

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra ekologie a životního prostředí



Nanočástice železa a jejich interakce se složkami potravního
řetězce ve vodách

Iron nanoparticles and their interactions with trophic chain components
in aquatic ecosystems

Iveta Navrátilová

Bakalářská práce

předložená

na Katedře ekologie a životního prostředí

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků

na získání titulu Bc. v oboru

Ekologie a ochrana životního prostředí

Vedoucí práce: doc. RNDr. Martin Rulík, Ph.D.

Olomouc 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením doc. RNDr. Martina Rulíka, Ph.D. a jen s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci dne 18. července 2020

.....

Navrátilová, I. (2020): Nanočástice železa a jejich interakce se složkami potravního řetězce ve vodách. Bakalářská práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 52 pp., v češtině.

Abstrakt

Aplikace uměle vytvořených nanočástic do vodního prostředí přináší mnohdy žádané pozitivní účinky v podobě dekontaminace znečištěných vod. Nicméně druhou stranou mince je hromadění těchto částic v životním prostředí a jejich potenciál ovlivnit organismy v něm žijící. Předmětem této bakalářské práce je především studium bioakumulace nanočástic nulavalentního železa (nZVI) na hrotnatku velkou (*Daphnia magna*) a plovatku bahenní (*Lymnaea stagnalis*) v laboratorních podmínkách. V experimentu byly modelové organismy vystaveny různým koncentracím nZVI po dobu 24 h. Analýza dat prokázala značnou akumulaci nZVI v hrotnatkách i v defekátech plovatek. U hrotnatek byla v reakci na nZVI pozorována zvýšená úmrtnost jedinců dosahující až 15 % na testovanou skupinu. Tyto znalosti by mohly vést k hlubšímu poznání vlivu nZVI na organismy a postupu nanočástic potravním řetězcem až k člověku.

Klíčová slova: nanočástice, železo, nZVI, akumulace, toxicita, *Daphnia magna*, *Lymnaea stagnalis*

Navrátilová, I. (2020): Iron nanoparticles and their interactions with trophic chain components in aquatic ecosystems. Bachelor's Thesis, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, 52 pp., in Czech.

Abstract

Application of synthetic nanoparticles into the aquatic ecosystem often brings positive effects in the form of decontamination of polluted waters. However, there may be a problem with the accumulation of these particles in the environment and their potential to affect organisms living in it. The subject of this bachelor thesis is mainly the study of the bioaccumulation of nano zero-valent iron (nZVI) in *Daphnia magna* and *Lymnaea stagnalis* under laboratory conditions. Model organisms were exposed to various concentrations of nZVI for 24 h. Data analysis showed a significant accumulation of nZVI in *Daphnia* and in defecates of *Lymnaea*. Increased mortality of *Daphnia* up to 15% per test group was observed in response to iron. This knowledge could lead to a better understanding of the influence of nZVI on organisms and their interactions with trophic chain components.

Keywords: nanoparticles, iron, nZVI, accumulation, toxicity, *Daphnia magna*, *Lymnaea stagnalis*

Obsah

Seznam tabulek	vii
Seznam obrázků	viii
Poděkování	ix
1. Úvod	10
1.1 Nanomateriály	10
1.2 Nanočástice železa	15
2. Cíle práce	19
3. Materiál a metody	20
3.1 Experimentální organismy a jejich kultivace	20
3.2 Nanočástice nulavalentního železa	21
3.3 Bioakumulace	21
3.3.1 V prostředí bez řasy	21
3.3.2 V prostředí s řasou	23
3.3.3 Vlastnosti vody během experimentu	23
3.4 Experiment s plovatkami	24
3.5 Statistika	24
4. Výsledky	25
4.1 Obsah bioakumulovaného železa v sušině hrotnatek	25
4.2 Počet uhynulých jedinců hrotnatek	26
4.3 vlastnosti vody	28
4.4 Plovatky	30
5. Diskuze	31
6. Závěr	34
7. Literatura	35
8. Přílohy	43

Seznam tabulek

Tab. 1 Procentuální množství uhynulých jedinců	27
Tab. 2 Obsah železa v exkrementech plovatek	30

