
Rozptyl světla se využívá u pozorování koloidních disperzí. Protože nanočástice kvůli jejich velikosti nelze pozorovat klasickými optickými metodami (pod 200 nm), je nutno použít tzv. ultramikroskop, který je založen na principu pozorování rozptýleného záření. Částice se pak jeví jako světlé body na černém pozadí.⁵

Pokud se jako zdroj záření použije laser, lze pozorovat v určitých směrech interferenci záření, která způsobuje zesílení intenzity rozptýleného záření. Vlivem difúzního pohybu částic tato zesílená intenzita kolísá (v závislosti na čase). Tento jev se nazývá dynamický rozptyl světla. Z tohoto dynamického rozptylu se dá zjistit velikost částic, na základě této skutečnosti pracuje řada přístrojů na stanovení velikosti koloidních částic.⁵

2.4 Stabilita koloidních soustav

Koloidní soustava vykazuje přebytek povrchové energie díky velkému povrchu částic disperzní fáze. Kvůli tomuto nadbytku povrchové energie se koloidní soustava nachází v metastabilním stavu. To znamená, že při překonání energetické bariéry se soustava může dostat do stavu s nižší povrchovou energií a částice začnou agregovat. Stabilitu koloidních soustav popisuje tzv. interakční křivka, která vyjadřuje působení odpudivých a přitažlivých sil v závislosti na vzdálenosti částic H . Na této křivce lze vidět dvě minima energie. První minimum M_1 znázorňuje koagulaci, kdy sou částice vlivem silných přitažlivých sil nevratně pospojovány. V případě, kdy jsou částice od sebe ve vzdálenosti, která odpovídá druhému minimum M_2 , dojde ke vratnému spojování částic slabými silami, tzv. flokulaci. Soustava je stabilní, když převažují odpudivé mezimolekulové síly nad přitažlivými. Tato optimální vzdálenost mezi částicemi je na interakční křivce vyznačena bodem P.

Dostatečně velké odpuzivé interakce, které zamezí překonání energetické bariéry, jsou převážně dány nábojem na povrchu částic. Využívá se i stericke stabilizace, která spočívá v přidání tzv. ochranných koloidů do soustavy. Mezi ochranné koloidy patří např. želatina nebo různé druhy polymerů. Tyto látky se adsorbují na povrch částic a zabrání tak agregaci.⁵



Obr. 3. Interakční křivka⁵

3 Koloidní Ag

První důkazy používání stříbra a jeho sloučenin pocházejí ze Starého Egypta, kde bylo využíváno zvláště pro jeho antibakteriální účinky. Ze stejného důvodu se stříbro využívalo v medicíně na počátku 20. století. Po objevení penicilinu využití koloidního stříbra jako antibakteriálního prostředku rapidně pokleslo.¹¹ Koloidy ušlechtilých kovů, především stříbra a zlata, byly po staletí hojně využívány pro barvení keramiky a skla.¹² Například tzv. Lykurgovy poháry, které pocházejí z období římské říše z 5. st.n.l., obsahují 40 ppm zlata a 300 ppm stříbra o velikosti 70 nm. Počátky moderní koloidní chemie se připisují Michaelu Faradayovi, který v roce 1957 připravil koloidní zlato redukcí tetrachlorozlatitanu.¹³

3.1 Příprava koloidního Ag

V současné době se dají metody přípravy koloidů kovů (a tedy i Ag) rozdělit do dvou skupin, a to metody dispergační a metody kondenzační. Principem kondenzačních metod je kondenzace atomů nebo molekul do větších agregátů. Tyto metody se dají použít v případě, kdy je dostatek jader k agregaci a nově vytvořený stav je termodynamicky stabilnější. Kondenzační metody se dají rozdělit na chemické a fyzikálně-chemické. Mezi chemické metody se řadí např. redukční, acidobazické a precipitační reakce. Fyzikálně-chemickými metodami myslíme změnu stavových podmínek, zejména teploty a tlaku nebo změnu rozpouštědla. Dispergační metody jsou založené na zvětšování stupně disperzity disperzního podílu v disperzním prostředí. Jelikož tyto děje neprobíhají samovolně, je nutno pro rozklad použít např. mechanickou sílu, elektrický výboj, ultrazvuk nebo laser. Kondenzační metody jsou převážně používány zejména pro snadnou korigovatelnost stupně disperzity výsledného koloidu.²

3.1.1 Kondenzační metody přípravy koloidního Ag

Nejrozšířenějším způsobem přípravy koloidního Ag jsou redukční reakce, které spočívají v redukcí rozpustné Ag sloučeniny vhodným redukčním činidlem.¹² U některých redukčních postupů lze korigovat výslednou velikost nanočástic. Tyto postupy se dělí na jedнокrokové a dvukrokové. U jedнокrokových (např. Tollensův postup) se redukuje jedním redukčním činidlem. Naopak tomu je u dvukrokových redukcí, kde se nejdříve použije silné redukční činidlo a vzniknou tak menší částice, následně se přidá další množství rozpustné Ag sloučeniny, ta se redukuje slabším redukčním činidlem, což má za následek zvětšování velikosti původních částic připravených v prvním kroku.¹⁴

Příprava podle Creightona, Blatchforda a Albrechta

Při tomto postupu se používá silné redukční činidlo (NaBH_4), kterým se redukuje AgNO_3 ve vodném prostředí. Vzniknou nanočástice o velikosti 5-20 nm. Nevýhodou tohoto postupu je přítomnost borátového aniontu, který se následně sorbuje na povrch vzniklých nanočástic. Tento fakt může být problém např. u některých analýz metodou SERS.¹²

Příprava podle Lee-Meisella

V tomto případě se oproti předchozímu postupu používá slabší redukční činidlo a to citrátový anion. Velikou výhodou je, že citrátový anion zároveň vzniklé nanočástice stabilizuje. Velikost vzniklých nanočástic se pohybuje v rozmezí 30 -120 nm.¹²

Tollensův postup

Tento postup dovoluje při výrobě nanočástic korigovat jejich výslednou velikost. Základem je vznik amoniakálního komplexu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ (vzniká reakcí NH_3 a AgNO_3) a jeho následná redukce s redukujícím sacharidem (např. glukosa, fruktosa, maltóza nebo laktóza).¹² Velikost částic lze korigovat koncentrací ligandu v $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, změnou koncentrace Ag^+ , změnou redukčního sacharidu či změnou hodnoty pH.¹⁴

Ostatní redukční reakce

Jako redukčních činidla se dají využít i jiné látky než které byly doposud uvedeny jako např. EDTA, hydroxylamin, kyselina Askorbová, hydrazin nebo formaldehyd¹²

3.1.2 Dispergační metody přípravy koloidního Ag

Nejdůležitější z dispergačních metod je laserová ablace, touto metodou můžeme připravit velmi malé koloidní částice o velké chemické čistotě. Z dalších používaných metod můžeme zmínit přípravy koloidního Ag působením UV a gama záření nebo působením ultrazvuku.²

Laserová ablace

Nespornou výhodou této metody je zajisté již výše zmiňovaná chemická čistota vzniklých částic, ta je dána tím, že není potřeba používat chemická činidla. Další z výhod je možnost volby rozpouštědla. Laser se nechá působit na makroskopické stříbro, nejčastěji na stříbrnou folii. Tato metoda je využívána pro účely měření metodou SERS, kde se jednak dají použít vzniklé koloidní částice, tak i zbylá stříbrná folie. Velikost výsledných částic závisí na vlnové délce a intenzitě pulsů použitého laseru.² Velikost částic klesá se zvětšujícím se počtem ozařujících pulsů laseru (při 1064 nm), tento fakt se vysvětluje samoabsorpcí záření koloidními částicemi v roztoku. Také je dokázáno, že další ozařování již vzniklých koloidních částic vede ke zmenšování jejich velikosti. Jak bylo již zmíněno výše, velikost vzniklých částic se dá také ovlivnit změnou vlnové délky použitého laseru. Při použití kratších vlnových délek vzniknou menší částice než při použití vlnových délek delších.¹⁵

Příprava pomocí účinků gama záření

Principem této metody je přímé ozařování stříbrné soli zářením gama. Ozařování se provádí ve vodíkové atmosféře, ve které působením záření vznikají hydratované elektrony a atomární vodík, které redukují stříbrnou sůl. Vzniklé částice jsou ovšem oxidovány přítomnými OH radikály. Část OH radikálu reaguje s molekulou vodíku ve vodíkové atmosféře a vzniká atomární vodík. Velikost vzniklých částic se pohybuje kolem 7 nm. Při této metodě se do reakční směsi přidává minimum chemických látek, což vede k velké chemické čistotě vzniklých částic.²

Příprava pomocí účinku UV záření

K reakční směsi se přidává určitá organická látka, která vlivem UV záření vytváří radikály, které redukují stříbrnou sůl. Výhodou této metody oproti přípravě pomocí gama záření je levnější pořizovací cena a levnější provozní náklady.²

3.2 Využití koloidního Ag

V současnosti se stříbro používá v medicíně jako velice účinná dezinfekce zejména chirurgických nástrojů, také jako antibakteriální prostředek při léčení popálenin nebo při výrobě endoprotéz a umělých srdečních chlopní, kde se stříbro používá při úpravě povrchů.¹¹

Využití nanočástic stříbra (SNPs) zdaleka nekončí u medicíny. SNPs nyní prochází velkou komercializací a používají se zejména pro své antibakteriální účinky jako přísady do běžného spotřebního zboží, jako jsou deodoranty, pleťová tonika, zubní kartáčky, oděvy apod. Dalším využitím SNPs díky jejich specifickým vlastnostem je použití v technickém sektoru. V 70. letech se začalo koloidní stříbro používat u Ramanovy spektroskopie. Tím byla vyvinuta velice citlivá optická metoda SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy). Koloidní stříbro se také používá pro jeho vysoce vodivé účinky při výrobě elektroniky, díky přítomnosti povrchového plazmonu se využívá při konstrukcích vysoce citlivých a selektivních detektorů.¹⁶ V neposlední řadě se koloidní Ag využívá pro jeho katalytické účinky zejména pro rozklad chemických látek zatěžujících životní prostředí. (např. organické barviva nebo nitrosloučeniny)

