



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL
PROTECTION

EKOTOXIKOLOGIE NANOČÁSTIC

ECOTOXICOLOGY OF NANOPARTICLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

VERONIKA KERBEROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. HELENA ZLÁMALOVÁ
GARGOŠOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0804/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Veronika Kerberová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)
Vedoucí práce: **MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Ekotoxikologie nanočástic

Zadání bakalářské práce:

Práce bude teoretická, jejím cílem bude popsat problematiku spojenou s výskytem nanočástic v ekosystému a jejich vlivem na organismy jednotlivých složek ekosystému.

Termín odevzdání bakalářské práce: **22.5.2015**

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Veronika Kerberová MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D. prof. RNDr. Milada Vávrová, Csc.

V Brně, dne 30. 1. 2015

Prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakult

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá charakteristikou nanočástic, jejich chováním a ekotoxicitou v životním prostředí. Práce je zaměřena na stručný popis nanotechnologií, nejčastěji využívaných nanočástic v průmyslu, medicíně a dalších aplikacích. Zkoumá jejich zdroje úniku do životního prostředí a také výskyt v akvatickém a terestrickém prostředí. Z hlediska ekotoxikologie se zabývá testováním nejčastěji používaných a v životním prostředí nejvíce se vyskytujících nanočástic. Zároveň hodnotí, zda jsou současné ekotoxikologické testy dostačující, nebo zda je potřeba jejich úprava a zohlednění specifických vlastností nanočástic.

ABSTRACT

This thesis deals with the characterization of nanoparticles, their behaviour and ecotoxicity in the environment. A brief description of nanotechnology is given together with the overview of the most commonly used nanoparticles in industry, medicine and other applications. Their sources and their fate in the environment are further described. Possibilities of ecotoxicological testing of the most commonly used nanoparticles with the most frequent occurrence in the environment are evaluated. At the same time sufficiency of currently used ecotoxicological test is assessed and necessity of their modification owing to the specific characteristics of nanoparticles is discussed.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nanočástice, ekotoxická, testování

KEYWORDS

Nanoparticles, ecotoxicity, testing

KERBEROVÁ, V. *Ekotoxikologie nanočástic*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 48 s. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat mé vedoucí bakalářské práce MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. za ochotu, trpělivost a cenné rady při zpracování této bakalářské práce.

Obsah

1. ÚVOD	7
2. NANOTECHNOLOGIE	8
2.1. Charakteristika nanotechnologií	8
2.2. Historie a počátky	9
3. NANOMATERIÁLY	10
3.1. Využití nanomateriálů	11
3.2. Vlastnosti nanomateriálů	11
4. POHYB ŠKODLIVÝCH LÁTEK V PROSTŘEDÍ.....	13
4.1. Osud nanočástic v životním prostředí	14
5. VÝSKYT NANOČÁSTIC V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ	15
5.1. Nanočástice v akvatickém prostředí	15
5.2. Nanočástice v terestrickém prostředí.....	16
5.3. Nepřímá kontaminace.....	16
6. NEJČASTĚJI POUŽÍVANÉ NANOČÁSTICE	17
6.1. Nanočástice stříbra	17
6.2. Nanočástice zlata	18
6.3. Nanočástice uhlíku	19
6.4. Nanočástice titanu.....	21
7. TOXICITA NANOČÁSTIC	21
7.1. Expozice nanočásticím	21
7.2. Biologická dostupnost	22
7.3. Mechanismy toxického účinku.....	22
7.4. Hodnocení rizik	23
8. EKOTOXIKOLOGIE	24
8.1. Charakteristika toxikantů.....	25
8.2. Vztah expozice – účinek.....	25
9. EKOTOXIKOLOGICKÉ ASPEKTY POUŽÍVÁNÍ NANOČÁSTIC	26
10. SPECIFIKA EKOTOXIKOLOGICKÉHO TESTOVÁNÍ NANOČÁSTIC.....	28
10.1. Testování ekotoxicity nanočástic stříbra.....	29
10.2. Testování ekotoxicity nanočástic zlata	33

10.3.	Testování ekotoxicity nanočástic TiO ₂	35
10.4.	Testování ekotoxicity nanočástic uhlíku.....	36
11.	ZÁVĚR.....	40
12.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	41
13.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	48

1. ÚVOD

Nanočástice nacházejí uplatnění již od pradávna, aniž by lidé věděli, že se jedná o částice, které budou v budoucnu hrát na poli vědy důležitou roli. V poslední době ovšem nanotechnologie patří mezi rychle se rozvíjející disciplínu, která postupně proniká do oblastí průmyslu, ale i do běžného života. Dá se předpokládat, že nanočástice v budoucnu najdou velmi rozsáhlé využití v širokém spektru aplikací, a to hlavně díky svým jedinečným vlastnostem, které získávají právě po převedení částic do rozměrů nanometrů. Nanotechnologie nachází uplatnění v informačních technologiích, začaly se využívat v mnoha spotřebitelských produktech a také ke zlepšení povrchových vlastností. Očekává se, že přinesou revoluci v medicíně a v potravinářství, zejména v obalových materiálech, své místo mají i v textilním a strojírenském průmyslu.

Při neustále zvyšujícím se trendu používání nanomateriálů je zapotřebí zkoumat kromě užitečných vlastností i možné negativní důsledky jejich výskytu v životním prostředí – tj. případná rizika nejen pro člověka, ale i pro ostatní organismy. V dnešní době již bylo provedeno mnoho studií, které se zabývají ekotoxicitou nanočástic, jejich osudem a chováním. Z jejich výsledků a závěrů stále však není přesně známo, jaké účinky mohou vyvolat a jakým způsobem mohou ovlivnit organismus. Pro bezpečné používání nanomateriálů je nutné dostatečně vyhodnotit, jakými parametry je třeba se zabývat při jejich hodnocení a jakým způsobem je nutné upravit současné metody testování jejich účinků na organismy. Je zapotřebí, aby byly objeveny jejich negativní vlastnosti, které se mohou projevit při vstupu těchto látek do životního prostředí a tím ovlivnit celou řadu procesů probíhajících v ekosystémech.

2. NANOTECHNOLOGIE

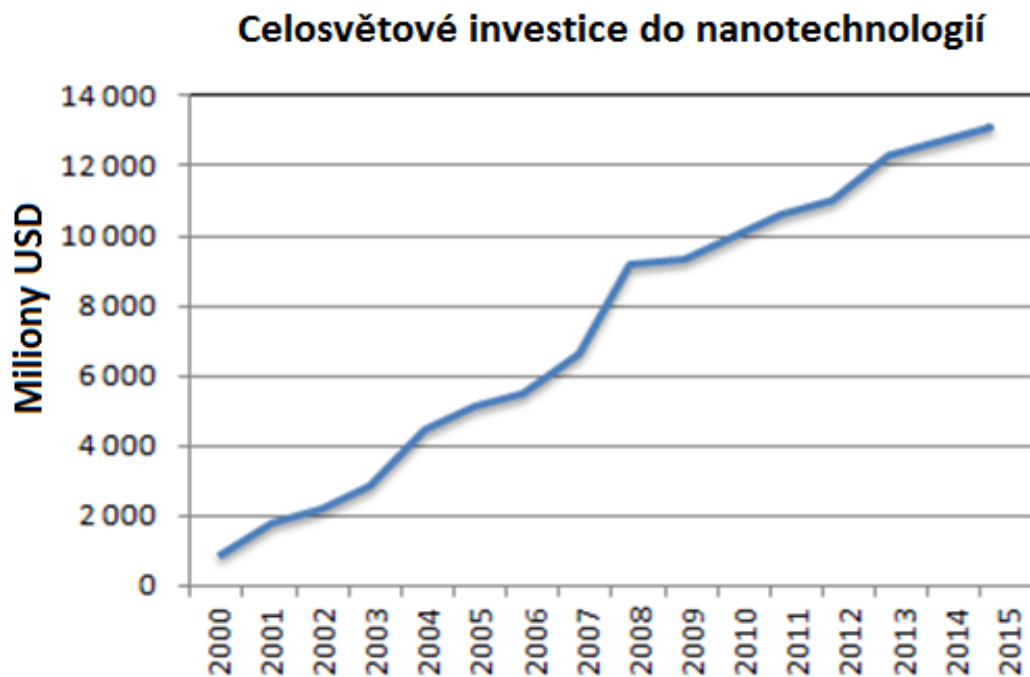
2.1. Charakteristika nanotechnologií

Nanotechnologie lze definovat jako vědu o vytváření materiálů, zařízení a systémů z velmi malých částic, které jsou i pod optickým mikroskopem neviditelné. Vědci se shodují, že má nakročeno k označení „gigaideology“ díky svému velmi širokému využití. Nanotechnologie nacházejí uplatnění nejen v chemii, ale i fyzice, strojírenství nebo také ve výpočetních a materiálových vědách. Objevuje se snaha vyvíjet nové katalyzátory chemických reakcí, nová mazadla i otěruvzdorné povlaky strojních součástí. Nanoelektronika se snaží zkoumat možné využití nanostruktur v informačních technologiích. Dále nachází uplatnění i v optice, kde jsou objeveny díky nanočásticím nové zdroje laserových světél a optických systémů. Také v lékařství dochází k neustálému rozvoji – existuje předpoklad, že bude možné implantovat nanosenzory do lidského těla, a ty následně budou schopny rozeznat, kdy diabetik bude potřebovat svoji dávku inzulínu. Dále se očekává, že senzory zabudované v náramkových hodinkách budou indikovat nebezpečné množství škodlivých plynů v ovzduší, čímž mohou upozornit člověka na hrozbu astmatického záchvatu.

V dnešní době se však teprve začíná rozumět podstatě zákonitostí, kterými se řídí jak fyzikální, chemické, tak i biologické a další procesy v nano rozměrech. Vlastnosti nanočástic (a tím i jejich chování) nelze jednoduše předpovědět na základě zkoumání jejich větších rozměrů, protože dochází k modifikaci charakteristických vlastností právě z důvodu jejich velikosti. Stejně jako je široké využití nanotechnologií, existuje spousta názorů, které se liší v otázce jejich potenciálního dopadu na život člověka a životní prostředí. V každém oboru se nanotechnologie uplatňují různým způsobem a tudíž i v rozdílném rozsahu. Proto je třeba zkoumat jejich vývoj samostatně ve všech oblastech lidské činnosti, z čehož plyne, že dopady aplikací nanotechnologií nelze zobecňovat.

Jakmile došlo k rozvoji v oblasti nanotechnologií, začal samozřejmě růst počet vědců, kteří měli zájem podílet se na vývoji a objevovat další možnosti. V řadě států vznikají výzkumné programy, ale ani nadnárodní aktivity nezůstaly pozadu. Příkladem může být dokument vydaný Evropskou unií (4. rámcový program výzkumu a vývoje EU, platící v letech 1994 – 1998), ve kterém bylo hodnoceno řešení různých problémů týkajících se nanotechnologií. Sdružením, které se zabývá současným stavem nanotechnologií, je European Scientific Foundation (ESF, Evropská vědecká nadace) [1, 2, 3].

Zájem o tuto vědu je patrný i z následujícího grafu na obr. 1, který ilustruje vzrůst financování nanotechnologií v posledních patnácti letech.



Obr. 1 Celosvětové investice do nanotechnologií, upraveno podle [4]

2.2. Historie a počátky

Historie dokládá, že se lidstvo setkávalo s nanočásticemi již v dřívější době. Jako příklady jsou známy nanočástice zlata a stříbra, které se používaly při výrobě třpytivých keramických glazur. Egypťané využívali nanočástice zlata k duševní i celkové tělesné očistě. V obou těchto případech lidé netušili, že používají nanočástice ve smyslu, v jakém jsou dnes chápány [5].

Jedním z prvních vědců, kteří se zabývali tímto oborem, byl americký fyzik Richard Phillips Feynman, nositel Nobelovy ceny za fyziku, který v roce 1959 na své přednášce „*There's Plenty of Room at the Bottom*“ (volně přeložitelné jako „Tam dole je spousta místa“) představil svoji vizi – možnosti manipulovat a kontrolovat samostatné atomy a molekuly. V tomto případě hovořil o takzvané mikrotechnologii [6].

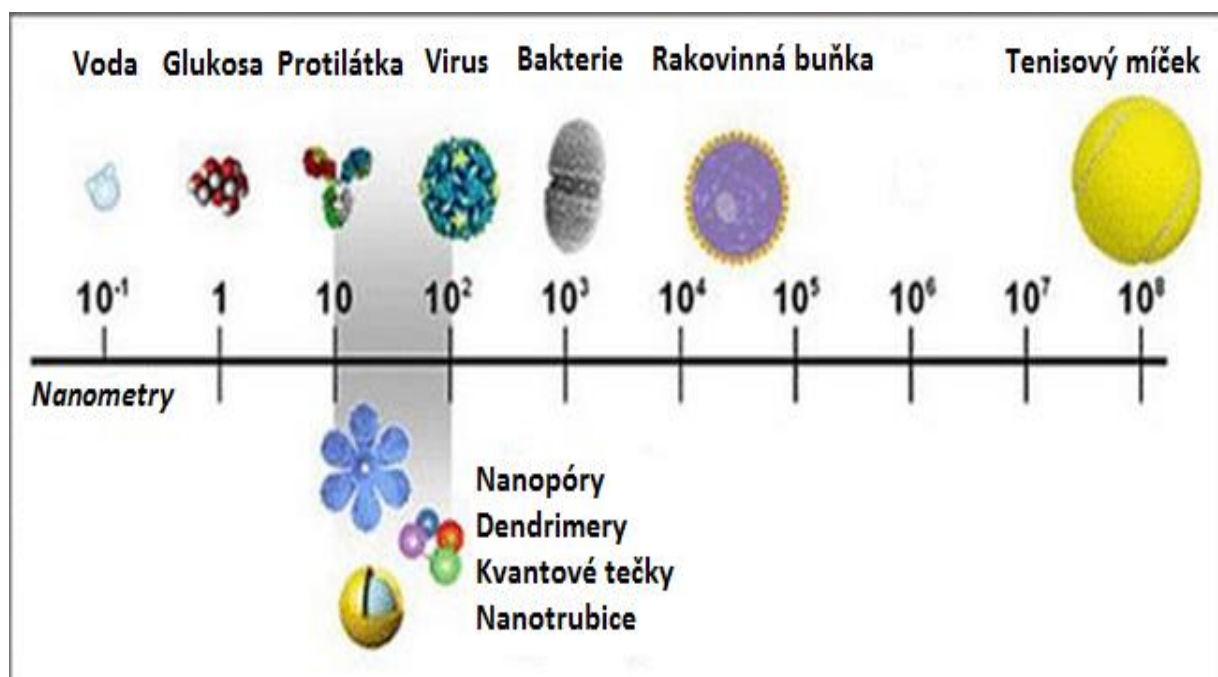
Termín nanotechnologie poprvé použil v roce 1974 japonský fyzik Norio Taniguchi v souvislosti s procesy, díky nimž bylo možno vyrobit součástky o velikosti nano. Jeho definice se i dnes považuje za platnou a zní následovně: „*Nanotechnology mainly consists of the processing of separation, consolidation, and deformation of materials by one atom or one molecule.*“ („Nanotechnologie sestává hlavně z procesů separace, konsolidace a deformace materiálu jedním atomem nebo molekulou“) [7].

Dalším průkopníkem v této oblasti je Kim Eric Drexler, který ve své publikaci „*Engines of Creation: The coming era of Nanotechnology*“ (přeložitelné jako „Stroje tvoření – nastupující éra nanotechnologie“) stanovil základní principy molekulárního inženýrství a nastínil vývoj nanotechnologií [8].

3. NANOMATERIÁLY

Nanomateriály mohou být vyrobeny z nanočástic, nanovláken nebo nanofilmů. Nicméně, v dnešní době jsou právě nanočástice typem s nejširším využitím. Za nanomateriály považujeme látky, které obsahují částice o velikosti 1 – 100 nm alespoň ve dvou rozměrech. Na obr. 2 je patrné porovnání rozměrů nanočástic, virů, bakterií atd.

