

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**STUDIUM INTERAKCE NANOČÁSTIC STRÍBRA
S FOTOSYNTETICKÝMI PIGMENTY ZELENÝCH ŘAS**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: PAVLA VYSLYŠELOVÁ
Studijní program: B 1407 Chemie
Studijní obor: Ekochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

OLOMOUC 2010

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze uvedené zdroje a literaturu. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 13. 5. 2010

.....

Děkuji vedoucímu bakalářské práce RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za ochotu při vedení mé bakalářské práce, za jeho vstřícný přístup, cenné podněty a poskytnutý materiál.

Bibliografické údaje:

Jméno a příjmení autora:	Pavla Vyslyšelová
Název práce:	Studium interakce nanočástic stříbra s fotosyntetickými pigmenty zelených řas
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Aleš Panáček, Ph. D.
Rok obhajoby práce:	2010
Abstrakt:	Cílem bakalářské práce bylo zjištění toxických účinků nanočástic stříbra a iontového stříbra na řasu rodu <i>Scenedesmus subspicatus</i> a sinici rodu <i>Chroococcales minutus</i> . Ke zjištění toxického účinku bylo sledováno množství chlorofylu a ve vzorcích v závislosti na koncentraci stříbra pomocí spektrofotometrické metody. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se sledovalo poměrné zastoupení jednotlivých fotosyntetických pigmentů. Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že koloidní stříbro nevykazuje téměř žádnou toxicitu vůči řase ani sinici. Naopak iontové stříbro vykazovalo toxicitu vysokou a to již od nejnižších sledovaných koncentrací (1 mg/L). Metodou HPLC bylo zjištěno, že koloidní ani iontové stříbro nemá vliv na zastoupení fotosyntetických barviv.
Klíčová slova:	nanočástice stříbra, ekotoxicita, zelené řasy, sinice, fotosyntetické pigmenty, HPLC
Počet stran:	55
Počet příloh:	12
Jazyk:	český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Pavla Vyslyšelová

Title: Study of silver nanoparticles interaction with photosynthetic pigments of green algae

Type of thesis: Bachelor

Department: Department Of Physical Chemistry

Supervisor: RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

The year of presentation: 2010

Abstract: The aim of the bachelor thesis was to determine the toxic effects of silver nanoparticles and ionic silver to the algae species *Scenedesmus subspicatus* and cyanobacteria species *Chroococcales minutus*. Spectrophotometric determination of chlorophyll a concentration was determined for the toxicity evaluation of the nanoparticulate and ionic silver depending on their concentration. Percentual of different photosynthetic pigments was determined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The obtained values proved that colloidal silver did not show any toxicity to algae and cyanobacteria. On contrary, ionic silver showed high toxicity to algae and cyanobacteria at very low concentrations (1 mg/L). It was found that colloidal silver and ionic silver had no influence on the percentual representation of photosynthetic pigments based on the results obtained from HPLC analysis.

Keywords: Silver nanoparticles, ecotoxicity, green algae, cyanobacteria, photosynthetic pigments, HPLC

Number of pages: 55

Number of appendices: 12

Language: Czech

OBSAH

1. ÚVOD	9
TEORETICKÁ ČÁST	
2. DISPERZNÍ SOUSTAVY	10
2.1. KOLOIDNÍ SOUSTAVY	10
2.2. KINETICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV	10
2.2.1. Difúze	11
2.2.2. Sedimentace	11
2.2.3. Osmóza	11
2.3. OPTICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV	12
2.3.1. Absorpce záření	12
2.3.2. Rozptyl záření	12
2.4. ELEKTRICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV	13
2.4.1. Elektrická dvojevrstva	13
2.4.2. Elektrokinetické jevy	14
2.5. METODY PŘÍPRAVY KOLOIDNÍCH SOUSTAV	14
3. KOLOIDNÍ STŘÍBRO	15
3.1. METODY PŘÍPRAVY KOLOIDNÍHO STŘÍBRA	15
3.2. VYUŽITÍ KOLOIDNÍHO STŘÍBRA	16
3.2.1. Ramanova spektroskopie	16
3.2.2. Katalyzátory	16
3.2.3. Senzory	16
3.2.4. Antibakteriální účinky	17
4. TOXIKOLOGIE	19
4.1. NANOTOXIKOLOGIE	19
4.2. EKOTOXIKOLOGIE	20
4.2.1. Ekotoxicita nanočástic	21
4.2.1.1. Ekotoxicita nanočástic na řasy, houby a rostliny	21
4.2.1.2. Ekotoxicita nanočástic na vodní organismy	22
4.2.1.3. Ekotoxicita nanočástic na hmyz	23

5. ŘASY	24
5.1. ZELENÉ ŘASY	25
5.2. SYSTÉM ZELENÝCH ŘAS	26
5.2.1. Třída Chlorophyceae	27
5.2.1.1. Řád chlorococcales	28
5.2.1.1.1. Rod Scenedesmus	28
5.3. VÝZNAM ŘAS	29
6. SINICE	31
6.1. SYSTÉM SINIC	32
6.1.1. Řád Chroococcales	32
6.1.1.1. Rod Chroococcus	32
6.2. VÝZNAM SINIC	33
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	
7. MATERIÁL A METODY	34
7.1. CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL	34
7.2. PĚSTOVÁNÍ ZELENÝCH ŘAS A SINIC	35
7.3. PŘÍPRAVA KOLOIDNÍHO A IONTOVÉHO STŘÍBRA	35
7.4. KONCENTROVÁNÍ KOLOIDNÍHO STŘÍBRA	37
7.5. APLIKACE STŘÍBRA NA ŘASY	38
7.6. VYHODNOCENÍ	38
7.6.1. Spektrofotometrická metoda	38
7.6.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (Reversed-phase HPLC)	38
8. VÝSLEDKY	40
8.1. VÝSLEDKY VLIVU STŘÍBRA NA ŘASY	40
8.2. VÝSLEDKY VLIVU STŘÍBRA NA SINICE	45
9. DISKUZE	47
9.1. STUDIUM TOXICKÉHO VLIVU STŘÍBRA NA ŘASY	47
9.2. STUDIUM TOXICKÉHO VLIVU STŘÍBRA NA SINICE	49

10. ZÁVĚR	50
11. SUMMARY	51
12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
13. PŘÍLOHA	55

1 ÚVOD

Nanotechnologie je skupina intenzivně se rozvíjejících vědních oborů, které se zabývají studiem a popisem fyzikálně chemických vlastností nanočástic. Velikost nanočástic se pohybuje v rozmezí od 1 nm do 100 nm. Funkčnost a využití nanočástic vychází z jejich specifických vlastností, které jsou důsledkem unikátních malých rozměrů. [1, 2]

Nanočástice nacházejí díky svým vlastnostem využití nejen ve výzkumných laboratořích, ale i v běžném lidském životě. Už nyní se používají v oblastech medicíny, elektroniky, zdravotnictví nebo v kosmetickém průmyslu. V současné době jeví nanotechnologie zájem především o nanočástice kovů, zejména zlata a stříbra. Jako příklad může sloužit objev zesíleného Ramanova rozptylu na částicích stříbra, který započal rychlý rozvoj nové, vysoce citlivé spektroskopické metody. Nanočástice lze využít nejen v Ramanově spektroskopii, ale také mají uplatnění jako katalyzátory nebo senzory. Nanočástice stříbra by mohly v budoucnu nahradit stávající antibiotika, protože určité druhy bakterií začínají být na antibiotika rezistentní. Antibakteriální účinnost těchto částic vůči bakteriím už byla prokázána. Nanočástice stříbra slouží ke sterilizaci vody, přidávají se do tkanin a jsou součástí protéz nebo jiných zdravotnických potřeb. [1, 3]

Ještě nejsou známy veškeré informace o tom, jak tyto částice působí na životní prostředí a jednotlivé živé organismy. V současnosti se výzkum zaměřuje především na zjištění mechanismu interakce těchto částic s živou hmotou. Proto jsem se v této bakalářské práci zabývala studiem vlivu koloidního a iontového stříbra na zelené řasy rodu *Scenedesmus subspicatus* a na sinice rodu *Chroococcales minutus*.

2 DISPERZNÍ SOUSTAVY

Disperzní soustava je termodynamický systém, který je složený nejméně ze dvou chemicky nebo fázově odlišných složek, z nichž jedna tvoří disperzní fázi a druhá disperzní prostředí. Disperzní prostředí je spojitou částí disperzní soustavy, ve které je disperzní fáze rovnoměrně rozptýlena. Disperzní soustavy lze dělit dle skupenství disperzního prostředí a fáze, dle tvaru dispergovaných částic a dle velikosti dispergovaných částic. [1,4]

Velikost částic disperzní soustavy se vyjadřuje tzv. stupněm disperzity, což představuje převrácenou hodnotu lineárního rozměru částic. Částice analytických disperzí mají velikost pod 10^{-9} m, koloidních disperzí od 10^{-9} – 10^{-6} m. Částice hrubých disperzí jsou větší než 10^{-6} m. Pokud soustava obsahuje částice stejných velikostí, jedná se o monodisperzní soustavu. Daleko častější jsou ale polydisperzní soustavy s částicemi různých velikostí. [2, 5]

2.1 KOLOIDNÍ SOUSTAVY

Koloidní soustavy se vyznačují specifickým chováním, které často souvisí s velkou plochou fázového rozhraní mezi fází a disperzním prostředím v porovnání s vlastním objemem rozptýlené disperzní fáze. [5]

Označení koloid zavedl v roce 1861 T. Graham. Od něho také pochází první klasifikace koloidních systémů, které se řídí povahou disperzního prostředí a fáze. [6]

Další možné rozdělení koloidních soustav je založeno na jejich způsobu vzniku a stálosti. Lyofilní soustavy mají fázové rozhraní rozprostřeno do větších šířek, mohou se vytvářet samovolně, dosahují termodynamické stability a jsou tvořeny převážně vysokomolekulárními látkami. Lyofobní soustavy mají ostře vymezené fázové rozhraní, jsou termodynamicky nestabilní, proto vyžadují speciální stabilizaci, nevznikají samovolně a jsou většinou tvořeny látkami anorganickými. Asociativní koloidy nemají pevně definované fázové rozhraní, protože dochází k neustálé výměně molekul mezi koloidní částicí a disperzním prostředím. [5, 7]

2.2 KINETICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV

Částice disperzní fáze se pohybují v disperzním prostředí chaotickým pohybem, který je důsledkem neustálých náhodných nárazů molekul disperzního prostředí. Tento pohyb byl objeven v roce 1827 Angličanem Robertem Brownem a dostal název Brownův pohyb. Jeho intenzita se zmenšuje s rostoucí velikostí částic a s klesající teplotou. Díky Brownovu pohybu se u koloidních soustav vyskytují jevy, jako jsou difúze, osmotický tlak a sedimentace. [4]

2.2.1 DIFÚZE

Difúze je projevem Brownova pohybu, kde hnací silou je koncentrační gradient. Částice disperzní fáze se pohybují z míst s vyšší koncentrací do míst s koncentrací nižší tak, aby v celém objemu došlo k vyrovnání koncentrace. Zákon difúze byl formulován v roce 1855 Adolphem Fickem jako tzv. Fickův zákon

$$j_{dif} = -D \frac{dc}{dx}$$

kde j_{dif} je difúzní tok, D je difúzní koeficient a dc/dx je koncentrační gradient. [5, 7]

2.2.2 SEDIMENTACE

Koloidní částice jsou vlivem gravitačních sil přitahovány ke dnu, to znamená, že sedimentují. Na takto sedimentující částice působí i síla vztlaková a třecí. Vztah mezi těmito třemi silami popisuje Stokesův vztah:

$$F_g = F_{vztl} + F_{vis}$$

kde F_g je gravitační síla, F_{vztl} je vztlaková síla a F_{vis} je třecí síla. [4, 5]

Sedimentace probíhá určitou rychlostí a za nějaký čas se ustanoví sedimentační rovnováha:

$$v = \frac{2r^2(\rho - \rho_0)}{9\eta}$$

kde v je rychlost sedimentace částic, ρ a ρ_0 jsou hustoty částic a disperzního prostředí, g je gravitační zrychlení a η je viskozita. [7]

Pro zvýšení rychlosti sedimentace a ustanovení sedimentační rovnováhy lze použít centrifugy. Centrifuga je zařízení, které působí na částice odstředivou silou. Tato síla bývá v porovnání se silou gravitační mnohonásobně větší. [4]

2.2.2.1 OSMÓZA

Osmóza je děj, který nastává při vyrovnání různých koncentrací roztoků, které se stýkají polopropustnou membránou. Dochází tedy k pohybu molekul rozpouštědla přes membránu. Hnací silou pohybu rozpouštědla je osmotický tlak, který je popsán van't Hoffovou rovnicí:

$$\pi = cRT$$

kde c je molární koncentrace [mol/m^3], R je univerzální plynová konstanta a T je termodynamická teplota [K].

Na principu osmózy je založena dialýza, ultrafiltrace, elektrodialýza a elektrofiltrace. [5]

2.3 OPTICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SOUSTAV

Studium optických vlastností koloidních soustav nám umožňuje určit přítomnost a koncentraci částic a analyzovat jejich strukturu. Mezi optické vlastnosti charakteristické pro koloidy patří absorpce a rozptyl záření. Jev, který bude převládat, závisí na charakteru disperzní soustavy. [1, 7]

2.3.1 ABSORPCE ZÁŘENÍ

Princip absorpce spočívá v pohlcení energetického kvanta záření při průchodu soustavou, což má za následek změnu energetických stavů valenčních a vazebných elektronů. Absorpcí se zvýší vnitřní energie molekul, která je následně přeměněna na energii tepelnou. Množství absorbovaného světla popisuje Lambert-Beerův zákon:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon cd$$

kde I je intenzita prošlého záření, I_0 je intenzita dopadajícího záření, ε je molární absorpční koeficient, c je koncentrace látky a d je tloušťka vrstvy, kterou záření prochází. [5]

2.3.2 ROZPTYL ZÁŘENÍ

Při průchodu světla libovolným prostředím (s výjimkou vakua) dochází k rozptylu světla. Homogenní prostředí (např. plyny, analytické disperze nebo dokonalé krystaly) rozptylují pouze nepatrnou část vstupujícího záření, avšak v hrubých a koloidních disperzích je rozptyl světla mnohem intenzivnější. [4]

Poprvé byl rozptyl světla kvalitativně pozorován Johnem Tyndallem v 19. století. Při průchodu záření koloidní soustavou lze pozorovat světelný kužel s vrcholem v místě, kde paprsek vchází do prostředí a který se rozšiřuje ve směru postupujícího paprsku. Popsaný rozptyl světla ve tvaru kužele je označován jako tzv. Tyndallův jev. [5, 6]

Princip rozptylu spočívá v krátkodobé existenci elektrických dipólů, které emitují záření o stejné vlnové délce jako záření dopadající. Mírou úhrnného množství světelné energie, která se při průchodu disperzním prostředím rozptýlí do všech stran od původního paprsku, je tzv. turbidita:

$$\log \frac{I_0}{I} = \tau d$$

kde I_0 je dopadající záření, I je vycházející záření, τ je turbidita a d je optická dráha.