3.2.1 Antibakteriální účinky SNPs

Pro bakterie jsou toxické koncentrace SNPs řádově nižší než pro vyšší organismy. Například toxická koncentrace pro bakterii *E. coli* a *S. aureus* je 1,69 µg/ml.¹¹ Pro srovnání toxická koncentrace pro hladké svalové buňky cév je 5 µg/ml, pro fibroblasty 50 µg/ml, pro alveolární makrofágy 25 µg/ml a pro zárodečné kmenové buňky 10 µg/ml. Pro velikost toxicity SNPs je důležitý jejich tvar. Testy prováděné na *E. coli* ukazují, že totální inhibice růstu bakterií nastává při expozici 1 µg celkového množství stříbra pro zkosené trojhranné částice, narozdíl od kulovitých částic, kdy pro zpozorování inhibice růstu je třeba použít 50-100 µg celkového množství stříbra.¹⁷ Velikost antibakteriální aktivity SNPs závisí také na velikosti částic, menší částice vykazují větší antibakteriální aktivitu. Např. při přípravě částic Tollensovou metodou byla zjištěna největší aktivita u částic připravených pomocí maltózy (25 nm). Působení těchto částic na bakterie vede k inhibici růstu a může vést až k zabití bakterie. Mechanismy těchto dějů nejsou přesně známy, ale předpokládá se, že se částice navážou na povrch buněčné stěny a omezí tím její propustnost a respiraci. Proto menší částice, které mají větší aktivní povrch, jsou pro bakterie toxičtější. Určité množství částic se může dostat skrz buněčnou membránu a nepříznivě působit na DNA. K celkové toxicitě může přispívat uvolňování stříbrných iontů samotnými nanočásticemi.¹⁴

4 Toxikologie

Toxikologie je nauka o jedech a jejich působení na organismus nebo životní prostředí. Jedem mohou být všechny látky, jestli je látka jed závisí na dávce. Jed je látka s negativním vlivem pro živé organismy a posunuje negativně rovnováhu v ekosystémech. Toxicita látek se dělí na akutní a chronickou. Akutní se projeví po jednorázové aplikaci jedu, jinak je tomu u toxicity chronické, kde se účinky jedu projeví až při dlouhodobé expozici. Mezi tyto jedy se například řadí DDT (dichlordifenyltrichlormethylmethan). Toxikologie zahrnuje několik odvětví a to zejména toxikologii chemickou, farmakologickou, průmyslovou, klinickou, biochemickou, potravinářskou, veterinární, vojenskou, zemědělskou a nejmladší odvětví ekotoxikologii.¹⁸ Toxicita látky je dána jednak její strukturou, ale také její rozpustností ve vodě a v kyselém prostředí. Při styku toxické látky s organismem dochází k průchodu látky do organismu a poté dochází k její distribuci organismem, část látky se může specificky navázat na receptor (makromolekuly o velké molekulové hmotnosti), což se projeví specifickými

účinky. Zbytek látky se váže nescificky na jiné struktury, tyto nescifické vazby se neprojeví na specifickém účinku, ale mohou být příčinou sekundárních toxických účinků. Látka se může přeměnit na řadu metabolitů, ty jsou pak znovu distribuovány po organismu. Nakonec dochází k exkreci látky z organismu. Exkrece u živočichu probíhá prostřednictvím vylučování moči, pevných výkalů, žlázami a dýcháním, u rostlin pak vylučováním exudátů.^{18,19}

4.1 Ekotoxikologie

Moderní ekotoxikologie je obor, který kombinuje poznatky z ekologie a toxikologie. V 60. letech se kromě přímých toxických účinků látek začala sledovat bioakumulace látek v organismu a začaly se vyvíjet metody, kterými bylo možné sledovat toxické účinky látek na organismus a životní prostředí. Pojem ekotoxikologie poprvé použil dr. René Truhaut v roce 1969.¹⁸

Ke zkoumání ekotoxicity se používají organismy, u kterých dobře známe stavbu těla, fyziologii a životní procesy. Tyto organismy se pak vystaví působení toxické látky a z reakce se vyhodnotí rizika expozice příslušné látky na populace sledovaného nebo příbuzného organismu, popřípadě se rizika mohou aproximovat na člověka. Například pro vodní prostředí se používají bakterie, ryby, bezobratlí, prvoci, řasy a vodní rostliny. Vyšší rostliny se používají jako testovací organismus i pro jiné než vodní prostředí. Pro tyto účely se používají různé druhy rostlin, např. pro testování toxicity přípravků na ochranu rostlin se používá 75 druhů rostlin. Rostliny se pěstují ve vhodné půdě nebo hydroponicky, což znamená pěstování rostlin bez půdního substrátu, ale přímo na výživném roztoku. Dnes se používají nejvíce dvě metody testů toxicity a to testy klíčivosti semen a sledování růstu rostlin po vyklíčení. Druhá varianta je používanější, jelikož poměrně hodně látek se do semene nedostane a rostlina využívá při fázi klíčení zásobní látky v semeni. Při testech, kde se sleduje růst rostliny po vyklíčení, se následně vyhodnocuje hmotnost kořene, hmotnost nadzemní části rostliny, výška rostliny apod. Test toxicity by měl být citlivý, měl by být ekologicky významný a zároveň cenově nenáročný.¹⁹

4.2 Ekotoxicita nanočástic a nanomateriálů

Ekotoxicita nanočástic a nanomateriálů je v současnosti velice aktuální téma. Vědci z celého světa zkoumají toxicitu výše zmíněných látek na životní prostředí a organismy, vedou se také rozsáhle debaty, které se především zabývají riziky a výhodami používání těchto materiálů. Přírodní nanočástice se nacházejí v životním prostředí již v dobách vzniku Země jako takové. Například v ledovcích byly nalezeny uhlíkové nanotrubičky, uhlíkové fullereny nebo nanočástice oxidu křemičitého, jejichž stáří se odhaduje na 10 000 let. Přírodní nanočástice mohou vznikat geologickými nebo biologickými mechanismy. S geologických mechanismů je třeba zmínit zvětrávání půd nebo vulkanickou činnost, pro tyto procesy je typická tvorba anorganických nanočástic. Biologickými mechanismy většinou vznikají organické nanočástice, např. rozkládáním organické hmoty huminovými kyselinami. Přírodní nanočástice nepředstavují problém pro životní prostředí a organismy, protože organismy byly vystavovány působení nanočástic během evoluce a adaptovaly se. Ovšem i přírodní nanočástice mohou být za určitých okolností pro organismy toxické (např. toxicita vulkanického prachu). Výskyt přírodních nanočástic je většinou přechodný, částice agregují nebo jsou rozpouštěny, což je velký rozdíl oproti průmyslovým nanočásticím, které se záměrně stabilizují a následně mohou být v životním prostředí perzistentní, navíc mohou obsahovat toxické části nebo struktury, které přírodně nevznikají. Proto průmyslově vyráběné nanočástice mohou v budoucnu představovat hrozbu pro životní prostředí.²⁰

4.3 Toxicita Ag

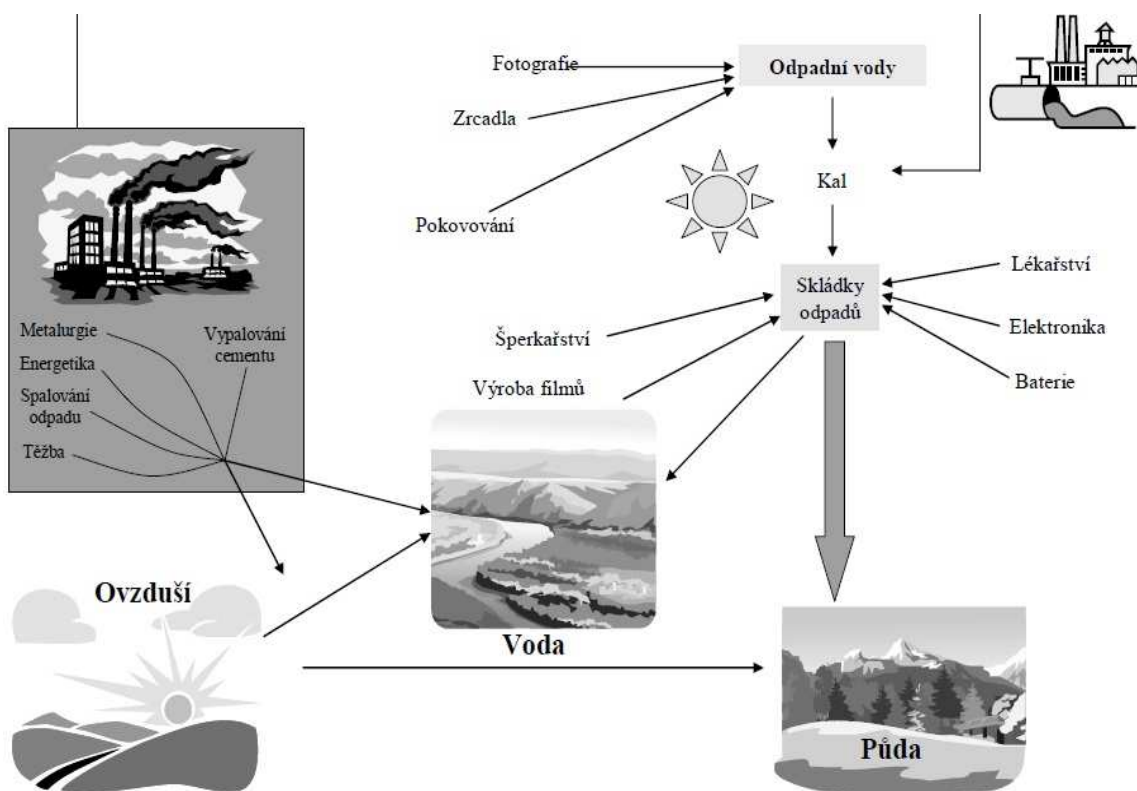
Těžké kovy interagují s bílkovinami a nukleovými kyselinami a indukují vznik kyslíkových radikálů (ROS). Kromě známých účinků hydroxilového, peroxidového a superoxidového radikálu ROS způsobují poškození DNA, které se projevuje především oxidativními poruchami bází a jednovláknovými nebo dvouvláknovými zlomy DNA, což může vést až k apoptóze buňky.²¹

Čím je těžký kov rozpustnější ve vodě, tím je pro organismus toxičtější. Vzhledem k velké rozpustnosti stříbrných solí se Ag řadí mezi kovy nejtoxičtější. Působení Ag na vyšší a nižší organismy vede k inhibici enzymů, např. pro bakterie se uvádí hlavní důvod toxicity Ag inhibice enzymů spojených s udržováním osmotického tlaku. U rostlin je to například

inhibice působení ethylenu.²² Toxicita byla prokázána i pro savce, kde byly testovány různé druhy lidských buněk.¹⁷ Genotoxicita SNPs byla testována na zárodečných myších kmenových buňkách, kde byly zpozorovány dvouvláknové zlomy DNA a chromozomální odchylky.²¹ Genotoxicita a cytotoxicita byl prokázána i u několika druhů ryb.