Seznam obrázků

Obr. 1 Červené šipky znázorňují možné trasy nanočástic (žluté body) ve vodním prostředí: (1) potenciál biomagnifikace, agregace na primární producenty, (2) kumulace částic zooplanktonem a zoobentosem, (3) přenos do vyšších trofických úrovní (Bundschuh et al. 2016)	13
Obr. 2 Schéma adsorpce nanočástic (červené body) na modelový organismus <i>Daphnia sp.</i> (Ma & Lin 2013)	14
Obr. 3 Nanočástice nulvalentního železa vytvořené redukcí FeCl_3 za pomoci NaBH_4 (Li et al. 2006).....	15
Obr. 4 Model struktury nanočástice kovového železa s příkladem probíhajících dějů (Nováková et al. 2009).....	16
Obr. 5 Aparatura ke kultivaci řasy (foto I. Navrátilová).....	20
Obr. 6 Trojice akvárií s perloočkami a rozdílnými koncentracemi nZVI, pět opakování (foto I. Navrátilová)	22
Obr. 7 Hrotnatka s akumulovaným nZVI (1) na tykadlech, (2) ve střevě, (3) na exoskeletu (foto I. Navrátilová)	25
Obr. 8 Obsah železa (mg/g) v sušině bez řasy	26
Obr. 9 Obsah železa (mg/g) v sušině s řasou	26
Obr. 10 Počet uhynulých jedinců v prostředí bez řasy.....	27
Obr. 11 Počet uhynulých jedinců v prostředí s řasou.....	27
Obr. 12 Vývoj teploty vody během experimentu v závislosti na čase (průměr z pěti opakování).....	28
Obr. 13 Vývoj konduktivity během experimentu v závislosti na čase (průměr z pěti opakování).....	28
Obr. 14 Vývoj obsahu O_2 (ml/l) v závislosti na čase (průměr z pěti opakování).....	29
Obr. 15 Vývoj nasycení vody O_2 (%) v závislosti na čase (průměr z pěti opakování) ...	29
Obr. 16 Vývoj hodnoty pH během experimentu v závislosti na čase (průměr z pěti opakování).....	30

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. RNDr. Martinu Rulíkovi, Ph.D. za odbornou pomoc, přínosné konzultace a čas, který mi věnoval. Taktéž děkuji Mgr. Lukáši Weberovi a RNDr. Petru Hekerovi, Ph.D. za jejich vstřícnost, ochotu a pomoc při získání potřebných informací. Mé poděkování patří také Mgr. Janu Filipovi, Ph.D., Mgr. Ivovi Medříkovi a RNDr. Michalu Šorfovi Ph.D. za poskytnutí materiálu a vybavení. V neposlední řadě děkuji svým rodičům, kteří mi umožnili studovat vysokou školu a podporovali mě, a také mému příteli za podporu a trpělivost během celého studia.

1. Úvod

1.1 Nanomateriály

Existenci částic v nano-velikosti předpokládáme od samotného vzniku Země (Guzmán et al. 2006). Přírodní nanočástice (z anglického *nanoparticles* = NP) se objevují v sopečném prachu, většinou přírodních vod a půd (Handy et al. 2008). Jejich přítomnost dokazuje mimo jiné nález NP v jádrech ledových krystalů, jejichž stáří je datováno na 10 000 let (Murr et al. 2004). Je tedy zřejmé, že lidé byli vystaveni nanočásticím od nepaměti. V posledním století však expozice nanočásticím dramaticky vzrostla díky antropogenním zdrojům (Oberdörster et al. 2005). Během posledních 20 let stoupá celosvětová produkce nanomateriálů do tisíců tun ročně a stále se zvyšuje (Navarro et al. 2008; Sovová & Kočí 2012; The Royal Society 2004).

Evropská komise v roce 2011 definovala „nanomateriál“ jako materiál obsahující částice, jejichž velikost je alespoň v jednom ze tří vnějších rozměrů v rozsahu velikostí 1-100 nm (The European Commission 2011). Tato velikost odpovídá téměř stotisícině průměru lidského vlasu nebo přibližně polovině průměru DNA (Office of the Science Advisor 2007). Pro další účely práce využijí i definici evropské komise pro pojem „agregát“, jakož to částice složenou z pevně vázaných nebo sloučených částic (The European Commission 2011). Agregaci částic způsobují především Van der Waalsovy síly a magnetické interakce. Částice narostlé shlukováním do mikro či větších rozměrů ztrácí jejich specifické vlastnosti, reaktivitu a mobilitu (Nováková et al. 2009).

Dle způsobu vzniku dělíme nanomateriály do dvou skupin: přírodní a syntetické (Nowack & Bucheli 2007). Přírodní (přírodní) NP jsou produkovány nejrůznějšími geologickými a biologickými procesy, jako je fyzikálně-chemické zvětrávání, vulkanická aktivita či biologická tvorba organických nanomolekul (Handy et al. 2008). Jistě není třeba představovat popel, půdní koloidy, minerály, viry (Navarro et al. 2008; Office of the Science Advisor 2007). Všechny tyto složky jsou běžnou součástí vzduchu, vody i půdy, často v nemalém množství (Nowack & Bucheli 2007). Roční produkce atmosférického prachu v nanovelikosti je odhadována až na jednu miliardu tun ročně (Kellogg & Griffin 2006).