Turbidita závisí na teplotě, vlnové délce, velikosti, tvaru a koncentraci částic. [4]

Sledování rozptylu záření je jeden z nejvyužívanějších způsobů studia disperzních soustav. K metodám studia rozptylu se řadí fotometrie, turbidimetrie a nefelometrie. Nefelometrie je metoda založená na měření turbidity pomocí měření intenzity světla, které se rozptyluje pod určitým úhlem. [7]

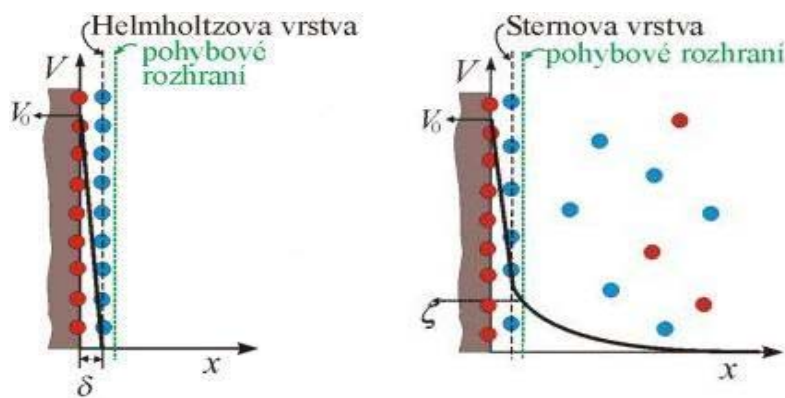
2.4 ELEKTRICKÉ VLASTNOSTI

Náboj na povrchu koloidních částic může vznikat buď disociací některých funkčních skupin (např. $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$), nebo adsorpcí iontů na svém povrchu. Takto nabitá částice k sobě přitahuje náboje opačného znaménka a vytváří se elektrická dvojvrstva. [4]

2.4.1 ELEKTRICKÁ DVOJVRSTVA

První teorii uspořádání elektrické dvojvrstvy vypracoval Hermann von Helmholtz v tzv. Helmholtzově modelu. Model je tvořen ze dvou vrstev nábojů opačného znaménka, které se navzájem kompenzují.

Helmholtzův model ovšem neodpovídal realitě a byl doplněn na tzv. Sternův model. K povrchu částice lne vrstva protiiontů, která se pohybuje zároveň s částicí. Na tuto vrstvu přiléhá difúzní vrstva, která se při pohybu s částicí nepohybuje. Rozhraní, které odděluje pohyblivou a nepohyblivou část, se označuje jako pohybové rozhraní. Potenciál v místě pohybového rozhraní se nazývá elektrokinetický potenciál (zeta, ζ). Zeta potenciál je závislý na rychlosti pohybu částic vůči prostředí, teplotě a koncentraci částic. [4, 5]



Obr. 1. Helmholtzův a Sternův model elektrické dvojvrstvy

Zdroj: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/figures/modely_elektricke_dvojvrstvy.jpg

2.4.2 ELEKTROKINETICKÉ JEVY

Díky zeta potenciálu vykazují koloidní soustavy elektrokinetické jevy. Rozeznáváme čtyři jevy – elektroosmózu, potenciál proudění, elektroforézu a sedimentační potenciál. V praxi je nejvíce využívána elektroosmóza a elektroforéza. [8]

Elektroosmóza je jev, u kterého dochází k pohybu kapaliny vlivem průchodu elektrického proudu. Rychlost pohybu kapaliny závisí na velikosti proudu, ale není závislá na průměru kapilár ani na jejich počtu.

Při elektroforéze se kapalina nepohybuje a vlivem elektrického pole dochází k přesunu dispergovaných částic. Elektroforézy se využívá především při studiu bílkovin, k preparačním účelům nebo k odhadu hmotnosti micel. [4, 8]

2.5 METODY PŘÍPRAVY KOLOIDNÍCH SOUSTAV

Na přípravu koloidních soustav se používají metody dispergační a kondenzační. Při dispergačních metodách se vychází z tuhých fází, hrubých suspenzí nebo sraženin, které se převedou na částice o koloidních rozměrech. Mezi dispergační metody patří např. peptizace, mletí a rozmělnování (= ablace) ultrazvukem. [6, 8]

Při přípravách koloidních soustav kondenzačními metodami se vychází z pravých roztoků. Molekulově nebo iontově dispergovaná fáze se převede na nerozpustnou sloučeninu, která se shlukuje na částice koloidní velikosti. Mezi kondenzační metody se řadí např. srážení, oxidačně-redukční reakce nebo hydrolýza. [6]

V praxi se využívají jak metody dispergační, tak i kondenzační. Kondenzační způsob přípravy je ale rozšířenější, protože je méně náročný na materiál, finance i čas. [1]

3 KOLOIDNÍ STŘÍBRO

3.1 METODY PŘÍPRAVY KOLOIDNÍHO STŘÍBRA

K přípravě koloidního stříbra se využívají obě metody. Mezi metody dispergační lze zařadit laserovou ablaci. Vlivem působení laserového záření na povrch pevné fáze dochází k lokálnímu přehřátí. Vznikne vysoký tlak, který odtrhává z povrchu látky částice o koloidních rozměrech. Takto připravené koloidní částice jsou chemicky čisté a mají velikost od 30–40 nm. Velikost částic závisí na vlnové délce a intenzitě laserového záření, na době ozařování a na přítomnosti chloridů a jiných činidel. [5, 9]

Další metodou přípravy je redukce pomocí ultrazvuku. Bývá řazena jak mezi metody dispergační, tak kondenzační. Ultrazvuk je schopný rozštěpit molekulu vody na hydroxylový a vodíkový radikál. V následujících reakcích vystupují organické radikály jako redukující částice. [9]

Na přípravu koloidního stříbra lze použít také redukci pomocí gama záření. Výhodou této metody je, že se v reakční směsi vyskytuje minimální množství chemických látek, které by mohly pozměnit vlastnosti částic. Při této metodě se využívá vodný roztok stříbrné soli, který se ozáří γ paprsky. Dochází ke tvorbě vodíkových atomů, které redukují stříbrné ionty, a ke tvorbě hydroxylových radikálů, které oxidují stříbrné částice. Touto metodou lze připravit monodisperzní soustavy s částicemi o velikosti 7 nm. [1, 9]

Další metodou přípravy je redukce anorganickými látkami. Jako nejčastější činidlo se používá tetrahydroboritan sodný (NaBH_4), který redukuje dusičnan stříbrný. Takto lze snadno připravit částice o velikosti v jednotkách nanometrů. Příprava částic větších rozměrů je složitější. Metodu, jak je připravit, navrhl Schneider. Jako redukční činidlo se opět používá tetrahydroboritan sodný. Dochází k tvorbě malých částic stříbra, které slouží jako zárodečná centra pro růst větších částic. K růstu dochází následnou redukcí, např. kyselinou askorbovou. [9]

Poslední, nejrozšířenější metodou přípravy koloidního stříbra je redukce organickými látkami. Nejběžnější používanou organickou látkou je citrát trisodný, který se využívá především pro experimenty v oblasti povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS). Do 500 ml vodného roztoku, který obsahuje 90 mg AgNO_3 , se přidává 10 ml 1% citrátu trisodného. Reakce probíhá za stálého míchání po dobu jedné hodiny. Touto metodou lze připravit polydisperzní soustavu s částicemi o velikosti 60–80 nm. Pro přípravu částic stříbra lze využít i Tollensův proces. Ionty stříbra ve formě komplexu s amoniakem jsou redukovány aldehydy nebo redukujícími sacharidy. Lze použít monosacharidy (např. glukózu a

galaktózu), nebo disacharidy (např. maltózu nebo laktózu). Takto se dají připravit částice o velikosti 25-450 nm, přičemž velikost částic závisí na koncentraci amoniaku a na použitém redukčním činidle. [9, 10]

3.2 VYUŽITÍ KOLOIDNÍHO STŘÍBRA

Díky svým specifickým vlastnostem se koloidní stříbro využívá v mnoha odvětví, jako jsou farmacie, biologie, elektronika a další. V dnešní době jsou nanočástice intenzivně zkoumány a stále se nachází jejich nové uplatnění.

3.2.1 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE

Detekovat velmi nízké koncentrace chemických látek je nezbytné v mnoha oblastech lidské aktivity, jako je chemie, biologie, medicína a farmacie.

Pro stopovou analýzu chemických látek se využívají velmi citlivé spektroskopické techniky – povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS) a povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl (SERRS). Molekuly se adsorbují na hrubé kovové povrchy nebo na povrch koloidních částic stříbra, a tak dochází ke zvýšení intenzity Ramanova rozptylu. Detekční limit SERS a SERRS leží v oblasti $10^{-12} - 10^{-15}$ mol/l. Bylo zjištěno, že při použití laserů ve viditelné oblasti spektra je vhodné zvolit materiály z ušlechtilých kovů (Au, Ag, Cu), přičemž nejpoužívanějším kovem je stříbro. [9]

3.2.2 KATALYZÁTORY

Kovové koloidní disperze se používají jako katalyzátory redukci, zřídka jako katalyzátory oxidací. Výjimkou je ale koloidní stříbro, které se často používá jako oxidační katalyzátor. Využívá se např. při přípravě etylenoxidu z etylenu [1, 9]

3.2.3 SENZORY

Při interakci nanočástic kovů s elektromagnetickým zářením můžeme pozorovat charakteristické absorpční maximum, které se nazývá plasmonová resonance. Poloha maximální vlnové délky a tvar pásu závisí na velikosti a tvaru částic, na stupni jejich vzájemných interakcí, na vlnové délce dopadajícího záření a na indexu lomu média na obou stranách kovového filmu. Tato závislost může být využita k vývoji nových, vysoce citlivých senzorů. [1, 9]

3.2.4 ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINKY

Antibakteriální účinky stříbra znala již staroindická a arabská medicína. Větší rozmach nastal až v období starověkého Říma. Římané používali stříbro k výrobě nádob, aby byla zajištěna zdravotní nezávadnost vody a potravin. Elementární stříbro není toxické, ale ve sloučeninách při dlouhodobém užívání způsobuje argyrii. Argyrie se projevuje nevratným usazováním stříbra v pokožce a očním bělmu, způsobuje poškození jater a dalších orgánů, nedochází však k výraznějším negativním účinkům na život. [2, 11] To je důvod, proč se začalo od používání stříbra opouštět.



Obr. 2. Chrup člověka postiženého argyrií

Zdroj: http://www.dr-liethen.info/Praxis/Prophylaxe/Zerst_rtes_Gebiss.jpg

Od studia antimikrobiálních vlastností koloidních částic se začalo opouštět díky vynálezu antibiotik. Antibiotika poškozují buňky bakterií, ale lidské buňky poškozovány nejsou, nebo jen minimálně. Antibiotika mohou bakterii buď usmrtit, nebo pozastavit její růst a množení. Postupem času začaly být bakterie proti antibiotikům odolné. [1, 9, 12]

Rozvoj antibiotik začal Flemingovým objevem penicilinu v roce 1929. Klinicky byl penicilin použit až během 2. světové války při léčení zraněných vojáků. Od té doby bylo vyrobeno mnoho antibiotik, u kterých se s rezistencí příliš nepočítalo. Dnes je např. 40 % kmenů běžné bakterie *Staphylococcus aureus* rezistentních vůči penicilinu, bakterie *Mycobacterium tuberculosis* jsou rezistentní vůči chemoterapeutikům a antibiotikům. [12]

Jako vhodná alternativa za antibiotika se nabízí koloidní stříbro. Je prokázáno, že koloidní stříbro ničí bakterie, houby a plísně, a přitom je minimálně toxické pro vyšší organismy. Rezistence bakterií na koloidní stříbro se zatím nevyskytla. [1]

Mechanismus antimikrobiální aktivity není ještě zcela objasněn. Nanočástice se mohou přichytit k povrchu buněčné membrány a mohou omezit funkce, jako jsou např.

propustnost a dýchání. Experimenty ukázaly, že nanočástice se vyskytovaly nejen na povrchu buněčné membrány, ale také uvnitř bakterie, kde mohou interagovat s vazbou fosfor-síra. Tato interakce může způsobit např. poškození DNA. Antibakteriální aktivita závisí na velikosti částic. Menší částice (do 10 nm) mají k dispozici větší plochu k interakci s bakterií, proto vykazují větší antibakteriální aktivitu než nanočástice o velikosti 20-50 nm. [9, 10]

Antibakteriálních vlastností stříbra lze využít např. v medicíně ke snížení infekcí, k ochraně protéz, cévních štěpů nebo dentálních pomůcek. Používá se také při sterilizaci zdrojů pitné vody nebo při výrobě tkanin. [1, 10]

4 TOXIKOLOGIE

Toxikologie je nauka o škodlivém působení látek na živé organismy a ekosystémy. V průběhu let se vyvinula řada specializovaných odvětví – toxikologie chemická, farmakologická, klinická, průmyslová, vojenská, soudní, ekotoxikologie atd. [13]

Jedem je považována každá látka, závisí ale na dávce a podmínkách jejího působení. I vysoce nebezpečné jedy v malém množství nevyvolávají žádné patologické změny. [13, 14]

Toxicita je schopnost látky poškozovat živý organismus. Rozeznáváme toxicitu akutní a chronickou. Mnohem nebezpečnější je toxicita chronická, kdy je toxická látka v malém množství podávána opakovaně. Existuje mnoho sloučenin, které v jednorázových dávkách nevyvolávají žádné patologické změny, ale při dlouhodobém působení mohou způsobit vážná onemocnění až smrt. [14]

Každá sloučenina, která vstoupí do organismu, metabolizuje, to znamená, že podléhá biotransformaci. Konkrétní druh reakcí je dán enzymatickou výbavou organismu. Produkty metabolismu jsou zpravidla lépe rozpustné ve vodě, a jsou proto z těla snadněji vylučovány. Některé látky se v organismu nemění a jsou kumulovány. [13]

Toxické účinky závisí na koncentraci a dávce látky, způsobu kontaktu s organismem a na době expozice. Změnou doby trvání expozice lze účinek pozměnit. Základním údajem o akutní toxicitě je letální dávka LD (=smrtná), pro plyny a páry letální koncentrace LC. Dávka, při níž uhynie 50 % sledovaných jedinců, se označuje jako LD₅₀. Látka je tím toxičtější, čím nižší je hodnota LD₅₀. U jednotlivých hodnot se uvádí také druh testovaného organismu a způsob podání látky. [13]

Toxická látka může působit na místě vstupu, lokálně nebo po distribuci v organismu. Podle mechanismu působení lze účinek toxické látky rozdělit na orgánovou toxicitu, na účinek přímý toxický, biochemický, mutagenní, karcinogenní, teratogenní a imunotoxický. [13]

4.1 NANOTOXIKOLOGIE

V současné době se nanočástice využívají v mnoha odvětvích, např. ve farmacii, v elektrotechnice nebo biotechnologii. Rozmach nanočástic je obrovský, ale dosud ještě nejsou spolehlivé informace o tom, jaké mají tyto látky při dlouhodobé expozici nežádoucí účinky.