4.3.1 Ekotoxicita Ag

Stříbro se v životním prostředí vyskytuje v iontové formě Ag^+ i jako SNPs. Zdrojem iontového Ag v životním prostředí jsou odpadní vody, průmyslová těžba, metalurgický průmysl a v menší míře fotografický průmysl. Kvůli velké rozpustnosti ve vodě představuje Ag největší hrozbu pro vodní ekosystém. Ag ovšem rychle přechází do nerozpustných sloučenin, takže se neřadí mezi nejzávažnější polutanty (jako například Hg).²² SNPs se do životního prostředí dostávají v největší míře z komerčních produktů, které byly již zmíněny výše.



Obr. 4. Koloběh Ag^+ v životním prostředí²²

4.3.2 Toxicita Ag pro vodní organismy

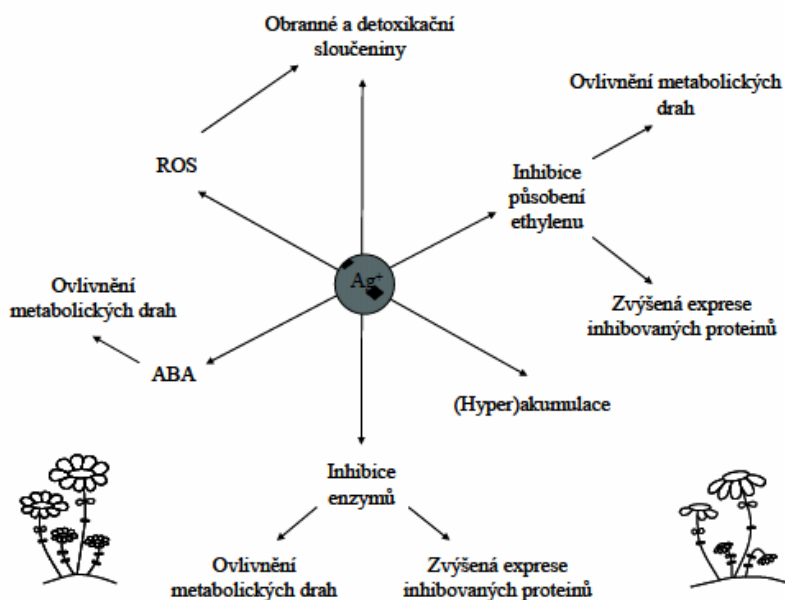
Toxicita SNPs ve vodním prostředí je spojena s uvolňováním iontového stříbra, které může být toxické pro určité druhy ryb a řas už v mikromolárních koncentracích. Příjem iontového Ag je uskutečněn skrze Cu (I) transportér přes buněčnou membránu. O mechanismech příjmu SNPs je toho zatím známo málo. Při testech působení SNPs na výtěžek fotosyntézy u řasy *Chlamydomonas reinhardtii* bylo zjištěno dle očekávání, že negativní působení SNPs na fotosyntézu je spojeno s uvolňováním iontového Ag z částic. Uvolňování iontů Ag zahrnuje oxidaci, která je efektivnější v přítomnosti řasy zejména kvůli produkci H₂O₂, který je metabolickým produktem řasy a může být uvolňován do roztoku SNPs, kterým působíme na danou řasu.²³

Toxicita SNPs byla testována na několika druzích ryb. Nejvíce využívaným organismem je *Oryzias latipes* (japonská Medaka). Testy byly prováděny pomocí 6 druhů biomarkerů (HSP70s, GST proteiny, gen p53, Cytochrom P450 1A a další.), kdy se zkoumala jejich exprese vlivem působení SNPs a Ag iontů. Exprese těchto genů je spojena z odpovědí buňky na stres a nepříznivé podmínky. Bylo prokázáno že SNPs (46,5 nm) způsobují větší toxicitu než iontové Ag (AgNO₃), avšak rozdíl není zas tak velký. Pro dobu expozice 96 hod. byly zaznamenány hodnoty LC₅₀ 34.6±0.9 µg/l pro SNPs a 36.5±1.8 µg/l pro AgNO₃. Větší rozdíly byly ovšem zaznamenány při kratších dobách expozice (24, 48, 72 hod). Co se týká exprese genů, je rozdíl značný při expozici do 4 dnů (krátkodobé expozice). Exprese proteinů CYP1A a p53 v játrech Medak, poukazuje na jejich roli v obraných a detoxikačních mechanismech. Z výsledků je patrné, že v ranném stádiu expozice mají SNPs značné karcinogenní a apoptické účinky.²⁴

4.3.3 Fytotoxicita Ag

Ag⁺ způsobuje v rostlinách oxidativní stres (uvolňování ROS), který má za následek poškození DNA, karboxylových kyselin a proteinů. Všechny tyto efekty mohou způsobit úhyn rostliny. Zvýšený obsah ROS se projeví předčasnou senescencí rostliny. Ag⁺ indukuje tvorbu fytochelaninu- nízkomolekulárního peptidu, který se účastní chelatačních procesů při intoxikaci těžkými kovy. Zvýšená tvorba fytochelatinu byla prokázána u nižších i vyšších rostlin. Ag⁺ také indukuje tvorbu obraných proteinů, především thioninů a fytoalexinů, které jsou toxické pro některé druhy bakterií a hub (díky přítomnosti velkého počtu bazických aminokyselin). Tyto proteiny se řadí do skupiny patogenních proteinů, které se začínou vytvářet při napadení rostliny patogeny (houby, viry, bakterie), při aplikaci chemikálií nebo při intoxikaci těžkými kovy. Přítomnost Ag⁺ v rostlině omezuje příjem vody prostřednictvím

inhibice transmembránových proteinů, které vedou vodu v cévnatých rostlinách. Další z efektů je inhibice enzymů, což vede k ovlivnění metabolických drah. Ag působí asi na 70 enzymů. Nejvíce zasahuje do odbourávání disacharidů a polysacharidů, čímž se vysvětluje pomalejší zrání plodů. Ag ovlivňuje i rostlinné hormony, především ethylen, který se řadí mezi 5 klasických rostlinných hormonů v celé rostlinné říši. Ethylen má v rostlině mnoho funkcí, mezi nejdůležitější patří řízení dozrávání plodů, klíčení, opad listů, senescenci a růst. U rostlinek hrachu bylo úspěšně pozorováno odvrácení tzv. trojitě odezvy (zkrácení a ztloustnutí kořene, kroucení stonku), která je typická pro rostlinky hrachu vystavovaným dávkám ethylenu. Inhibice ethylenu také vede k omezení tvorby vlasatých kořenů. Samotný proces inhibice ethylenu se vysvětluje substitucí Cu^+ , skrze který se ethylen váže na specifické receptory. Prostřednictvím Ag^+ se sice ethylen na receptor naváže, nedojde však k přenosu signálu. Ag ovlivňuje i jiné hormony např. kyselinu abscisovou (ABA), která řídí v rostlině procesy dormance (přechodné zastavení nebo omezení fyziologických procesů v živých organismech) a abscise (opad listů a padání plodů). U rostlin vystavením působení AgNO_3 byla zpozorována větší koncentrace tohoto hormonu.²²



Obr. 5. Působení Ag^+ na rostliny²²

SNPs vykazují podobné účinky jako Ag. Způsobují oxidativní stres a poruchy DNA. Genotoxicita byla prokázána na modelovém organismu cibule kuchyňské (*Alium cepa*), kdy byly sledovány odchylky chromozomů ve vzorcích v závislosti na koncentraci SNPs od

srovnávacího vzorku, který nebyl SNPs ošetřen. Také byly pozorovány změny miotického indexu (MI), který slouží k vyjádření míry rozmnožování buněk. Při aplikaci SNPs na již výše zmíněnou rostlinu *Allium cepa* byl sledován pokles MI. Kontrolní rostliny, které nebyly vystaveny působení SNPs, měly MI 60,3 %. MI klesá se zvyšující se koncentrací SNPs, kde byla zaznamenána nejmenší hodnota 27,6 koncentrace SNPs 100 ppm. Mezi další negativní účinky SNPs patří rozklad buněčné stěny, praskliny na povrchu rostliny a větší lepkavost, která se vysvětluje depolymerizací a degradací DNA. Lepkavost obecně poukazuje na přítomnost toxinů, které ovlivňují DNA, a pravděpodobně se jedná o nevratný efekt.²⁵

Přesné mechanismy působení toxicity SNPs zatím nejsou zcela známy. Předpokládá se, že toxicita je založena jednak na chemických vlastnostech, jako uvolňování Ag iontů apod. tak i na fyzikálně chemických vlastnostech jako jsou velikost a tvar částic nebo velikost aktivního povrchu.²⁵

Většina Ag je v rostlinách uložena v kořenech. V nadzemní části se pak hromadí převážně v mladších listech a to ve větší míře na jejich okrajích. Druhy rostlin, které jsou schopné hyperakumulace kovů, označujeme souhrnně jako metalofyty. Tyto rostliny jsou schopny vázat vysoké koncentrace těžkých kovů (více než 0,1% hm. v sušině pro Ag).²² První druhy metalofytů schopných hyperakumulace stříbra byly nalezeny až v roce 2008. Jedná se o brukev sítinovitou (*Brassica juncea*) a tolici vojtěšku (*Medicago sativa*). Zjistilo se, že *Brassica juncea* je schopná akumulovat až 12,6 hm% Ag při době expozice 72 hod roztoku AgNO₃ o koncentraci 1000 ppm. *Medicago sativa* je schopná akumulovat 13,5 hm % Ag (při době expozice 24 hod roztoku AgNO₃ o koncentraci 10 000 ppm). U těchto rostlin se stříbro ukládá ve formě SNPs o průměrné velikosti 50 nm. Hyperakumulace se vysvětluje možnou snahou rostlin bránit se proti hmyzu nebo býložravcům. Metalofyty se používají v technologii zvané fytoextrakce, která má hned několik využití. Např. phytominig, který představuje těžbu přírodně vznikajících prvků pomocí rostlin. Dalším využitím Fytoextrakce může být ve fytoemediacích, které spočívají ve stabilizaci antropogenních polutantů pomocí rostlin a jejich následném zneškodnění.²⁶

5 Charakteristika testovaného organismu *Pisum sativum*

Čeleď: bobovité (*Fabaceae*)

Druh: *Pisum*

Rod: *Pisum sativum*

Pisum sativum (hrách setý) patří mezi jednoleté byliny. Lodyha je přímá, vystoupavá nebo popínavá, barvy lysé, sivé nebo žlutozelené. Lodyha dosahuje průměrných délek 30- 120 cm. Listy jsou sudospeřené a zakončené úponkou. Palisty jsou velké a objímavé, v dolních částech zubaté. Velikost palistů dosahuje až 10 cm. Lístky jsou přisedlé, na vrcholu tupé a dosahují délky 1,5 - 6 cm. Hrách kvete. Květenství s 1 - 4 květy s kalichem zvonkovitého typu, koruna dosahuje délek 22 - 32 mm. Květy jsou nevonné. Barva květů je bílá, namodralá nebo narůžovělá. Pestík se později mění na lusky s 3 - 10 semeny o velikosti 40 - 160 mm. Semena o velikosti 4-10 mm jsou kulovitá až zaobleně mnohohranná.