Nanočástice mohou být podle původu rozděleny do dvou skupin na přírodní a antropogenní. Nanočástice utvářející se bez lidského přičinění vznikají při procesech, jako jsou například eroze, vulkanická aktivita, při lesních požárech, ale i biologickými procesy. Částice v nanořádech vznikají také při spalovacích procesech, především v letecké a automobilové dopravě. Z toho vyplývá, že nanomateriály, resp. nanočástice tu byly dávno před tím, než je lidé začali cíleně vyrábět a používat v různých oblastech průmyslu. Lze namítnout, že se příroda na výskyt nanočástic mohla adaptovat během vývoje, tak proč je nutnost zabývat se jejich toxicitou? Je to z toho důvodu, že i některé přírodní látky mohou vykazovat toxické vlastnosti, tím pádem tyto vlastnosti můžeme s určitostí očekávat i u vyrobených částic [9].



Obr. 2 Srovnání rozměrů, upraveno podle [10]

3.1. Využití nanomateriálů

Se sílícím vývojem vědního oboru nanotechnologie roste na trhu počet produktů vyrobených z nanočástic, což přináší velké množství potenciálních výhod. Tyto produkty můžeme nalézt v elektronice, optice, textilním průmyslu, dále ve zdravotnictví a kosmetice. V neposlední řadě se používají jako nové obalové materiály, využívají se také v technologiích na úpravu vody. Své uplatnění nachází i v dopravním průmyslu jako palivové články a katalyzátory, také jako biosenzory a prostředky pro sanaci životního prostředí [11].

Pro představu lze uvést pár příkladů využití. Antibakteriální částice stříbra jsou používány v ponožkách nebo vložkách do bot. Nanočástice TiO_2 jsou schopny absorbovat UV-zářeni, tudíž je lze využít při ochraně proti slunečnímu záření, další význam mají po přidání do kosmetických přípravků, kde fungují jako složky proti stárnutí pleti. Nanočástice mědi slouží jako přísady do gelů, které účinně zmírňují tření mezi kovovými povrchy. Nanočástice zinku se dají využít jako vysoce reaktivní katalyzátory organických reakcí a k likvidaci zbytkových automobilových plynů. Vědci po celém světě se věnují výzkumu použití nanotechnologií v biomedicínských aplikacích. Velkému zájmu se těší také uhlíkové nanomateriály v oboru biologie a farmacie, a to díky jejich jedinečné geometrické struktuře. Ve srovnání s materiály ve velikosti mikro rozměrů disponují fantastickými vlastnostmi [12, 13].

Nanočástice jsou velmi rozmanité (v současné době je známo více než 44 prvků, ze kterých je lze připravit), a to z hlediska chemického složení, ale i vlastností. I když je roční produkce nanomateriálů odhadována na tisíc tun ročně a jejich výroba a možnosti využití neustále rostou, je třeba jistá opatrnost vzhledem k jejich zavádění. Stále není přesně známo, jaký mohou mít vliv na člověka i životní prostředí [14].

3.2. Vlastnosti nanomateriálů

Vlastnosti nanomateriálů se výrazně liší od materiálů s většími rozměry. Pro představu lze uvažovat homogenní materiál o velikosti například v milimetrech. V tomto případě většina z jeho vlastností bude souviset s jeho chemickým složením a krystalovou strukturou. Tyto vlastnosti studuje fyzika a chemie pevných látek. Pro objekt o určité velikosti platí, že počet povrchových atomů je zanedbatelný vůči celkovému počtu atomů, ze kterých je materiál složen.

Z hlediska složení nanomateriálů se nejedná o nové látky, ale o látky, které jsou vyrobeny z upravených částic v rozměrech nanometrů. Zjednodušeně lze říci, že povrchové atomy mají nižší počet sousedů, tzn. vytváří menší počet vazeb, než atomy v objemu daného materiálu. Takle skutečnost podstatným způsobem ovlivňuje vazebné energie atomů a zároveň jejich prostorové uspořádání, čímž se zásadně mění vlastnosti daných látek. Platí, že povrchové vlastnosti postupně převažují nad vlastnostmi objemovými. Právě s klesající velikostí částic nepřímo roste plocha jejich povrchu, díky tomu dochází ke zvýšení Gibbsovy energie, což má za následek větší chemickou reaktivitu [15, 16, 17].

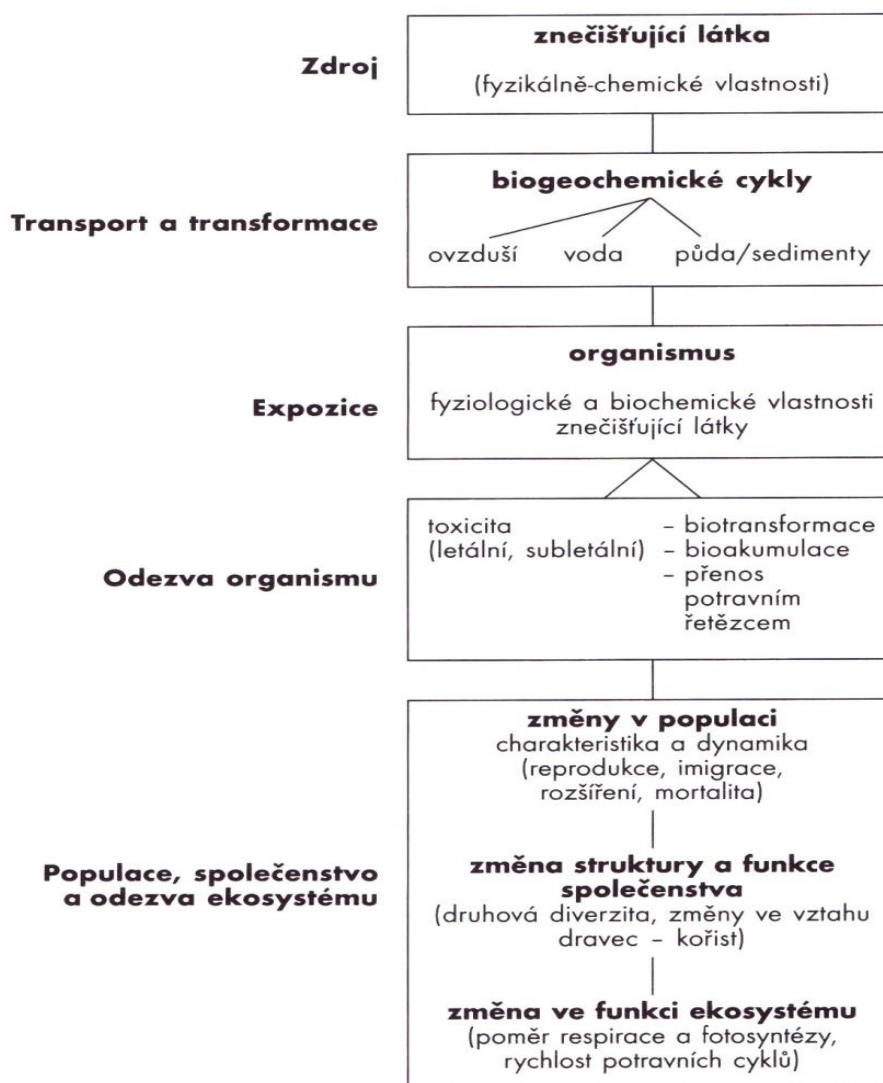
Pokud se velikost částic, ze kterých jsou vyráběny nové materiály, blíží k nano měřítku, mění se téměř všechny jejich vlastnosti, zejména elektrické, magnetické, optické i mechanické. Obecně platí, že fyzikálně-chemické vlastnosti jsou ovlivněny velikostí, tvarem, krystalinitou, strukturou složení atd. S obrovským rozvojem nanotechnologií mohou být částice navrženy tak, že mají vylepšeny jeden nebo i více uvedených parametrů [18].

Jedním z nejdůležitějších atributů je tvar nanočástic. V makroskopickém světě se předpokládá, že tvar více či méně souvisí se samotnou funkcí objektu. V mnoha studiích je zkoumáno, zda existuje nějaký vztah mezi tvarem a fyzikálními vlastnostmi nano objektů. A také se najdou případy, kdy existuje daná korelace. Například nanokrystaly kadmia selenidu jsou schopny emitovat světlo v různých barvách právě v závislosti na jejich velikosti a tvaru. I další polovodiče a mnoho kovů vykazují rozdílné optické vlastnosti s rozdílnou velikostí částic. Pro příklad lze uvést koloidní suspenzi nanočástic zlata, která má tmavě červenou barvu, ale se zvětšováním částic se mění dožluta. Podobné je to i s nanočásticemi stříbra [15, 19].

Očekává se, že použití a výroba nanomateriálů povede k vylepšení spotřebních a průmyslových produktů, k řešení kritických energetických potřeb, zlepšení bezpečnostních systémů a také k pokroku v oblasti medicíny, především z důvodu jejich jedinečných fyzikálních vlastností a kvantové mechaniky [20].

4. POHYB ŠKODLIVÝCH LÁTEK V PROSTŘEDÍ

Znečišťující látky, které jsou zdraví škodlivé, se do prostředí mohou dostávat z mnoha přirozených zdrojů i z činnosti člověka na základě svých fyzikálně-chemických vlastností. Jsou přenášeny a účastní se biogeochemických cyklů v jednotlivých složkách životního prostředí – v ovzduší, půdě, vodním prostředí, horninách a také v sedimentech. Do organismů jsou tyto látky transportovány potravou, při dýchání a dalšími cestami [21]. Vliv látek na organismus a populace demonstruje obr. 3.



Obr. 3 Vliv znečišťující látky na ekosystém [21]

Často je vliv látek modifikován a záleží právě na pochodech a reakcích, kterými se dostanou k cílovému jedinci. Ovzduší a voda se dají považovat za velmi dynamická média, která dokáží přenášet řadu látek a zároveň s nimi zprostředkovávat styk rychle a na velké vzdálenosti.

Na druhou stranu půda, sedimenty a organismy jsou spíše pomalá transportní média, dokonce se dají označit jako dlouhodobé rezervoáry celé řady škodlivin. Biogeochemické cykly jsou navzájem propojeny a většinou platí, že kontaminace jedné složky má za následek postupné znečištění složek dalších. Škodlivina v prostředí se dá rozeznávat do té doby, dokud se její množství či koncentrace nesníží zředováním pod přijatelnou hodnotu nebo dokud se chemickými, fyzikálními nebo metabolickými procesy změní na látku netoxickou [21].

4.1. Osud nanočástic v životním prostředí

Vyráběné nanomateriály jsou do životního prostředí uvolňovány ať už neúmyslně, nebo záměrně. Jedna z klíčových otázek týkající se expozice a pohybu nanočástic je, jakými parametry je nutné se zabývat při zkoumání jejich osudu a chování. Mohou jimi být hmotnostní koncentrace, plocha, povrchová aktivita (například schopnost produkovat radikály, zeta potenciál), chemické složení, distribuční koeficient. Dále může docházet k aglomeraci a agregaci – v tomto případě nanočástice ztrácejí dosavadní vlastnosti dané jejich velikostí. A vzhledem k tomu, že aglomeráty a agregáty mají tendenci k usazování, je nutné sledovat a kontrolovat i tuto vlastnost [22].

Na rozdíl od volných částic, nanočástice obsažené v matrici nejsou považovány za nebezpečné. I přesto se očekává, že po čase dojde k uvolnění nanočástic z produktů a ke změnám v jejich vlastnostech. Například loužením odpadů ze skládek mohou nanočástice vstupovat do životního prostředí a pohybovat se různými cestami, ovšem jinými než větší částice. Jak již bylo řečeno, osud a chování nanočástic stále nelze důkladně předpovědět. V životním prostředí na ně působí mnoho faktorů, které je mohou izolovat, modifikovat nebo degradovat, čímž ovlivňují jejich biodostupnost a potenciální toxicitu. Jako příklad, který dokazuje jedinečnost a nepředvídatelnost jejich chování, lze uvést fullereny – předpokládá se, že všechny uhlíkové molekuly by měly být hydrofobní a nerozpustné ve vodě. Ovšem vědci zjistili, že hydrofobní fullerenové molekuly získají náboj, čímž vznikají klastry [nano – C₆₀ (nC₆₀)] suspendované ve vodě. Takové jejich seskupení by umožňovalo lepší distribuci fullerenů ve vodním prostředí a tím i jejich lepší biodostupnost. Navíc roztoky neobsahující soli podporují rozpouštění fullerenů, na rozdíl od slaných roztoků, které je neutralizují, což způsobuje jejich uvolnění a následnou kumulaci v sedimentech. Tyto studie tedy potvrzují, že osud fullerenů v životním prostředí závisí především na vlastnostech vodního ekosystému, ve kterém se nachází [23].

Hlavním faktorem ovlivňující osud nanočástic je jejich rozpustnost ve vodě, která souvisí se schopností dispergovat v určitém prostředí – což zvětšuje možnosti expozice organismů těmto částicím. Povrch nanočástic je upravován například přidáním funkčních skupin, čímž mohou být ovlivněny jejich fyzikální i chemické vlastnosti. Konkrétně nanočástice titanu vykazují hydrofilní vlastnosti, ale během procesu stárnutí dochází ke vzniku agregátů v důsledku oxidace a desorpce molekul povrchových vrstev. Kovové nanočástice bývají často potaženy organickými nebo anorganickými sloučeninami (například citrátem nebo povrchově aktivními látkami jako je dodecylsírán sodný). Díky těmto látkám je dosaženo stability koloidní suspenze. Z výše uvedeného, povrchové vlastnosti nanočástic ve vodách souvisí se složením těchto

povlaků a také s povrchovým nábojem, pH, teplotou a iontovou silou. Pro příklad lze uvést nanočástice oxidu titanu, které jsou při $\text{pH} < 6$ pozitivně nabity, ale pokud je $\text{pH} > 7$, mají negativní náboj [24, 25].

Vliv na chování nanočástic má jejich schopnost tvořit větší koloidní agregáty, které jsou méně biodostupné. Například uhlíkové nanotrubičky utváří agregáty mnohem větších rozměrů, než jsou samotné nanočástice, čímž se jejich biodostupnost významně snižuje. Naopak velká povrchová plocha malých částic umožňuje lepší biodostupnost, a proto se může zvýšit riziko expozice a toxického efektu. Existují studie, které dokazují, že menšími agregáty jsou způsobeny rozsáhlejší nepříznivé účinky na bakterie než těmi většími. Také antimikrobiální vlastnosti nanočástic TiO_2 jsou nepřímo úměrné jejich velikosti. Faktory, které podporují agregaci, mohou pozměnit pohyb částic a tím i jejich toxicitu. V určitých případech v závislosti na nanomateriálu může agregace zmírnit expozici a zároveň i toxicitu, ovšem v opačných je dosaženo zvýšení toxického efektu. Kinetiku agregace ovlivňují rozdílné hydrochemické parametry jako pH, iontová síla, tvrdost vod nebo kyslíkové podmínky. Agregace a sedimentace nanočástic může přirozeně probíhat v přítomnosti suspendovaných nebo rozpuštěných látek ve vodě (jakými jsou například přirozené organické materiály), které mohou zapříčinit jejich odstranění z vodního sloupce [23, 26].

5. VÝSKYT NANOČÁSTIC V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Nanočástice se v životním prostředí vyskytují v následujících složkách: voda, vzduch, půda a sedimenty. V současné době stále není známo, která složka životního prostředí může být nejnebezpečnější a největším rezervoárem a ve které by mohlo docházet k největší expozici. Pozornost musí být věnována i přetrvávání nanočástic v potravinovém řetězci [27].

5.1. Nanočástice v akvatickém prostředí

Pokud jsou zkoumány emise nanočástic ve vodě, lze očekávat, že k největšímu uvolňování dochází v průběhu jejich užívání a následnému nakládání s odpady. Z následujících příkladů je vidět, jakým způsobem mohou nanočástice unikat do vodního systému – jejich použití v opalovacích krémech jako ochrana proti UV záření, z aplikací používaných k úpravám vody a půdy, z čisticích prostředků, z přísad obsažených v naftě a automobilových pneumatikách a z řady stále nových produktů. Modelové studie odhadují, že obsah nanočástic ve vodách se pohybuje v koncentracích $\mu\text{g/l}$ až mg/l , přesněji nelze rozsah určit vzhledem k neustále se zvyšujícímu využívání nanotechnologií [25, 26].

Chování nanočástic ve vodě

Obecně lze konstatovat, že jsou nanočástice ve vodě málo a špatně rozpustné. Právě z toho důvodu mohou být považovány za perzistentní kontaminanty. Podle známých předpokladů by se měly srážet a tvořit větší agregáty a aglomeráty takové, aby jejich energetický stav byl co nejvýhodnější. Ovšem zveřejnění několika výsledků studií vyvolává otázky, zda tyto zákonitosti platí i pro částice nano rozměrů [27].