Nanočástice mohou ovlivňovat dýchací, nervovou a kardiovaskulární soustavu, dále i pokožku a zrak. Na dýchací soustavu má negativní vliv především znečištěné ovzduší, kdy

se částice usazují v dýchacích cestách. Místo zachytu závisí na jejich velikosti. Nejnebezpečnější jsou právě nanočástice, protože mohou vstupovat až do plicních sklípků a způsobovat závažné zdravotní problémy. [15]

Výskyt akutní toxicity je velmi nepravděpodobný, ale k chronické toxicitě dojít může. Jakmile se nanočástice (NPs – nanoparticles) dostanou do dýchacích cest, mohou díky své velikosti snadno proniknout do buněk a okolních tkání. Ty jsou dále transportovány po celém těle a mohou se dostat do mimoplicních orgánů. Studie ukázaly, že se u dětí žijících ve velmi znečištěné oblasti jihozápadního Mexika vyskytl chronický zánět dýchacích cest a došlo k poškození nosní sliznice. [15]

V mnoha studiích bylo dokázáno, že NPs mohou způsobit v kardiovaskulárním systému zánět. Vystavení organismu nanočásticím může vést ke zhoršení angíny nebo může vyvolat akutní infarkt myokardu. [15]

NPs negativně působí i na pokožku. Po lokální expozici dochází k podráždění kůže. Mohou se vyskytnout různá onemocnění, jako jsou dermatitida nebo hyperkeratóza (tj. nadměrné zmožutnění a rohovatění kůže). Nicméně např. fullereny mají i příznivý účinek a používají se při léčbě řady onemocnění. Nanočástice TiO_2 se běžně používají do opalovacích krémů a kosmetiky, protože mají schopnost absorbovat UV záření. Ukázalo se však, že tyto nanočástice nepronikají do funkčně schopných vrstev kůže. [15]

Nanočástice stříbra mohou mít negativní vliv na DNA buněk. Těžké poškození DNA by mohlo vést k apoptóze (tj. k programované buněčné smrti). Apoptózu mohou způsobit jak nanočástice stříbra, tak i stříbro iontové. Pokud se hodnotil celkový apoptický účinek stříbra, větší toxicitu projevovalo stříbro iontové. Tyto testy byly prováděny na myších na HeLa buňkách. Buňky HeLa jsou nesmrtelné buněčné linie, které se mohou neustále množit. Jedná se o buňky nádorové, které byly poprvé izolovány v roce 1951 z nádoru Henrietty Lacksové (z prvních písmen jejího jména a přijetí pochází označení těchto buněk). [16, 17]

4.2 EKOTOXIKOLOGIE

Ekotoxikologie je hraniční obor mezi toxikologií a ekologií, jejímž cílem je studovat, monitorovat a předpovídat osud a vlivy cizorodých látek v prostředí.

Znečišťující látky se z různých zdrojů dostávají do prostředí a účastní se biogeochemických cyklů v jednotlivých složkách životního prostředí – v ovzduší, půdě, sedimentech či vodním prostředí. [13, 14]

Při hodnocení škodlivosti látky se využívá ekotoxikologických testů. Tyto testy se často provádějí v uměle připraveném prostředí na jednoduchých organismech, u kterých jsou dobře známy životní projevy, stavba těla a fyziologie (např. bakterie, sinice, řasy, vyšší rostliny, ryby nebo ptáci). Organismy jsou vybírány tak, aby byly typickými druhy zastupujícími nejvýznamnější složky ekosystému. Organismy mohou reagovat na působení toxické látky např. změnou růstu, změnou pohyblivosti či reprodukci. V krajním případě může být testovací organismus usmrcen. [13]

4.2.1 EKOTOXICITA NANOČÁSTIC

Přírodní nanočástice existují v životním prostředí od počátku historie Země. Jsou generovány geologickými a biologickými procesy, nacházejí se v sopečném prachu, ve většině přírodních vod, půd a sedimentů. Některé přírodní NPs jsou toxické, proto se předpokládá, že toxické by mohly být i NPs uměle vytvořené. [18]

Vyráběné nanomateriály (nanomaterials - NMs) jsou navrženy tak, aby bylo dosaženo takových fyzikálně-chemických vlastností, který daný výrobek požaduje. NMs jsou používány v elektronice, optice, textilním průmyslu, ve zdravotních zařízeních nebo v kosmetice. Výzkum NMs je zaměřen především na posouzení jejich toxicity, protože zatím není zcela jisté, jak se tyto látky v životním prostředí chovají. [18]

4.2.1.1 EKOTOXICITA NANOČÁSTIC NA ŘASY, HOUBY A ROSTLINY

Na rozdíl od zvířat má většina buněk řas, hub a rostlin buněčnou stěnu, která představuje primární místo pro interakci nanočástic s organismem. Buněčná stěna je semipermeabilní, umožňuje tedy průchod malých částic. Póry v buněčné stěně mají průměr od 5–20 nm, a tak se některé nanočástice mohou dostat až k plazmatické membráně a následně do celé buňky. Mohou se vázat na různé orgány a způsobovat např. otok plazmatického retikula, vakuolární změny nebo změny struktury membrány. Dochází potom ke zvýšení její pórovitosti, což má za následek snazší přístup dalších nanočástic. [19]

Stříbrné ionty inhibují respirační enzymy a vyvolávají oxidativní stres. Ionty stříbra se také mohou navázat na síru nebo fosfor, které se nacházejí např. v cysteinu nebo v glutathionu. Vlivem iontového stříbra dochází také ke zpomalení specifického růstu buněk a ke snížení kvantového výtěžku fotosystému II. Vyjmenované toxické účinky stříbrných iontů závisí na jejich uvolňování z nanočástic stříbra. Studie ukázaly, že při působení nanočástic stříbra dochází k uvolnění asi 1 % toxických stříbrných iontů. [19]

Oxidativní stres je definován jako nerovnováha mezi produkcí volných kyslíkových radikálů a jejich odstraňováním pomocí antioxidantů. Brání klíčové kroky biosyntézy chlorofylů buď přímo, nebo inhibuje aktivity enzymů potřebných k biosyntéze. Při jednom z experimentů byl vystaven těžkým kovům mech *Racomitrium crispulum*. Po 15 dnech působení kovů došlo k úbytku obsahu chlorofylu o 28%. Existují však i dokumenty, které uvádějí po 2 týdnech úbytek chlorofylu až o 40%. Při působení nízkých koncentrací kovů bylo naopak zaznamenáno zvýšení obsahu karotenoidů. [20]

V jiné studii se autoři zabývali vlivem kadmia na barviva řasy *Scenedesmus subspicatus*. S rostoucí koncentrací kadmia klesal obsah chlorofylu, ale rozdíly v produkci beta- karotenu nebyly patrné. Obdobné výsledky byly naměřeny i s jinými těžkými kovy. [21]

Některé nanočástice mohou mít na řasy, rostliny a houby i pozitivní vliv. Zjistilo se, že fullereny působí jako antioxidanty, nanočástice TiO₂ mohou u špenátu navodit klíčivost semen a růst rostlin. [19, 22]

4.2.1.2 EKOTOXICITA NANOČÁSTIC NA VODNÍ ORGANISMY

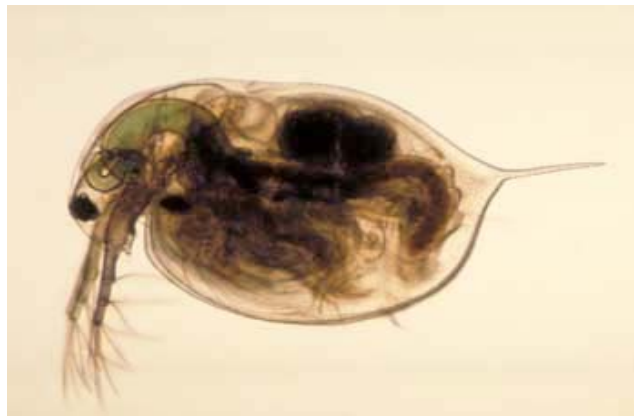
Obecně platí, že syntetické nanočástice tvoří pevné hmoty a jsou navrhovány tak, aby přetrvávaly ve vodním prostředí. Většina dostupných informací o akutní toxicitě nanočástic pochází ze sladkovodních organismů.

Vhodným modelovým jednobuněčným eukaryotním organismem je *Paramecium caudatum* (treпка velká). *Paramecium caudatum* je nálevník, žijící ve znečištěných vodách. Při testech toxicity byla použita kultura trepek o objemu 1-5 ml, přičemž 1 ml obsahoval 200-300 organismů. Testy byly prováděny s neupravenými nanočásticemi stříbra. Nanočástice o koncentraci menší než 20 mg/L prokázaly vysoký pokles toxicity, dokonce i při působení koncentrace 25 mg/L byly organismy schopné přežít déle než sedm dní. Avšak stříbro iontové o koncentraci 0,4 mg/L způsobilo okamžitou smrt organismů. [23]

Při nedávném experimentu byly nanočásticím stříbra vystaveny v různých stádiích vývoje *Phoxinus phoxinus* (střevle potoční). Nanočástice způsobovaly různé deformace, např. krvácení do hlavy nebo otoky, které se později ukázaly jako smrtelné. Autoři detekovali pomocí elektronové mikroskopie uvnitř embryí nanočástice o velikosti pod 30 nm. Takto malé NPs byly schopné překonat vaječné blány a dostat se do embrya méně než za jeden den. [22]

Kromě nanočástic stříbra bývají v současné době testovány i jiné nanočástice, jako jsou např. TiO₂ nebo fullereny C₆₀. Řada studií byla provedena na sladkovodním korýši

Daphnia Magna (Hrotnatka velká), což je důležitý, ekologicky významný druh. Hrotnatky jsou používány jak v akutním, tak i v chronickém testu toxicity. Tento korýš se živí filtrováním vody – to je také způsob, jak může nanočástice přijmout. Organismus byl exponován nanočásticím C₆₀. Po první hodině působení NPs byla u dospívajících jedinců úmrtnost nízká, někteří jedinci znehybněli. Po 48 hodinách ti jedinci, kteří přežili, získali zpět svoji mobilitu. Dospělí jedinci projevovali známky chaotického plavání a dezorientace. Totožné experimenty se prováděly s TiO₂, ale nedocházelo k žádným změnám v chování jako u C₆₀. [13, 24]



Obr. 3. *Daphnia Magna*

Zdroj: <http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=2491.php>

4.2.1.3 EKOTOXICITA NANOČÁSTIC HMYZ

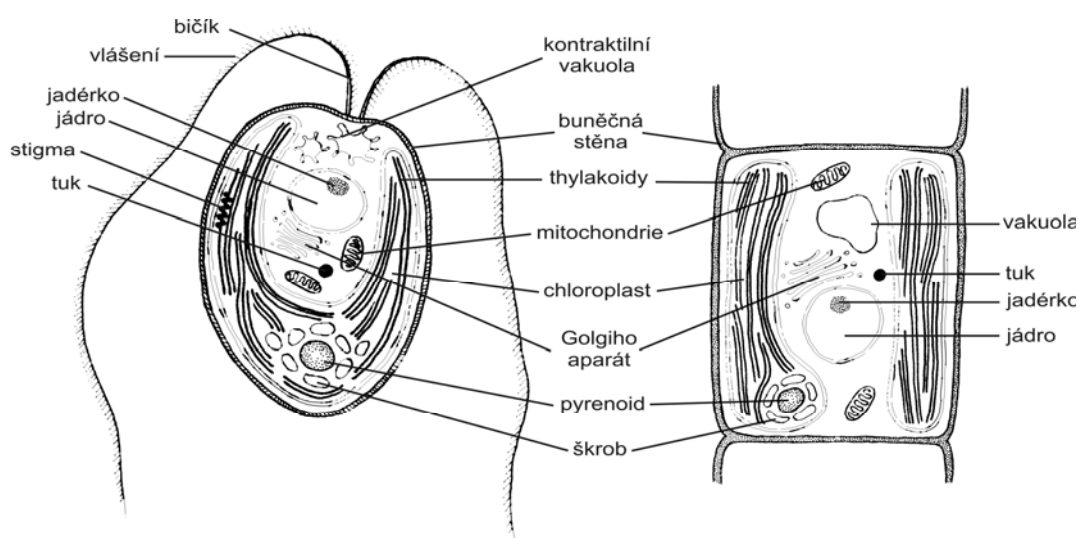
Vhodným organismem z třídy hmyzu je rod *Drosophila* (octomilka). Vzhledem k jeho rychlé reprodukci a vývoji lze hodnotit dlouhodobé účinky nanočástic stříbra v krátkém časovém období. Nedávný experiment byl prováděn s nanočásticemi stříbra o velikosti 10 nm, které byly potaženy polysacharidem. Organismy byly vystavovány koncentracím stříbra 50 a 100 µg/ml po dobu 24 a 48 hodin. Nanočástice stříbra vyvolaly u octomilky oxidativní stres, tepelný šok, poškození DNA a apoptózu. [25]

5 ŘASY

Řasy (Algae) jsou eukaryotní organismy, převážně autotrofní s jednobuněčnou nebo mnohobuněčnou stélkou. Zástupci jednotlivých tříd se liší stavbou buněk, kombinací fotosyntetických pigmentů a chemickým složením zásobních látek. [26]

5.1 ZELENÉ ŘASY

Zelené řasy (Chlorophyta) vynikají rozmanitostí ve stavbě stélek (tj. tělo nižších rostlin, které není rozčleněno na kořen, stonek a list). Jsou tvořeny všemi stélkami kromě stélky rhizopodové. Ta je jednobuněčná, tvoří panožky a nemá buněčnou stěnu. [26]

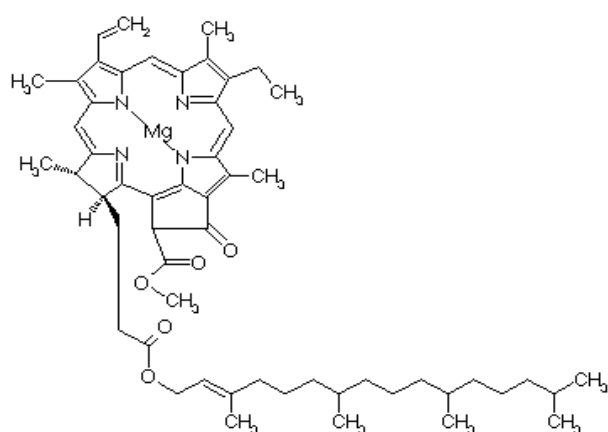


Obr. 4. Stavba bičíkaté a vláknité buňky

Zdroj: http://www.sinicearasy.cz/sites/default/files/Chlorophyta_obe.gif

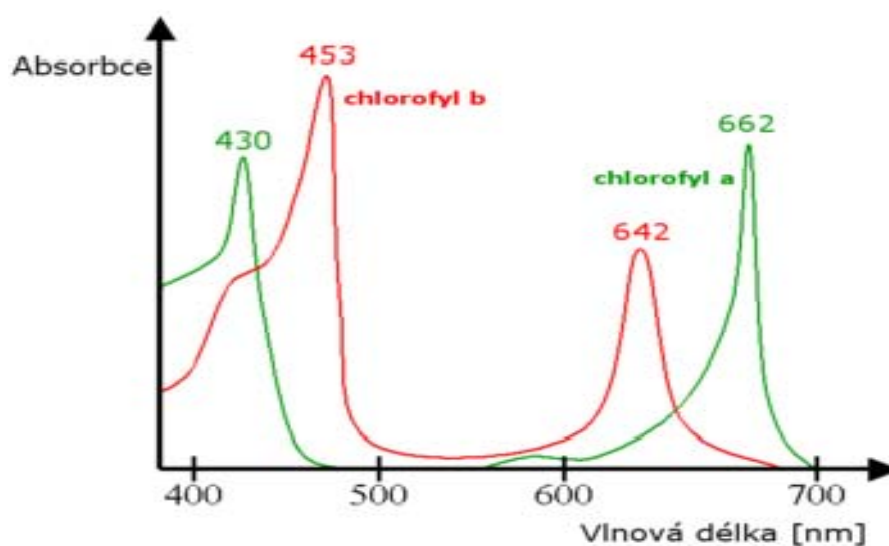
Buněčná stěna se nachází na povrchu buňky, je permeabilní a většinou je tvořena celulózou. Zásobními látkami jsou škrob, mono- a disacharidy a jejich deriváty. Zelené řasy jsou většinou mikroskopické, ale při hromadném výskytu tvoří makroskopické povlaky nebo trsy. [27, 28]

Základním znakem této skupiny je přítomnost chlorofylu a i b, α i β karotenu, stejně jako u vyšších rostlin. Chlorofyly jsou nejdůležitějšími fotosyntetickými pigmenty. Základem struktury chlorofylu jsou porfyriny, což jsou čtyři pyrolová jádra navázána na hořčík, který se nachází v centru molekuly chlorofylu. Tetrapyroly se vyznačují několika intenzivními absorpčními pásy v oblasti 360–700 nm. Nejvýznamnějším a nejrozšířenějším chlorofylem je modrozelený chlorofyl a. [29]



Obr. 5. Strukturní vzorec chlorofylu a

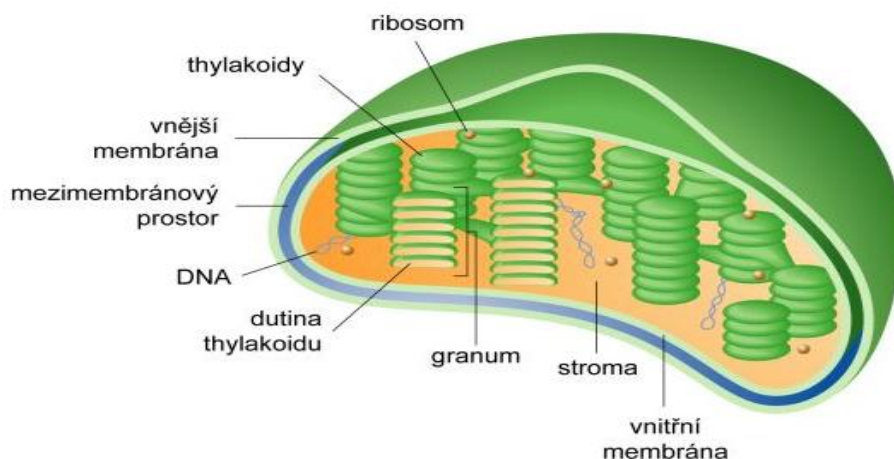
Zdroj: http://www.sinicearasy.cz/files/chlorofyl_a.gif



Obr. 6. Absorpční spektrum chlorofylu a a chlorofylu b.