Hrách patří mezi staré kulturní rostliny a je rozšířen prakticky po celém světě. Nejstarší nalezené semena se ve střední Evropě datují do mladší doby kamenné. V ČR lze pozorovat zplaňování hrachu, zejména na rumištích, skládkách a polích. Hrách se využívá jako potrava, převážně pak semena, která obsahují škrob, jednoduché bílkoviny a reverzní celulózy. V případě hrachu cukrového se využívají nezralé sladké lusky jako zelenina.²⁷

Experimentální část

6 Průběh pokusné práce

6.1 Použité chemikálie a materiál

Pro přípravu koloidního stříbra byly použity tyto chemikálie

- dusičnan stříbrný (p.a., Tamda)
- amoniak (p.a., vodný roztok, min 25% (v/v), Lachema)
- hydroxid sodný (p.a., Lachner)
- D (+) - maltosa monohydrát (99+%, Riedel-de-Haën)

Pro koncentraci koloidního stříbra byly použity tyto chemikálie

- Sorbent Polyakrylát-polyalkohol (Sigma-aldrich), dialyzační membrány

K přípravě mineralizační směsi byly použity tyto chemikálie

- kyselina dusičná (p.a, vodný roztok, min. 65% (v/v), Lachner)
- peroxid vodíku (p.a, vodný roztok, min. 30% (v/v), Penta)

Médium pro hydroponické pěstování

- jako živné médium pro hydroponické pěstování byl použit Hoaglandův roztok

Tabulka 2 : Složení 1l Hoaglandova roztoku

Hlavní sloučeniny	Koncentrace	Objem (ml)
2M KNO ₃	202 g/l	2.5
2M Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	118 g/l	2.5
Fe	15 g/l	1.5
2M MgSO ₄ x 7H ₂ O	493 g/l	1
1M NH ₄ NO ₃	80 g/l	1
Vedlejší sloučeniny	2.86 g/l	0,5
H ₃ BO ₃	1.81 g/l	0,5
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0.22 g/l	0,5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0.051 g/l	0,5
CuSO ₄	0.09 g/l	0,5

6.2 Příprava koloidního Ag

Roztok koloidního stříbra byl připraven pomocí Tollensovy redukční metody. V následujícím pořadí byly smíchány tyto roztoky:

- 250 ml AgNO₃ (c = 4 x 10⁻³ mol/l)
- 250 ml NH₃ (c = 0,02 mol/l),
- 250 ml NaOH (c = 0,0384 mol/l)
- 250 ml Maltózy (c = 4x10⁻² mol/l)

Tato reakce se provedla dvakrát a připraveno 2 x 1000 ml zásobního roztoku koloidního Ag o koncentraci 108 mg/l. K míchání bylo použito mechanické míchadlo. Výsledná průměrná velikost připravených částic byla 30 nm. Velikost částic byla změřena metodou DLS na přístroji 90 plus particle size analyzer (Brookhaven, USA). Kontrolní spektra byla změřena na spektrometru Specord S 600 Analytic Jena (Germany).

Z těchto zásobních roztoků se následně naředily požadované koncentrace 0,1, 1 a 10 mg/l ze zásobního roztoku č.1 a koncentrace 25, 50 a 75 mg/l ze zásobního roztoku č.2.

Pro srovnání toxicity byly připraveny dva zásobní roztoky AgNO₃. Koncentrace těchto roztoků odpovídala koncentracím zásobních roztoků koloidního Ag po zakoncentrování.

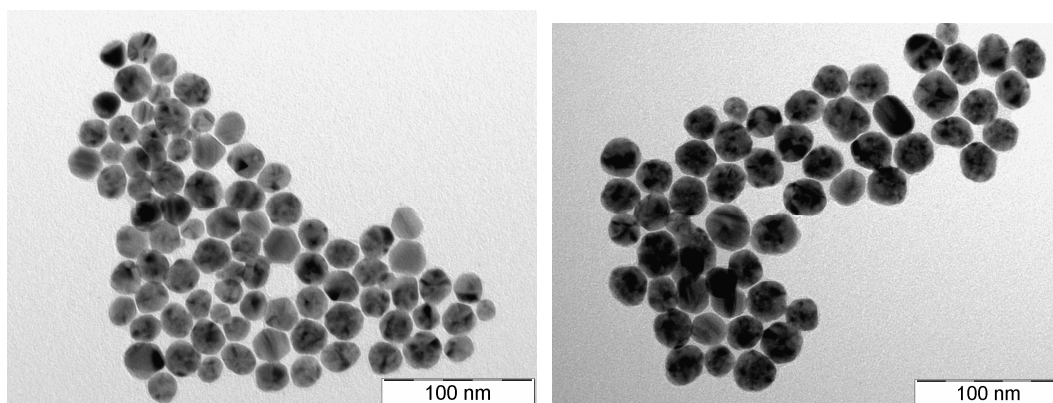
6.3 Zakoncentrování koloidního Ag

K zakoncentrování roztoku byly použity dializační membrány z celulosy (Sigma-aldrich). Jako sorbent byl použit polyakrylát-polyalkohol. Do litrové kádinky bylo umístěno 10 membrán, do každé z nich se aplikoval 1 g sorbetu. Membrány byly ponechány v roztoku po dobu 3 dní. Po skončení procesu koncentrace se roztok zvážil a následně se vypočítala koncentrace.

Koncentrace zásobního roztoku č.1 – 200 mg/l (540 ml)

Koncentrace zásobního roztoku č.2 – 205 mg/l (522 ml)

Velikost částic zakoncentrovaného roztoku (taktéž měřeno na přístroji 90 plus particle size analyzer (Brookhaven USA) byla naměřena nepatrně vyšší (33 nm), skutečná velikost zůstává ovšem stejná, jak dokazují snímky z elektronového mikroskopu.



Obr. 6. Snímky z elektronového mikroskopu

6.4 Testy toxicity

Byly zvoleny 2 metody testování toxicity Ag na *Pisum sativum*. První metoda byla založena na sledování klíčivosti semen s následným pozorováním růstu rostliny po jednorázové aplikaci koloidního a iontového Ag o koncentracích 25, 50 a 75 mg/l. Druhou metodou bylo sledování růstu 10 denních rostlin po jednorázové aplikaci koloidního a iontového Ag o koncentracích 0,1, 1 a 10 mg/l. V Případě druhého testu byl hrách setý pěstován hydroponicky. Vypěstovaný rostlinný materiál byl mineralizován a následně bylo stanoveno množství Ag metodou AAS ve vzorcích rostlin. Analyzovaly se zvláště kořeny a nadzemní části rostlin.

6.4.1 Test klíčivosti semen s následným pozorováním růstu

Jako substrát byla zvolena vata. Do litrové sklenice se rovnoměrně umístilo na dno 0,3 g vaty. Následně se na vatu rovnoměrně rozložilo 20 semen. Sklenic bylo připraveno celkem 14. Do třech sklenic bylo odpipetováno 15 ml koloidního Ag o koncentracích 25, 50 a 75 mg/l , tyto koncentrace byly připraveny ze zásobního roztoku koloidního Ag č.2. Do dalších třech sklenic bylo odpipetováno 15 ml roztoku AgNO₃ o koncentracích 25, 50 a 75 mg/l. Do jedné sklenice bylo odpipetováno 15 ml destilované vody, tento vzorek sloužil jako kontrolní. Pro

větší přesnost testu byly všechny vzorky připraveny 2 x. Sklenice byly nakonec přikryty polyethylenovou folií, pro snížení ztrát spojených z výparem. Rostliny se nechaly růst po dobu 10 dní. Po této době se rostliny vytáhly se substrátu, očistily, položily na filtrační papír. Následně byly odděleny stonky od kořene, jednotlivé kořeny a stonky byly zváženy a byla změřena jejich délka.

6.4.2 Test růstu 10 denních rostlin po jednorázové aplikaci Ag

Celkem 20 misek bylo umístěno do fytotronu, který zajišťoval stabilní podmínky pro růst. Teplota ve dne byla 23 C, v noci 18 C. Osvětlení ve dne bylo při intenzitě $100 \mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-1}$. Semena byla vyseta po 10 kusech do jednotlivých misek a byla zalita vodou. Jako substrát pro pěstování byl zvolen perlit. Po třech dnech byly misky zality 25ml vody. Po dalších třech dnech byly misky zality 50 ml vody. Totéž se opakovalo následující den. Po dalších dvou dnech byly misky zality 25ml vody. Po dalším dnu bylo do vybraných misek aplikované Ag o koncentracích 0,1, 1 a 10 mg/l v koloidní formě a ve formě iontové. Rozdělení misek znázorňuje tabulka 2.

Tabulka 3: Rozdělení misek po 10 dnech růstu

1	voda
2	voda
3	0,1 mg/l Ag (koloidní.)
4	0,1 mg/l Ag (koloidní.)
5	1 mg/l Ag (koloidní.)
6	1 mg/l Ag (koloidní.)
7	10 mg/l Ag (koloidní.)
8	10 mg/l Ag (koloidní.)
9	0,1 mg/l Ag (iontové)
10	0,1 mg/l Ag (iontové)
11	1 mg/l Ag (iontové)
12	1 mg/l Ag (iontové)
13	10 mg/l Ag (iontové)
14	10 mg/l Ag (iontové)

Po pěti dnech od aplikace Ag byly rostlinky vytaženy z perlitu, očištěny, položeny na filtrační papír. Následně byly odděleny stonky od kořene, jednotlivé kořeny a stonky byly zváženy a byla změřena délka kořenů a stonků.

6.5 Mineralizace rostlin a stanovení množství Ag metodou AAS

Do varné baňky s kulatým dnem bylo pipetováno 3ml HNO₃ a 2 ml H₂O₂, následně bylo do této baňky odváženo 0,1 g vysušeného rostlinného materiálu. Baňky byly umístěny do mineralizátoru KSMA Behrlabor-technic GmSH . Mineralizace bylo prováděna po dobu 3 hodin. Mineralizované vzorky byly analyzovány na přístroji AAS Model 3300, Perkin Elmer.

6.6 Kritéria vyhodnocení

Jedním z kritérií testu bylo zkoumání vlivu iontového Ag a koloidního Ag na růst nadzemní části a kořene rostliny. Zaznamenala se jak hmotnost, tak i délky jednotlivých rostlin (kořenů a nadzemních částí). Také byly zdokumentovány růstové anomálie (absence postraních kořenů, změna tloušťky kořene, ovlivnění gravitropismu apod). U testu klíčivosti semen se zkoumal vliv Ag na klíčení.