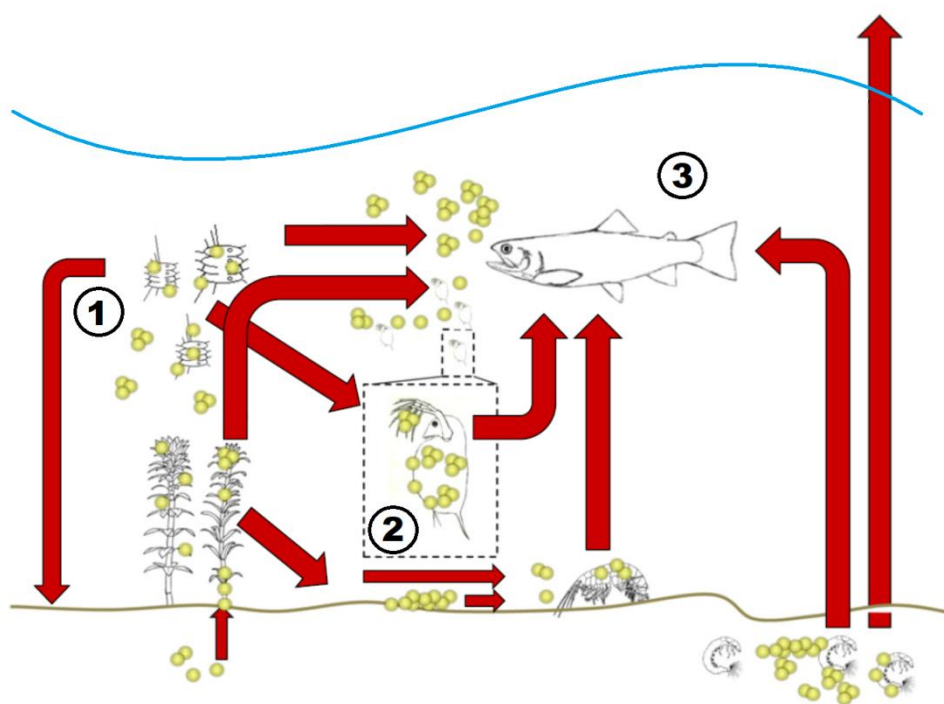
Za syntetické částice považujeme ty člověkem vytvořené (Li et al. 2006; Navarro et al. 2008; The European Commission 2011; Zhang 2003). Účelem výroby umělých NP je vytvoření materiálů se specifickými vlastnostmi. Tyto procesy se vyvíjejí a zdokonalují velmi rychle (The European Commission 2011). Předmětem mnoha výzkumů jsou možnosti jejich prospěšného využití i jejich nežádoucí účinky (Hughes et al. 2012; Xue et al. 2018). Umělé NP nacházejí uplatnění v řadě oblastí biomedicínské, farmaceutické, energetické, materiálové i environmentální aplikace (Navarro et al. 2008; Nowack & Bucheli 2007; The Royal Society 2004). Rovněž tvoří složku v široké škále produktů, jako jsou opalovací krémy, součástky lékařských a elektronických přístrojů a chemické katalyzátory (Office of the Science Advisor 2007). K nejvíce zkoumaným environmentálním nanotechnologickým aplikacím patří použití nanočástic nulamocného železa pro sanace podzemních vod (Mueller et al., 2012).

Problémovým odvětvím tohoto technologického rozmachu mohou být neúmyslně produkované nanomateriály, jako jsou částice výfukových plynů, zplodiny z nafty a jiné vedlejší produkty tření nebo spalování (Office of the Science Advisor 2007). To může být potíží především při úniku NP do přírody (Brandeburová et al. 2019), kdy mohou částice svými unikátními vlastnostmi ovlivnit ŽP i organismy v něm žijící (Čiháková et al. 2017). Bez ohledu na to, jak velké množství NP může uniknout, je potřeba věnovat pozornost možným dopadům na celou biosféru (Hund-Rinke & Simon 2006). NP mohou mít negativní vliv na přírodu a lidské zdraví, mohou vykazovat toxické vlastnosti či je u nich prokázána mutagenita (Moore 2006). V životním prostředí se tyto emitované NP shlukují do větších agregátů, které se následně dostávají do vody, půdy a sedimentů (Brandeburová et al. 2019). Některé NP mohou při vniknutí do živých tkání procházet buněčnými membránami nebo hematoencefalickou bariérou (Office of the Science Advisor 2007). Některé NP také interagují s proteiny, membránami, buňkami, DNA a organelami, představují řadu příležitostí k složitým dynamickým biochemickým procesům a změnám. Tyto interakce mohou vést k tvorbě proteinových korun, obalení částic, intracelulární absorpci částic a biokatalytickým procesům, které by mohly mít významný dopad na organismy vystavené NP (Nel et al. 2009). Bohužel znalosti o interakcích v nano a mikro měřítku jsou omezené a stále se čeká na úplné pochopení problematiky (Ma & Lin 2013).