Zdroj: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5e/Chlorophyll_ab_spectra_\(cs\).png/350px-Chlorophyll_ab_spectra_\(cs\).png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5e/Chlorophyll_ab_spectra_(cs).png/350px-Chlorophyll_ab_spectra_(cs).png)

Chlorofyly a karoteny se nacházejí v chloroplastech. Chloroplast je organela čočkovitého tvaru, na jejímž povrchu se nachází dvojná selektivní permeabilní membrána. Ve stromatu vznikají komplikovaným naskládáním dalšího typu membrán thylakoidy, v nichž probíhá světelná fáze fotosyntézy. U zelených řas tvoří thylakoidy granum, tak jako je tomu u vyšších rostlin. Chloroplasty obsahují vlastní DNA. [26, 29]



Obr. 7. Trojrozměrný model chloroplastu

Zdroj: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/figures/chloroplast.01.jpg

Existují obecné typy rozmnožování, ale celá skupina zelených řas je natolik rozsáhlá a rozmanitá, že každá ze skupin má výrazná specifika. Rozmnožování zelených řas lze rozdělit na dva typy – pohlavní a nepohlavní.

Mezi nepohlavní rozmnožování patří schizotomie. Schizotomie je podélné dělení mateřské buňky na dvě buňky dceřiné. Tímto způsobem se rozmnožují např. bezblanní bičíkovci. Oblaněné jednobuněčné řasy se rozmnožují cytogonií, kde dceřiné buňky vznikají uvnitř mateřské buněčné stěny. Cytonomie je dělení vegetativních buněk vláknitých řas za vzniku dvou buněk dceřiných. [26]

Mezi pohlavní rozmnožování patří gametogamie, při níž dochází ke splynutí gamet. Při izogamii mají gamety stejný tvar a jsou stejně velké, při anizogamii mají gamety stejný tvar, ale liší se svojí velikostí. Oogamie je jednou z nejvyspělejších rozmnožovacích metod u řas, kde velká nepohyblivá vaječná gameta splyne s menší spermatickou pohyblivou gametou. Po oplození vzniká zygota, která většinou dozraje, její buněčná stěna ztloustne a získá specifickou povrchovou strukturu. [26, 30]

5.2 SYSTÉM ZELENÝCH ŘAS

Nejstarší zmínky o řasách se nacházejí v literatuře staré Číny a Koreje, kde byly řasy tradiční součástí potravy. Botanický zájem o řasy projevil až v 18. století švédský přírodovědec C. Linné, který popsal přes sto druhů řas. Podstatně větší zájem ale můžeme

zaznamenat až v 19. století, v období zámořských plaveb. Nyní dochází k intenzivnímu studiu zelený řas, zejména v oblasti ekofyziologie, biochemie a genetiky řas. [26]

Existuje mnoho názorů, jak zorganizovat zelené řasy. Systém, který uveřejnil Ch. van den Hoek v roce 1988, obsahuje sedm tříd:

- Prasinophyceae – třída obsahuje sladkovodní a mořské bičíkovce a přisedlé řasy. Povrch buněk kryjí organické šupiny.
- Chlamydomphyceae – do této třídy patří bičíkovci a řasy s kapsální a kokální stélkou.
- Chlorophyceae – třída obsahuje bičíkovce, jednobuněčné, kapsální, kokální, vláknité a heterotrichální řasy.
- Pleurostrophyceae – tato třída je zatím nejméně prozkoumanou skupinou, patří sem jednobuněčné řasy.
- Ulvophyceae – do této třídy se zařazují vláknité, parenchymatické, signální a sifonokladální řasy.
- Zygnematophyceae – třída obsahuje vláknité a jednobuněčné řasy bez bičíkatých stadií.
- Charophyceae – jsou to nejdokonalejší zelené řasy. Svým vzhledem připomínají přesličky a dosahují velikosti několika centimetrů až decimetrů. [26, 30]

5.2.1 TŘÍDA CHLOROPHYCEAE

Chlorophyceae, českým názvem zelenivky, jsou velmi rozmanitou třídou zelených řas. Jsou mnohobuněčné nebo jednobuněčné, žijí jednotlivě, v koloniích nebo cenobiích. Cenobia jsou zvláštní typ kolonie, kde všechny buňky patří k jedné generaci. Mohou se aktivně pohybovat pomocí bičíků, které jsou stejně dlouhé, nebo se volně vznášet ve vodě. Všechny zelenivky obsahují chloroplast s jedním nebo více pyrenoidy. Jsou většinou jednojaderné. Buněčná stěna se u jednotlivých řádů liší, zpravidla je pevná a může produkovat sliz. [26, 31]

Nepohlavní rozmnožování probíhá zoosporami, pohlavní izogamií, heterogamií a vzácně oogamií. Životní cyklus je haploidní, jedinou diploidní buňkou je zygota. [26, 27]

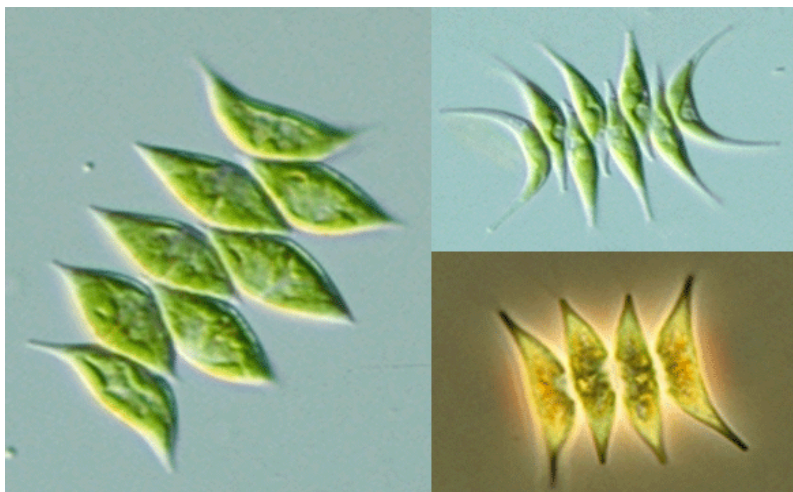
Zelenivky jsou rozšířené ve všech známých biotopech, běžně se vyskytují v planktonu stojatých i tekoucích vod. Často žijí na vlhkých místech (v kalužích, mokřadech a malých jezírkách), v půdách nebo na svrchních vrstvách letního sněhu v horských oblastech. [27]

5.2.1.1 ŘÁD CHLOROCOCCALES

Chlorococcales, neboli buňkové zelené řasy, patří mezi druhově nejbohatší skupiny řas. Do tohoto řádu patří jednobuněčné řasy žijící jednotlivě, v koloniích nebo v cenobiích. Ve vegetativním stavu jsou bez bičíků, pulzujících vakuol a stigmy. Žijí volně nebo jsou přichycené k podkladu. Rozmnožují se nepohlavně dvojbičíkatými nebo čtyřbičíkatými zoosporami. Při nepříznivých podmínkách vytvářejí akinety. Chlorococcales se nejčastěji nacházejí ve stojatých a tekoucích vodách, převážně v létě. [27]

5.2.1.1.1 ROD SCENEDESMUS

Do rodu Scenedesmus je zařazeno nejvíce popsáných druhů buňkových zelených řas, zejména sladkovodní planktonní druhy. Cenobia se skládají ze čtyř, osmi až šestnácti buněk, které jsou uloženy v jedné nebo ve dvou řadách. Cenobia jsou při pohledu shora prohnuta do mírného oblouku. Buněčná stěna je hladká, u některých rodů s podélnými žebry, na jejímž povrchu se mohou tvořit trny nebo ostny. Při rozmnožování se v každé buňce vyvíjí autocenobium, které je kopií dospělého jedince. [26, 31]



Obr. 8. Scenedesmus

Zdroj: http://www.rbg Syd.nsw.gov.au/__data/assets/image/0004/48235/Scenedesmus.gif

5.3 VÝZNAM ŘAS

Jedna z nejvýznamnějších úloh řas je tvorba kyslíku fotosyntézou. Podílí se také na koloběhu uhlíku, kdy oxid uhličitý je při fotosyntéze hlavním substrátem pro syntézu sacharidů. Proto je koncentrace oxidu uhličitého klíčovým momentem v produkci kyslíku a v syntéze uhlikatých sloučenin. [31]

Řasy jsou také využívány jako součást jídelníčků, především v Číně, Japonsku a Velké Británii. Na počátku 20. století sloužily mořské řasy jako surovina pro výrobu jódu, sody a potaše. Při tomto procesu docházelo ke spalování řas a k následné extrakci požadovaných látek. V současné době se kultivují některé druhy bičíkovců pro výživu mořských měkkýšů a jejich larev, které jsou následně součástí lidské potravy. [31]

Řasy slouží jako potrava také pro koryše, perloočky, ryby nebo larvy buchanek. Sedimentující řasy padají na dno nádrží, kde slouží jako potrava pro bentos (tj. organismy obývající dna vod). [31]

Řasy patří mezi hlavní ukazatele eutrofizace vod (tj. proces obohacování vod o živiny, především o fosfor a dusík). Příмым důsledkem je zvýšený růst řas. Větší množství řas bude produkovat více látek, které negativně působí na kvalitu prostředí, mnohé jsou nebezpečné i pro člověka. Zvláštní skupinu tvoří invazivní mořské druhy, které znehodnocují pláže, porůstají trupy lodí a přístavní konstrukce. *Caulerpa taxifolia* se rozmnožila tak, že nyní porůstá pobřežní pásmo moří v šesti zemích s délkou 180 km a plochou 10 000 ha. [31]



Obr. 9. Vodní květ zamořující Baltské moře

Zdroj: <http://www.techblog.cz/images/vodni-kvet-baltske-more.jpg>

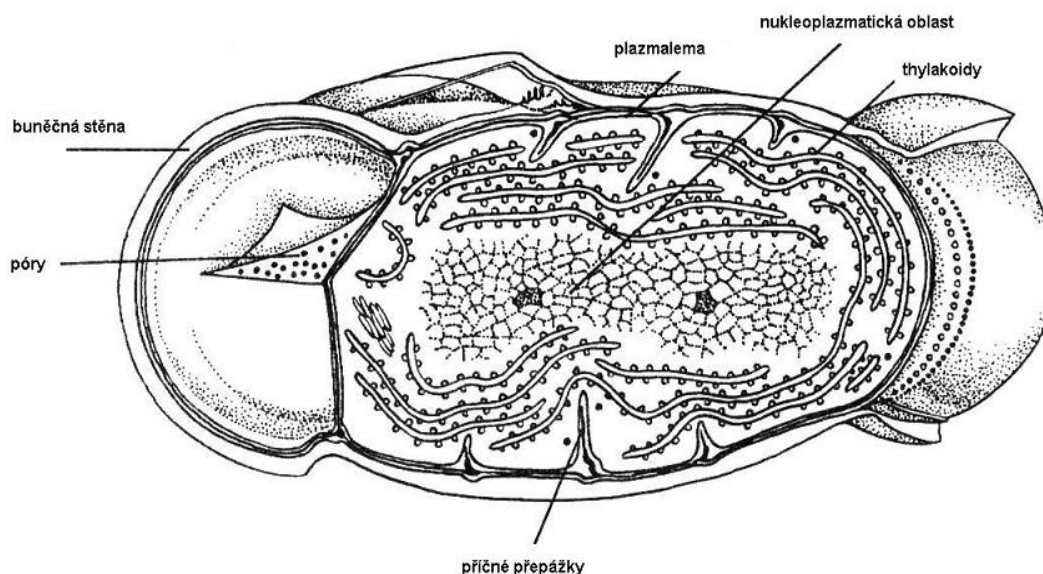
Řasy našly uplatnění při biologických testech jakosti vody – testy na toxicitu vody a testy na výživnost vody. Testy na toxicitu spočívají ve zjištění přímých škodlivých vlivů, které způsobují některé látky ve vodě na vybraných zástupcích. Při testech musejí být zajištěny standardní podmínky, např. teplota a sluneční svit. Velkým problémem je zabezpečení výživy řas v průběhu pokusu. Do této kategorie testů patří např. chlamydomonádový test, při kterém je testovacím organismem *Chlamydomonas gelatinosa*. Testem se sleduje vliv toxické látky na rozmnožování. Kromě zjišťování toxicity se řasy používají na testy stanovující výživnost (trofický potenciál) vody. Na toto stanovení byly vypracovány mnohé metody, které ale mají společný základ – kultivaci řas, při které je směrodatná hodnota na posouzení celkové výživnosti vody dána jako přírůstek řasové hmoty. [27]

6 SINICE

Sinice (Cyanophyta) jsou převážně autotrofní organismy schopné fotosyntézy s jednobuněčnou nebo vláknitou stélkou. Některé druhy sinic se mohou i větvit, přičemž rozlišujeme větvení pravé a nepravé. Ve starší literatuře nebylo rozdělení řas a sinic příliš důsledné. Teprve na počátku tohoto století byla zjištěna příbuznost s bakteriemi a sinice se zařadily mezi organismy prokaryotické. [26, 30, 31]

Sinice se stavbou buněk podobají bakteriím. Buněčná stěna je pevná, vícevrstevná a jsou v ní vytvořeny transportní kanály. Protoplast sinic je obklopen plazmalemou, která se na rozdíl od eukaryotních rostlin účastní dělení buněk. Protoplasma je tvořena převážně bílkovinami, má značnou viskozitu a obsahuje volně uložené thylakoidy, ribosomy, zásobní látky a u některých sinic také plynné vakuoly. Thylakoidy obsahují fotosyntetická barviva, chlorofyl *a*, β -karoten, zeaxantin, echinenon, myxoxantofyl, fykocyanin a fykoerytrin. Kombinace barviv dodává sinicím různé výsledné zbarvení, které je ale dosti proměnlivé. Závisí na dědičných faktorech a podmínkách výživy. Hlavní zásobní látkou je sinicový škrob (α -1, 4-polyglukan), který vzniká při fotosyntéze. [32]