5.2. Nanočástice v terestrickém prostředí

Předpokládá se, že mnoho používaných nanočástic se nakonec různými cestami dostane do půdy. K přímým emisím může dojít při skladování odpadů a používání nanotechnologií k ochraně plodin a zemědělských půd. Poté, co se dostanou do půd, podléhají rozmanitým půdním procesům, z nichž nejvýznamnějšími jsou degradace a adsorpce, mimo to nanočástice mohou samy adsorbovat jiné látky na svůj povrch. Kromě vlivu na samotnou půdu dochází i k přímému ovlivnění půdních organismů. Opět je těžké odhadnout, do jaké míry se nanočástice mohou do půdy dostat a jaké negativní (popřípadě pozitivní) účinky mohou způsobit [27].

Chování nanočástic v půdě

Biologická dostupnost nanočástic je ovlivněna přítomností různých chemických látek v prostředí. V půdách, které obsahují organické látky produkované půdními organismy (polysacharidy, glykoproteiny, fulvonové a huminové kyseliny) se předpokládá, že dojde k navázání těchto látek na nanočástice, čímž způsobí jejich stabilizaci v dispergované formě. Z tohoto důvodu se mohou takto modifikované nanočástice stát více biodostupné pro půdní organismy. Naopak anorganické ionty mohou zvyšovat stupeň agregace či aglomerace částic a znesnadnit tak průnik do organismů [17].

5.3. Nepřímá kontaminace

Používáním nanotechnologií může také docházet k nepřímé kontaminaci životního prostředí. Jedním z příkladů je schopnost nanočástic adsorbovat rozpuštěné nečistoty, což souvisí s jejich velkým specifickým povrchem. Díky této vlastnosti by mohlo být z prostředí odstraněno velké množství znečišťujících látek. Na druhou stranu by také mohly být zachyceny i živiny potřebné pro organismy, což by způsobilo jejich následný úhyn. V důsledku tohoto by mohlo dojít k lokálnímu navýšení koncentrace znečišťujících látek, například v sedimentech [27].

6. NEJČASTĚJI POUŽÍVANÉ NANOČÁSTICE

Následující kapitola pojednává o nejčastěji používaných a v životním prostředí nejvíce se vyskytujících nanočásticích.

Teoreticky mohou být nanomateriály vyrobeny z jakékoliv látky. Jak již bylo zmíněno, v současné době je známo zhruba 44 prvků periodické tabulky, ze kterých lze vyrobit jejich nanoformu, a tento počet neustále roste. Mezi nejčastěji používané se řadí nanočástice vyrobené z přechodných kovů (stříbro a zlato), křemíku, uhlíku a oxidy kovů (převážně oxidy titanu, zinku a ceru) [9].

6.1. Nanočástice stříbra

Stříbro, jakožto těžký kov, je jeden z nejtoxičtějších prvků v iontové podobě, ale v životním prostředí velmi rychle přechází do nerozpustných sloučenin, a proto se neřadí k nejzávažnějším polutantům, na rozdíl například od rtuti. Platí, že akutní toxicita různých sloučenin stříbra se liší zejména díky rozdílné rozpustnosti ve vodách. Byly provedeny mnohé studie, z nichž vyplývá, že stříbro vykazuje toxický efekt především při působení na nižší organismy, ovšem dokáže ovlivňovat i celou řadu buněčných procesů ve všech organismech. Tyto studie byly prováděny na vodních rostlinách, bezobratlých a rybách. Studií týkajících se vlivu stříbra na terestrické rostliny je méně [28].

V dnešní době jsou nanočástice stříbra (AgNPs) a mnohé další formy široce využívány hlavně díky jejich antibakteriálním vlastnostem. Tyto nanočástice nachází využití například v oblasti textilního průmyslu. Do oblečení, ale i pracích prostředků a deodorantů se přidávají kvůli výše uvedenému antibakteriálnímu účinku, kdy AgNPs ničí bakterie produkující zápach při rozkladu organických látek obsažených v potu. S ohledem na jejich rostoucí využití je na místě otázka, zda jsou spotřebitelské a zdravotnické produkty bezpečné pro životní prostředí nebo pro člověka a jestli se mohou bakterie stát rezistentní vůči částicím stříbra s ohledem na jejich všudypřítomné použití. V lékařském průmyslu mají nanočástice stříbra také své místo. S rostoucí odolností bakteriálních kmenů vůči dnes používaným antibiotikům je snaha vyrábět nové typy antibiotik a homeopatik. Další použití nanočástic lze nalézt v elektronice a informačních technologiích. Díky svým rozměrům a unikátním optickým a elektrickým vlastnostem je možnost využití pro konstrukci mikroelektronických obvodů. AgNPs se dají používat i jako katalyzátory pro oxidaci organických látek a nacházejí se možnosti využití při redukční degradaci fenolů a při katalytické redukci organických barviv a nitrosloučenin, což jsou látky vykazující vysoký stupeň toxicity pro životní prostředí. Tyto schopnosti mají díky svému velkému povrchu a vysoké povrchové energii [29, 30].

Z důvodu velmi širokého využití nanočástic je zapotřebí sledovat, jak se zachází s produkty, které již dále nelze využít a stávají se proto odpadem. Nanočástice stříbra se uvolňují z různých zdrojů v různých formách. Do životního prostředí se mohou dostat, pokud nejsou recyklovány,

buď jako pevný odpad ze skládek, nebo jako emise z čistíren odpadních vod, ale i jako zbytkový odpad ze spaloven. Dále také z různých odvětví průmyslu a medicínských aplikací [31].

Při uvolňování nanočástic stříbra do životního prostředí dochází k několika jeho transformacím. Kromě agregace a aglomerace také dochází k jejich rozpouštění a následné speciaci, vzniká například chlorid stříbrný a sulfid stříbrný, který je velmi stabilní. Z tohoto důvodu se nachází v čistírnách odpadních vod a také v mnoha sladkovodních zdrojích. Chemická specie daného prvku, která se momentálně za daných podmínek vyskytuje v životním prostředí, je tedy určující pro biodostupnost a toxicitu stříbra. Biologická dostupnost AgNPs v půdách závisí jak na vlastní částici, tak na půdních vlastnostech. Obecně lze říci, že mobilita iontů stříbra je v půdě a sedimentech jen omezená.

K uvolňování AgNPs dochází z různých zdrojů v závislosti na jejich formě, zejména při kontaktu s vodou. Ta, pokud se dostane do kanalizace a následně do čistíren odpadních vod, je zdrojem jeho reziduí v čistírenských kalech. Je prokázáno, že asi 95% stříbra (obsaženého v různých nejen v nano sloučeninách) vstupujícího do čistíren odpadních vod se stane součástí čistírenských kalů. Jsou-li tyto kaly aplikovány na zemědělské půdy, mohou být rezidua stříbra opět přenesena do povrchových vod. Je nutné, aby koncentrace stříbra v určité složce životního prostředí nepřekročila stanovené hodnoty, které musí být v souladu s prahovými koncentracemi nežádoucích účinků u druhů, jako jsou bakterie, žížaly, řasy a ryby. Určitá část stříbra, která se uvolní z nanočástic, se většinou dostane do půdy, především právě z kalů. Do organismů se pak mohou dostat několika cestami. Buď ve formě půdního roztoku kořeny rostlin, nebo v případě živočišných organismů při výživě a tělesným kontaktem. Například žížaly nebo hlístice mají vysoce propustnou pokožku kvůli dýchání, čímž dochází ke kontaktu a vniknutí zmíněných částic do organismu. Proto je potřeba, aby byly známy prahové koncentrace všech forem stříbra, nejen iontových, ale i kovových nanočástic [31].

6.2. Nanočástice zlata

Nanočástice zlata patří mezi nejdéle používané, již ve středověku byly příčinou červeného zbarvení výrobků ze skla. Mají jedinečné optické, elektronické a tepelné vlastnosti, jsou začleněny v nejrůznějších technologiích od mikroskopie, elektroniky až po diagnostiku a terapeutiku. V dnešní době se nejčastěji pro jejich přípravu používá Turkevičova redukční metoda kyseliny chlorozlatité pomocí citranu sodného ve vroucím vodném roztoku. Různými metodami lze připravit kulové částice, tetragonální krystaly nebo protáhlé nanotyče. Na použitých tvarech pak závisí jejich optické a elektrické vlastnosti. Jejich vylepšené optické vlastnosti nachází uplatnění ve výrobě barevných fotografií, protože zvyšují jejich stálost a odolnost. K identifikaci a lokalizaci buněk, bakterií a organických látek se využívá fluorescenčních vlastností. Dále mají takto upravené částice zlata využití přímo i jako léčivo, například při Alzheimerově chorobě. Také se díky své stálosti a elektrické vodivosti používá v elektronice při tisknutí elektronických obvodů nano inkousty [32, 33].

Zlato jako takové je „bezpečné“ a chemicky inertní. Sloučeniny zlata nachází uplatnění v klinické praxi jako protizánětlivé látky na léčbu revmatoidní artritidy, kromě toho i zlaté radioaktivní mikročástice byly účinně použity při léčbě rakoviny. V případě nanotechnologií se ve většině zmíněných aplikacích nanočástice zlata nachází ve velikosti větší než 5 nm, v takovém případě se předpokládá, že částice zlata má velmi podobné vlastnosti jako jeho částice ve větších rozměrech, tj. jiných než v nanometrech. Pokud se nanočástice nachází ve velikosti 3 nm a menší, jejich chemická reaktivita se s největší pravděpodobností liší [34].

V posledním desetiletí se objevuje čím dál více zpráv, které se snaží poukázat na možnou toxicitu těchto částic jak pro člověka, tak pro životní prostředí. Z tohoto důvodu se výzkumy zaměřují právě na problematiku případné toxicity a ekotoxicity těchto částic. Jejich úkolem je porozumět interakcím mezi buňkami a nanočásticemi, které jsou ovlivněny velikostí, tvarem, povrchem a dalšími vlastnostmi [34].

6.3. Nanočástice uhlíku

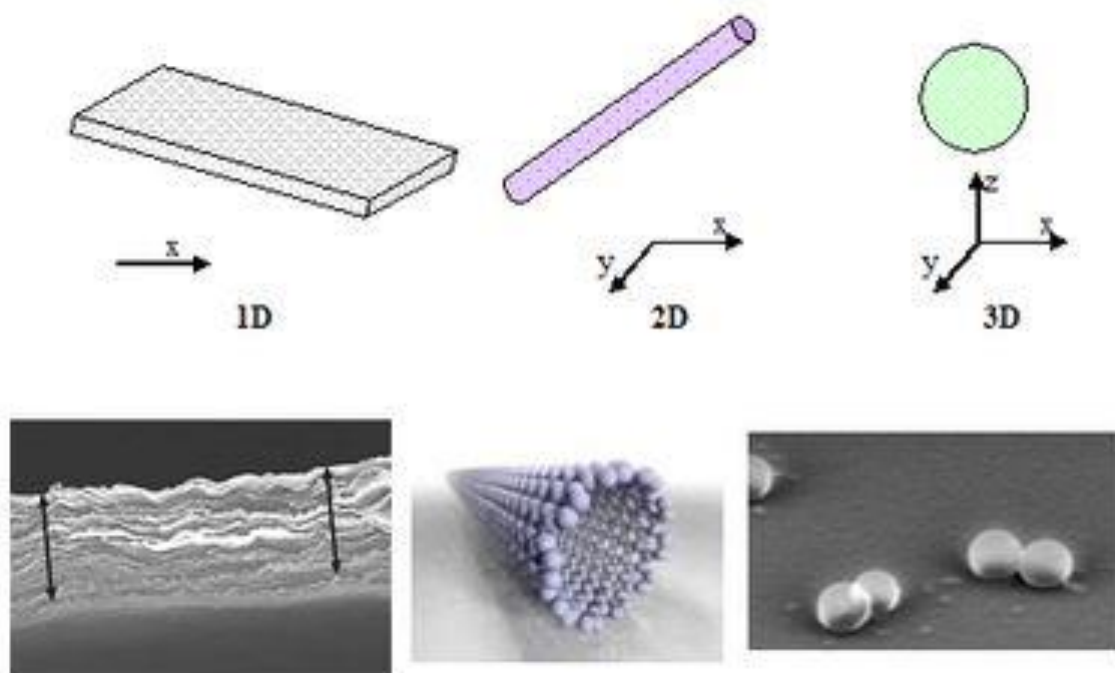
Mezi obecně známé nanočástice uhlíku patří například saze o velikosti 10 – 500 nm. Ty vznikají při nedokonalém spalování organických látek. Uhlík tvoří základní stavební kámen všech organických sloučenin a je základem všech živých organismů. Je čtvrtým nejrozšířenějším prvkem ve vesmíru a patnáctým nejvíce zastoupeným prvkem v zemské kůře.

V polovině 80. let nastal rozsáhlý výzkum uhlíku v submikronové oblasti a na začátku 90. let, s objevem dalších forem, došlo k vývoji uhlíkových nanočástic.

Z hlediska geometrie lze uhlíkové nanočástice rozdělit do několika skupin:

- 0D – nanokuličky, což jsou částice mající všechny rozměry v oblasti jednotek, fullereny.
- 1D – nanovlákna, nanotrubičky, nanotyčinky jsou částice s jedním rozměrem větším než je 100 nm.
- 2D – plošné nanoútvary, které mají dva rozměry větší než 100 nm, grafen.
- 3D – nanokrystaly, které mají všechny své rozměry v oblasti 100 nm nebo jsou kombinací předchozích, nanokrystalický diamant [35]

Rozdělení nanočástic uhlíku z geometrického hlediska je patrné z obr. 4.



Obr. 4 Rozdělení nanočástic uhlíku [35]

Vlastnosti uhlíkových nanomateriálů přináší široké aplikační možnosti v oblasti elektroniky (odvod tepla, paměťová média, displeje, palivové články), stavebnictví (nanokompozitní materiály), strojírenství (mechanicky odolné povrchy, snižování tření), či ve zdravotnictví (cílená doprava léčiv). Dále jsou aplikovány jako různé senzory, nachází uplatnění v chemickém, automobilovém a také ve vojenském průmyslu [36].

Při zkoumání chování uhlíkových nanočástic v životním prostředí je nutné věnovat se jejich povrchovým vlastnostem, protože právě ty ovlivňují jejich agregaci, mobilitu ve vodních systémech a v neposlední řadě interakce s vodními organismy a jejich možný vstup do potravního řetězce. Je také nutné zabývat se ostatními interakcemi, které by mohly ovlivnit jejich chování ve vodě a půdě. Ekotoxikologické hodnocení fullerenů a nanotubic je pomocí stávajících metod velmi obtížné – hydrofobnost a van der Waalsovy interakce způsobují agregaci a sedimentaci ve vodních systémech, zatímco různé povrchové úpravy zlepšující jejich vlastnosti mají za následek zvýšení stability. Z tohoto důvodu je usuzováno, že se uhlíkové nanočástice mohou v životním prostředí chovat velmi rozdílně v závislosti na jejich úpravách, které tudíž ovlivňují jejich toxicitu. Dostupné údaje ukazují, že za určitých podmínek mohou uhlíkové nanočástice překonat membránové bariéry a vniknout až k orgánům, kde mohou vyvolat negativní účinky [37].

6.4. Nanočástice titanu

Oxid titaničitý se v přírodě vyskytuje ve třech modifikacích – rutil, anatas a brookit, přičemž nejčastější formou je rutil. Je znám jako bílý pigment, který poskytuje ochranu barvám, papíru a inkoustům, používá se i v zubních pastách. Další využití nachází při výrobě plastů a v jiných aplikacích (opalovací krémy) z důvodu absorbování UV záření. Anatas vykazuje největší fotokatalytickou aktivitu, a právě proto se využívá jako katalyzátor a fotokatalyzátor. Například je známa aplikace, při které dochází k dopování TiO_2 dusíkem, následkem čehož dochází k posunutí absorpce záření do spodní hranice viditelného světla, což významně ovlivňuje průběh fotokatalýzy. Takové fotokatalytické oxidy mohou rozkládat organické polymery a likvidovat mikroorganismy. Spolu s brookitem nachází uplatnění jako elektrody v solárních článcích. Nanočástice titanu jsou chemicky inertní, časově velmi stabilní a podle posledních výzkumů netoxické pro člověka. Právě tyto vlastnosti vedly k zavedení výroby nanočástic titanu a ke snaze zlepšit jeho dosavadní vlastnosti. Využívají se pro širokou škálu aplikací, nejvíce jako prostředky pro samočisticí povrchy, světelné diody, solární články, dezinfekční spreje, sportovní potřeby a také v procesech úpravy vody.