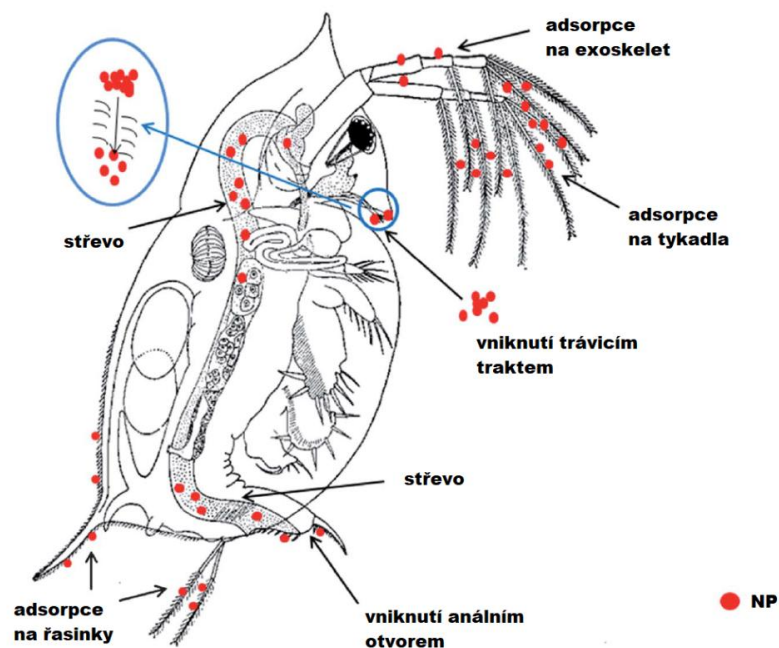
Pro posouzení rizik výskytu nanočástic v životním prostředí je nezbytné pochopit jejich mobilitu, reaktivitu a ekotoxicitu (Nowack & Bucheli 2007). Ve vodním prostředí mohou NP interagovat s mikroorganismy, vodními rostlinami, bezobratlými živočichy i obratlovci, a tím je vystavovat případné toxicitě. Základní a nejdůležitější rozhraní, kde dochází ke kontaktu, je mezi NP a buňkami (Ma & Lin 2013). Na povrchu buněk hydrofytů, řas a bakterií je buněčná stěna, jakož to nejsvrchnější vrstva, která přichází do styku s okolím (Jelínek & Zicháček 2007). Hlavní složkou buněčných stěn řas a rostlin je celulóza a pektin, zatímco u bakterií zde dominují peptidoglykany. Tvrdé buněčné stěny těchto organismů hrají důležitou roli při odolávání potenciálně škodlivých látek, včetně NP (Ma & Lin 2013). Živočišné buňky naproti tomu nedisponují buněčnou stěnou (Jelínek & Zicháček 2007). Od okolí a částic v něm obsažených je odděluje pouze membrána, skládající se z fosfolipidové dvojvrstvy (Ma & Lin 2013). Jakmile přijdou NP do styku s buněčnými povrchy, mohou být adsorbovány pomocí Van der Waalsových sil, elektrostatické přitažlivosti či specifických interakcí, jako např. vodíkových vazeb a interakcí receptor-ligand, v závislosti na povrchových vlastnostech NP i buněk (Nel et al. 2009).

Významné riziko může představovat také přijímání nanočástic v potravě, což by mohlo vést k naakumulování částic v potravním řetězci, viz Obr. 1 (Brandeburová et al. 2019). Jak je známo, ve vodním prostředí existují složité potravní sítě, které jsou oporou celého ekosystému (Jelínek & Zicháček 2007). První trofickou úroveň tvoří mikroskopické řasy a hydrofyty, jakož to primární producenti. U rostlin byla např. ve velké míře zaznamenána akumulace NP v kořenovém systému (Kim et al. 2012). Bakterie jsou rovněž začátkem potravního řetězce (Ma & Lin 2013). Také ony mohou hromadit množství NP po dlouhou dobu (Hayden et al. 2012). Spolu jsou konzumovány zooplanktonem, zoobentosem a dalšími bezobratlými, kteří tvoří druhou trofickou úroveň potravního řetězce a nepochybně mohou přijímat NP adsorbované na buňkách řas (Ma & Lin 2013). Dále bylo pozorováno, že NP setrvávající ve vodním sloupci mohou interagovat se zooplanktonem, jako jsou hrotnatky (*Daphnia sp.*), viz Obr. 2 (Baun et al. 2008; Dabrunz et al. 2011). Po vstupu do trávicího ústrojí mohou NP ovlivnit střeva a další orgány. Jsou zdokumentovány poruchy funkce lysozomů i oxidační poškození způsobené jistými druhy nanočástic (Canesi et al. 2012). NP mohou též reagovat v sedimentu se zoobentosem, jako jsou slávky jedlé (*Mytilus edulis*), u kterých bylo potvrzeno začlenění NP do perleťové vrstvy (Zuykov

et al. 2011). Především planktonní korýši jsou obecně potravním a energetickým spojením mezi řasami a rybami, tedy sekundárními konzumenty (Baun et al. 2008). Na vodních obratlovcích byl rovněž pozorován negativní vliv NP. Existuje několik studií dokazujících toxicitu NP pro ryby ve všech stádiích vývoje (Lin et al. 2014; Manabe et al. 2011; Zhang et al. 2015).



Obr. 1 Červené šipky znázorňují možné trasy nanočástic (žluté body) ve vodním prostředí: (1) potenciál biomagnifikace, agregace na primární producenty, (2) kumulace částic zooplanktonem a zoobentosem, (3) přenos do vyšších trofických úrovní (Bundschuh et al. 2016)

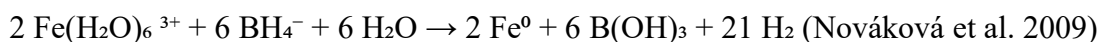


Obr. 2 Schéma adsorpce nanočástic (červené body) na modelový organismus *Daphnia sp.* (Ma & Lin 2013)