Hlavním kritériem bylo zaznamenat množství Ag akumulovaného jak v kořenech tak v nadzemních částech rostliny. Tyto hodnoty se následně porovnaly v závislosti na koncentracích Ag a také na formě Ag (koloidní, iontové).

7 Výsledky

7.1 Test klíčivosti s následným pozorováním růstu rostliny

7.1.1 vliv Ag na klíčivost semen

Jak ukazuje tabulka 4, neprokázal se negativní účinek Ag na klíčivost semen, a to v jak iontové tak i v koloidní formě.

Tabulka 4 : Vliv Ag na klíčivost semen

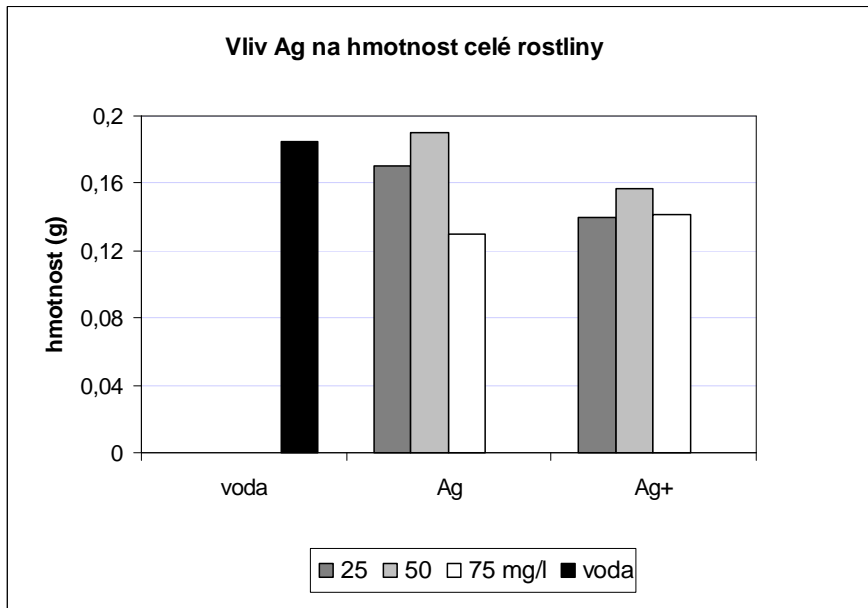
vzorek	voda	Ag 25 mg/l	Ag 50 mg/l	Ag 75 mg/l	Ag+ 25 mg/l	Ag+ 50 mg/l	Ag+ 75 mg/l
Počet vyklíčených semen	16	17	15	16	16	18	17

7.1.2 Vliv Ag na délku a hmotnost kořene a stonku

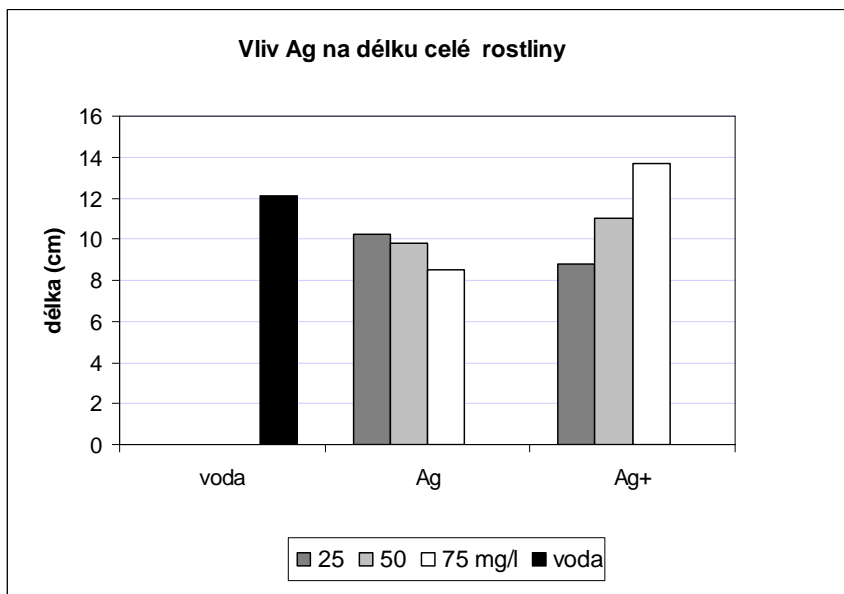
Bylo zjištěno, že nejpatrnější vliv na rostlinu má Ag v iontové formě v nejvyšší koncentraci a to zejména na délku kořene. Kořeny ovšem byly znatelně tenčí než kořeny rostlin pěstovaných na čisté vodě, což se projevilo na průměrné hmotnosti kořenů, která se znatelně nelišila. U koloidního stříbra nebyl zaznamenán větší vliv jak na délku kořenů, tak na hmotnost. Délky stonů rostlin u vzorků s koloidním Ag se nepatrně zmenšovaly se zvyšující se koncentrací oproti kontrolním vzorkům. Naopak tomu bylo u vzorků s iontovým Ag, kdy se průměrná velikost nadzemních částí rostlin nepatrně zvyšovala se zvyšující se koncentrací. Tyto změny jsou ovšem zanedbatelné, ve srovnání se změnami na kořenech. Naměřené hodnoty byly zaznamenány v tabulce 5. (Celková délka rostliny je ovšem silně ovlivněna délkou kořene).

Tabulka 5 : Vliv Ag na hmotnost a délku kořene, stonku a celé rostliny

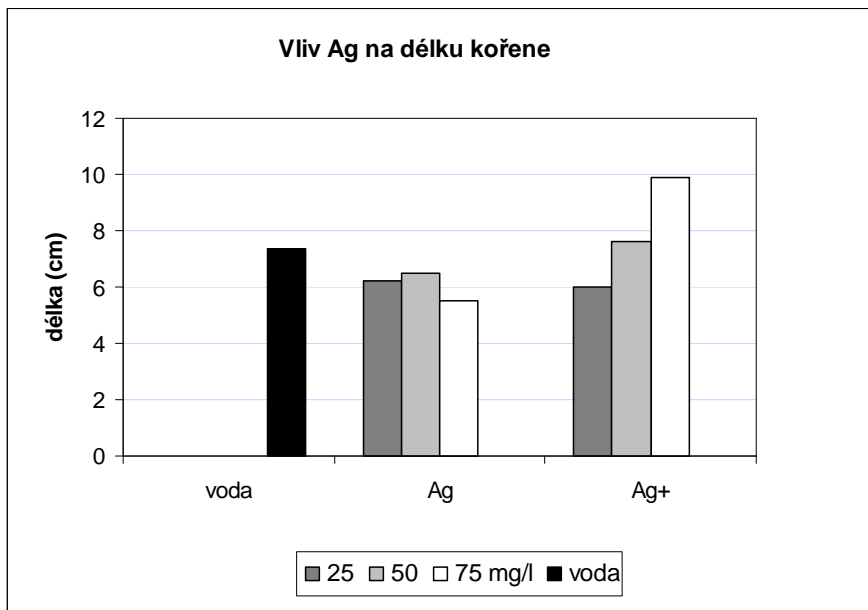
koncentrace g/ml	délka kořenu (cm)	délka stonku (cm)	hmotnost stonku (g)	hmotnost kořenu (g)	délka celé rostliny (cm)	hmotnost celé rostliny (g)
Ag 25	6,24	3,925	0,115	0,055	10,165	0,17
Ag 50	6,525	3,285	0,11	0,08	9,81	0,19
Ag 75	5,525	2,955	0,085	0,045	8,48	0,13
Ag+ 25	6,025	2,74	0,078	0,057	8,765	0,1355
Ag+ 50	7,59	3,43	0,1	0,057	11,02	0,157
Ag+ 75	9,94	3,8	0,08	0,061	13,74	0,141
Voda	7,35	4,715	0,13	0,055	12,065	0,185



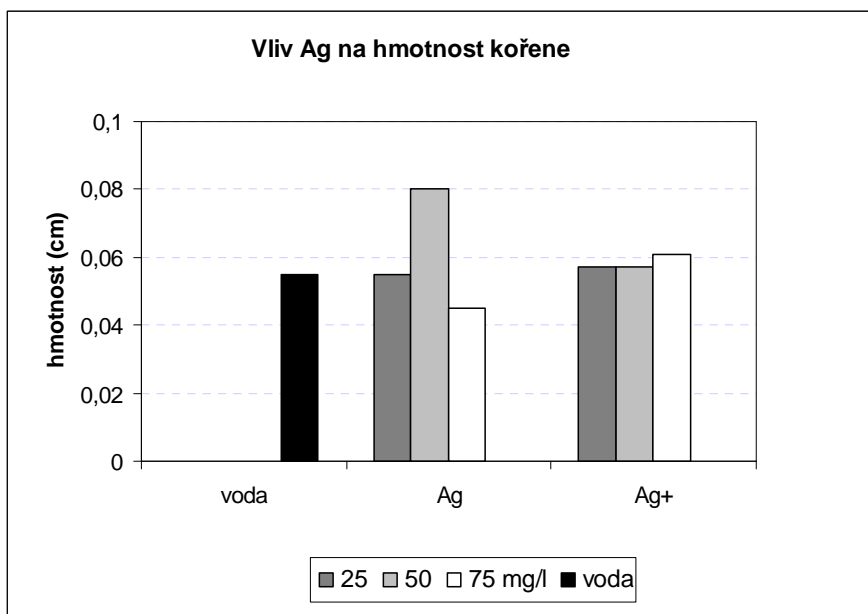
Graf I: Vliv Ag na hmotnost celé rostliny