Z důvodu širokého využívání nanočástic titanu by mohlo dojít k jejich nezanedbatelnému uvolňování do životního prostředí [38, 39].

7. TOXICITA NANOČÁSTIC

Obecně platí, že působení těžkých kovů na organismus je podmíněno jejich interakcí s biopolymery a indukcí vzniku volných kyslíkových radikálů, z čehož lze vyvodit jejich rozdílné toxické vlastnosti. Jak je již uvedeno výše, důležitým sledovaným prvkem při posuzování toxicity nanočástic je jejich rozpustnost ve vodě.

V posledním desetiletí se objevuje čím dál více zpráv, které se snaží poukázat na možnou toxicitu nanočástic jak pro člověka, tak i pro životní prostředí. Bohužel pořád nejsou účinky nanočástic přesně známy. Navíc většina vědeckých zpráv se týká zkoumání působení nanočástic na buňky *in vitro*. Úsilí pochopit chování a skutečnou situaci *in vivo* je stále nedostačující [28, 34].

7.1. Expozice nanočásticím

Pro stanovení toxického účinku je zapotřebí určit koncentraci dané látky a dobu trvání expozice. Pokud je sledován vztah expozice a účinku u nanočástic, je nutné, kromě stanovení dávky a doby expozice, určit a charakterizovat i fyzikálně-chemické vlastnosti hodnocených částic. Významné jsou rovněž informace o objemu produkce, možných průmyslových aplikacích, o transportu a chování nanočástic v životním prostředí, o jejich distribuci a rovněž o způsobech odstranění, které mohou být spojené s jejich recyklací. V ideálním případě by posouzení expozice nanočásticím mělo dávat informace o zdrojích, osudu a nejistotách v hodnocení.

To je ovšem v dnešní době stále nemožné právě proto, že nanomateriály představují velice rozmanitou skupinu a každý typ nanočástice se chová jinak než její konvenční provedení. Environmentální studie dokazují, že nanočástice mají tendenci k aglomeraci, agregaci, adhezi, difúzi, disociaci, degradaci, adsorpci různých částic a také jsou schopny bioakumulace v organismech [40].

Existuje několik druhů expozice v závislosti na době působení:

- Akutní jednorázová – škodlivá látka pronikne do organismu pouze jednou.
- Subakutní – látka proniká po dobu 4 týdnů.
- Subchronická – látka působí v organismu 1 až 3 měsíce.
- Chronická – působení látky je delší než 3 měsíce.
- Celoživotní

Při opakované expozici je zapotřebí brát v úvahu, v jakých časových intervalech expozice probíhá a zároveň i jaká je délka jednotlivých intervalů, tzn. délka působení chemické látky [17].

7.2. Biologická dostupnost

Transport nanočástic životním prostředím k ekologickým receptorům ovlivňuje jejich biologická dostupnost, z čehož plyne, že mobilita nanočástic není způsobena pouze vlastností vod a půd, ale i přítomností biomolekul včetně biomasy, rostlin a organismů [24].

Lze rozlišovat dva druhy biologické dostupnosti:

- Externí – definována jako schopnost dané látky přecházet z roztoku a následně být uvolněna v různých médiích.
- Interní – je schopnost dané látky být absorbována organismy a poté být transportována k cílovým orgánům, ve kterých může vyvolat toxický účinek [17].

7.3. Mechanismy toxického účinku

Pokud dojde k průniku nanočástic do organismu některou z možných expozičních drah, mohou tak vyvolat poškození biologických struktur. A právě díky jejich vlastnostem a biologické aktivitě se předpokládá, že mohou do buněk penetrovat několika cestami. Hluboko do tkání organismů prostřednictvím kapilár, kde poté mohou ovlivňovat buňky tkáně i orgány. Pokud jsou dostatečně malé, difúzí přes jadernou membránu se mohou dostat přímo do jádra buněk. Další možností je jejich náhodné uzavření v jádře. V takovém případě mohou interagovat s molekulami DNA a výsledkem by bylo poškození genetického materiálu. Nanočástice mohou pronikat také do lysosomů a mitochondrií, čímž ovlivňují jejich funkce.

Při vstupu nanočástic do organismu dochází ke zvýšení produkce různých přenašečů, jakými mohou být ATP (adenosintrifosfát) a vápník, dále dochází k aktivaci signálních drah, které vedou k buněčným odezvám, například ke vzniku oxidativního stresu. Studie *in vivo* a *in vitro* dokázaly, že pokud se nanočástice dostanou do kontaktu s buňkou, mohou způsobit tvorbu ROS (reaktivní formy kyslíku). Vznik intracelulárních reaktivních forem kyslíku je častější v přítomnosti nanočástic s fotokatalytickými vlastnostmi (například TiO_2) za současného vystavení UV záření. Při působení těchto nanočástic na bakterie bylo dokázáno, že působení UV záření má větší negativní efekt než sluneční záření.

Jako klíčový mechanismus toxicity nanočástic je považován oxidativní stres. Za normálních podmínek existuje v organismu rovnováha mezi reaktivními formami kyslíku a antioxidanty. Pokud je ale nějakým způsobem narušena, vzniká tzv. oxidativní stres, který je definován jako nerovnováha mezi produkcí volných kyslíkových radikálů a jejich současným odstraňováním antioxidanty. Tento stav je vyvolán buď zvýšenou tvorbou radikálů kyslíku, nebo snížením kapacity antioxidačního systému. Zmíněná nerovnováha vede k peroxidaci lipidů a následnému poškození buněčné membrány, což způsobí potlačení normálních funkcí buňky a následně až buněčnou smrt.

Experimentální data prokazují, že nanočástice s rozdílnými vlastnostmi mohou zapříčinit podobný efekt. Například nanočástice fullerenu C_{60} a TiO_2 mohou způsobovat oxidativní stres navzdory ke svým rozdílným fyzikálním a chemickým vlastnostem. Bylo také dokázáno, že nanočástice vstupující do mozku mohou rovněž způsobit oxidativní stres, což vyvolává jejich neurotoxicitu [17, 25, 40].

Schopnost nanočástic proniknout do buněk je dána jejich velikostí. Proniknout mohou jen ty, které mají menší velikost než největší póry buněk. Propustnost buněčné stěny se může měnit v průběhu reprodukce, navíc interakce nanočástic s buňkami může způsobit vznik nových pórů, díky kterým pak mohou částice pronikat ve větším množství [25].

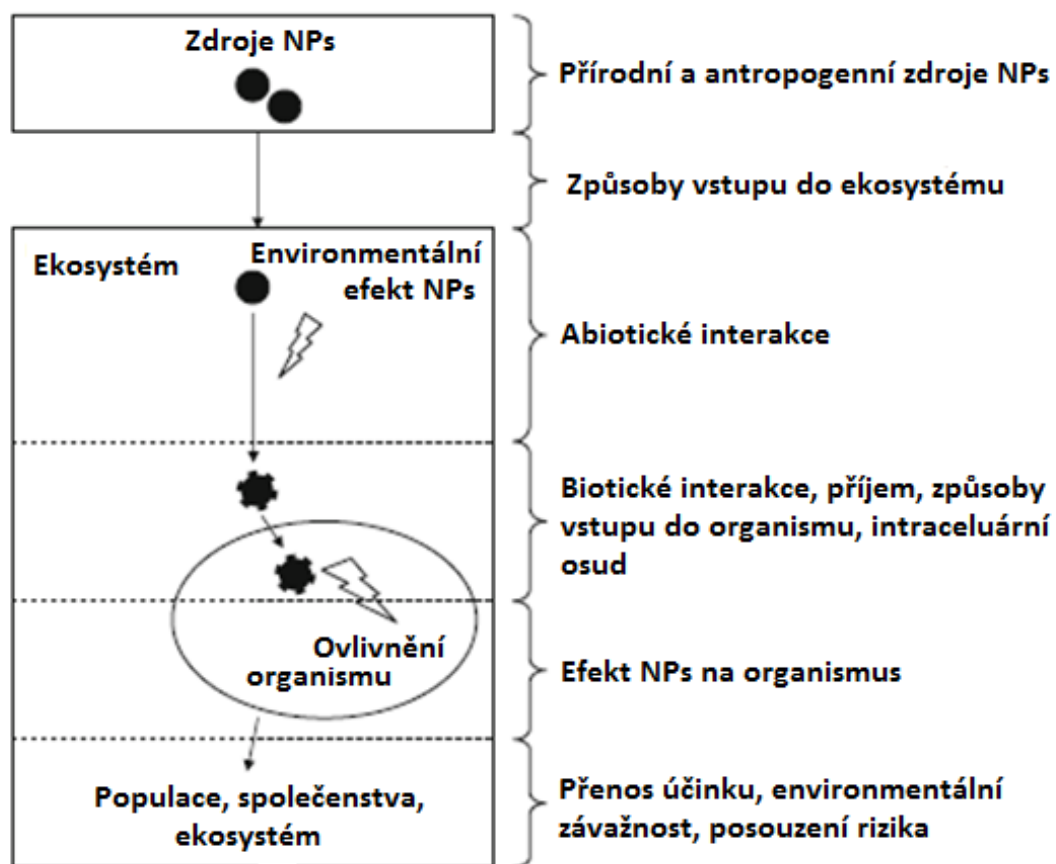
7.4. Hodnocení rizik

Vzhledem k tomu, že se nedá dospět k žádnému obecnému závěru, který by vypovídal o toxicitě nanočástic pro živou složku ekosystémů, je nutné, aby každá nově objevená nanočástice byla prozkoumána rovněž z hlediska ekotoxicity, než bude uvedena na trh [40].

Hodnocení rizik, které mohou nanočástice představovat pro životní prostředí, zahrnuje stanovení a následné srovnání jejich koncentrací v životním prostředí s těmi, které už mohou být toxické pro organismy. Je zapotřebí identifikovat cesty, kterými nanomateriály a nanočástice přichází do životního prostředí, dále jejich chování, osud a biodostupnost v ekosystémech, které jsou závislé, jak již bylo zmíněno výše, na vlastnostech nanočástic, ale také samozřejmě na vlastnostech prostředí, které je přijímá. Například ve vodním prostředí by mohla být ohrožena produktivita řas, a to z důvodu přímých toxických účinků nanočástic na tyto producenty, ale také nepřímých, při kterých dochází k adsorpci na povrchu řas. V takovém případě dochází k jejich zastínění, popř. k navyšování hmotnosti, což má za následek sníženou

dostupnost světla pro fotosyntézu a takto i redukcí biomasy pro organismy živící se fytoplanktonem.

Pohyb nanočástic v životním prostředí demonstruje následující obr. 5. Při hodnocení toxicity je třeba nejprve brát v úvahu zdroje nanočástic a jejich vstupní cesty do ekosystému. Jak je popsáno na obrázku, částice podléhají abiotickým reakcím, což vede k jejich fyzikálním a chemickým změnám. Tyto změny výrazně určují osud nanočástic v životním prostředí, a tím i jejich biologickou dostupnost pro organismy. V blízkosti organismů může docházet k interakcím okolo biologického rozhraní, které vedou ke vstupu nanočástic do organismů, a tudíž mohou způsobit toxický účinek, který například prostřednictvím potravního řetězce může ovlivnit i jiná společenstva [25].



Obr. 5 Pohyb látek v životním prostředí, upraveno podle [25]

8. EKOTOXIKOLOGIE

Ekotoxikologie je poměrně mladá vědní disciplína, která se neustále vyvíjí. Je součástí toxikologie životního prostředí a jak již samotný název napovídá, je oborem na hranici mezi ekologií a toxikologií, ale zároveň zahrnuje poznatky i z chemie životního prostředí, také z biologie a lékařství. Poprvé se o ekotoxikologii jako o samostatném oboru zmínil René Truhaut, člen francouzské akademie věd, v roce 1969. Toto mezioborové vědní odvětví definoval následovně: „Studium nepříznivých účinků chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společnosti.“ V dnešní době je ekotoxikologie chápána jako věda zkoumající toxické působení látek, které mohou být jak lidského, tak antropogenního původu, na živé organismy, jejich populace a společnosti. Klade si za úkol nejen vyvíjet nové metody, jejichž cílem je zjistit vliv látek na živé organismy ve všech úrovních ekosystému, ale i monitorovat toxické látky v životním prostředí a schopnost předvídat na základě výsledků ekotoxikologických testů nepříznivé vlivy [41, 42].

Toxikologie versus ekotoxikologie

Toxikologii můžeme definovat jako lékařský obor, který má za úkol studovat vliv jedovatých látek na člověka. Za jed se dá považovat každá látka, která má schopnost vyvolat poruchu biologických rovnováh charakteristických pro zdraví. V tom spočívá hlavní rozdíl mezi těmito disciplínami. Toxikologie je věda, která se zabývá působením látek na člověka, zatímco ekotoxikologie rozšiřuje toto zaměření na ostatní živé organismy. Při studiu živých organismů je vhodnější používat termín živé systémy a to z toho důvodu, že živé organismy nelze studovat izolovaně. Je potřeba brát v úvahu jejich vzájemné ekologické vztahy na úrovni populací až ekosystémů. Pro zkoumané látky nebo směs látek způsobující toxický vliv na biosystémy se používá termín toxikant [43].

8.1. Charakteristika toxikantů

Aby mohla být látka označena jako riziková, musí splňovat následující dvě podmínky:

- Potenciální nebezpečnost – látka se hodnotí na základě svých fyzikálních a chemických vlastností. Do této skupiny řadíme látky, které jsou toxické v nízkých koncentracích a snadno pronikají do organismu.
- Dostatečný výskyt v životním prostředí – látka se musí vyskytovat v takovém množství, aby mohla být škodlivá. Její výskyt je dán buď přirozeně, nebo se do životního prostředí uvolňuje z průmyslových výroby. Dále se hodnotí schopnost dlouhodobého setrvání v prostředí (perzistence), akumulace v organismech (bioakumulace) a v potravním řetězci [43].

8.2. Vztah expozice – účinek

Pokud probíhá hodnocení vlivů toxikantu na biosystém, je zapotřebí rozlišovat dva základní děje:

- Expozice se dá popsat jako stav, při kterém se toxikant dostává do přímého kontaktu s biosystémem. Zároveň s tím souvisí i cesty, kterými se daná látka dostává od zdroje znečištění k příjemci, a jaký má osud v prostředí.
- Účinek je změna vyvolaná působením toxikantu v biosystému.

Škodlivé působení toxikantu může nastat jen v případě, jestliže vstoupí do organismu, najde místo, které je citlivé na jeho působení, tzv. místo účinku, a dojde k reakci s molekulami zúčastňujícími se metabolismu. Tento jev se nazývá přímý účinek. Ovšem může docházet i k nepřímým účinkům a to tehdy, pokud nedochází k přímé expozici. I této skupině účinků je zapotřebí věnovat stejnou pozornost jako přímým.

Obor hodnocení ekologických rizik se podrobně zabývá tím, zda se vůbec může toxikant dostat různými transportními cestami k organismu a následně zda je schopný proniknout do tohoto organismu a vyvolat v něm negativní účinek [43].

9. EKOTOXIKOLOGICKÉ ASPEKTY POUŽÍVÁNÍ NANOČÁSTIC

Jedna z organizací, která se zabývá standardizací metod pro testování vlastností chemických látek nejen fyzikálně-chemických nebo toxických, ale zejména ekotoxikologických je Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD, Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj). Poskytuje řadu metodik, prostřednictvím kterých lze zjistit negativní vlivy chemických látek na životní prostředí, respektive na biotu akvatického a terestrického ekosystému – v poslední době diskutuje i otázku nanočástic, které mají svá fyzikálně-chemická specifika a z toho vyplývající i toxikologická a ekotoxikologická.

OECD je mezivládní organizace, která reprezentuje 34 zemí ze Severní a Jižní Ameriky, Evropy, Asie a Tichomoří – jako komise mají za úkol prodiskutovat společné zájmy a společně řešit mezinárodní problémy, kterými se zabývá více než 200 specializovaných výborů a pracovních skupin složených ze členů členských zemí [44].