Buňky sinic se dělí prostým zaškrcením na dvě buňky dceřiné, a to od obvodu směrem dovnitř. Jednobuněčné sinice se rozmnožují dělením, vláknité sinice hormogoniemi. Hormogonie jsou několikabuněčná vlákna, která se oddělují od vlákna mateřského. Pohybují se pomalým klouzavým pohybem. [26, 32]



Obr. 10. Prokaryotická buňka typická pro sinice

Zdroj: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/hesla/img__d10e16105.html

Některé sinice mohou fixovat vzdušný dusík. Tato schopnost byla dokázána u všech vláknitých sinic, které tvoří heterocysty. Jednobuněčné sinice byly v tomto ohledu studovány málo, ale zdá se, že jejich schopnost fixovat dusík je nepatrná. [32]

Sinice jsou téměř všudypřítomné, mohou žít i v horkých pramenech, v ledových vodách Antarktidy či v pouštích. Jsou důležitou složkou společenstev půdních mikroorganismů. Ve sladkých vodách tvoří planktonní společenstvo – vodní květ. V době rozvoje vodního květu dochází k úbytku jiných řas, k vyčerpání kyslíku a k úhynu ryb. Sinice mohou žít také ve vodách slaných. [32]

6.1 SYSTÉM SINIC

Ve sladkých vodách žije přibližně 111 rodů a 1000 druhů sinic. Podle stavby stélky dělíme sinice do čtyř řádů:

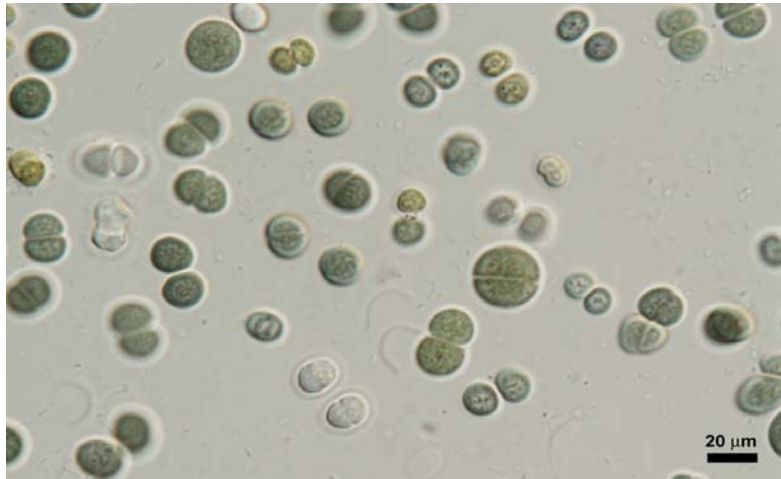
- Chroococcales – tento řád obsahuje jednobuněčné sinice, které žijí samostatně nebo v koloniích.
- Oscillatoriales – do tohoto řádu se řadí jednoduché vláknité sinice.
- Nostocales – do tohoto řádu patří vláknité sinice s heterocysty.
- Stigonamatales – tento řád obsahuje vláknité sinice s heterocysty a s pravým větvením. [26, 28]

6.1.1 ŘÁD CHROOCOCCALES

Do tohoto řádu patří jednobuněčné sinice žijící jednotlivě nebo v koloniích. Buňky jsou kulovité nebo oválné, často s plynnými vakuolami, které se množí dělením v jedné nebo v několika vzájemně kolmých rovinách. Některé sinice se rozmnožují exocytou, které se odčleňují. Jiné druhy se rozmnožují beocytou (tj. drobnými buňkami, které vznikají mnohonásobným dělením buňky mateřské). [31, 32]

6.1.1.1 ROD CHROOCOCCUS

Do tohoto rodu se řadí jednobuněčné sinice, které se rozmnožují prostým dělením na dvě buňky dceřiné o velikosti 2–45 μm . Tyto sinice se vyskytují v rašelinných tůňkách, na smáčených skalách, v půdě nebo v miskách pod květináči. Jsou původci vodních květů. Nepříznivé zimní období přečkávají slizem chráněné kolonie na dně nádrže, což jim v letních měsících umožňuje rychlý rozvoj. [30]



Obr. 11. Chroococcus Minutus

Zdroj: http://www.butbn.cas.cz/ccala/col_images/57.jpg

6.2 VÝZNAM SINIC

Sinice mají velký význam v zemědělství (hlavně na rýžových polích), kde svou přítomností umožňují udržovat úrodu bez užívání umělých hnojiv. V zemích, kde je rýže hlavním zemědělským produktem, se zavádí i umělé očkování polí sinicemi. [32]

Sinice mohou být také využity jako zdroj bílkovin ve výživě jak lidí, tak i hospodářských zvířat. V Číně a Japonsku se sinice běžně přidávají do potravy, v okolí Čadského jezera v Africe se připravují sušené placky z vodního květu druhu *Spirulina geitleri*. [32]

Sinice lze použít i ke tvorbě léčivých bahen a v lékařství, kde jsou pokusně užívány při léčení zánětů a ran. [32]

Sinice mají i negativní vliv na člověka a životní prostředí. Vylučují nejrůznější organické látky, které mohou omezit růst jiných organismů (např. zelených řas). Některé látky jsou i toxické. U člověka mohou vyvolat záněty pokožky a alergie. [32]

Na vodní hospodářství mají negativní vliv vodní květy, které postihují zejména přehrady a málo průtočné rybníky bohaté na živiny. Vodní květy znemožňují nebo znesnadňují technologické využití důležitých zásobáren vody. [32]

7 MATERIÁL A METODY

7.1 CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Na přípravu koloidního stříbra byly použity tyto chemikálie: dusičnan stříbrný (p.a. Tamba a.s.), hydroxid sodný (p.a. Lach-Ner, s.r.o.), amoniak (p.a. 25% vodný roztok, Lach-Ner, s.r.o.) a D (+) - maltosa monohydrát (p.a., Riedel de Haën).

Pro pěstování řas bylo použito základní kultivační médium – BBM (Bold-Basal/Bristol Medium) o složení:

Chemikálie a její množství	Koncentrace
10 ml NaNO ₃	25 g/1000 ml
10 ml CaCl ₂ · 2H ₂ O	5 g/1000 ml
10 ml MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,5 g/1000 ml
10 ml K ₂ HPO ₄	7,5 g/1000 ml
10 ml NaCl	2,5 g/1000 ml
10 ml KH ₂ PO ₄	17,5 g/1000 ml
1 ml EDTA + KOH	5 g Chelatonu III + 3,1 g KOH/100 ml
1 ml FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,498 g Fe + 0,1 ml H ₂ SO ₄ /100 ml
1 ml H ₃ BO ₃	1,142 g/100 ml
1 ml ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,82 g/1000 ml
1 ml MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,44 g/1000 ml
1 ml MoO ₃	0,71 g/1000 ml
1 ml CuSO ₄ · 5H ₂ O	1,57 g/1000 ml
1 ml Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,49 g/1000 ml

Tab. 1. Složení kultivačního média BBM

Zdroj: http://www.sinicearasy.cz/pro_prof/media/BBM

Na extrakci chlorofylu a byly použity tyto chemikálie: aceton (p.a. Lachema), uhličitan vápenatý (p.a. Lachema) a mořský písek (p.a. Lachema).

Toxické účinky nanočástic stříbra byly testovány na řasách druhu *Scenedesmus subspicatus* a na sinicích druhu *Chroococcales minutus*.

7.2 PĚSTOVÁNÍ ZELENÝCH ŘAS A SINIC

Při pěstování zelených řas a sinic je nutné pracovat pouze ve sterilním prostředí a používat jen sterilní nástroje a pomůcky. Na sterilizaci Erlenmeyerových baněk, média, zátek, gázy a pipet byl použit autokláv. Proces sterilizace je prováděn teplým vlhkým vzduchem za zvýšeného tlaku.

Očkování řas a sinic probíhalo ve flow boxech (tj. zařízení pro práci se sterilním materiálem). Z namnožené kultury bylo do 250 ml media přidáno 5 ml řas *Scenedesmus subspicatus* a 5 ml sinic *Chroococcales minutus*. Po inokulaci byly Erlenmeyerovy baňky přemístěny do kultivační místnosti (při fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy), kde byly ponechány 14 dní. Kultivační místnost je klimatická komora určena k pěstování rostlin za kontrolovaných a regulovaných vnějších podmínek.



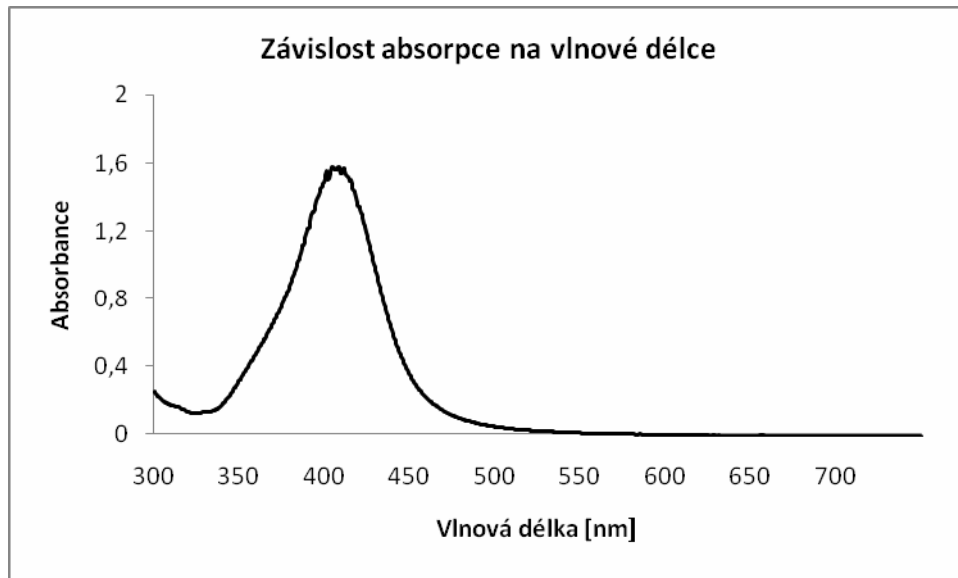
Obr. 12. Flow box

Zdroj: http://www.laflow.de/6.2Flowbox_01.jpg

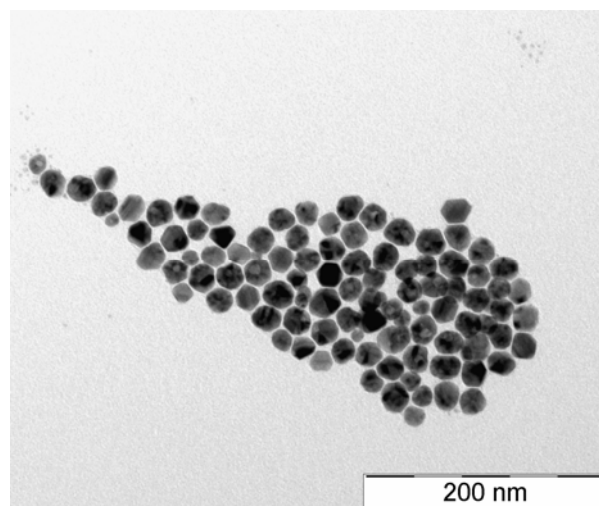
7.3 PŘÍPRAVA KOLOIDNÍHO STŘÍBRA

K přípravě koloidního stříbra byl použit roztok dusičnanu stříbrného, amoniaku, hydroxidu sodného a maltosy. K dusičnanu stříbrnému byl přidán roztok amoniaku za vzniku diaminstříbrného komplexu, který byl následně redukován maltosou v alkalickém prostředí. Redukce byla prováděna za neustálého míchání na elektrické míchačce. Konečná koncentrace dusičnanu stříbrného byla 10^{-3} mol/L, amoniaku $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L, hydroxidu sodného $9,6 \cdot 10^{-3}$ mol/L a maltosy 10^{-2} mol/L. Po redukci byla změřena průměrná velikost částic metodou DLS na přístroji Zeta Plus Analyzer (Brookhaven, USA), vznikly částice s velikostí 31,5 nm. Velikost nanočástic stříbra byla potvrzena snímkem z elektronového mikroskopu

JEM 2010 (Jeol, Japan), (obr. 13). Absorpční spektrum bylo proměřeno na spektrofotometru Specord S 600 (Analytik Jena, Germany) s křemennými kyvetami. V grafu č. 1 je pak znázorněno absorpční maximum při vlnové délce 405 nm, které je charakteristické pro nanočástice stříbra a je označováno jako povrchový plasmon.



Graf 1. Absorpční spektrum připraveného koloidního stříbra (koncentrace Ag 10 mg/L)



Obr. 13. TEM snímek nanočástic stříbra po jejich přípravě

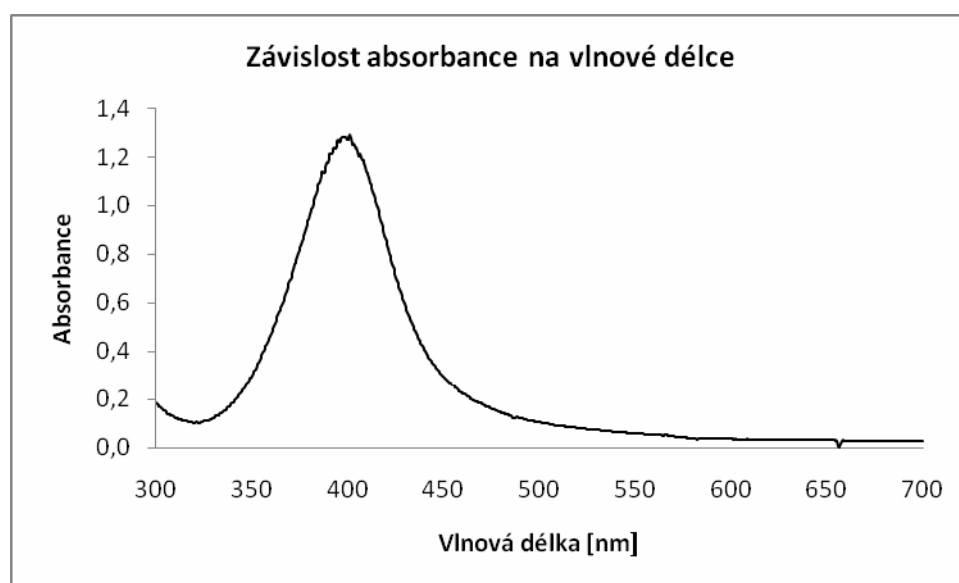
7.4 KONCENTROVÁNÍ KOLOIDNÍHO STŘÍBRA

Koncentrace připraveného koloidního stříbra činila pouze 100 mg/L. Bylo nutné koncentraci zvýšit, aby bylo dosaženo vyšších testovacích koncentrací stříbra a zároveň aby nedocházelo k přílišnému ředění kultivačního média.