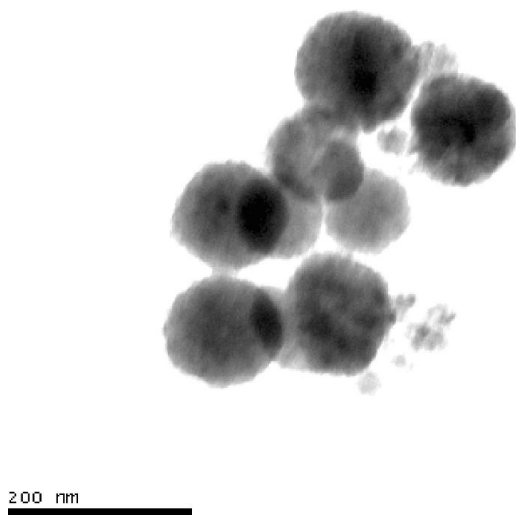
Ačkoli existují údaje, které naznačují, že některé nanočástice mají potenciál vyvolat poškození exponovaných vodních organismů, neexistuje dostatek důkazů o poškození organismů při environmentálně skutečně užívaných koncentracích téměř všech testovaných NP (Scown et al. 2010). Rovněž jsou stále nejasné podrobné trasy a příslušné interakce NP mezi jednotlivými stupni potravních řetězců (Ma & Lin 2013). Značné mezery v chápání osudu a chování NP ve vodním prostředí tedy často znemožňují konečné stanovení ekotoxikologických závěrů (Scown et al. 2010).

1.2 Nanočástice železa

Nanočástice nulavalentního železa (z anglického *nanosized zero-valent iron* = nZVI) jsou drobné částice elementárního železa v maximální velikosti 100 nm. Zjednodušeně si je můžeme představit jako zrna tisíckrát menší než červené krvinky (Office of the Science Advisor 2007). Je vyvinuta řada chemických a/nebo fyzikálních způsobů, jak tyto částice (a nanomateriály obecně) vyrábět (Li et al. 2006). V zásadě existují dva typy. První je tzv. technika bottom up „zdola nahoru“, kdy se nanočástice skládají z atomů a molekul. Druhým principem je top down „shora dolů“, při kterých se materiály v nano-velikosti tvoří z jejich protějšků v makro měřítku (Crane & Scott 2012). K běžně používaným procesům přípravy nZVI patří agregace rozprašovacího plynu, tepelná redukce oxidových sloučenin, chemická depozice par atd. (Li et al. 2006). V praxi se zdaleka nejčastěji využívá redukce kapalného $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ postupným přidáváním NaBH_4 (Nováková et al. 2009). Chemický zápis reakce je následující:



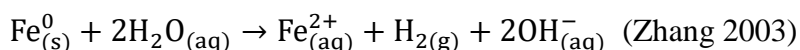
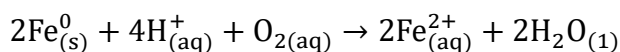
Výsledným produktem jsou uhlově černé shluky nanočástic železa, viz Obr. 3 (Li et al. 2006). Ke spotřebiteli se nZVI může dostat v několika podobách. Na trhu je dostupné jako prášek, vodná suspenze či suspenze v minerálním oleji (Nováková et al. 2009).



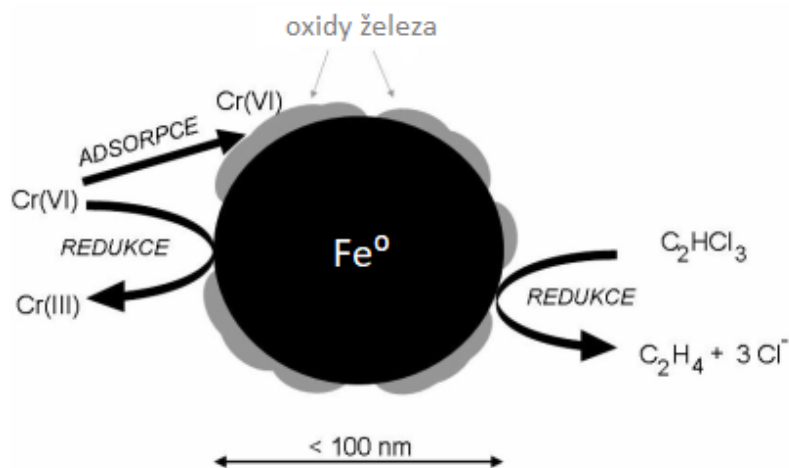
Obr. 3 Nanočástice nulavalentního železa vytvořené redukcí FeCl_3 za pomoci NaBH_4 (Li et al. 2006)

Kovové neboli nulové železo (Fe^0) je redukční činidlo, které velmi rychle reaguje s kyslíkem i s vodou. Při redoxních reakcích samo Fe^0 oxiduje – odevzdává své

elektrony, přičemž zvyšuje svůj náboj a mění se na méně reaktivní Fe^{2+} či Fe^{3+} , jež se mimochodem běžně vyskytují v sedimentech v přírodě (Nováková et al. 2009). Tento děj vyjadřují následující rovnice:



Stejně tak, jako u železa v makro velikosti, dochází při kontaktu nZVI s vodním prostředím ke korozi, tedy k nezvratné degradaci materiálu způsobené prostředím (Crane & Scott 2012). Je známo, že nZVI je díky velkému relativnímu povrchu částic ke korodování vysoce citlivé (Crane & Scott 2012; Nurmi et al. 2005), proto k němu dochází v daleko větším rozsahu než u objektů v makro měřítku (Nováková et al. 2009; Zhang 2003). Na povrchu železných částic vzniká vrstva sloučenin, která nemá nadále vlastnosti kovu. Při kontaktu s dalšími prvky obsaženými ve vodě se částice nejčastěji obalí oxidy železa, jak je tomu na Obr. 4 (Nováková et al. 2009). Zda jsou oxidy více či méně toxické než volné kovy, závisí na kovu samotném (Office of the Science Advisor 2007).