Tato organizace vydala směrnici pro testování chemických látek, což je sbírka asi 150 nejdůležitějších mezinárodně uznávaných testovacích metod, které používá průmysl a nezávislé laboratoře k identifikaci a charakterizaci potenciálně nebezpečných chemických látek. Jsou také využívány při vývoji nových látek a produktů a v toxikologickém výzkumu. Rizikové chemické látky pro člověka a životní prostředí jsou posuzovány pomocí získaných údajů o nebezpečnosti chemických specifik a odhadů, do jaké míry mohou být organismy vystaveny působení chemikálií. OECD se zabývá především posouzením expozice v životním prostředí už více než 40 let [45, 46].

Vyráběné nanomateriály se dnes využívají v řadě komerčních aplikací, a proto se neustále zvyšuje tlak na zjištění možného nebezpečí pro člověka a životní prostředí. OECD zahájila program na hodnocení bezpečnosti a posouzení rizik vyráběných nanomateriálů, který má pomáhat zemím zajistit odpovědný rozvoj těchto technologií. V roce 2006 byla založena pracovní skupina na podporu mezinárodní spolupráce, jejímž cílem je pomáhat zemím v jejich úsilí o posouzení bezpečnostních dopadů nanomateriálů na lidské zdraví a životní prostředí. Zaměřuje se na vytvoření databáze vyrobených nanomateriálů, testování konkrétních materiálů při současném zajištění vhodných zkušebních metod – *in vivo* a *in vitro*.

Důraz je kladen i na zjištění možností využívání nanomateriálů při řešení hlavních problémů životního prostředí, jako je změna klimatu, znečištění vody, půdy i ovzduší a vyčerpání přírodních zdrojů. Zapotřebí je ovšem brát v úvahu i možné negativní dopady, které mohou tyto technologie způsobit, proto OECD vydává pokyny pro měření a zároveň snižování expozice a zabývá se podporou využívání nanotechnologií s použitím znalostí životního cyklu vyráběných nanomateriálů.

Nanomateriály jsou zkoumány z hlediska jejich fyzikálně-chemických vlastností, environmentálního osudu a chování, ekotoxicity a toxicity použitím vhodných testovacích metod. Zjišťuje se, zda jsou existující zkušební metody používané pro “tradiční” chemické látky vhodné k posouzení bezpečnosti a rizik nanočástic. Předběžné analýzy prozatím ukázaly, že postupy testování a hodnocení tradičních chemických látek jsou dostačující pro posouzení bezpečnosti nanomateriálů, avšak je potřeba přizpůsobit je jejich specifickým vlastnostem [47, 48].

V Berlíně roku 2013 bylo v rámci OECD uspořádáno setkání expertů se zaměřením na ekotoxikologii a environmentální osud nanomateriálů s cílem diskutovat vhodnost testování nanočástic ve vodě, půdě a sedimentech. Jejich úkolem bylo navrhnout aktualizace a úpravy v testování, dále vyvinutí nových testů a navrhnout další kroky v prováděných změnách se zaměřením na ekotoxikologii, osud a chování nanočástic v životním prostředí [46].

10. SPECIFIKA EKOTOXIKOLOGICKÉHO TESTOVÁNÍ NANOČÁSTIC

Pro posouzení ekotoxikologických vlastností látek se používají biologické testy toxicity, které slouží k určení druhu a míry nepříznivého působení látek na testovací organismy. Význam biotestů spočívá v zachycení účinků všech přítomných složek v testovaném roztoku na testovaný materiál, kterým může být organismus, kultura, tkáň i buňka. Poskytují informace o biologické aktivitě a schopnosti toxických látek procházet biomembránami, dále jsou založeny na fyziologických pochodech, biochemických změnách, fotosyntéze a dýchání. Výsledky získané z biotestů jsou využívány ke zhodnocení rizik testovaných látek v životním prostředí. Podle délky testování se dělí na testy s akutní expozicí – jsou prováděny v krátkém časovém intervalu nebo se jedná o dlouhodobé testování – tyto testy jsou označovány jako chronické.

Pomocí akutního testování lze sledovat působení látek na přežívání organismů po krátkodobé expozici toxické látky. Je třeba brát v úvahu, že u tohoto druhu testování je spolehlivý pouze pozitivní nález, protože negativní výsledek nedává jistotu, že se toxické účinky nebudou projevovat po dlouhodobější expozici. Chronické testy toxicity zjišťují nepříznivé působení i při nižších koncentracích toxické látky, jsou schopné postihnout účinky látek na růst, rozmnožování, četnost populace a také mohou zaznamenat genetické změny [41, 49].

Mezi hlavní problém v hodnocení ekotoxicity nanočástic patří výběr nejvhodnějších měřících metod. V dnešní době jsou nejvíce využívány offline metody, dále se k analýze nanočástic využívá mnoho moderních, rozvíjejících se nástrojů pro zkoumání morfologie a struktury. Patří mezi ně například skenovací elektronová mikroskopie, mikroskopie atomárních sil, částicová elektroforéza a rentgenová absorpční spektrometrie [50].

Z hlediska toxicity jsou nanočástice děleny na primární, které jsou cíleně syntetizované, a sekundární, které vznikají jako produkty v nejrůznějších spalovacích, fyzikálních nebo chemických procesech, dále mohou vznikat během degradace materiálu nebo pokud reaguje primární částice s jinými složkami. V neposlední řadě to jsou produkty tabákového kouře a dieslových motorů – emitují do ovzduší elementární uhlík ve formě sazí o velikosti 50 nm. Tyto primární i sekundární částice mohou být v prostředí přeměněny na jiné fyzikální či chemické formy, čímž je ovlivněna jejich distribuce a zároveň také toxicita [17].

Obor nanotoxikologie má za úkol soustředit se na specifické problémy, které nanomateriály mohou přinášet, pokud dochází k interakcím s živými systémy. Ke většině studií jsou používány buněčné modely – *in vitro* toxikologie nebo zvířecí modely – *in vivo* toxikologie [17].

In vitro studie

Primárním cílem tohoto typu studie je sledování případné toxicity a snaha porozumět biologickým odpovědím a mechanismům. Měla by poskytovat pohled na vnitřní mechanismy toxicity – cytotoxicita, oxidační stres, imunotoxicita, případný vznik zánětu. Testy se využívají při studiu příjmu a přenosu nanočástic přes tělní bariéry, cytotoxicity a dalšího vlivu na buňku, při zkoumání oxidačního stresu a důležitých mechanismů toxicity nanočástic a také při zkoumání mutagenity a genotoxicity. Zavedení těchto testů je sice rychlejší než metody *in vivo*, ale na druhou stranu nedokáží postihnout celou složitost organismu a jsou vyvinuty spíše pro krátkodobé studie [17].

In vivo studie

Nejdůležitější znak *in vivo* testů je ten, že umožňují určit vztah mezi dávkou a odezvou na danou dávku. Jsou potřebné k určení toxikokinetického profilu nanočástic a k ověření *in vitro* studií genotoxicity. Jejich výsledky jsou nezbytné pro tzv. ADME studie (absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece), které jsou zase velmi důležité z hlediska bezpečného hodnocení toxicity nanočástic [17].

10.1. Testování ekotoxicity nanočástic stříbra

Nejvíce studií se zabývá zjišťováním a porovnáním toxicity povrchově upravených nanočástic, jejichž modifikace může změnit osud, stabilitu i toxicitu v akvatickém a terestrickém prostředí. V následující části bude uvedeno několik příkladů, které demonstrují, jak mohou být povrchově upravené nanočástice ovlivněny pH, iontovou silou, organickými matricemi, redoxními podmínkami a v neposlední řadě i světelnými podmínkami [51].

Existuje mnoho detailních studií na bakteriích, které se zabývají ekotoxicitou nanočástic stříbra. Nejčastěji používanými druhy k testování jsou bakterie *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*. Mezi metody, kterými lze zjišťovat životaschopnost a růst bakterií, patří testování na koloniích, při nichž se využívá měření optické hustoty, díky kterému lze vypočítat minimální inhibiční koncentraci.

Výsledky těchto studií dokazují, že nanočástice jsou schopny pronikat buněčnou membránou bakterií, což má za následek zvýšení propustnosti samotné buňky a následné poruchy v dýchání vedoucí k buněčné smrti. Uvolněný iont Ag^+ může reagovat s thiolovou skupinou proteinů, v tomto případě dojde k inaktivaci důležitých enzymů, díky čemuž je ovlivněna replikace DNA. Byla provedena studie na *E. coli*, která zjišťovala roli velikosti nanočástic a přítomnosti kyslíku na toxicitu. V anaerobních podmínkách nebyl pozorován toxický efekt v případě nanočástic stříbra stabilizovaných pokrytím polyethylenglykolem (PEG – AgNP) při koncentraci 158 mg/l (velikost částic 5 nm) a koncentraci 195 mg/l (velikost částic 11 nm), což je koncentrace až o tři řády vyšší než je minimální letální koncentrace iontů

stříbra za podobných podmínek expozice. V aerobních podmínkách byla toxicita zvýšená, což je vysvětlováno rozpouštěním nanočástic, uvolňováním stříbrných iontů a tím i zmíněné navýšení toxicity [51].

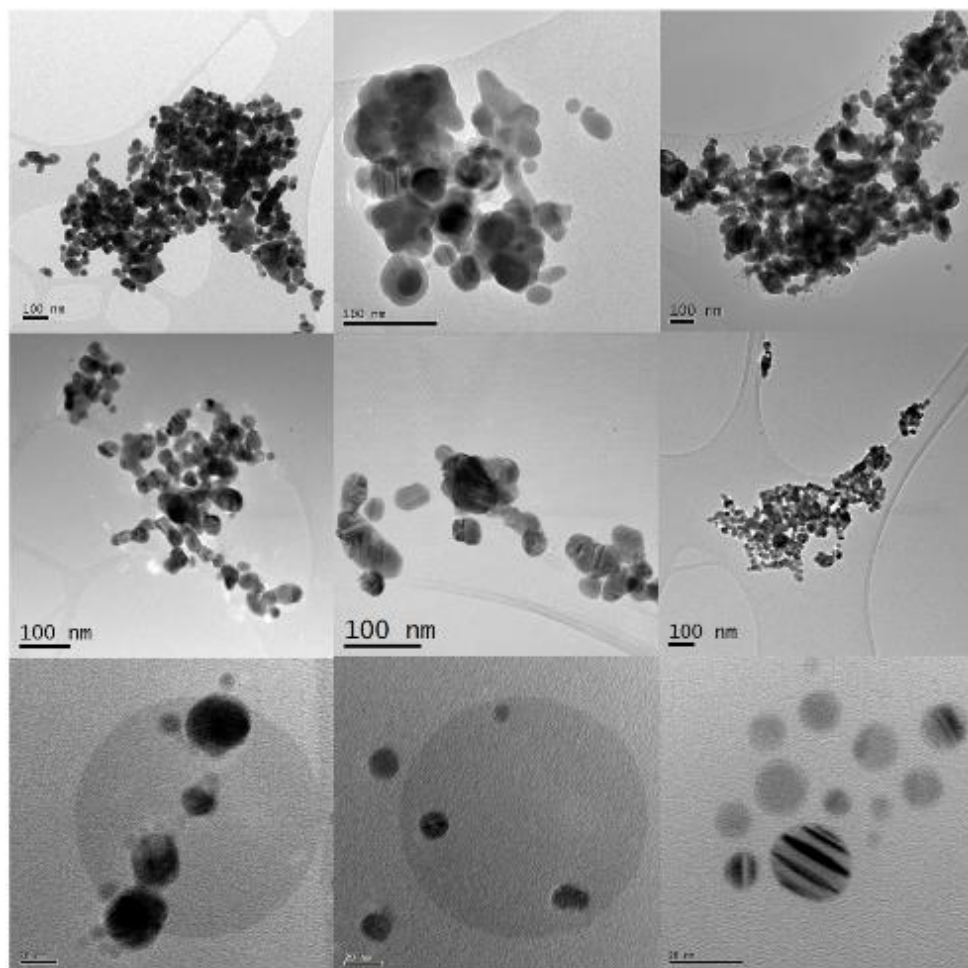
V rámci konference Nanocon, která se konala v říjnu roku 2009 v Rožnově pod Radhoštěm, byly prezentovány výsledky testování environmentální toxicity připravených nanočástic stříbra. Běžně se k tomuto účelu testování využívá mikroorganismus *Paramecium caudatum* (trepka velká). Toxicita AgNPs byla určena na základě stanovení hodnoty LT_{50} , což je doba, za kterou při dané koncentraci stříbra zahyne právě polovina mikroorganismů. Testování bylo provedeno ve zkumavkách s množstvím 1 až 5 ml suspenze mikroorganismů (koncentrace 200 až 300 jedinců na 1 ml), ke kterým bylo přidáno určité množství disperze nanočástic stříbra o koncentraci 200 mg Ag/l.

Tato studie měla potvrdit, že toxicita stříbra klesá s rostoucí složitostí organismu. V případě nanočástic akutní toxicita klesá při koncentraci přibližně 25 mg/l, kde prvoci v médiu přežívají minimálně 7 dní. Pro porovnání lze uvést výsledky s použitím iontové formy stříbra, které zabíjí trepky prakticky okamžitě i při nižších koncentracích než 1 mg/l. Navíc byla určena i hodnota LC_{50} po jedné hodině expozice, která se pohybuje okolo 39 mg/l. Z výsledků testování lze usuzovat, že toxicita nanočástic stříbra je vůči jednobuněčnému eukaryotickému organismu minimálně o řád nižší než vůči bakteriím (prokaryotický organismus), což potvrzuje předchozí tvrzení, že toxicita nanočástic stříbra a jeho sloučenin klesá s rostoucí složitostí organismu [29].

Podle OECD je *Daphnia magna* (hrotnatka velká) jeden z druhů organismů doporučených pro akutní a chronické ekotoxikologické testování. Cílem studie bylo zjistit stabilitu a následně i toxicitu tří velikostně různých nanočástic stabilizovaných citrátem v tzv. standardní ředící vodě připravené podle metodiky OECD 202 a následně ředěné. Stabilita agregátů a jejich velikost byla zjišťována metodami transmisní elektronové mikroskopie a mikroskopii atomových sil, následně byl zjišťován i jejich toxický účinek.

Standardní ředící voda podle OECD 202 obsahovala $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (294 mg/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (123,25 mg/l), $NaHCO_3$ (64,75 mg/l), KCl (5,75 mg/l) a Na_2SeO_3 (2 μ g/l) a byla upravena na konečné pH 7,5. Neředěný roztok byl označen jako medium 1, posléze z něj byl připraven dvojnásobně zředěný (medium 2) a desetinásobně zředěný roztok (medium 10). Dále byly připraveny nanočástice o velikostech v průměru 20 nm (AgNP1), 10 nm (AgNP2) a 7 nm (AgNP3), všechny stabilizovány citrátem. Stabilita těchto nanočástic byla měřena ve výše uvedených roztocích, které byly ponechány ve tmě při pokojové teplotě po dobu 24 hodin [52].

Níže na obr. 6 je zobrazena stabilita/nestabilita (agregace) nanočástic.



Obr. 6 Stabilita nanočástic stříbra [52]

Podle očekávání byla největší agregace pozorována v mediu 1 a mediu 2, zatímco v mediu 10 byla agregace minimální a částice o všech velikostních rozměrech byly rozptýleny. Bylo pozorováno, že vzrůstající iontová síla roztoků a jejich rozdílné složení ovlivňuje velikost agregátů. Medium 1 mající největší iontovou sílu podmiňuje velmi rychlý vznik agregátů při všech velikostech nanočástic. V případě media 2 byla rovněž pozorována rychlá agregace, přičemž vznik velkých agregátů byl sledován také u malých rozměrů nanočástic AgNP3. Při porovnání rychlosti sedimentace bylo zjištěno, že větší agregáty v mediu 1 mají kratší dobu sedimentace než dispergované částice v mediu 10.

Výše uvedená media byla rovněž využita v testech akutní toxicity s cílem zjistit vliv podmínek prostředí na ekotoxicitu nanočástic. Bylo testováno nezředěné medium (medium 1) a zředěné medium (medium 10) s použitím nejmenších nanočástic AgNP3. Koncentrace nanočástic stříbra v testovaných médiích byla následující: 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 11,25 a 20 $\mu\text{g/l}$. Imobilizace neonatů a jiné abnormality v jejich chování byly posuzovány vizuálně po uplynutí 24 hodin.