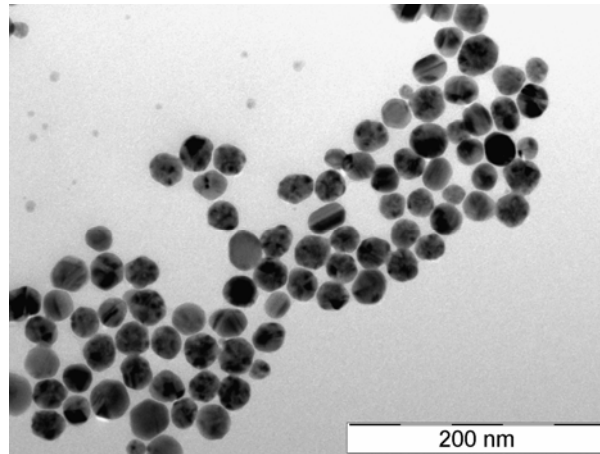
K zakoncentrování byla použita modifikovaná dialyzační metoda, při které se odčerpávalo disperzní prostřední přes polopropustnou membránu. Bylo použito deset dialyzačních trubic, do kterých byl nasypán 1 g kopolymeru poly(acrylate-co-vinylalcohol). Dialyzační proces probíhal 96 hodin. Kopolymer absorboval vodné disperzní prostředí, docházelo k jeho bobtnání a po ukončení procesu vyplnil celou dialyzační tubici. [1]

Po 96 hodinách se objem disperze zmenšil z původních 1000 ml na 270 ml. Výsledná koncentrace koloidního stříbra byla 400 mg/L. Po zakoncentrování disperze nanočástic stříbra byla změřena velikost částic metodou DLS, která mírně vzrostla na průměrnou hodnotu 35 nm. V absorpčním spektru byl zaznamenán mírný pokles v absorbanci při vlnové délce 405 nm, což souvisí se ztrátou určitého množství stříbra v průběhu procesu koncentrování. Velikost částic byla rovněž ověřena na elektronovém mikroskopu. Z obrázku je patrné, že nanočástice po zkoncentrování si zachovávají svoji velikost a nedochází u nich k agregaci.

Vedle stříbra koloidního se pro srovnání experimentovalo i se stříbrem iontovým o stejné koncentraci. Množství koloidního i iontového stříbra bylo zkontrolováno metodou atomové absorpční spektroskopie.



Graf 2. Absorpční spektrum zakoncentrovaného koloidního stříbra (koncentrace Ag 10 mg/L)



Obr. 14. TEM snímek nanočástic stříbra po jejich zakoncentrování

7.5 APLIKACE STŘÍBRA NA ŘASY

Po 14 dnech byly řasy a sinice dostatečně v kultivační místnosti namnoženy a mohlo se aplikovat koloidní a iontové stříbro. Aplikace byla prováděna ve flow boxech, aby byla zajištěna sterilita prostředí. Testovány byly koncentrace 0,3 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 9 mg/L a 30 mg/L koloidního i iontového stříbra. Dvě kontrolní Erlenmeyerovy baňky obsahovaly pouze řasu (příp. sinici) s médiem.

Po aplikaci stříbra byly všechny baňky (včetně baněk kontrolních) doplněny sterilní vodou do celkového objemu 270 ml. Po přidání koloidního a iontového stříbra byly baňky ještě další tři dny v kultivační místnosti ponechány.

7.6 VYHODNOCENÍ

Na posouzení vlivu koloidního a iontového stříbra byly použity dvě metody: metoda stanovení množství chlorofylu a pomocí spektrofotometru a vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází k posouzení procentového zastoupení jednotlivých barviv.

7.6.1 SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA

Z každého vzorku bylo odebráno 160 ml kultury řasy, která byla zcentrifugována na centrifuze EBA 20. Při stanovení řas i sinic se centrifugovalo pět minut při 2000 otáčkách. Médium bylo slito a zcentrifugovaný obsah byl nalit do třecí misky. Byla přidána jedna lžička mořského písku, na špičku nože CaCO_3 a pět ml acetonu. Vše se třelo v misce minimálně pět minut. Při stanovení chlorofylu a byl obsah slit do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněn acetonem. Podle potřeby byl použit ultrazvuk.

Před spektrofotometrickým stanovením bylo nutné oddělit výluh od písku. K tomu byla opět použita centrifuga, tentokrát se centrifugovalo pět minut při 2500 otáčkách. Vzorek bez obsahu písku byl odpipetován do křemenné kyvety a provedlo se měření. Jako slepý vzorek byl použit čistý aceton.

Koncentrace chlorofylu a ve vzorcích byla dopočítána pomocí rovnice:

$$\text{chlorofyl } a = 9,784 \cdot A_{662} - 0,990 \cdot A_{644} \quad (1)$$

kde A je absorbance při příslušné vlnové délce a šířce kyvety 1 cm. Množství chlorofylu a se udává v jednotkách $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. [1]

7.6.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE S REVERZNÍ FÁZÍ (REVERSED-PHASE HPLC)

Získaný extrakt barviv v acetonu byl analyzován metodou HPLC s reverzní fází na přístroji Alliance 2695 Separations Module (Waters, USA). K separaci byla použita kolona 250/4 RP 18 (Lichrocart, Germany), k detekci pak PDA detektor 2996 (Waters, USA). Touto metodou bylo stanoveno poměrné zastoupení fotosyntetických barviv ve vzorku extraktu. Sledovali se tyto barviva: neoxanthin, violaxanthin, anteraxanthin, zeaxanthin, lutein, chlorofyl a, chlorofyl b a beta-karoten. Barviva neoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin a lutein patří do skupiny xantofylů.

Metodou HPLC byla stanovena pouze řasa *Scenedesmus subspicatus*, protože sinice *Chroococcales minutus* nenarostla v potřebném množství.

8 VÝSLEDKY

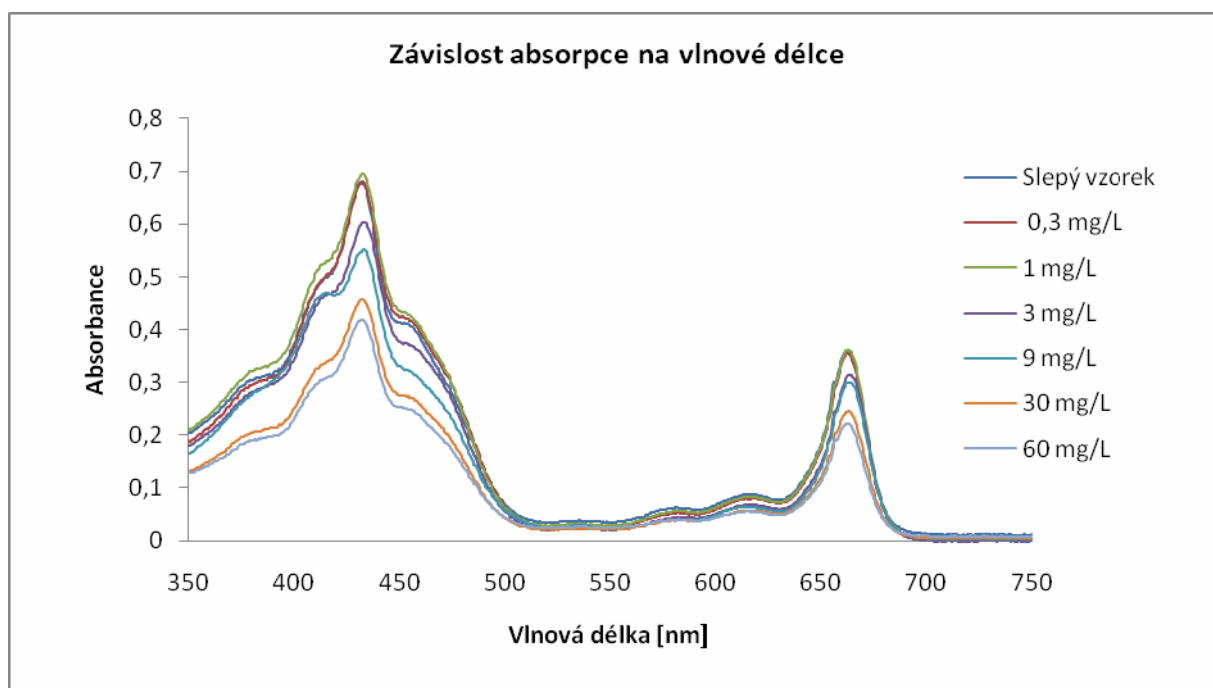
Množství chlorofylu a ve vzorcích řas a sinic se zjišťovalo spektrofotometricky. Koncentrace chlorofylu a byla vypočítaná podle rovnice (1). Výsledné hodnoty množství chlorofylu a v závislosti na koncentraci koloidního stříbra jsou uvedeny v tabulkách č. 2 a 4, v závislosti na koncentraci iontového stříbra v tabulkách č. 3 a 5. Hodnoty absorpce vzorků v závislosti na koncentraci koloidního stříbra jsou vyneseny v grafech č. 3 a 9, v závislosti na koncentraci iontového stříbra v grafech č. 4 a 10.

Poměr jednotlivých barviv ve vzorcích byl sledován metodou HPLC. Výsledné zastoupení sledovaných barviv jsou uvedeny v grafech č. 5, 6, 7 a 8.

8.1 VÝSLEDKY VLIVU STŘÍBRA NA ŘASY

Koncentrace Ag ⁰ [mg/L]	Koncentrace chlorofylu <u>a</u> [mg/L]
Kontrolní vzorek	3,398
0,3	3,331
1	3,383
3	2,906
9	2,801
30	2,293
60	2,086

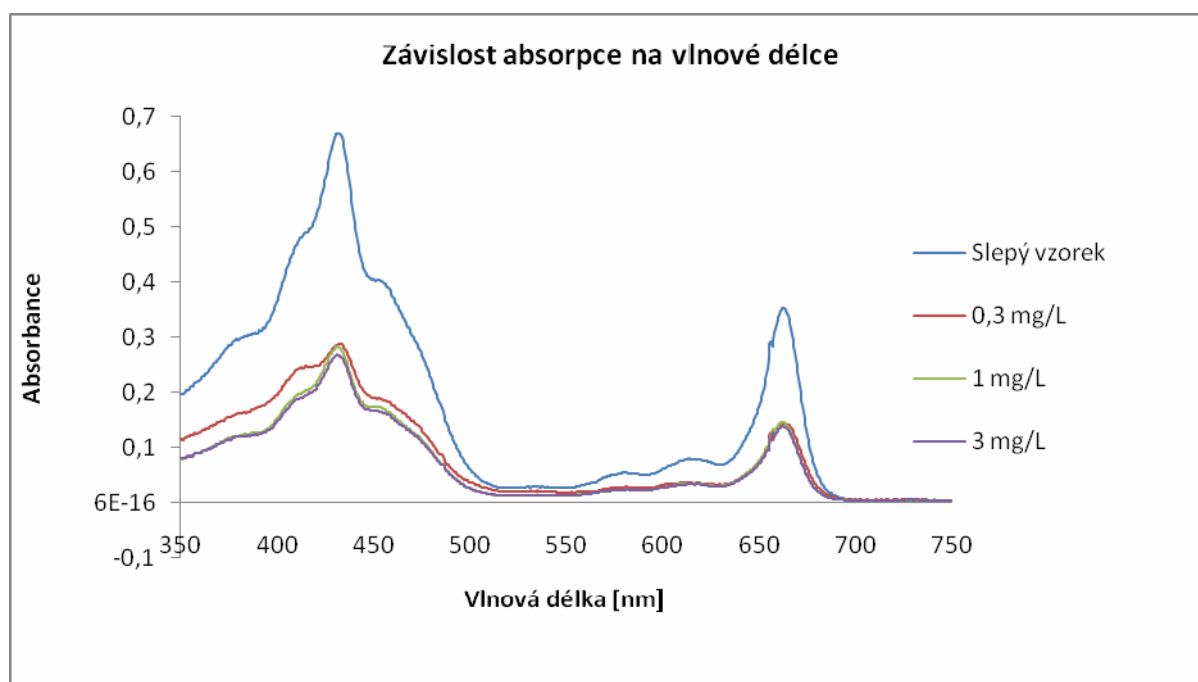
Tab. 2. Výsledné naměřené koncentrace chlorofylu a řasy *Scenedesmus subspicatus* v závislosti na koncentraci koloidního stříbra.



Graf 3. Absorpční spektra vzorků řasy *Scenedesmus subspicatus* v závislosti na koncentraci koloidního stříbra.

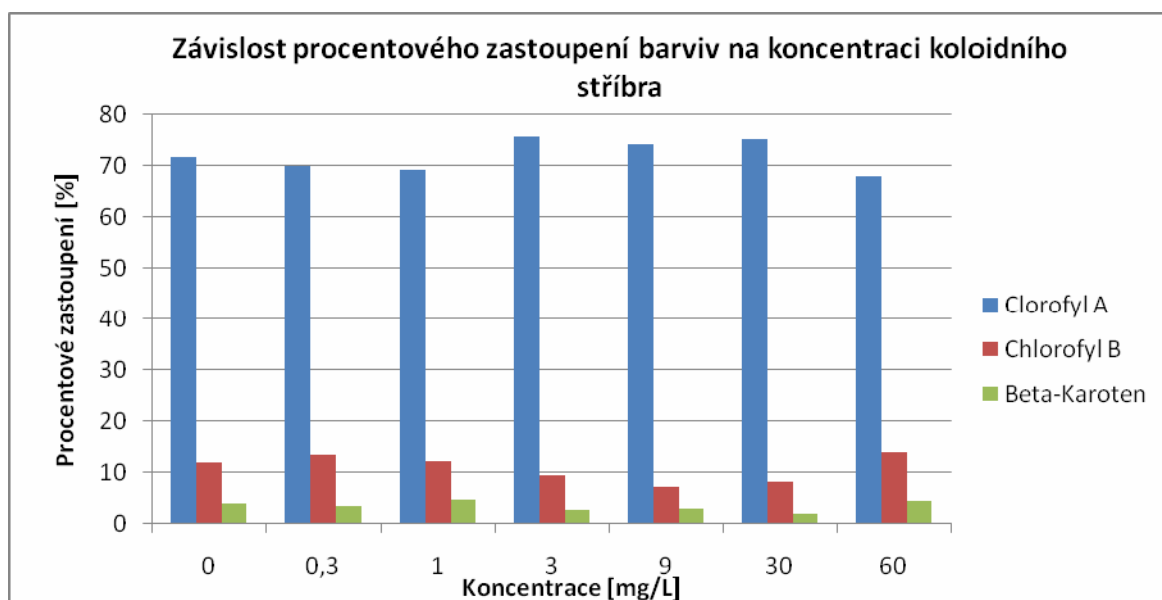
Koncentrace Ag ⁺ [mg/L]	Koncentrace chlorofylu <u>a</u> [mg/L]
Kontrolní vzorek	3,399
0,3	1,336
1	1,374
3	1,299
9	---
30	---

Tab. 3. Výsledné naměřené koncentrace chlorofylu a řasy *Scenedesmus subspicatus* v závislosti na koncentraci iontového stříbra.