Obr. 4 Model struktury nanočástice kovového železa s příkladem probíhajících dějů (Nováková et al. 2009)

Všechny výše uvedené vlastnosti jsou klíčem k tomu, proč je nZVI tak hojně používáno. Díky kombinaci výborných reakčních schopností a přirozeného výskytu kovu v prostředí se v posledních 15 letech o nZVI hovoří nejčastěji v souvislosti s čištěním půdních vod (Mueller et al. 2012). Železné částice mají schopnost ve velké

míře odstraňovat nečistoty z podzemní vody (Crane & Scott 2012; Office of the Science Advisor 2007), rychle asimilovat škodlivé látky (Nguyen et al. 2018) a degradovat různé třídy kontaminantů (Li et al. 2018). Jedná se především o chlorované organické polutanty (rozpouštědla, pesticidy), anorganické anionty (Mueller et al. 2012; Schiwy et al. 2016), PCB (Ševců et al. 2017; Zhang 2003) a těžké a radioaktivní kovy (Filip et al. 2019). Kromě čistého nZVI jsou testovány také další upravené NP obsahující železo, jako sírou modifikované nZVI (Cheng et al. 2019) či poměrně populární oxidy železa (Gupta & Gupta 2005). Jeden z prvních výzkumů s tématem odstranění kontaminace z vod pomocí nZVI provedl Feitz et al. (2005), na kterého navázala řada dalších experimentů. Malá velikost nZVI přispívá k efektivní podpovrchové disperzi, zatímco velká reakční plocha částic zodpovídá za velmi rychlou reaktivitu při přeměně znečišťujících látek (Li et al. 2006). Kvůli poměrně krátké životnosti jsou železné částice navrhovány a uvolňovány do ŽP jako reakční složky a očekává se jejich chemická transformace (Zhang 2003). Bylo zjištěno, že nejlepší potenciál odstraňovat kontaminanty vykazuje nZVI během prvních 2 hodin reakce. Později účinnost klesá důsledkem oxidace a stárnutí NP (Calderon & Fullana 2015).

Novější výzkumy představují nZVI i jako možnou zbraň proti nežádoucímu biologickému jevu – vodnímu květu (Marsalek et al. 2012; Nguyen et al. 2018; Su et al. 2018). Ošetření vodní plochy nanočásticemi železa je efektivní metoda eliminace sinic tvořící vodní květ (Su et al. 2018). Nulavalentní železo se tak překvapivě ukázalo jako první víceúčelová zbraň proti sinicím: ničí cyanobakteriální buňky, vychytává biologicky dostupný fosfor a imobilizuje mikrocystiny, tedy zabráňuje jejich uvolnění do vodního sloupce. Takto vytvořené agregáty nanočástic železa a biologického materiálu se usazují během několika hodin ke dnu, což vede ke kompletnímu pročištění a dekontaminaci vodního sloupce (Marsalek et al. 2012).

Je tedy potvrzeno z více zdrojů, že nZVI interaguje s rostlinnými buňkami (Schiwy et al. 2016). Důležitou ekotoxikologickou otázkou zůstává vliv nZVI na ostatní organismy ve vodním prostředí. Na růst bakterií a mikroorganismů může nZVI působit stimulačním i inhibičním účinkem (Xie et al. 2017). Mechanismy cytotoxicity nZVI (tj. inhibiční účinek) většinou zahrnují fyzické poškození a biochemickou destrukci stejně jako u sinic. U jistých bakterií byly pozorovány stimulační účinky nZVI, které jsou spojovány s vytvořením vhodného životního prostředí, buď poskytnutím chybějících

prvků a sloučenin nebo odstraněním škodlivých látek, které mohou působit baktericidně (Ševců et al. 2017; Xie et al. 2017). nZVI lze navíc využít některými bakteriemi redukujícími železo, což může dále přispět ke snížení kontaminace. Rovněž kombinace nZVI a některých mikrobů může mít synergický účinek na odstraňování polutantů, především chromu (Peng et al. 2015). Toxicitu nZVI se podařilo prokázat také na korýších a rybách (Schiwy et al. 2016). Experimenty s perloočkami pozorovaly čtenější úmrtnost v reakci na zvyšující se koncentraci nZVI ve vodě (Keller et al. 2012). V těle drobné sladkovodní ryby medaky japonské (*Oryzias latipes*) byly zase pozorovány histopatologické a morfologické změny (otoky buněk, hyperplazie atd.) ve tkáních žaber a střev, což potvrdilo nežádoucí účinky přímého kontaktu s nZVI (Li et al. 2009). Akutní letální a subletální toxické účinky u larev medaky zaznamenal též Chen et al. (2011).