V obou typech medií (medium 1 a 10) byla zpozorována nehybnost organismů v závislosti na koncentraci. V mediu 10, ve kterém byly nanočástice nejvíce rozptýlené, byla stanovena nejnižší pozorovaná koncentrace způsobující nepříznivý účinek (NOAEL) na hodnotu 2,5 µg/l, imobilizace všech testovacích jedinců byla pozorována při koncentraci 10 µg/l. Hodnota EC₅₀ byla 7,46 µg/l (dolní a horní mez v intervalu 6,84 – 8,13 µg/l). V mediu 1, ve kterém byla pozorována výrazná agregace, byla koncentrace NOAEL stanovena na 11,25 µg/l, ovšem ke kompletní imobilizaci nedošlo. V tomto případě nelze přesně stanovit EC₅₀, ale zároveň je prokázáno, že tato hodnota nemůže být nižší než 11,25 µg/l.

Z výše popsáných testů tedy vyplývá, že nejmenší a nejvíce rozptýlené částice vykazují vyšší toxicitu. Tyto poznatky mohou mít dvě vysvětlení – a) dochází ke změnám ve vlastní biodostupnosti agregátů, která je obtížnější v porovnání s rozptýlenými nanočásticemi a b) dochází ke změnám reálných expozičních koncentrací, díky agregaci a jiným procesům, vzhledem k původní nominální dávce toxikantu. Počet částic a specifický povrch dostupný pro interakce je větší v dispergované formě, což vede k odpovědi, která reflektuje skutečný vliv nanočástic na testovací organismy. Proto je velmi důležité, aby byla dobře známa případná disperze nebo agregace nanočástic pro objektivní posouzení ekotoxicity [52].

Testování, které mělo zohlednit vliv prostředí na výslednou ekotoxicitu testované látky, bylo provedeno též na korýši *D. magna*. Testy byly rozděleny podle prostředí, ve kterém nanočástice působily: voda, voda + sedimenty, voda + rostliny a voda + rostliny + sedimenty. Po porovnání působení nanočástic stabilizovaných polyvinylpyrrolidonem (PVP) a arabskou gumou (GA) bylo zjištěno, že výsledky v prostředí voda + sedimenty a voda + rostliny + sedimenty se neliší od výsledků získaných ve vodném prostředí. Zatímco ve vodě s rostlinami byla pozorována mnohem menší úmrtnost než v samotné vodě, z čehož lze usuzovat, že rostliny snižují toxicitu daných nanočástic [51].

Nejvíce výzkumů toxicity nanočástic stříbra na vyšších organismech je uskutečněno v akvatickém prostředí na rybách, nejčastěji na druzích *Danio rerio* (danio pruhované, sladkovodní organismus) a *Japanese medaka* (medaka japonská, slánovodní organismus). V případě, že bylo *D. rerio* vystaveno expozici nanočásticím stříbra stabilizovaných citrátem, docházelo ke kumulaci těchto částic v těle embrya. Při testování na organismu *J. medaka* byla zjištěna rozdílná toxicita u AgNPs stabilizovaných pokrytím citrátem, arabskou gumou (GA – AgNPs) a polyvinylpyrrolidonem (PVP – AgNPs), přičemž nejvyšší hodnoty byly zjištěny u GA – AgNPs. Tato studie také ukázala, že pokud odděleně působí stejné množství AgNO₃ a AgNPs, Ag⁺ ion uvolněný z dusičnanu stříbrného je třikrát toxičtější než stříbrné nanočástice [51].

Studie dokazující, že AgNPs mohou představovat potenciální riziko i pro rostlinné organismy akvatických ekosystémů, byla provedena na rostlině *Lemna minor* (okřehek menší). Bylo zjištěno, že nejen menší (okolo 20 nm), ale i větší nanočástice (okolo 100 nm) způsobují inhibici růstu již při nízkých koncentracích (5µg/l). S rostoucí dobou expozice je tento účinek ještě vyšší – touto studií byla prokázána lineární závislost dávky a účinku po dobu expozice 14 dnů [53].

Co se týká testování efektů nanočástic s využitím bezobratlých organismů v půdách, je k dispozici mnohem méně výsledků. Studie zkoumají růst, biodostupnost, chování, úmrtnost, reprodukci a genovou expresi, přičemž výsledky jsou odvislé na typu půdy. Například akumulace stříbrných nanočástic byla nižší v umělých než v písečných půdách. Jako modelový půdní druh byla použita žížala *Eisenia fetida* [51, 54].

Na žížale *E. fetida* (žížala hnojní) byla zjišťována subchronická reprodukční toxicita dusičnanu stříbrného a nanočástic stříbra pokrytých polyvinylpyrrolidonem (hydrofilní) a kyselinou olejovou (amfifilní). Při tomto testování nebyly pozorovány žádné efekty ve změně růstu a úmrtnosti testovacích organismů u žádných testovaných modifikací.

Co se týká reprodukčních schopností, tyto byly pozměněny v závislosti na typu testované látky. U žízal, které byly vystaveny expozici AgNO₃, byl pozorován významný pokles v reprodukci při koncentraci 94,21 mg/kg. Tento účinek se projevil i při působení nanočástic stříbra, v případě povrchové úpravy kyselinou olejovou při koncentraci 727,6 mg/kg a úpravě polyvinylpyrrolidonem při koncentraci 773,3 mg/kg. Tyto koncentrace jsou však mnohem vyšší než koncentrace nanočástic vyskytujících se v čistírenských kalech. Biokumulace stříbra byla patrná u všech organismů vystavených všem typům testované substance a závisela na koncentraci. Nejvyšší kumulace byla pozorována u sloučeniny AgNO₃. Mezi nanočásticemi s různou úpravou povrchů nebyl pozorován žádný významný rozdíl ani v toxicitě, ani v kumulaci sledovaných AgNPs [55].

V dnešní době již existuje mnoho studií, které se zabývají ekotoxicitou AgNPs, ale i přesto je třeba opatrnosti s využíváním nanočástic v praxi, protože zjištěné limity toxicity v přírodním prostředí mohou být ovlivněny přítomností dalších polutantů v prostředí. Tato skutečnost by mohla vést k porušení rovnováhy už na úrovni nejjednodušších živých organismů [29].

10.2. Testování ekotoxicity nanočástic zlata

Nanočástice zlata jsou obecně považovány jako netoxické, vzhledem k jejich využívání v široké škále aplikací, lékařství a výzkumu molekulární biologie. Přesto doposud nebyl proveden dostatek studií, který by toto tvrzení řádně podpořil. Z environmentálního pohledu je důležité testovat, jak budou přírodní koloidy reagovat s nanočásticemi a jak následně budou ovlivňovat jejich osud a chování v prostředí. Byly prováděny studie, které se zaměřovaly na toxicitu částic v mediích s vysokou iontovou silou. Diskutovaly se podobnosti a rozdíly

v toxicitě ve sladkých a slaných vodách. Díky velké iontové síle mořské vody v porovnání se sladkou bylo zjištěno, že počet nanočástic ve formě přírodních koloidů je mnohem menší, protože v mořské vodě dochází spíše k agregaci a tím k následné sedimentaci koloidů. Při pozorování vlivu nanočástic zlata (AuNPs) na buněčné úrovni byly zjištěny nepříznivé účinky – dochází k interakcím s buněčnou membránou, oxidativní stres vede k cytotoxickým účinkům, dochází k poškození metabolické aktivity, což může vést k narušení mitochondrií a případně až k pozměnění nebo poškození DNA. Je známo, že v krvi nanočástice zlata katalyzují produkci oxidu dusnatého NO vznikajícího z S – nitroso aduktů s thiolovými skupinami, který velmi rychle reaguje se superoxidem O_2^- , produktem této reakce je peroxydusitan ($ONOO^-$), který může interagovat s lipidy, DNA a proteiny přímou oxidační reakcí nebo nepřímo prostřednictvím radikálů [56].

Zjišťování účinků nanočástic zlata bylo zkoumáno na mlži *Mytilus edulis* (slávka jedlá), který byl vystaven po dobu 24 hodin působení nanočástic o velikosti 5,3 nm v koncentraci 750 ppb. Bylo zjištěno, že největší akumulace částic byla v oblasti zažívacích žláz, kde také docházelo ke zvýšení peroxidace lipidů. Analýza zažívacích žláz ukázala, že došlo k poklesu počtu thiolových proteinů. Aktivita lysozomální membrány měřená v hemolymfě byla snížena. Nicméně, s použitím stejného organismu i stejných experimentálních podmínek pouze s rozdílnou velikostí nanočástic (15nm), byl pozorován jen mírný oxidační stres, k akumulaci částic docházelo opět v zažívacích žlázách, ale i v žábrech a tkáních pláště. Z těchto studií vyplývá, že v případě nanočástic zlata je toxicita závislá na jejich velikosti [57, 58].

Při testování biodostupnosti s využitím organismu *D. magna*, který byl vystaven působení nanočástic po dobu 1, 6, 12 a 24 hodin, bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace v organismech byla naměřena po 12 hodinách expozice. U testovacího organismu byla také zkoumána extrakce a retence částic ve střevní tkáni. Přes počáteční trend vysoké koncentrace v ústní oblasti byl s postupem času pozorován trend opačný, tedy vysoké koncentrace stanovené v kaudální části. Tyto výsledky naznačují, že dochází nejen k příjmu, ale i k extrakci částic [56].

Účinky nanočástic zlata byly rovněž zkoumány na dalších dvou akvatických organismech - sladkovodní škebli *Corbicula fluminea* (korbikula asijská) a sladkovodní řase *Scenedesmus subspicatus*. Tyto organismy byly vystaveny působení nanočástic zlata (pokrytých aminy) o velikosti 10 nm. Při zjišťování účinků nanočástic na *C. fluminea* byly použity tři různé koncentrace ($1,6 \cdot 10^3$ – $1,6 \cdot 10^5$ AgNPs/buňka). Byla zjištěna kumulace nanočástic v žábrech a trávicích epitelech. Jejich lysozomální lokalizace vedla ke ztrátě povrchové stabilizace aminy, což způsobilo vznik oxidačního stresu. V případě sledování vlivu nanočástic na řasy byly použity čtyři různé koncentrace (v rozmezí $1,6 \cdot 10^2$ – $1,6 \cdot 10^5$ AuNPs/buňka) společně s kontrolním roztokem. Výsledky ukázaly, že k 20 % úmrtnosti došlo při vystavení řas nanočásticím v nejnižší použité koncentraci, zatímco v případě testování nanočástic s největší koncentrací byla způsobena 50 % úmrtnost. Nanočástice byly silně adsorbovány povrchem buněk, což vedlo k jejich poškození [59].

Byla provedena kombinovaná studie toxicity nanočástic stříbra a nanočástic zlata o velikosti v intervalu rozměrů 5 – 10 nm s použitím čtyř různých koncentrací v rozmezí 0,063 – 19 mg/l (Ag) a 0,058 – 17,4 mg/l (Au). Testování probíhalo na jaterních buňkách ryby *Oncorhynchus mykiss* (pstruh duhový). Posuzována byla aktivita mitochondriální membrány – byl pozorován významný pokles v případě obou testovaných kovů. Nanočástice stříbra překvapivě nevyvolaly oxidační stres, což může být odůvodněno krátkou dobou expozice, nízkou citlivostí metody nebo typem sledovaných buněk. Co se týká sledování nanočástic zlata, nebyla zjištěna žádná cytotoxická odezva, ovšem nanočástice způsobily na subcelulární úrovni vznik ROS a tedy i oxidační stres, který byl nejvýraznější u nejvyšší použité koncentrace 17,4 mg/l. Důvodem, proč nebyl pozorován cytotoxický účinek, je vyvolání oxidačního stresu pouze v takové míře, kdy nebyly překonány buněčné obranné antioxidační mechanismy [56].

K dispozici jsou i studie, které se zabývají zjišťováním stability nanočástic zlata pokrytých citrátem a akrylátem v prostředí přirozeně se vyskytujících huminových kyselin. Pokud se nanočástice vyskytují v médiu s iontovou silou 0,1 M, dochází k velmi rychlé a rozsáhlé agregaci, z čehož se dá usuzovat, že ve vodách s vysokou iontovou silou (tvrdé vody, ústí řek) bude agregace největší, a tudíž bude docházet k sedimentaci. V tomto případě jsou tedy nejvíce ohrožené bentické organismy [56].

Z hlediska aktuálních informací je v podstatě známo, že toxicita nanočástic zlata způsobuje oxidační stres a vyvolává efekty, které mohou ovlivnit DNA, lipidy, proteiny i některé metabolické aktivity [56].

10.3. Testování ekotoxicity nanočástic TiO₂

Nanočástice titanu patří mezi nejvíce studované kovové nanočástice hlavně díky velmi širokému využívání v průmyslu, ale i přesto je množství testů na vodních i půdních organismech stále velmi omezené. Z mnoha studií bylo prokázáno, že nanočástice titanu indukují cytotoxicitu, genotoxicitu a karcinogenní odezvy jak *in vivo*, tak *in vitro*. Četné *in vitro* studie naznačují možný vliv nanočástic na řadu vodních organismů. Toxicita je spojena s jejich rozpouštěním, povrchovými vlastnostmi a velikostí [60].

Jedním z *in vivo* testů, který je k dispozici, je studie zabývající se genotoxicitou nanočástic, která byla provedena na organismu *D. rerio*. Po dvou týdnech adaptace v nádobě obsahující 50 l vody, byla skupina pokusných organismů přemístěna do menších nádob s 5 l vody s rozptýlenými nanočásticemi o koncentraci 1 a 10 µg/l po dobu 5, 7, 14, 21 a 28 dní. Po vyhodnocení testu bylo zjištěno, že nedošlo k úmrtnosti ani ke změně hmotnosti testovacích organismů. Studium krevních erytrocytů ukázalo, že životaschopnost těchto buněk byla vyšší než 96 % v obou případech testovaných koncentrací. Při posuzování genotoxického účinku bylo zjištěno, že nejvyšší účinek byl pozorován při koncentraci 10 µg/l, po 14 a 21 dnech expozice [60].

Byl zkoumán efekt dlouhodobější expozice dvou rozdílných forem nanočástic TiO₂ při rozdílných světelných podmínkách. Ryba *Piaractus mesopotamicus* (myletes jedlý) byla vystavena po dobu 21 dní množství 100 mg/l nanočástic TiO₂ anatasu (což je jedna ze tří v přírodě se vyskytujících modifikací oxidu titaničitého) a směsi anatasu a rutilu v poměru 80:20 za podmínek osvětlení viditelným světlem a ultrafialovým světlem. Výsledky studie ukázaly nízkou toxicitu a rovněž nedocházelo ke kumulaci titanu ve svalové tkáni. Nicméně byl pozorován subletální účinek. Tento byl ovlivněn použitou formou nanočástic a typem osvětlení. Čistý anatas způsobil rozsáhlejší oxidační poškození v oblasti viditelného světla, zatímco směs anatas – rutil způsobila větší subletální účinek při expozici pod UV světlem [61].

Další studie, která se zabývala toxicitou nanočástic TiO₂ byla prováděna na zelených jednobuněčných řasách *Chlamydomonas reinhardtii* (pláštěnka). Bylo dokázáno, že tyto nanočástice inhibují efektivitu fotosyntézy a růst buněk, neovlivňují obsah chlorofylu *a*, zatímco obsah karotenoidů a chlorofylu *b* se zvyšuje. Snímky elektronové mikroskopie prokazují, že se vzrůstající koncentrací nanočástic dochází k poškození velkého počtu buněk, dále dochází ke snížení počtu chloroplastů. Uvnitř buněk a membrán byly nalezeny samotné nanočástice. Rovněž bylo zjištěno, že se shromažďují i na povrchu buněk, což by mohlo představovat překážku pro výměnu látek mezi buňkou a jejím okolím.

Ve výše uvedené studii byly použity roztoky o koncentracích 0,1; 1; 10; 20 a 100 mg/l. Na základě hodnocení růstové křivky bylo zjištěno, že během osmihodinové expozice nedocházelo k významným rozdílům mezi kontrolní skupinou a exponovanými skupinami. Po 12 hodinách při koncentraci 0,1 mg byl pozorován malý nárůst biomasy oproti kontrole. Tento trend byl patrný u dalších testovaných koncentrací, kde jak testovací, tak i kontrolní skupiny vykazovaly podobný nárůst biomasy. Po 24 hodinách expozice však již nastal významný pokles nárůstu biomasy u exponovaných organismů v porovnání s kontrolní skupinou a to zejména u koncentrací 10, 20, 100 mg/l nanočástic. Tato data ukazují, že efekt nanočástic na řasy *C. reinhardtii* je nejspíše akutní a fotosyntetický systém řas je schopný se aklimatizovat na přítomnost nanočástic TiO₂. Rovněž byla posuzována agregace nanočástic na povrchu buněk. Bylo dokázáno, že záleží na povrchu buněčné stěny a také na koncentraci nanočástic [62].