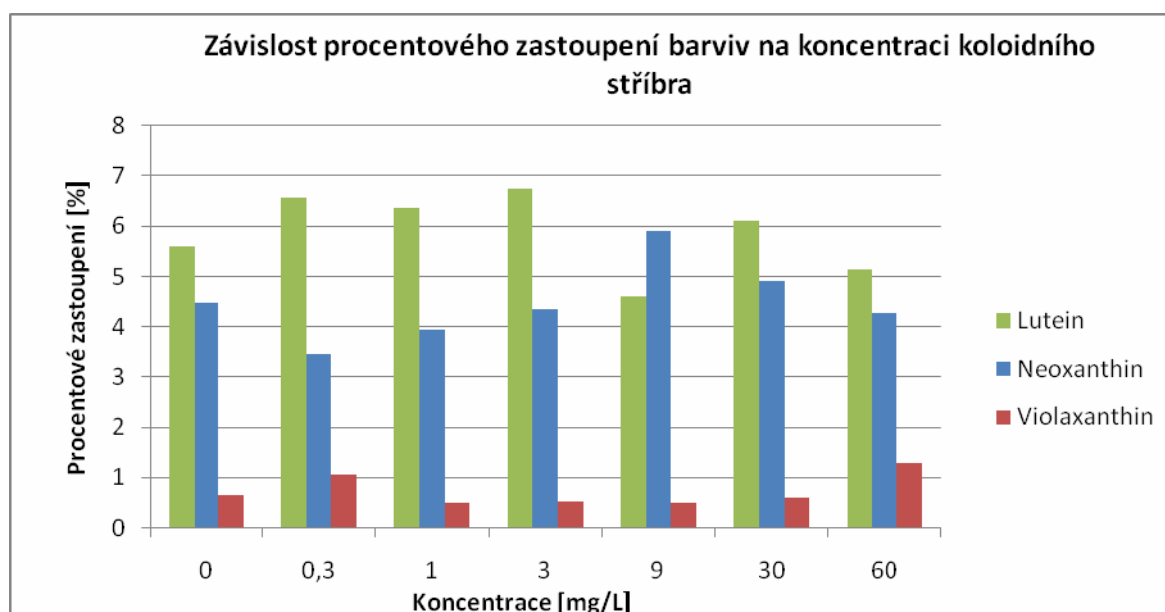


Graf 4. Absorpční spektra vzorků řasy *Scenedesmus subspicatus* v závislosti na koncentraci iontového stříbra.

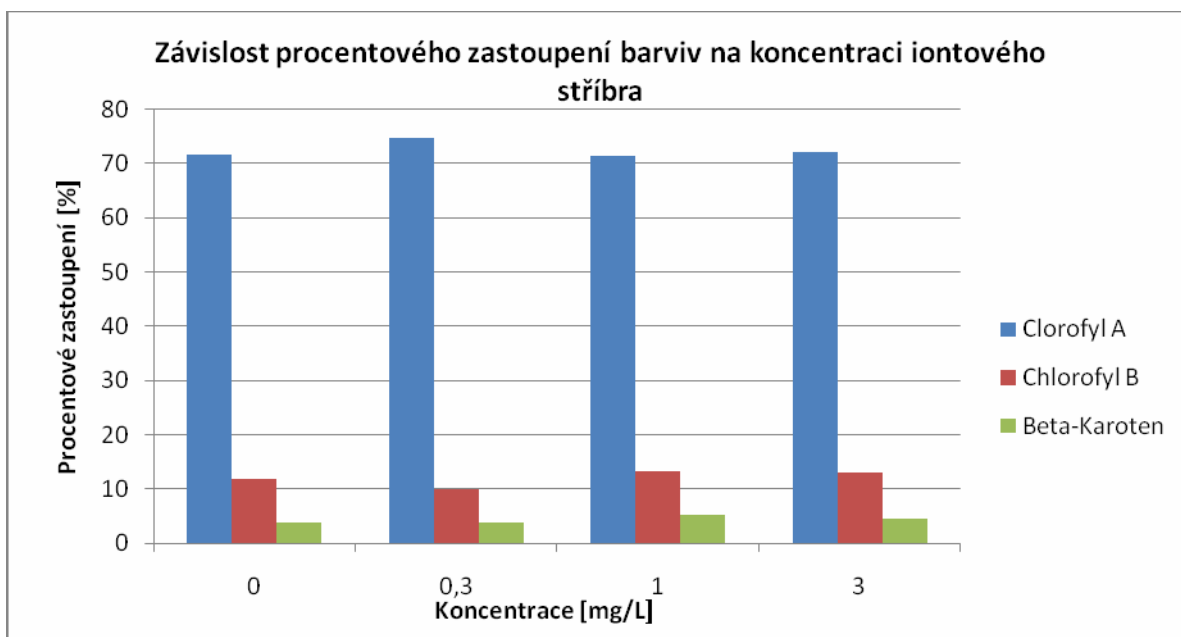
Metodou HPLC byl stanovován výsledný poměr jednotlivých barviv ve vzorcích s různou koncentrací koloidního a iontového stříbra. Z grafů je patrné, že poměr mezi jednotlivými barvivami se v závislosti na koncentraci koloidního a iontového stříbra výrazně nemění. Poměrné zastoupení analyzovaných barviv se pohybuje na velmi blízkých hodnotách pro všechny testované koncentrace stříbra.



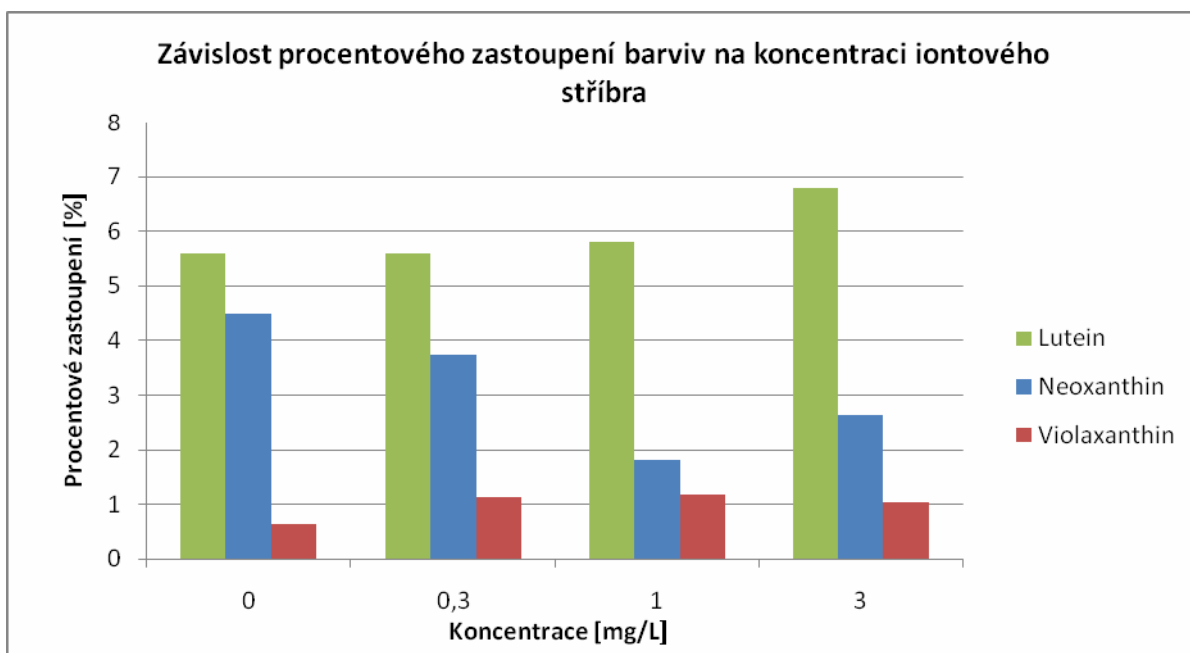
Graf 5. Srovnání procentového zastoupení chlorofylu a, chlorofylu b a beta-karotenu v závislosti na koncentraci koloidního stříbra.



Graf 6. Srovnání procentového zastoupení luteinu, neoxanthinu a violaxanthinu v závislosti na koncentraci koloidního stříbra.



Graf 7. Srovnání procentového zastoupení chlorofylu a, chlorofylu b a beta – karotenu v závislosti na koncentraci iontového stříbra.

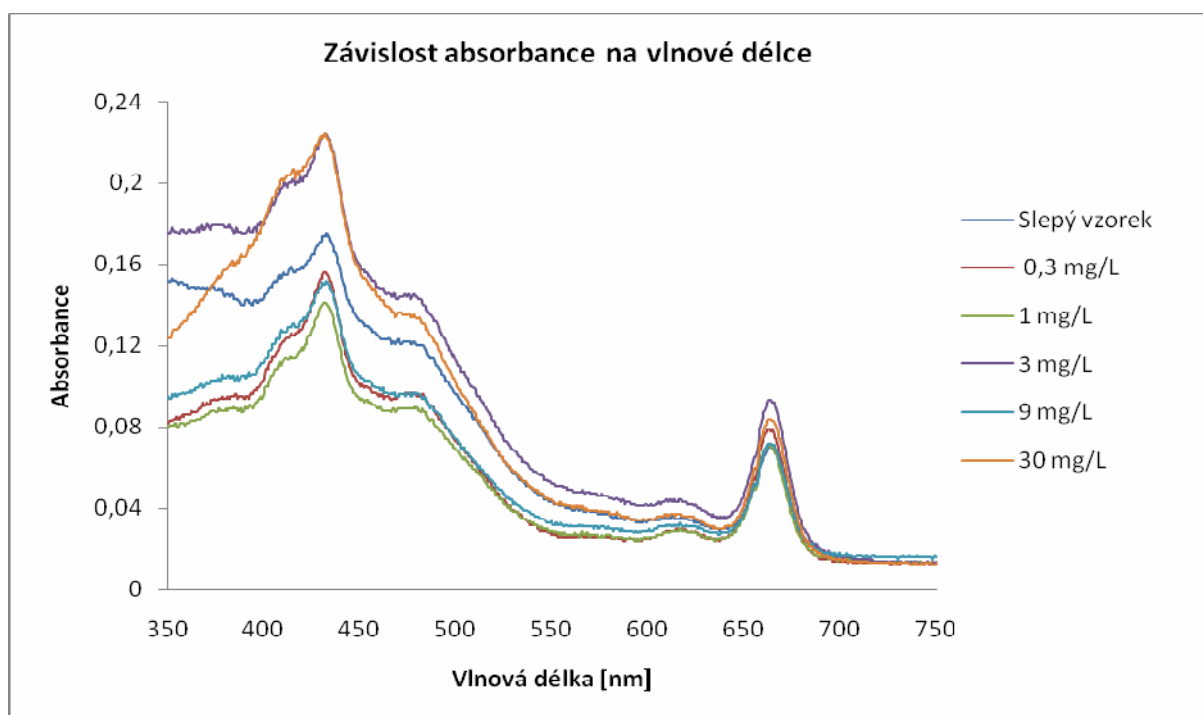


Graf 8. Srovnání procentového zastoupení luteinu, neoxanthinu a violaxanthinu v závislosti na koncentraci iontového stříbra.

8.2 VÝSLEDKY VLIVU STŘÍBRA NA SINICE

Koncentrace Ag ⁰ [mg/L]	Koncentrace chlorofylu <u>a</u> [mg/L]
Kontrolní vzorek	0,644
0,3	0,745
1	0,657
3	0,862
9	0,665
30	0,780

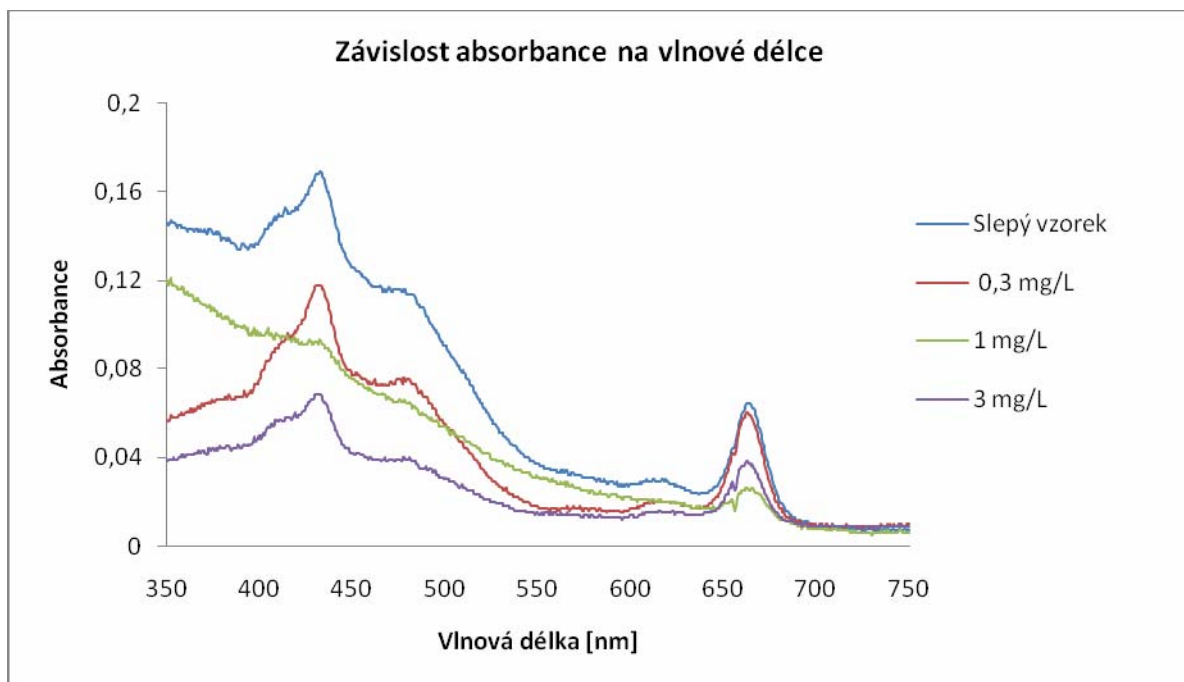
Tab. 4. Výsledné naměřené koncentrace chlorofylu a sinice *Chroococcales minutus* v závislosti na koncentraci koloidního stříbra.



Graf 9. Absorpční spektra vzorků sinice *Chroococcales minutus* v závislosti na koncentraci koloidního stříbra.

Koncentrace Ag^+ [mg/L]	Koncentrace chlorofylu <u>a</u> [mg/L]
Kontrolní vzorek	0,644
0,3	0,557
1	0,237
3	0,346
9	---
30	---

Tab. 5. Výsledné naměřené koncentrace chlorofylu a sinice *Chroococcales minutus* v závislosti na koncentraci iontového stříbra.



Graf 10. Absorpční spektra vzorků sinice *Chroococcales minutus* v závislosti na koncentraci iontového stříbra.

9 DISKUZE

9.1 STUDIUM TOXICKÉHO VLIVU STŘÍBRA NA ŘASY

Pro studium vlivu koloidního a iontového stříbra na zelenou řasu rodu *Scenedesmus subspicatus* byla vybrána metoda stanovení množství chlorofylu a pomocí spektrofotometru a metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie, kterou se stanovovalo procentové zastoupení vybraných barviv.

Koloidní stříbro nevykazovalo řasám téměř žádnou toxicitu. Pro kontrolu byl proveden experiment, při kterém byly řasy vystaveny koncentraci koloidního stříbra 60 mg/L, a i v tomto případě vzorek obsahoval 2,086 mg/L chlorofylu a. Obsah chlorofylu a s rostoucí koncentrací koloidního stříbra mírně klesal.