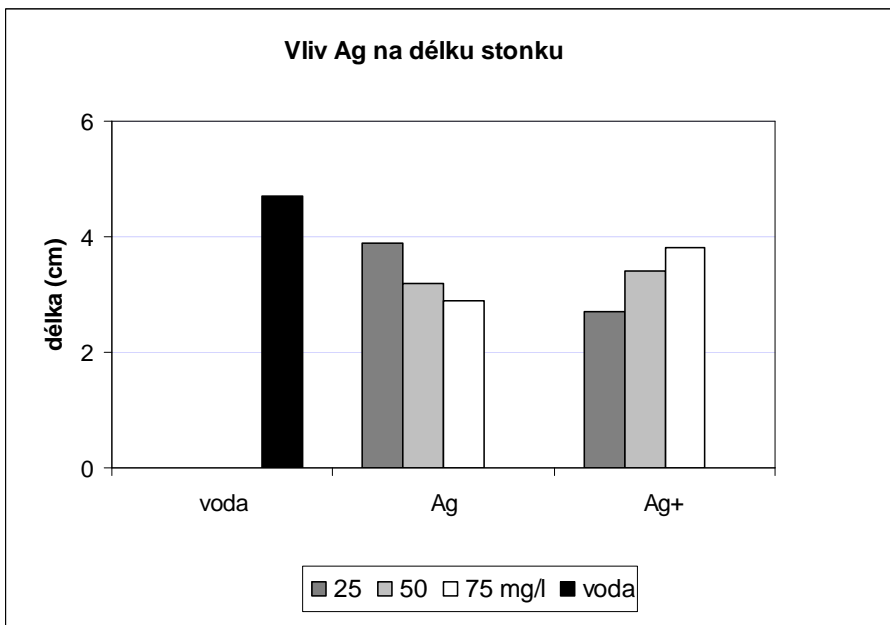
Graf II: Vliv Ag na délku celé rostliny



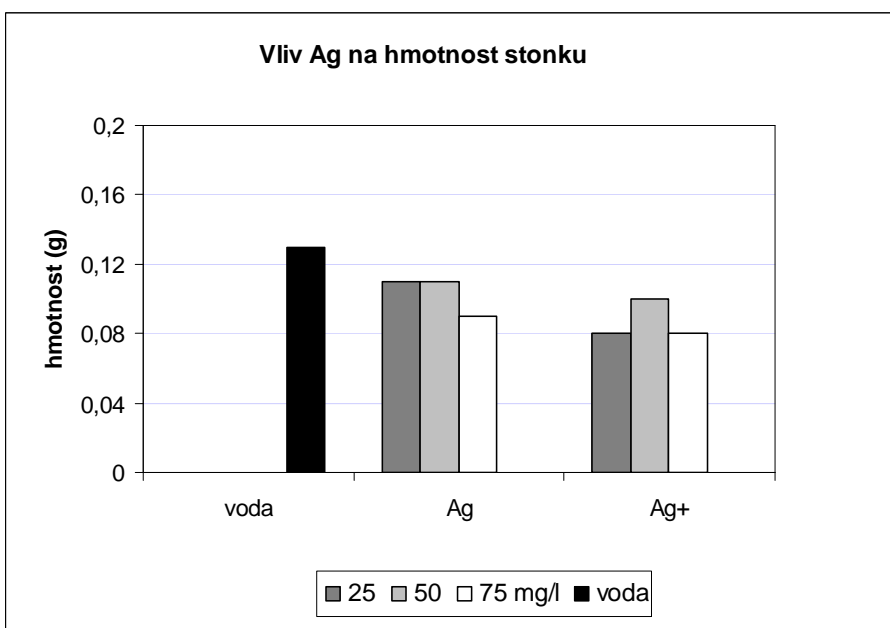
Graf III: Vliv Ag na délku kořene



Graf IV: Vliv Ag na hmotnost kořene



Graf V: Vliv Ag na délku stonku



Graf VI: Vliv Ag na hmotnost stonku

7.1.3 Stanovení množství stříbra v 0,1 g sušiny kořene a stonku

Z výsledků analýzy metodou AAS je patrné, že nejvíce se stříbro akumuluje v kořenech, v menším množství pak v nadzemní části rostliny, jak je patrné z tabulky 6, stříbro v iontové formě se do rostliny dostalo 2x více než ve formě koloidní.

Tabulka 6: Množství Ag v kořenu a ve stonku 0,1 g sušiny

vzorek	koncentrace v kořenu (mg/l)	koncentrace v nadzemní části (mg/l)
Voda	0,015	0,01
Ag 25 mg/l	0,155	0,061
Ag+ 25 mg/l	0,363	0,083

7.1.4 Pozorování dalších růstových anomálií

Vliv Ag na výskyt růstových anomálií je značný. Největší změny byly pozorovány u kořene rostlin. Kromě dlouhivého růstu byly pozorovány další anomálie. U vzorků, kde bylo aplikované Ag v koloidní i iontové formě byla zjištěna absence vlasových kořenů. (obr. 10)

Tato absence byla zpozorována u všech koncentrací (25, 50 a 75 mg/l). Také byl zjevný vliv Ag na gravitropismus rostlin, což se projevilo růstem kořenů vzhůru proti gravitaci. (obr. 7 - 9). Tento jev se projevil u vzorků s koloidním Ag u koncentrací 50 a 75 mg/l a u všech vzorků s iontovým Ag.



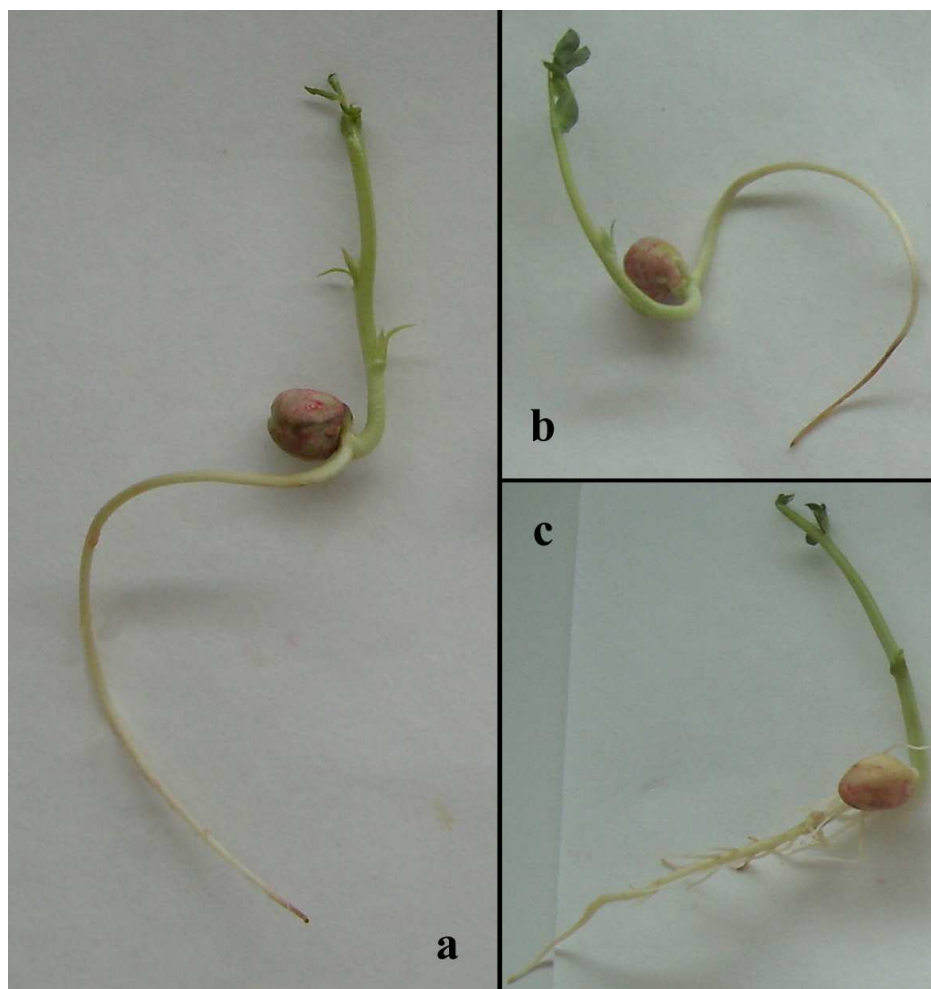
Obr. 7. Normální růst kořenů u kontrolního vzorku s čistou vodou



Obr. 8. Růst kořene u vzorku s iontovým Ag o koncentraci 75 mg/l



Obr. 9. Růst kořenů u vzorků u koloidním Ag o koncentraci 75 mg/l



Obr. 10. Kořeny rostlin u vzorků: a– koloidní Ag 50 mg/l, b– iontové Ag 50 mg/l, c- voda.

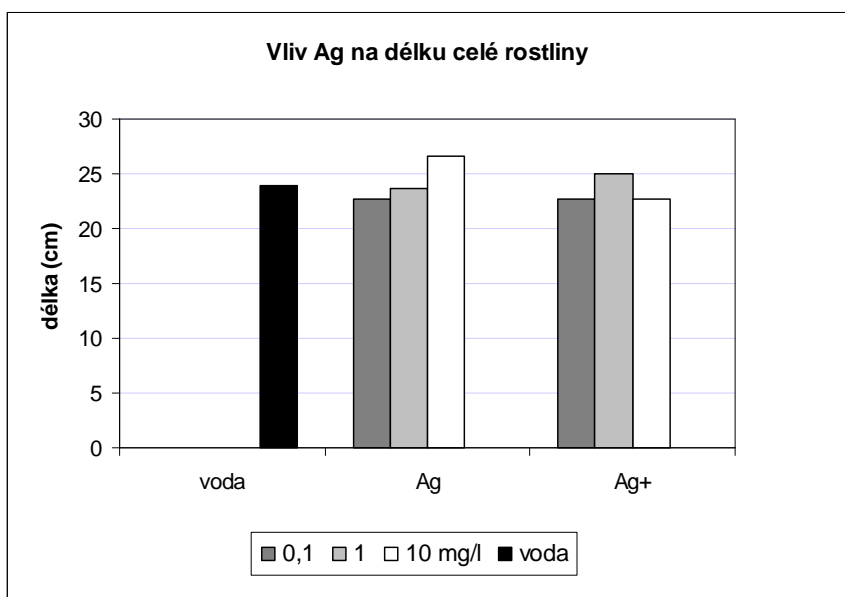
7.2 Test růstu 10 denních rostlin po jednorázové aplikaci Ag

7.2.1 Vliv Ag na délku a hmotnost celé rostliny, kořene a stonku.

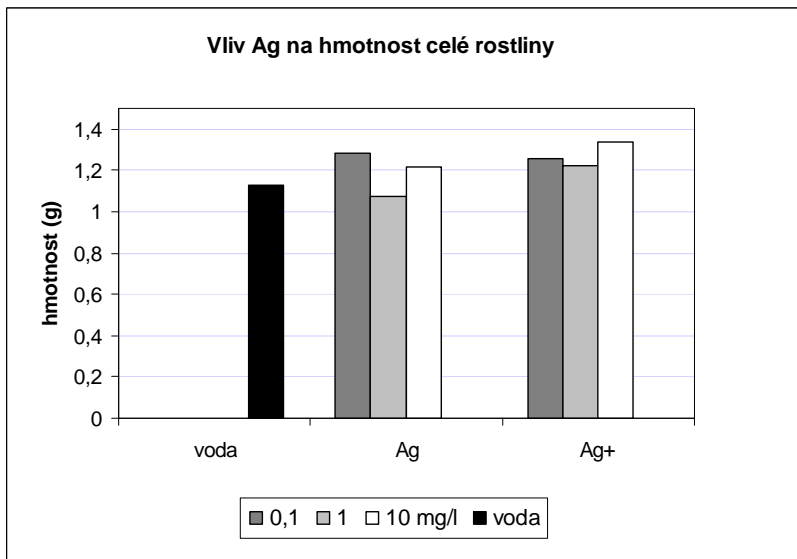
Při aplikaci Ag na desetidenní rostliny nebyly zaznamenány větší rozdíly. Naměřené hodnoty byly zaznamenány v tabulce 7.