Je prokázáno, že nanočástice TiO₂ mají i pozitivní účinky, například vyvolávají klíčení semen špenátu a růst rostlin. Mimo jiné bylo pozorováno, že za určitých podmínek zvyšují hmotnost biomasy, syntézu chlorofylu a urychlují metabolismus ve fotosyntetických organismech. Tyto účinky jsou nejspíš způsobeny antimikrobiálními vlastnostmi nanočástic, které mohou zvyšovat pevnost a odolnost rostlin vůči oxidačnímu stresu.

Na druhou stranu, studie zkoumající vodní organismy ukazují, že přítomnost TiO₂ zvyšuje akumulaci kadmia a arsenu v kaprech způsobenou silnou sorpční schopností těchto prvků [24].

10.4. Testování ekotoxicity nanočástic uhlíku

Rovněž při testování uhlíkových nanočástic je potřeba věnovat zvláštní pozornost povrchovým vlastnostem, které ovlivňují jejich další chování v životním prostředí. Výsledky ekotoxikologických testů v akvatickém prostředí ne vždy lze spolehlivě reprodukovat a interpretovat. Vzhledem k nízké rozpustnosti uhlíkových nanočástic (CNTs) ve vodě je nutné brát v úvahu, že se výsledky mohou lišit v závislosti na způsobu provedení disperze (míchání, sonikace, třepání, použití různých chemických dispergátorů), který byl použit při přípravě vzorků pro testování. Při použití rozpouštědel nebo dispergátorů je výhodou rychlý vznik stabilní disperze. Problémem ovšem je, že použitá rozpouštědla mohou být sama o sobě toxická, čímž ovlivňují výsledky testování. Užití sonikace může měnit tvar částic a tedy i toxicitu. Navíc přírodní vzorky obsahují donory elektronů a ultrazvukové vibrace mohou způsobit v přítomnosti těchto elektronů vznik ROS. Použitím metod míchání a třepání může vznikat nestabilní disperze, ovšem není potřeba používat žádné rozpouštědlo, které by mohlo mít vliv na stav testovacích organismů. Nevýhodou těchto metod je jednak jejich dlouhé trvání a rovněž i v těchto případech může docházet ke změně tvarů nanočástic.

Studie, která dokazuje výše popsané, se zabývala sledováním akutní toxicity na organismu *D. magna*. Byly použity dva roztoky – v prvním byly fullereny dispergovány v rozpouštědle tetrahydrofuranu (THF) a ve druhém byly rozmíchány ve vodě. Po 48 hodinové expozici byla stanovena hodnota LC₅₀. Pro nC₆₀ (koloidní suspenze) rozptýlené v THF byly výsledky ekotoxikologických hodnot alespoň o řád nižší (0,8 mg/l) než pro částice rozmíchané ve vodě (> 35 mg/l). Po porovnání těchto hodnot tedy vyplývá, že rozpouštědlo THF zvyšuje toxicitu fullerenů, což je způsobeno pravděpodobně díky zbytkovému THF zachycenému v centru agregátů. Právě z tohoto důvodu nelze s přesností tvrdit, že oxidační poškození má za následek samotné působení uhlíkových nanotrubic [37, 63].

Další studie využívající testovací organismus *D. magna* sledovala případné změny v mobilitě testovacího organismu – po expozici organickými polutanty (methylparathion, fenantren, pentachlorfenol) v přítomnosti a absenci vodní suspenze nC₆₀. Výsledky ukázaly velmi rozdílné efekty. Toxicita methylparathionu nebyla ovlivněna přítomností agregátů C₆₀, toxicita pentachlorfenolu klesla 1,9krát, ovšem v případě fenantrenu došlo ke zvýšení až o 60 %. Je tedy patrný různý vliv dalších přítomných polutantů na toxicitu nanočástic. Dále byla srovnána toxicita fullerenů a nanočástic titanu. Při expozici C₆₀ a TiO₂ bylo zjištěno, že mortalita rostla lineárně s koncentrací, nicméně fullereny vykazovaly vyšší toxicitu už při nižších koncentracích [37].

Další studie byla prováděna na rybě *D. rerio* (dánio pruhované), organismy byly vystaveny působení suspenze nC₆₀ bez použití THF, po 72 hodinách byly pozorovány minimální změny v genové expresi larev a také nebyly aktivovány žádné detoxikační cesty. Což lze odůvodnit také tím, že agregáty mají větší velikost, a tudíž nejsou schopny pronikat k cílovým strukturám [37].

Fullereny jsou lipofilní a redoxně aktivní látky, díky svým vlastnostem se lokalizují v oblastech bohatých na lipidy, jako jsou buněčné membrány. Mohou tvořit vodní koloidní suspenze (nC₆₀). Navíc nastává otázka, zda může lipofilní, redoxně aktivní molekula pronikat do buněčných membrán, zejména mitochondrií a způsobit oxidační poškození. Byla provedena studie, jejímž cílem bylo zjistit, zda dochází k poškození proteinů a zda se mění hladina glutathionu v organismu *Micropterus salmoides* (okounek pstruhovitý) po 48 hodinách expozice 0,5 ppm povrchově neupravené suspenze nC₆₀. Výsledkem bylo snížení obsahu glutathionu v žábách (chrání organismus před oxidačním stresem) a významný nárůst peroxidace lipidů v mozku. Vedlejším efektem byla zvýšená čírost vody, což pravděpodobně souvisí s antibakteriálními účinky nC₆₀ [64].

Dále bylo zjištěno, že při reakci s vysoce molekulárními přírodními organickými matricemi (jako jsou např. huminové látky) dochází k tvorbě větších agregátů a tím odstranění nanočástic z vodního sloupce do sedimentů, čímž se snižuje jejich biologická dostupnost. Naopak, pokud dojde k reakci mezi nanočásticemi a nízkomolekulární organickou matricí, zvyšuje se jejich mobilita a tím i jejich biodostupnost [37].

Byla zkoumána bioakumulace CNTs částic v kroužkovci žijícím ve sladkých vodách *Lumbriculus variegatus* (žížalnice pestrá). Po 6 hodinách expozice bylo provedeno posouzení testovacího organismu. Došlo k akumulaci CNTs ve střevech, avšak ve tkáních nanočástice nebyly nalezeny. Právě poznání interakce částic s tkáněmi je velmi důležité, protože uhlíkové nanotrubičky jsou schopné přenášet jiné molekuly ke specifickým orgánům, a tím přejít přes hematoencefalickou bariéru – tato vlastnost byla již dříve studována za účelem dosažení lepší účinnosti nosičů léčiv. Vlastnosti spojené s vysokou adsorpční schopností (danou jejich velikostí) a schopností transportovat další látky mohou být příčinou, proč se začínají čím dál více vyskytovat otázky v souvislosti právě s jejich možnou ekotoxicitou [37].

Test akutní toxicity byl prováděn na organismu *E. fetida* podle směrnice OECD (test č. 207). Vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky ve formě prášku byly zavedeny do umělé půdy v takovém množství, aby výsledná koncentrace byla 0, 50, 500 a 1000 mg/kg. Lahve s půdou o hmotnosti 750 g byly rychle promyty vodou a následně do nich bylo přidáno deset žížal. Láhve byly utěsněny plastovou fólií s malými dírkami tak, aby byl zajištěn přirozený zdroj světla při teplotě 20 °C po dobu 14 dnů. Mortalita byla hodnocena po 7 a 14 dnech. Po 14 dnech expozice však nebyla pozorována ani při nejvyšší koncentraci 1000 mg/kg, což naznačuje nízkou toxicitu uhlíkových nanotrubiček [65].

Jak z výše uvedených ekotoxikologických testů vyplývá, otázka ekotoxicity nanočástic není vyřešenou záležitostí. Stále se provádí testy spíše na úrovni *in vitro*. V současnosti je ovšem snaha převádět testování na úroveň *in vivo* zejména z důvodu, že chování nanočástic a tím i jejich případnou toxicitu významně ovlivňují právě podmínky prostředí, ve kterých se dané nanočástice vyskytují. Testování ekotoxicity na vodních organismech probíhá nejčastěji na bakteriích, rybách a řasách. Nejvyužívanější vodní organismy jsou koryš *D. magna* a ryba *D. rerio*, popřípadě zástupci planktonních řas.

V případě terestrických ekosystémů je testů využívajících půdní organismy mnohem méně, a proto je do budoucna snaha rozšířit testování právě na zástupcích půdních organismů. Nejčastějším doposud využívaným testovacím organismem v testech ekotoxicity nanočástic je žížala *E. fetida*. Rovněž častými organismy, na kterých se provádí studie, jsou bakterie *E. coli*.

11. ZÁVĚR

Přestože nanotechnologie mají v dnešní době již své místo v moderních vědních disciplínách a technologických procesech, stále dochází k jejich velkému a rychlému rozvoji. Neustále se vyvíjí nové nanočástice a nové aplikace, díky nimž mohou být stávající technologie dále rozvinuty, dokonce zjednodušeny. Problémem však zůstává, že po dlouhou dobu nebyl kladen důraz na zjišťování všech jejich vlastností včetně těch negativních. Předpokládalo se, že se vlastnostmi nebudou příliš lišit od svých komerčních forem. Zejména kvůli jejich stále častějšímu používání bylo žádoucí zabývat se i otázkami tykající se jejich možného negativního vlivu na organismy akvatického i terestrického prostředí. Především vyvstala otázka, zda jsou současné ekotoxikologické testy dostačující a zda dokáží odhalit toxické účinky nanočástic. V současné době je stále více odborníků a organizací, jejichž úkolem je zjišťovat vlastnosti nanočástic a na čem jsou tyto vlastnosti závislé.

V práci byly zmíněny nanočástice stříbra, zlata, titanu a uhlíku, přičemž největší důraz byl kladen na stručné popsání jejich využití v široké škále aplikací. Dále bylo zjišťováno, z jakých zdrojů by mohlo docházet k jejich uvolňování do životního prostředí, a byly zkoumány podmínky, které ovlivňují jejich následné chování a osud.

Bylo uvedeno několik příkladů studií ekotoxicity nanočástic na akvatických a terestrických testovacích organismech. Z uvedených testů vyplývá, že dalším směrem výzkumu v této oblasti je otázka přizpůsobení a modifikace současných ekotoxikologických testů tak, aby jejich prostřednictvím byly prokázány jejich případné škodlivé efekty na člověka i životní prostředí. Je zapotřebí, aby každá nově vyvinutá nanočástice byla nejdříve testována a až po prokázání jejích účinků, popř. po vyvrácení nebezpečnosti pro životní prostředí následně uvedena do praxe. Bylo prokázáno, že vlastnosti a tím i toxicita nanočástic jsou závislé na jejich velikosti, tvaru a povrchové úpravě. Velkou roli hraje i prostředí, ve kterém se nanočástice nachází. Podmínky prostředí určují jejich stabilitu, může docházet buď k agregaci, nebo naopak k disperzi, čímž je ovlivněna jejich biologická dostupnost. Biodostupnost nanočástic je samozřejmě ovlivněna i organismy, které jsou vystaveny jejich působení.

Mezi nejvíce testované nanočástice patří nanočástice stříbra, zlata a oxidů kovů. Bylo zjištěno, že nanočástice mohou vyvolat vznik reaktivních forem kyslíku a tím způsobit oxidativní stres, čímž dochází k poruše buněk. Dále mohou ovlivnit nebo dokonce poškodit růst, dýchání a v neposlední řadě také replikaci DNA. I přesto, že jsou nanotechnologie ve velkém vývoji, není v dnešní době stále dostatek relevantních testů, které by umožnily odhalit veškeré působení a efekty nanočástic v konkrétních podmínkách ekosystému, a tudíž i s jistotou určit ekotoxicitu nanočástic.

Na závěr práce je uveden citát K. E. Drexlera, který jej použil při popisu nanotechnologií. Demonstruje, jak různé složení atomů utváří rozdílné složky životního prostředí. "Rozložené jedním způsobem vytvářejí atomy zem, vzduch a vodu, při sestavení jiným způsobem tvoří stejné atomy třeba zralou jahodu. Jedno rozložení atomů tvoří domy a čerstvé povětrí, jiné třeba popel a dým" [8].

12. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MUNSHI, D., P. KURIAN, R. BARLETT, A. LAKHTAKIA. A map of the nanoworld: Sizing up the science, politics, and business of the infinitesimal. *Futures* [online]. 2007, vyd. 39, č. 4, str. 432-452 [cit. 11. 12. 2014]. DOI: 10.1016/j.futures.2006.08.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016328706001327>
- [2] PRNKA, T. *Pátý rámcový program evropského výzkumu a technického rozvoje*. Výzkum nanotechnologií a nanomateriálů v Evropě a USA. Česká společnost pro nové materiály a technologie, 2001. ISBN 80-86122-86-7.
- [3] PRNKA T., K. ŠPERLINK. *Šestý rámcový program evropského výzkumu a technického rozvoje*. Nanotechnologie. Česká společnost pro nové materiály a technologie, 2004. ISBN: 80-7329-070-7.
- [4] SLAVÍK, M. Nanotechnologie. *Nano.tul.cz* [online]. 2011, [cit. 14. 12. 2014]. Dostupné z: <http://nano.tul.cz/nanotechnologie>
- [5] NOHAVICA, D. Rizika nanomateriálů a nanotechnologií pro lidské zdraví a životní prostředí. *Československý časopis pro fyziku* [online]. 2011, vyd. 61, č. 3-4, str. 220-227 [cit. 14. 12. 2014]. Dostupné z: <http://www.ufe.cz/sites/default/files/Media/nohavica-rizika-nanomaterialu-2011.pdf>
- [6] ALLHOFF, F., P. LIN, D. MOORE. *What is nanotechnology and why does it matter? From science to ethics* [online]. Chichester, UK: Wiley- Blackwell, 2010, 304 str. [cit. 15. 12. 2014]. ISBN 978-144-4317-992. Dostupné z: http://books.google.cz/books?id=DIkt1w4LuvkC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gsb_a#v=onepage&q&f=false
- [7] KATEB, B., J. D. HEISS. *The Textbook of nanoneuroscience and nanoneurosurgery* [online]. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2013, 602 str. [cit. 15. 12. 2014]. ISBN 978-143-9849-422. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=DYgImzrBrroC&pg=PA7&dq=Taniguchi+On+the+Basic+Concept+of+%27Nanotechnology&hl=cs&sa=X&ei=V49DVfbPGsfTU-v5gfAL&ved=0CCkQ6AEwAQ#v=onepage&q=Taniguchi%20On%20the%20Basic%20Concept%20of%20%27Nanotechnology&f=false>
- [8] DREXLER, K. foreword by M. MINSKY. *Engines of creation: The coming era of nanotechnology* [online]. Garden City, N.Y: Anchor Press/Doubleday, 1987 [cit. 15. 12. 2014]. ISBN 03-851-9973-2. Dostupné z: <http://www.nanowerk.com/nanotechnology/reports/reportpdf/report47.pdf>
- [9] SOVOVÁ, T., V. KOČÍ. Ekotoxikologie nanomateriálů. *Chemické listy* [online]. 2012, vyd. 106, str. 82-87 [cit. 3. 1. 2015]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_02_82-87.pdf
- [10] HLUBINA, I. Nanotechnologie. *Nanotechnologie na VŠB – TUO* [online]. 2007 [cit. 3. 1. 2015]. Dostupné z: <http://nanotechnologie.vsb.cz>
- [11] HANDY, R., R. OWEN, E. VALSAMI-JONES. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* [online]. 2008, vyd. 17, č. 5, str. 315-325 [cit. 7. 1. 2015]. DOI: 10.1007/s10646-008-0206-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10646-008-0206-0>