Navzdory častějšímu používání nZVI a obavám z jejich potenciálních toxických účinků na vodní i půdní organismy existuje pouze omezený počet studií zkoumajících ekotoxicitu nZVI (Cheng et al. 2019). Kromě toho dosud nebyly získány obecné přesvědčivé důkazy o ekotoxicitě nZVI, protože ta pravděpodobně závisí na druhu testovaného organismu, složení, koncentraci, velikosti a povrchových vlastnostech konkrétních nanočástic železa, použité experimentální metodě a délce expozice (Jang et al. 2014). Z většiny dostupných experimentů tedy vyplývá, že nZVI je i v nižších koncentracích mírně toxické, avšak není zaznamenána dlouhotrvající toxicita. nZVI rovněž nevykazuje žádnou mutagenitu (Schiwy et al. 2016). V současné době jsou však studie toxicity primárně založené na testech in vitro (Xue et al. 2018) a je potřeba dalšího výzkumu.

2. Cíle práce

- Shrnutí dosavadních poznatků o problematice nanočástic železa v životním prostředí
- Vyhodnocení vlivu nulavalentního železa na hrotnatky velké (*Daphnia magna*)
- Důkaz přítomnosti nulavalentního železa v exkrementech plovatky bahenní (*Lymnaea stagnalis*)

3. Materiál a metody

3.1 Experimentální organismy a jejich kultivace

Kultivace řasy rodu *Desmodesmus* probíhala v izolované aparaturě (Obr. 5). Hlavními díly aparatury byly dvě hermeticky uzavíratelné skleněné nádoby Simax 5000 ml, peristaltická pumpa Schenchen labV1, zářivka Sun-glo 15W T8, skleněná kádinka a PVC hadičky. Každou z nádob jsem naplnila 5000 ml kultivačního „Z“ média (Příloha č. 1). Do jedné z nádob jsem umístila čistou kulturu zelených řas *Desmodesmus*, kterou jsme získali od RNDr. Michala Šorfa Ph.D. z ÚZRHV AF Mendelovy univerzity v Brně. Obě nádoby byly propojeny s peristaltickou pumpou, která přes den zajišťovala přívod čistého „Z“ média řasám a zároveň odváděla přebytečnou biomasu řasy do kádinky. Aparatura byla osvětlena zářivkou s režimem den/noc.



Obr. 5 Aparatura ke kultivaci řasy (foto I. Navrátilová)

Hrotnatky velké (*Daphnia magna*) jsem získala od výše zmíněného RNDr. Michala Šorfa Ph.D. Chov perlooček probíhal v kontrolovaném prostředí laboratoře v kruhových vodních nádržích s odstátou kohoutkovou vodou o objemu 10 litrů. V místě chovu byla udržována stálá teplota vody cca 23 °C a zaveden přirozený denní cyklus světlo/tma.

Dle potřeby byly perloočky 1-2× týdně přeočkovány do čisté vody. Perloočky byly krmeny střídavě zelenými řasami r. *Desmodesmus* a suspenzí potravinářských kvasinek.

Plovatky bahenní (*Lymnaea stagnalis*) byly získány z retenční nádrže v obci Továř a z tůní v areálu Centra ekologických aktivit Sluňákov. Jedinci byli aklimatizováni k pokusu ve stejné laboratoři jako perloočky se stálou teplotou vody cca 23 °C. Chov jsem vedla ve třech akváriích s obsahem 5 l odstáté kohoutkové vody. Akvária byla osvětlena zářivkou s režimem den/noc. Plovatky jsem krmila ledovým salátem, okřehkem (*Lemna sp.*) a řasou r. *Chlorella*.

3.2 Nanočástice nulavalentního železa

Nanomateriál jsme získali od Mgr. Jana Filipa, Ph.D. a Mgr. Iva Medříka z Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů. Pro experimenty byly použity práškové nanočástice kovového železa bez povrchové úpravy, typ NANOFER 25P od firmy NANO IRON s.r.o. Obsah elementárního železa Fe⁰ více než 80%, průměrná velikost částic (D50) je pod 50 nm, specifický povrch typicky 25 g/m² (Nano Iron 2009). Nanočástice byly pod ochrannou atmosférou (N₂, rukavicový box) převedeny do podoby suspenze. Zásobní suspenze nZVI měla koncentraci 1 g/l.

3.3 Bioakumulace

3.3.1 V prostředí bez řasy

Pro experiment jsem použila skleněná akvária o rozměrech 27×27×27 cm. Celkem jsem měla k dispozici 20 akvárií. Ředěním zásobní suspenze jsem připravila tři rozdílné koncentrace nZVI ve vodě: 0,001 g/l (5 ml zásobní suspenze nZVI), 0,01 g/l (50 ml zásobní suspenze nZVI), 0,1 g/l (500 ml zásobní suspenze nZVI), vždy o finálním objemu 5 000 ml. K ředění byla použita odstátá kohoutková voda pokojové teploty. Do připraveného roztoku jsem umístila 50 středně velkých hrotnatek, každá z připravených koncentrací byla testována v 16 opakováních (Příloha č. 2).