Tabulka 7 : Vliv Ag na hmotnost a délku kořene, stonku a celé rostliny

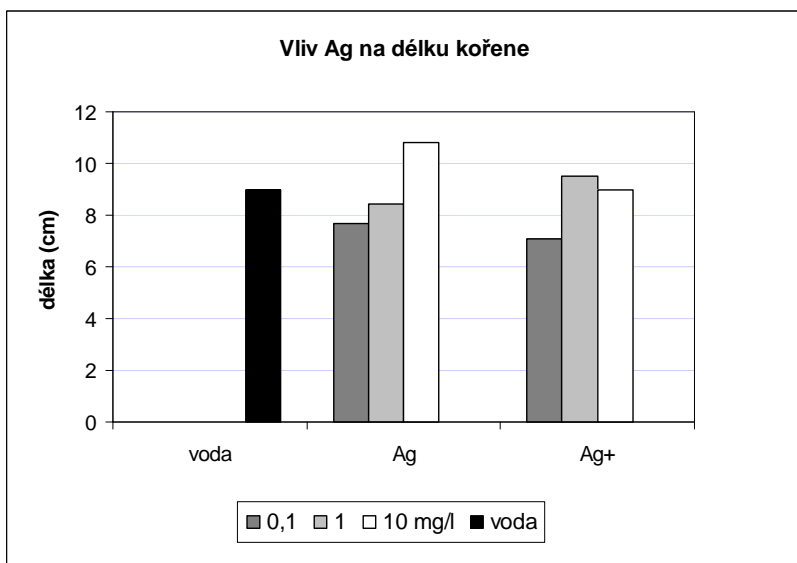
vzorek	délka celé rostliny (cm)	hmotnost celé rostliny (g)	délka kořene (cm)	hmotnost kořene (g)	délka stonku (cm)	hmotnost stonku (g)
voda	24,08	1,129	9	0,411	14,95	0,7
0.1 mg/l Ag	21,8	1,28	7,6	0,459	15,08	0,73
1 mg/l Ag	24,3	1,07	8,45	0,37	15,2	0,63
10 mg/l Ag	22,52	1,215	10,8	0,453	15,85	0,76
0.1 mg/l Ag+	20,6	1,254	7,1	0,49	15,55	0,74
1 mg/l Ag+	23,58	1,22	9,5	0,447	15,55	0,75
10 mg/l Ag+	24,95	1,337	8,95	0,515	13,7	0,74



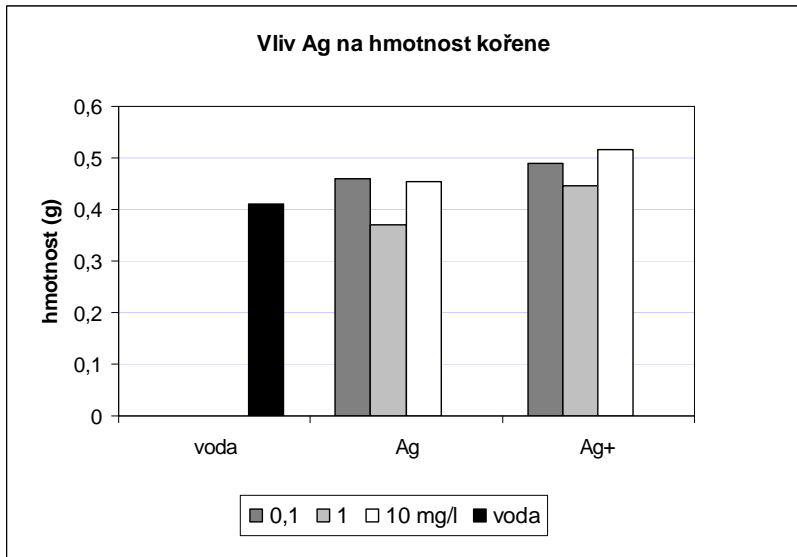
Graf VII: Vliv Ag na délku celé rostliny



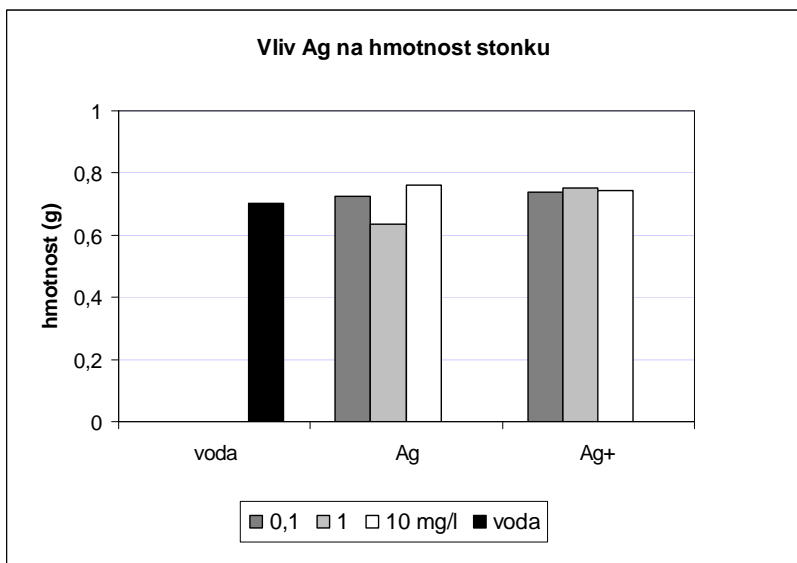
Grag VIII: Vliv Ag na hmotnost celé rostliny



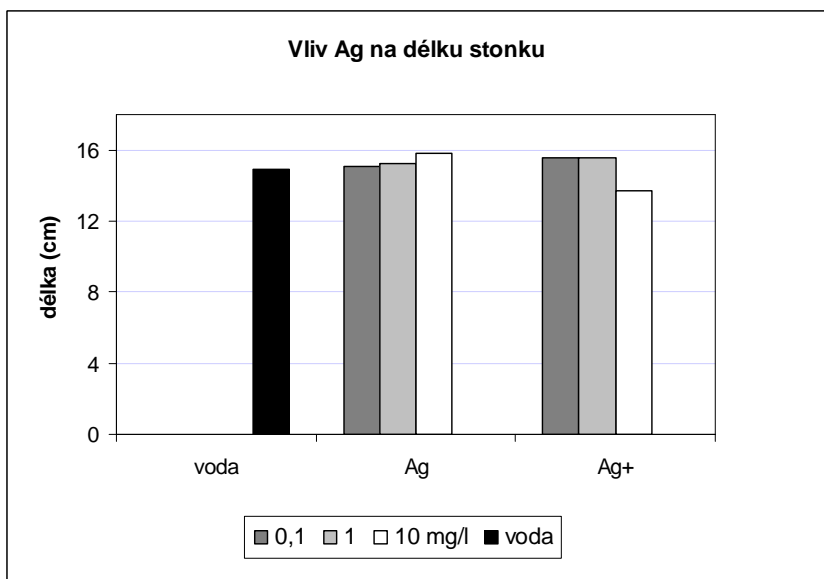
Grag IX: Vliv Ag na délku kořene



Graf X: Vliv Ag na hmotnost kořene



Graf XI: Vliv Ag na hmotnost stonku



Graf XII: Vliv Ag na délku stonku

7.2.2 Stanovení množství stříbra v 0,1 g sušiny kořene a stonku

Stejně jako v předešlém testu bylo metodou AAS stanoveno největší množství Ag v kořenech rostlin. Oproti předešlému testu nebylo zjištěno stříbro v nadzemních částech rostlin.

Tabulka 8 : Množství Ag v kořenu a ve stonku 0,1 g sušiny

Vzorek	koncentrace v kořenu (mg/l)	koncentrace v nadzemní části (mg/l)
Voda	0,010	0
Ag 10 mg/l	0,275	0
Ag+ 10 mg/l	0,268	0

8 Diskuze

8.1 Test klíčivosti semen s následným sledováním růstu

Jak lze vidět v tabulce 4, negativní vliv koloidního Ag na klíčivost semen ve zvolených koncentracích nebyl pozorován. Stejně výsledky byly pozorovány i u iontového Ag. Při procesu klíčení rostlina využívá převážně zásobní látky ze semene.¹⁹ Z tohoto důvodu nemá Ag ve zvolených koncentracích přímý vliv na proces klíčení, naopak může mít pro jeho antibakteriální a antifugicidní účinky vliv pozitivní (zamezí tvorbu hub a bakterií na semenech).

Jak lze vidět na obr. 10, byla pozorována inhibice růstu vlasových kořenů a to u všech vzorků, kde bylo aplikováno Ag (jak v koloidní tak v iontové formě). Tento jev souvisí s fytohormonem ethylen. Je dokázáno, že Ag je inhibitorem ethylenu. Předpokládá se, že se Ag naváže v iontové formě na receptor pro ethylen (substitucí Cu^+), což následně znemožní přenos signálu mezi ethylenem navázaným na tento receptor.²² Právě ethylen je zodpovědný za tvorbu vlasových kořenů. Z roztoků koloidního Ag se v menší míře uvolňuje iontové Ag. Pravděpodobně proto se inhibice růstu vlasových kořenů projevila i u vzorků s koloidním stříbrem. Inhibicí ethylenu se dá také vysvětlit dlouhivý růst kořenů u vzorků s iontovým Ag. Ethylen je totiž inhibitor dlouhivého růstu kořene. Jeho absence se pak projeví právě dlouhivým růstem.²⁸ Z výsledků testů plyne, že pro inhibici růstu vlasových kořenů stačí malé množství iontového Ag. Naopak pro dlouhivý růst kořene je pravděpodobně potřeba většího množství Ag v iontové formě, tím se vysvětluje nezpozorování tohoto jevu u vzorků s koloidním Ag.

Při zkoumání akumulace Ag v kořenech a nadzemních částech rostlin bylo dle očekávání zjištěno, že více stříbra bylo akumulováno v kořenech. Rostlina totiž Ag přijímá z roztoku kořenem a následně se část dostává xylemem do stonků. Z výsledků také vyplývá, že se Ag v iontové formě dostává do rostliny snadněji než Ag koloidní (viz tabulka 6).

Působení Ag na gravitropismus rostlin je zjevné z obr. 7 – 9. Tento efekt byl pozorován u iontového i koloidního Ag. Za gravitropismus rostlin zodpovídá fytohormon auxin. Je tedy možný vliv Ag na tento fytohormon. Přímý vliv Ag na auxin nebyl popsán, pravděpodobně je tento fytohormon nepřímo ovlivňován přes inhibici ethylenu.