- [12] Nanomaterial and integrated electronics. *BBC* [online]. 2014 [cit. 20. 1. 2014]. Dostupné z: <http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebiteize/design/textiles/productiontechniquesrev6.shtml>
- [13] CHEN, Z., H. MENG, G. XING, Ch. CHEN, Y. ZHAO. Toxicological and biological effects of nanomaterials. *International Journal of Nanotechnology*. 2007, vyd. 4, č. 1-2, str. 179-196. DOI: 10.1504/ijnt.2007.012323.
- [14] OPRŠÁL, J., P. KNOTEK, M. POUZAR, J. PALARČÍK, L. NOVOTNÝ. Vliv aglomerace stříbrných nanočástic na výsledky testů ekotoxicity na vodních organismech. *Chemické listy* [online]. 2013, vyd. 107, str. 386-392 [cit. 2. 12. 2014]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_05_386-392.pdf
- [15] BRÉCHIGNAC, C., P. HOUDY, M. LAHMANI. *Nanomaterials and nanochemistry* [online]. New York: Springer, 2007 [cit. 2. 12. 2014]. ISBN 978-354-0729-921. Dostupné z: <http://folk.ntnu.no/fredrol/Nanomaterials%20and%20Nanochemistry.pdf>
- [16] LEITNER, J. *Struktura nanomateriálů*. VŠCHT Praha, Ústav inženýrství pevných látek [online]. 2015 [cit. 24. 3. 2015]. Dostupné z: http://old.vscht.cz/ipl/nanomaterialy/Skripta/Struktura_nanomaterialu_04_01.02.2015.pdf
- [17] FILIPOVÁ Z., J. KUKUTSCHOVÁ, M. MAŠLÁŇ. *Rizika nanomateriálů*. Univerzita Palackého v Olomouci, katedra experimentální fyziky [online]. 2012, vyd. 1 [cit. 2. 12. 2014]. ISBN 978-80-244-3201-4. Dostupné z: <http://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/rizika.pdf>
- [18] YANG, Ch., Y. MAI. Thermodynamics at the nanoscale: A new approach to the investigation of unique physicochemical properties of nanomaterials. *Materials Science and Engineering R: Reports* [online]. 2014, vyd. 79, str. 1-40 [cit. 15. 1. 2015]. DOI: 10.1016/j.mser.2014.02.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927796X14000242>
- [19] Nanomaterials and its properties! *Shellzero.wordpress.com* [online]. 2012. [cit. 15. 1. 2015]. Dostupné z: <https://shellzero.wordpress.com/2012/05/14/nano-materials-and-its-properties>
- [20] Developing Safe Products Using Nanotechnology. *Society of Toxicology* [online]. 2015 [cit. 17. 2. 2015]. Dostupné z: http://www.toxicology.org/script/admin/toxtopics/114719_AMTT4_Nanotechnology_SOT.pdf
- [21] PROKEŠ, J. *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 248 str. ISBN 80-726-2301-X.
- [22] BORM J. P. et al. The potential risk of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and fibre toxicology* [online]. 2006 [cit. 4. 3. 2015], DOI: 10.1186/1743-8977-3-11. Dostupné z: <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/3/1/11>
- [23] GRASSIAN H. V. *Nanoscience and nanotechnology: environmental and health impacts*. New Jersey: John Wiley & Sons [online], 2008, 512 str. [cit. 8. 3. 2015]. ISBN: 978-0-470-08103-7. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=Y1n1T4M0NqC&pg=PA45&dq=fate+of+nanoparticle+in+environment&hl=cs&sa=X&ei=6w4DVY29IIPtUtPcgOgK&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=fate%20of%20nanoparticle%20in%20environment&f=false>

- [24] DWIVEDI D. A., P. S. DUBEY, M. SILLANPAA, N. Y. KWON, CH. LEE, S. R. VARMA. Fate of engineered nanoparticles: Implications in the environment. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2015, č. 287, str. 64-78 [cit. 4. 3. 2015]. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.12.014. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854514003579>
- [25] NAVARRO, E., A. BAUN, R. BEHRA et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* [online]. 2008, vyd. 17, č. 5, str. 372-386 [cit. 4. 3. 2015]. DOI: 10.1007/s10646-008-0214-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10646-008-0214-0>
- [26] LIU, Y., M. TOURBIN, S. LACHAIZE, P. GUIRAUD. Nanoparticles in wastewaters: Hazards, fate and remediation. *Powder Technology*. 2014, vyd. 255, str. 149-156, DOI: 10.1016/j.powtec.2013.08.025. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591013005366>
- [27] VANIJVERDEN, M. van. Nanotechnology in perspective : Risks to man and the environment. *National Institute for Public Health and Environment* [online]. 2009 [cit. 13. 2. 2015]. Dostupné z: http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Kvasnickova2/RIVM_report.pdf
- [28] KRÍŽKOVÁ, S., V. ADAM a R. KIZEK. Fytotoxicita stříbrných iontů. *Chemické listy* [online]. 2009, vyd. 103, str. 559-568 [cit. 14. 1. 2015]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_559-568.pdf
- [29] KVÍTEK, L., R. PRUCEK, A. PANÁČEK a J. SOUKUPOVÁ. Nanočástice stříbra-příprava, vlastnosti a aplikace. *Nanocon 2009, Rožnov pod Radhoštěm* [online]. 2009 [cit. 12. 12. 2014]. Dostupné z: http://www.nanocon.eu/files/proceedings/nanocon_09/Lists/Papers/008.pdf
- [30] KVÍTEK, L. *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra*. Habilitační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta [online]. 2008 [cit. 6. 11. 2014]. Dostupné z: http://www.zdravestibro.cz/admin/data/img/uploads/HP_Kvitek.pdf
- [31] Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. *European Commission – Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* [online], 2014 [cit. 5. 2. 2015]. ISBN 978-92-79-30132-2. Dostupné z: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_039.pdf
- [32] HOŠEK, J. *Úvod do nanotechnologie*. Praha: České vysoké učení technické, 2011. ISBN 978-80-01-04555-8.
- [33] Gold Colloid. *nanoComposix europe* [online]. 2014 [cit. 5. 2. 2015]. Dostupné z: <http://nanocomposix.eu/pages/gold-colloid>
- [34] ALKILANY, A., C. MURPHY. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2010, vyd. 12, č. 7, str. 2313-2333 [cit. 10. 2. 2015]. DOI: 10.1007/s11051-010-9911-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2988217/>
- [35] Nanotechnologie a nanomateriály pro dopravu, VŠB-TU Ostrava. *Evropská unie* [online], 2009 [cit. 10. 2. 2015]. Dostupné z: <http://projekt150.ha-vel.cz/node/132>
- [36] PRÁŠEK, J. *Uhlíkové nanočástice, grafen, nanotrubičky, fullereny*, Instrukční a studijní materiály [online]. Brno, 2011 [cit. 11. 2. 2015], Dostupné z:

<http://www.umel.feec.vutbr.cz/nanoteam/data/soubory/CTN,%20grafen,%20fullerenCNTs+grafen+fullereny.pdf>

[37] PERÉZ S., M. la FARRÉ, D. BARCELÓ. Analysis behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2009, vyd. 28, č. 6, str. 820-832 [cit. 12. 2. 2015]. DOI: 10.1016/j.trac.2009.04.001.

Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993609000739>

[38] MENARD A., D. DROBNE, A. JEMEC. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. *Environmental Pollution* [online]. 2010, vyd. 159, č. 3, str. 677-684 [cit. 3. 3. 2015]. DOI: 10.1016/j.envpol.2010.11.027. Dostupné z:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749110005385>

[39] HOCHMANNOVÁ L., J. VYTRÁSOVÁ. Vliv nanočástic TiO₂ a ZnO na fotokatalytické a antimikrobiální účinky silikátových nátěrů. *Chemické listy* [online]. 2010, vyd. 104, str. 940-944 [cit. 3. 3. 2015]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_10_940-944.pdf

[40] GAJEWICZ, A., B. RASULEV, T. DINADAYALANED et al. Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: Application of computational approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, vyd. 64, č. 15, str. 1663-1693 [cit. 15. 11. 2014]. DOI: 10.1016/j.addr.2012.05.014 Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12001950>

[41] KOČÍ V., K. MOCO VÁ, *Ekotoxikologie pro chemiky*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [online], 2009 [cit. 15. 11. 2014]. ISBN: 978-80-7080-699-9. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/uid_isbn-978-80-7080-699-9/anotace/

[42] KOČÍ, V. Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí. *Chemické listy* [online]. 2006, vyd. 100, str. 882-888 [cit. 13. 12. 2014]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_10_882-888.pdf

[43] ANDĚL, P. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Liberec: Evernia, 2011. ISBN 978-80-903787-9-7.

[44] Who drives the OECD's work? *OECD.org* [online]. 2015 [cit. 5. 3. 2015]. Dostupné z: <http://www.oecd.org/about/whodoeswhat/>

[45] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Effects on Biotic Systems. *OECDiLibrary* [online], 2015 [cit. 5. 3. 2015]. ISSN: 2074-5761. Dostupné z: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems_20745761

[46] OECD. *Ecotoxicology and environmental fate of manufactured nanomaterials: test guidelines, Expert Meeting Report, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 40* [online]. Paris, 2014. [cit. 5. 3. 2015]. Dostupné z: <http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO%282014%291&doclanguage=en>

[47] OECD. *OECD's programme on the safety of manufactured nanomaterials* [online], 2012. [cit. 5. 3. 2015]. Dostupné z: <http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/45910212.pdf>

[48] OECD. *Six Years of OECD Work on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Achievements and Future Opportunities* [online]. 2012, [cit. 5. 3. 2015]. Dostupné z:

<http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/Nano%20Brochure%20Sept%202012%20for%20Website%20%20%282%29.pdf>

[49] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. *Biologické testy toxicity. Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 23. 3. 2015]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=B023

[50] ZHUANG, W., G. XUELU. Methods, Mechanisms and Typical Bio-Indicators of Engineered Nanoparticle Ecotoxicology: An Overview. *CLEAN–Soil, Air, Water* [online], 2014, roč. 42, vyd. 4, str. 377-385 [cit. 26. 3. 2015]. DOI: 10.1002/clen.201200559. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/clen.201200559/full>

[51] SHARMA, V. K., K. M. SISOVA, R. ZBORIL, J. L. GARDEA-TORRESDEY. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Advanced in Colloid and Interface Science* [online]. 2014, vyd. 204, str. 15-34 [cit. 20. 3. 2015]. DOI: 10.1016/j.cis.2013.12.002. Dostupné z: http://ac.els-cdn.com/S0001868613001735/1-s2.0-S0001868613001735_main.pdf?_tid=48758d76-d2cb-11e4-b7ac-00000aab0f02&acdnat=1427273306_2fb9e6f96ab8863a58a9f15ec66da251

[52] RÖMER, I., A. J. GAVIN, T. A. WHITE et al. The critical importance of defined media conditions in *Daphnia magna* nanotoxicity studies. *Toxicology Letters* [online]. 2013, vyd. 223, č. 1, str. 103-108 [cit. 20. 3. 2015]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.08.026. Dostupné z: http://ac.els-cdn.com/S0378427413013076/1-s2.0-S0378427413013076-main.pdf?_tid=eb98e784-d2e7-11e4-9c77-00000aacb35e&acdnat=1427285606_a58a22107ce01ed2d58c89262c91b88a

[53] GUBBINS, E. J. L. C. BATTY, J. R. LEAD. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution* [online], 2011, vyd. 159, str. 1551-1559 [cit. 23. 3. 2015]. DOI: 10.1016/j.envpol.2011.03.002.

Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026974911100131X>

[54] GOMES, S. I. L., D. HANSEN, J. J. SCOT-FORSSMAND, M. J. B. AMORIM. Effects of silver nanoparticles to soil invertebrates: Oxidative stress biomarkers in *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* [online]. 2015, vyd. 199, str. 49-55 [cit. 25. 3. 2015]. DOI: 10.1016/j.envpol.2015.01.012. Dostupné z: http://ac.els-cdn.com/S0269749115000159/1-s2.0-S0269749115000159-main.pdf?_tid=a0f05e48-d20f-11e4-88a1-00000aacb360&acdnat=1427192709_69e61c6b2e66d7a69210c47d331b862d

[55] SHOULTS-WILSON A. W. et al. Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms (*Eisenia fetida*). *Nanotoxicology* [online]. 2010, str. 1-13 [cit. 23. 3. 2015].

Dostupné z: http://faculty.ce.cmu.edu/lowry/files/2014/06/Shoults-Wilson-Nanotox_2011.pdf

[56] LAPRESTA-FERNÁNDEZ, A., A. FERNÁNDEZ, J. BLASCO. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organism. *Trend in Analytical Chemistry* [online]. 2012, vyd. 32, str. 40-59 [cit. 26. 3. 2015]. DOI: 10.1016/j.trac.2011.09.007.

Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993611003748>

[57] TEDESCO S., H. DOYLE, J. BLASCO, G. REDMOND, D. SHEEHAN. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* [online]. 2010, vyd. 100, č. 2, str. 178-186 [cit. 26. 3. 2015]. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.03.001.

- Dostupné z: http://ac.els-cdn.com/S0166445X1000086X/1-s2.0-S0166445X1000086X-main.pdf?_tid=7ce339e8-e20f-11e4-a72d-00000aab0f6c&acdnat=1428951867_e0df7991e361dfc6462db872a25fbc7d
- [58] TEDESCO S., H. DOYLE, J. BLASCO, G. REDMOND, D. SHEEHAN. Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. 2010, vyd. 151, č. 2, str. 167-174 [cit. 29. 3. 2015]. DOI: 10.1016/j.cbpc.2009.10.002. Dostupné z: http://ac.els-cdn.com/S1532045609002130/1-s2.0-S1532045609002130-main.pdf?_tid=063349b8-e210-11e4-9e40-00000aab0f01&acdnat=1428952098_b39754a015617b965121fae91e75e654
- [59] RENAULT S., M. BAUDRIMONT et al. Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). *Gold Bulletin* [online]. 2008, vyd. 41, č. 2, str. 116-126 [cit. 1. 4. 2014]. DOI: 10.1007/BF03216589. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF03216589>
- [60] ROCCO, L., M. SANTONASTASO et al. Genotoxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in the teleost *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2015, vyd. 113, str. 223-230 [cit. 1. 4. 2015]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.012. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651314005673#>
- [61] Z. CLEMENTE, V. L. CASTRO et al. Biomarker Evaluation in Fish After Prolonged Exposure to Nano-TiO₂: Influence of Illumination Conditions and Crystal Phase. *Journal of nanoscience and nanotechnology* [online]. 2015, vyd. 15, č. 7, str. 5424-5433 [cit. 1. 4. 2015]. DOI: 10.1166/jnn.2015.10021. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=Q2ub0QIegegeTtREHbj&page=1&doc=1
- [62] CHEN, L., L. ZHOU et al. Toxicological effects of nanometer titanium dioxide (nano-TiO₂) on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2012, vyd. 84, str. 155-162 [cit. 2. 4. 2015]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.07.019. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0147651312002503>
- [63] ZHU S., E. OBERDÖRSTER, M. L. HAASCH. Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C₆₀) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow. *Marine Environmental Research* [online]. 2006, vyd. 62, dod. 1, str. 5-9 [cit. 5. 4. 2015]. DOI:10.1016/j.marenvres.2006.04.059. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113606000444>
- [64] OBERDÖRSTER, E., Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C₆₀) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2004, vyd. 112, č. 10, str. 1058-1062 [cit. 5. 4. 2015]. DOI: 10.1289/ehp.7021. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1247377/>

[65] HU, C. W., L. J.ZHANG, W. L. WANG, Y. B. CUI, M. LI. Evaluation of the combined toxicity of multi-walled carbon nanotubes and sodium pentachlorophenate on the earthworm *Eisenia fetida* using avoidance bioassay and comet assay. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2014, vyd. 70, str. 123-130 [cit. 5. 4. 2015]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.12.018. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071713004513>

13. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADME	absorption, distribution, metabolism, excretion; absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece
AgNPs	silver nanoparticles; nanočástice stříbra
ATP	adenosine triphosphate; adenosintrifosfát
AuNPs	gold nanoparticles; nanočástice zlata
CNTs	carbone nanotubes; uhlíkové nanotrubičky
ESF	European Scientific Foundation; Evropská vědecká nadace
EU	European Union; Evropská unie
GA	gum arabic; arabská guma
NOAEL	no observed adverse effect level; nejnižší pozorovaná koncentrace způsobující nepříznivý účinek
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development; Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj
PEG	polyethylen glycol; polyethylenglykol
PVP	polyvinylpyrrolidone; polyvinylpyrrolidon
ROS	reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
THF	tetrahydrofuran