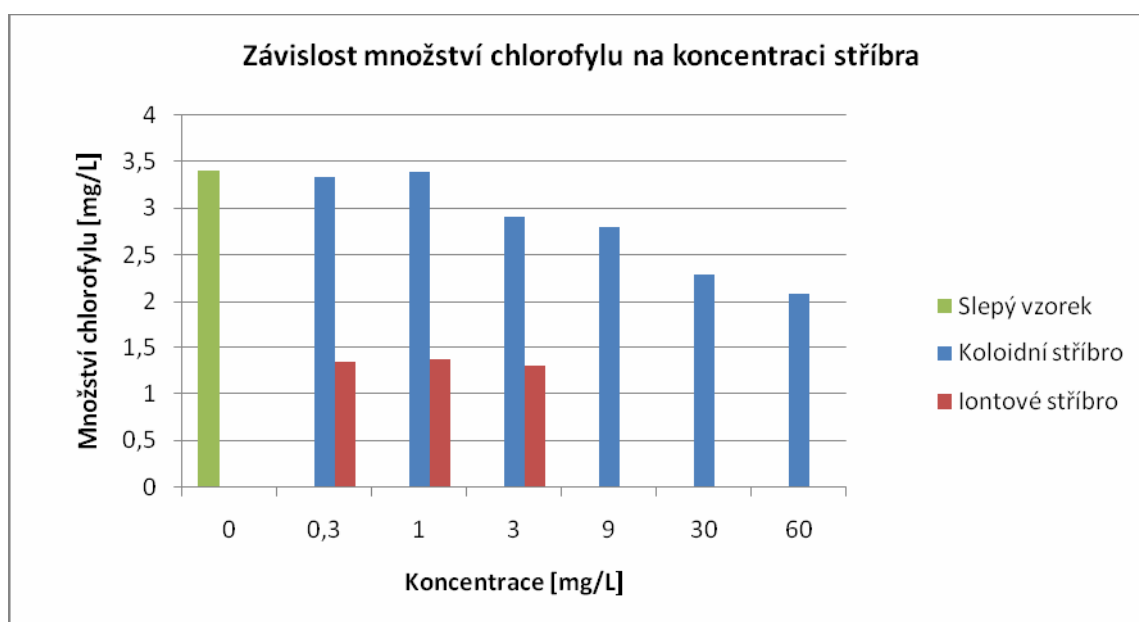


Obr. 15. Barevné srovnání vzorku *Scenedesmus subspicatus* s přidavkem koloidního stříbra (zleva vzorek kontrolní, dále vzorky o koncentraci 0,3 mg/L-30 mg/L).

Iontové stříbro, na rozdíl o stříbra koloidního, vykazovalo toxicitu k řasám rodu *Scenedesmus subspicatus* vyšší. Množství chlorofylu a ve srovnání s kontrolním vzorkem klesalo. Ve vzorcích s koncentrací iontového stříbra 9 mg/l a 30 mg/L se nenacházela žádná řasy, proto lze tyto koncentrace považovat za toxické.



Obr. 16. Barevné srovnání vzorku *Scenedesmus subspicatus* s přidavkem iontového stříbra (zleva vzorek kontrolní, dále vzorky o koncentraci 0,3 mg/L-30 mg/L).



Graf 11. Srovnání množství chlorofylu ve vzorcích řasy *Scenedesmus subspicatus* s různou koncentrací koloidního a iontového stříbra.

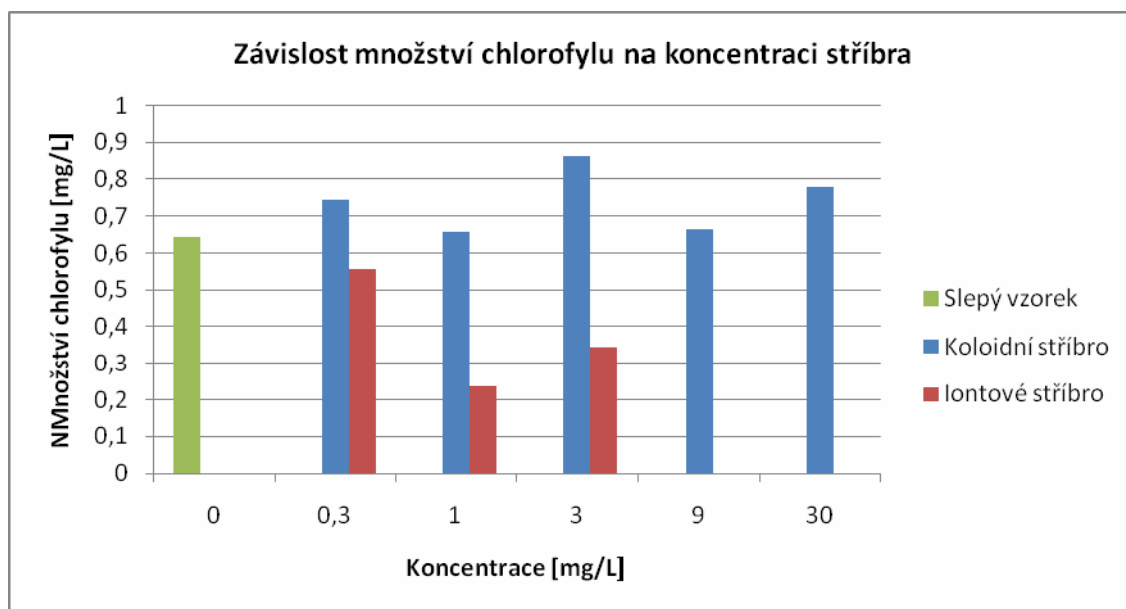
Je-li řasa vystavena působení toxické látky, tzn., že je ve stresu, tak možnou reakcí je změna v poměru fotosyntetických barviv. Dochází především k úbytku množství chlorofylu a a chlorofylu b, beta-karoten a ostatní barviva naopak své zastoupení zvyšují.

Jako vyhodnovací metoda byla zvolena HPLC, u které se stanovovalo poměrové zastoupení jednotlivých barviv. Na základě výsledků HPLC metody lze konstatovat, že nanočástice stříbra a iontové stříbro nevyvolávají v řase *Scenedesmus subsipatus* produkci specifických pigmentů. Úbytek chlorofylu je tedy zřejmě dán úhynem buněk vlivem toxického působení stříbra. Řasy mohly být usmrceny nebo mohlo docházet ke snížení kvantového výtěžku fotosyntézy. [19]

9.2 STUDIUM TOXICKÉHO VLIVU STŘÍBRA NA SINICE

Koloidní stříbro působilo na sinice rodu *Chroococcales minutus* srovnatelně, jako na řasy. Jednotlivá množství chlorofylu \underline{a} se liší jen nepatrně.

Toxicita iontového stříbra na sinice rodu *Chroococcales minutus* byla opět vyšší než toxicita stříbra koloidního. Množství chlorofylu \underline{a} s rostoucí koncentrací iontového stříbra klesá až do koncentrace 1 mg/L. U koncentrace 3 mg/L množství chlorofylu \underline{a} mírně vzrostlo. Zvýšení mohlo být způsobené UV záření (pocházející z kultivační místnosti) mohlo dojít k redukci iontového stříbra na kovové, které vykazuje toxicitu nižší. Ve vzorku s 9 mg/L a 30 mg/L iontového stříbra se nenacházela žádná kultura sinic, vzorek proto nebyl změřen. Tyto koncentrace lze považovat za toxické.



Graf 12. Srovnání množství chlorofylu ve vzorcích *Chroococcales minutus* s různou koncentrací koloidního a iontového stříbra.

10 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá studiem interakce koloidního a iontového stříbra s fotosyntetickými pigmenty zelených řas *Scenedesmus subspicatus* a sinic *Chroococcales minutus*. Jsou zde prezentovány výsledky obsahů chlorofylu a v jednotlivých vzorcích naměřené spektrofotometrickou metodou a výsledky procentového zastoupení jednotlivých fotosyntetických barviv naměřené vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s reverzní fází.

Koloidní stříbro vykazovalo na vybrané druhy sinic a řas minimální toxicitu. Množství chlorofylu a ve slepém vzorku je téměř srovnatelné s obsahem chlorofylu a ve všech sledovaných koncentracích. U řasy *Scenedesmus subspicatus* lze považovat za toxickou až koncentraci přesahující 60 mg/l. Koloidní stříbro působilo na řasy a sinice analogicky.

Iontové stříbro vykazovalo toxicitu výrazně vyšší, než stříbro koloidní. Množství chlorofylu a u řas i sinic s rostoucí koncentrací iontového stříbra klesalo, koncentrace 9 mg/L a 30 mg/L byla natolik toxická, že došlo k úhynu všech organismů a výsledná koncentrace chlorofylu a byla tedy nulová. Nejnižší sledovaná koncentrace iontového stříbra (0,3 mg/L) měla za následek snížení množství chlorofylu a více jak o polovinu vzhledem k množství ve slepém vzorku. Iontové stříbro působilo na řasy a sinice také analogicky.

Metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází bylo zjištěno, že jednotlivé zastoupení fotosyntetických barviv neoxanthinu, violaxanthinu, anteraxanthinu, zeaxanthinu, luteinu, chlorofylu a, chlorofylu b a beta-karotenu v řase *Scenedesmus subspicatus* se v závislosti na rostoucí koncentraci koloidního a iontového stříbra výrazně neměnilo. Lze tedy říci, že koloidní i iontové stříbro nemají vliv na poměrné zastoupení výše uvedených fotosyntetických barviv.

11 SUMMARY

This bachelor thesis deals with the study of silver nanoparticle and ionic silver toxicity to the algae species *Scenedesmus subspicatus* and cyanobacteria species *Chroococcales minutus*. Absorption spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography were used for the quantity determination of chlorophyll a and for separation analysis of photosynthetic pigments respectively.

Silver nanoparticles did not show any toxicity to tested algae and cyanobacteria for all tested concentrations expect the value equal to 60 mg/L of Ag which can be consider as concentration with little toxic effect.

On contrary, ionic silver showed high toxicity to tested algae and cyanobacteria. The concentration of chlorophyll a decreased with increasing concentration of ionic silver. Ionic silver wit the concentrations 9 mg/L and 30 mg/L can be consider as highly toxic concentrations to algae and cyanobacteria.

Colloid silver and ionic silver had no influence on the percentual representation of photosynthetic pigments based on the results obtained from HPLC analysis. There were analyzed following pigments: neoxanthin, violaxanthin, anteraxanthin, zeaxanthin, lutein, chlorophyl a, chlorophyl b and beta-caroten.

12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AMBROŽOVÁ, Jarmila. *Studium toxických účinků stříbra na vybrané druhy řas*. Olomouc, 2009. 78 str. Diplomová práce. UPOL. (str.9-24,53,56).
2. PRNKA, Tasilo; ŠPERLINK, Karel. *Bionanotechnologie, nanobiotechnologie, nanomedicína* [online]. 2006 [cit. 2010-02-17]. Dostupné z WWW: <<http://www.nanotechnologie.cz/storage/nanotechnologie200610.pdf>>.
3. KVÍTEK, Libor, et al. Nanočástice stříbra - příprava, vlastnosti a aplikace. *Nanocon* [online]. 2009, [cit. 2010-04-15]. Dostupný z WWW: <<http://konference.tanger.cz/data/nanocon2009/sbornik/Lists/Papers/008.pdf>>.
4. KOMERS, Karel. *Základy koloidní chemie*. vyd. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1996. 64 s. (str. 1-12, 18-29).
5. PANÁČEK, Aleš; KVÍTEK, Libor. *Základy koloidní chemie*. vyd. 1. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 70 s. (str. 7-18, 24-45).
6. BRDLIČKA, Rudolf; DVOŘÁK, Jiří. *Základy fyzikální chemie*. vyd. 2. Praha: Academia, 1977. 850 s. (str. 632–649).
7. ŠČUKIN, E. D.; PERCOV, A. V.; AMELINOVÁ, E. A. *Koloidní chemie*. vyd. 1. Praha: Academia, 1990. 484 s. (str. 16, 203-243).
8. FISCHER, Oldřich, et al. *Fyzikální chemie: Termodynamika, elektrochemie, kinetika, koloidní soustavy*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1983. 322 s. (str. 300-303).
9. PRUCEK, Rober; KVÍTEK, Libor; HRBÁČEK, Jan. Silver colloids – methods of preparation and utilization. *CHEMICA 43* [online]. 2004, vol. 43, [cit. 2010-02-12]. Dostupný z WWW: <<http://chemie.upol.cz/acta/accepted/prucek.pdf>>.
10. PANÁČEK, Aleš, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization and their antibacterial activity . *The journal of Physical Chemisty B*. 2006, vol. 110, no. 33, s. 16248-16253.
11. NEŠMĚRÁK, Karel, *Toxikologie*, [online], přednáška č. IX. Dostupný z www: <http://web.natur.cuni.cz/~nesmerak/>
12. SPÍŽEK, Jaroslav. Rezistence na antibiotika. *Vesmír 78* [online]. 1999, [cit. 2010-02-26]. Dostupný z WWW: <<http://www.vesmir.cz/clanky/clanek/id/676>>.
13. PAVLÍKOVÁ, Daniela, et al. *Ekotoxikologie*. vyd. 2. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2008. 171 str. (str. 3-7, 12-22, 124-135).

14. PROKEŠ, Jaroslav. *Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. vyd. 1. Praha: Karolinum, 2005. 248 s. (str. 13-16, 109-111).
15. MONTEIRO-RIVIERE, Nancy A. *Nanotoxicology: characterization, dosin and health effects*. New Yor : Informa Healthcare USA, 2007. 434 s. (str 267-348).
16. MIURA, Nobuhiko; SHINOHARA, Yasushi. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009, s. 733-737.
17. HeLa In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 2009, 2010 [cit. 2010-05-04]. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/HeLa>>.
18. HANDY, Richard D.; OWEN, Richard; VALSAMI-JONES, Eugenia. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* [online]. 2008, vol. 17, [cit. 2010-03-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/940g431151604721/fulltext.pdf>>.
19. NAVARRO, Enrique, et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*. 2008, vol. 17, s. 372-386.
20. SAXENA, Dinesh Kumar; SAIFUL-ARFEEN, Md. Effect of Cu and Cd on Oxidative Enzymes and Chlorophyll Content of Moss *Racomitrium crispulum*. *Taiwania*. 2009, 4, s. 365-374.
21. MARCANO, Letty Beatriz C. , et al. Effect of Cadmium on Cellular Viability in Two Species of Microalgae (*Scenedesmus* sp. and *Dunaliella viridis*). *Biol Trace Elem Res*. 2009, 130, s. 86–93.
22. Purdue University. Popular nanoparticle causes toxicity in fish, study shows. *ScienceDaily* [online]. 2010, [cit. 2010-03-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedaily.com/releases/2010/03/100302123126.htm>>.
23. KVÍTEK, Libor, et al. Initial Study on the Toxicity of Silver Nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *The journal of Physical Chemistry B*. 2009, no. 113, s. 4296–4300.
24. GARBER, Cathy. Toxicity of nanoparticles in aquatic environments. *Nanowerk Spotlight* [online]. 2007, [cit. 2010-03-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=2491.php>>.

25. AHAMED, Maqusood, et al. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010, no. 242, s. 263-269.
26. KALINA, Tomáš; VÁŇA, Jiří. *Systém a vývoj sinic a řas*. Praha: Karolinum, 1995. 165 s. (str. 20-24, 32-38, 98-105, 115-120).
27. HINDÁK, František, et al. *Sladkovodné riasy*. vyd. 1. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 1978. (str. 34, 132-135, 143, 473).
28. KOMÁREK, Jiří, et al. *Sinice a řasy* [online]. [cit. 2010-03-09]. Dostupné z WWW: <www.sinicearasy.cz>.
29. HNILÍČKA, František, et al. *Základy fytotechniky*. vyd. 1. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2005. 242 s. (str. 190-191).
30. POULÍČKOVÁ, Aloisie; JURČÁK, Jaroslav. *Malý obrazový atlas sinic a řas*. vyd. 1. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2001. 81 s. (str. 19, 22-24).
31. KALINA, Tomáš; VÁŇA, Jiří. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. vyd. 1. Praha: Karolinum, 2005. 606 s. (str. 44-48, 60, 459-461, 471-474).
32. URBAN, Zdeněk; KALINA, Tomáš. *Systém a evoluce nižších rostlin*. vyd. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1980. (str. 37-50).

13 PŘÍLOHA

Výstupní data získané při separační analýze fotosyntetických barviv metodou HPLC.