8.2 Test růstu 10 denních rostlin po jednorázové aplikaci Ag

Jak je patrné z tabulky 7, nemělo koloidní Ag výrazný vliv na růst rostliny ve srovnání s předchozím testem. Totéž platí pro Ag iontové. Ag pravděpodobně ovlivňuje rostlinu více v ranném stádiu vývoje. Možný vliv Ag může být v pozdějším stádiu vývoje rostliny, převážně ve stádiu senescence rostliny. Za senescenci rostliny zodpovídá právě ethylen, který je Ag inhibován, což by mohlo negativně ovlivňovat zrání plodů a opad listů. Toto ovšem nelze prokázat z našich testů, protože rostliny byly předčasně sklizeny po 15 dnech růstu v tomto případě a po 10 dnech růstu v případě předchozího testu. Rozdílné výsledky ve srovnání s předchozím testem mohou být dány skutečností, že byly zvoleny menší koncentrace Ag (0,1, 1 a 10 mg/l) a také byla o polovinu kratší doba expozice.

Množství stříbra akumulované v kořenech i přes menší koncentrace a kratší dobu expozice je srovnatelné s výsledky předešlého testu, viz tabulka 8. U vzorků s koloidním Ag bylo stanoveno dokonce dvojnásobné množství. Z toho vyplývá, že rostliny, které byly vystavené expozici po 10 dnech růstu, efektivněji přijímají Ag, než rostliny, které byly vystavovány expozici od začátku vývoje. Tady je to také dáno tím, že stříbro bylo přijímáno hydroponicky, což je snadnější cesta příjmu stříbra než z pevného substrátu (vata). Naopak tomu bylo u stonků, kde byly stanoveny koncentrace menší než 0,01 mg/l. Domnívám se, že 5 dní není dostatečně dlouhá doba pro transport Ag z kořene do stonku.

9 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo pozorovat účinky koloidního stříbra s velikostí nanočástic Ag 30 nm na rostlinu *Pisum sativa*. Primárním cílem bylo zjistit míru bioakumulace nanočástic Ag v nadzemní části rostliny a v kořenu. S bioakumulací Ag jsou spojeny růstové změny a anomálie, které byly také pozorovány a zaznamenány. Byly provedeny dva testy toxicity s rozdílnými koncentracemi Ag a odlišnou dobou expozice. U obou testů se pro srovnání toxicity koloidního Ag použilo Ag v iontové formě (vodný roztok AgNO₃) a destilovaná voda jako vzorek kontrolní. Při prvním testu byly zvoleny koncentrace Ag 25, 50 a 75 mg/l. Pozoroval se účinek Ag na klíčivost semen a následný růst rostlin po dobu 10 dnů, poté byly rostliny zmineralizovány a metodou AAS se vyhodnotilo množství stříbra v kořenech a v nadzemní části rostliny. Na klíčivost semen nemělo Ag vliv jak ve formě koloidní tak i iontové. Bylo zjištěno, že Ag se akumuluje převážně v kořenech, v menší míře pak v nadzemních částech rostlin. Ag v iontové formě se akumulovalo efektněji než Ag ve formě koloidní. Vliv Ag na růst rostliny je značný. U všech vzorků, které byly vystaveny expozici Ag a to i v nejmenších koncentracích, byla zjištěna inhibice růstu vlasových kořenů a také byly pozorovány negativní účinky na gravitropismus rostliny. U vzorků, které byly vystaveny expozici iontového Ag byl zjevný dlouhý růst kořenů. Tento efekt nebyl zaznamenán u vzorků vystavených expozicemi Ag v koloidní formě.

V druhém testu se pozoroval vliv Ag na růst 10 denních rostlin. Doba expozice Ag v koncentracích 0,1, 1 a 10 mg/l činila 5 dnů. Poté byly rostliny zmineralizovány a metodou AAS se vyhodnotilo množství akumulovaného Ag v kořenech a v nadzemních částech rostlin. Výsledky byly i přes nižší koncentrace a kratší dobu expozice u kořenů podobné jako u prvního testu. Naopak u množství Ag ve stonku se výsledky lišily u iontové i koloidní formy. Metodou AAS nebyla prokázána přítomnost Ag v nadzemních částech rostlin.

Z výsledků obou testů je patrné, že iontové Ag je pro teratální rostliny toxičtější než Ag ve formě koloidní. Toxické účinky koloidního Ag ovšem nejsou zanedbatelné a budou předmětem dalšího zkoumání.

10 Summary

Nowadays the silver nanoparticles (SNPs) are used in a common live especially for their specific antibacterial and antifungal properties. SNPs are used, for example, as antiseptic and disinfection agent in deodorants, clothing, or food industry. Antibacterial effects aren't only one reason for their broad use. SNPs are used for their specific physical – chemical properties too, mostly in electronics, specific sensors or for surface enhanced Raman spectroscopy (SERS). The increased use of SNPs is connected with potential release of these particles into the environment, that's why the risk assesment have to be practised. SNPs toxicity of organisms has been proved, especially for aquatic ecosystems.

In this bachelor thesis the toxicity of 30 nm size SNPs to the terrestrial plant *Pisum sativum* has been assessed. The aim of this work was to observe the effects of colloidal silver nanoparticles with sizes of 30 nm to plant *Pisum sativum*. The primary objective was to determine the degree of bioaccumulation of Ag in the aboveground plant parts and the roots. With bioaccumulation of Ag, growth changes and anomalies are associated. These changes and anomalies were also observed and recorded. There were carried out two tests of toxicity with different concentrations of Ag and also with different exposure time. In both used tests, colloidal Ag toxicity was compared with ionic Ag (aqueous solution of AgNO_3) toxicity. Concentrations of Ag 25, 50 and 75 mg / L were chosen for the first test. Toxic effect of Ag on seed germination and plant growth was assessed during 10 days test. The plants were mineralized and amount of Ag was determined by AAS. Ag did not affect the seeds germination in the both colloidal and ionic form. It was found that Ag is accumulated mainly in the roots. Ionic form of silver has been accumulated much more higher than colloidal Ag. Effect of colloidal and ionic Ag on the growth of plants is considerable. Growth inhibition of hairy roots and affection of the gravitropism reaction were observed. The root elongation was observed only in samples containing ionic silver.

In the next test, we have observed the effect of Ag on 10 days old plants. Five days exposure of silver at concentrations of 0.1, 1 and 10 mg / l to plants was applied. The plants were mineralized and amount of Ag was determined by AAS. The obtained results were, in spite of lower concentrations and shorter exposure time, similar to the first test. In the case of colloidal Ag the amount of silver in the roots was twice higher in comparison with the results of the first test. In contrast, the quantity of Ag in the stems varied with ionic and colloidal forms of silver. Ag in the aboveground parts of plants has not been determined.

The results of both tests have showed, that Ag in ionic form is more toxic than Ag in the colloidal form. However the toxic effects of SNPs were not irrelevant and will be the subject of the further research.

11 Použitá literatura

1 PIERCE WISE SR., John, et al. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquatic Toxicology*. 2010, 97, s. 34-41.

2 PRUCEK, Robert, KVÍTEK, Libor, HRBÁČ, Jan. Silver colloids – methods of preparation and utilization. *Facultas rerum naturalium (2004): CHEMICA 43* [online]. 2004, vol. 43 [cit. 2010-05-5].

3 KIM, Soohee, et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro*. 2009, 23, s. 1076-1084.

4 KOMERS, K.; *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1996. ISBN 80-7194-045-3.

5 PANÁČEK, Aleš; KVÍTEK, Libor. *Základy Koloidní chemie*. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2007.

6 HIEMENZ, Paul C.; RAJAGOPALAN, Raj. *Principles of colloid and surface chemistry*. New York : Marcel Dekker, Inc., 1997.

7 ŠIMEK, L.; HRNČÍŘ, J. *Fyzikální chemie II : Koloidní a makromolekulární soustavy*. Zlin : UTB-Academice Centrum Zlin, 2005.

8 POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha : VŠCHT, 1998.

9 ŠČUKIN, E. D.; PERCOV, A. V.; AMELINOVA, E. A. *Koloidní chemie*. Praha : Academia, 1998.

10 http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/motor/index.obrazky.html

- 11 KVÍTEK, Libor, et al. Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C*. 2008, 112, s. 5825-5834.
- 12 L. KVÍTEK, R. PRUCEK, A. PANÁČEK, J. SOUKOPOVÁ. Nanočástice stříbra- příprava, vlastnosti a aplikace, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Rožnov pod Radhoštěm 2009, Nanocon 2009,8, ISBN 978-80-87294-12-3.
- 13 <http://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/nanocastice/1>
- 14 PANÁČEK, Aleš, et al. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J. Phys. Chem. B*. 2006, 110, s. 16248-16253.
- 15 TSUJI, Takeshi; TSUJI, Masaharu. Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in solution: influence of laser wavelength on particle size. *Applied Surface Science*. 2002, 202, s. 80–85.
- 16 SOUKUPOVÁ, Jana, et al. Comprehensive study on surfactant role on silver nanoparticles (NPs) prepared via modified Tollens process. *Materials Chemistry and Physics*. 2008, 111, s. 77-81.
- 17 KITTLER, S., et al. Synthesis of PVP-coated silver nanoparticles and their biological activity towards human mesenchymal stem cells. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*. 2009, 40, s. 258-264.
- 18 PROKEŠ, Jaroslav. *Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Praha: Karolinum, 2005.
- 19 PAVLÍKOVÁ, Daniela, et al. *Ekotoxikologie*. Praha : Česká zemědělská univerzita v Praze, 2008.
- 20 D. HANDY, Richard; OWEN, Richard; VALSAMI-JONES, Eugenia. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*. 2008, 17, s. 315–325.

- 21 AHAMED, Maqsood, et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008, 233, s. 404–410.
- 22 KŘÍŽKOVÁ, Soňa; ADAM, Vojtěch; KIZEK, René. Fytotoxicita stříbrných iontů. *Chem. Listy*. 2009, 103, s. 559-568.
- 23 NAVARRO, Enrique, et al. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, s. 8959–8964.
- 24 JU CHAE, Yun, et al. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*. 2009, 94, s. 320–327.
- 25 KUMARI, Mamta; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*. 2009, 407, s. 5243–5246.
- 26 T. HARRIS, Andrew; BALI, Roza. On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. *J Nanopart Res*. 2008, 10, s. 691–695.
- 27 SLAVÍK, CSC, RNDr. Bohumil, et al. *Květena České republiky 4*. Praha : Akademi věd ČR, 1995.
- 28 SMALLE, Jan, et al. Ethylen can stimulate *Arabidopsis* elongation in the light. *Plant Biology*. 1997, 94, s. 2756-2761.