Obr. 6 Trojice akvárií s perloočkami a rozdílnými koncentracemi nZVI, pět opakování (foto I. Navrátilová)

Po 24 hodinách jsem všechny hrotnatky opatrně vylovila individuálně pipetou. Spočítala jsem uhynulé jedince a vyřadila je z dalšího testování. Živé perloočky jsem přenesla na očíslované Petriho misky. Misky s perloočkama jsem umístila do předem připravených kapes z filtračního papíru, aby se zamezilo silnému proudění vzduchu, který by mohlo těla korýšů odnést. Takto chráněné Petriho misky jsem přemístila do sušící pece. Nastavila jsem sušící cyklus 105°C na 3 h, během kterého došlo k úplnému vysušení vzorků. Vysušené vzorky jsem dále uchovávala v exsikátoru se silikagelem. Sušinu jsem velmi opatrně seškrábala ze skleněných misek a zvážila ji na váze Precisa 40SM-200A v plastových Petriho miskách.

Dalším krokem byla mineralizace, tj. úplné rozložení organické hmoty chemickými činidly. Sušinu jsem přemístila do teflonových nádob DAP-60K kompatibilních s mikrovlnným rozkladným systémem speedwave ENTRY firmy Berghof. K sušině jsem laboratorní skleněnou pipetou přidala 7 ml koncentrované 65% kyseliny dusičné. Takto připravené vzorky jsem podrobila totálnímu mikrovlnnému rozkladu v přístroji speedwave ENTRY firmy Berghof.

Vzorky jsem po vychladnutí přelila do uzavíratelných plastových zkumavek a naředila je destilovanou vodou do objemu 25 ml. Následně byly vzorky podrobeny analýze na spektrometru Avanta firmy GBC v plameni acetylén/vzduch, kde byl zjištěn celkový obsah železa ve vzorcích. Obsah železa byl přepočten na sušinu přeživších perlooček v daném opakování s konkrétní koncentrací nZVI. Výsledná hodnota naakumulovaného železa je udávána v mg/g sušiny.

Podíl mrtvých perlooček byl použit pro zhodnocení letálního vlivu nZVI. Pro každé opakování byla následně vypočtena procentuální mortalita (Příloha č. 4).

Pro pokus jsem vytvořila šest kontrolních vzorků, kam jsem nepřidala žádné nZVI. Do zmiňovaných akvárií jsem nalila 5 000 ml čisté odstáté kohoutkové vody a do nich umístila vždy 50 ks perlooček. Po 24 h jsem perloočky vylovila a podrobila jsem je stejnému postupu popsanému výše.

3.3.2 V prostředí s řasou

Účelem tohoto dílčího experimentu bylo porovnat, zda bude mít přítomnost řasy v prostředí vliv na množství naakumulovaného nZVI v perloočkách. Do stejných akvárií, jako v prvním případě, jsem připravila tři koncentrace nZVI: 0,001 g/l, 0,01 g/l a 0,1 g/l s rozdílem, že jsem do každého akvária přidala pipetou 10 ml řasy *Desmodesmus sp.* Konečný objem byl 5 000 ml. Do každého roztoku jsem opět umístila 50 středně velkých hrotnatek. Experiment jsem provedla v osmi opakováních pro každou koncentraci (Příloha č. 3). Další průběh pokusu byl zcela totožný jako v případě bioakumulace bez řasy.

3.3.3 Vlastnosti vody během experimentu

Pro přesnou definici podmínek při experimentu jsem měřila vybrané vlastnosti vody. Vodivost vody ($\mu\text{S}/\text{cm}$) jsem zjistila konduktoměrem značky Hanna a pH s pomocí pH metru Hanna. Obsah rozpuštěného kyslíku (mg/l), nasycení vody O_2 (%) a teplotu ($^{\circ}\text{C}$) jsem změřila multimetrem HQ40D Hach. Připravila jsem si akvária s koncentracemi nZVI 0 g/l, 0,001 g/l, 0,01 g/l a 0,1 g/l ve třech opakováních. Do každého z nich jsem umístila 50 hrotnatek. Měřicí přístroje jsem postupně vkládala do akvárií a zaznamenávala jsem naměřené hodnoty. Přístroje jsem před každým měřením očistila v čisté vodě, aby se předešlo rušivému ovlivnění výsledů. Měření jsem

provedla šestkrát: bezprostředně po přidání nZVI do vody (0,1 h), za 0,25 h, za 1,25 h, za 2,25 h, za 3,25 h a za 24 h po přidání nZVI. Hodnoty odečtené z přístrojů jsem zaznamenala do tabulky a vypočítala jsem jejich aritmetické průměry (Příloha č. 5).

Po dokončení všech měření jsem odebrala několik hrotnatek, které na sobě měly viditelně akumulované nZVI. Pomocí binokulárního stereomikroskopu jsem provedla vizuální kontrolu a pořídila jejich fotografie.

3.4 Experiment s plovatkami

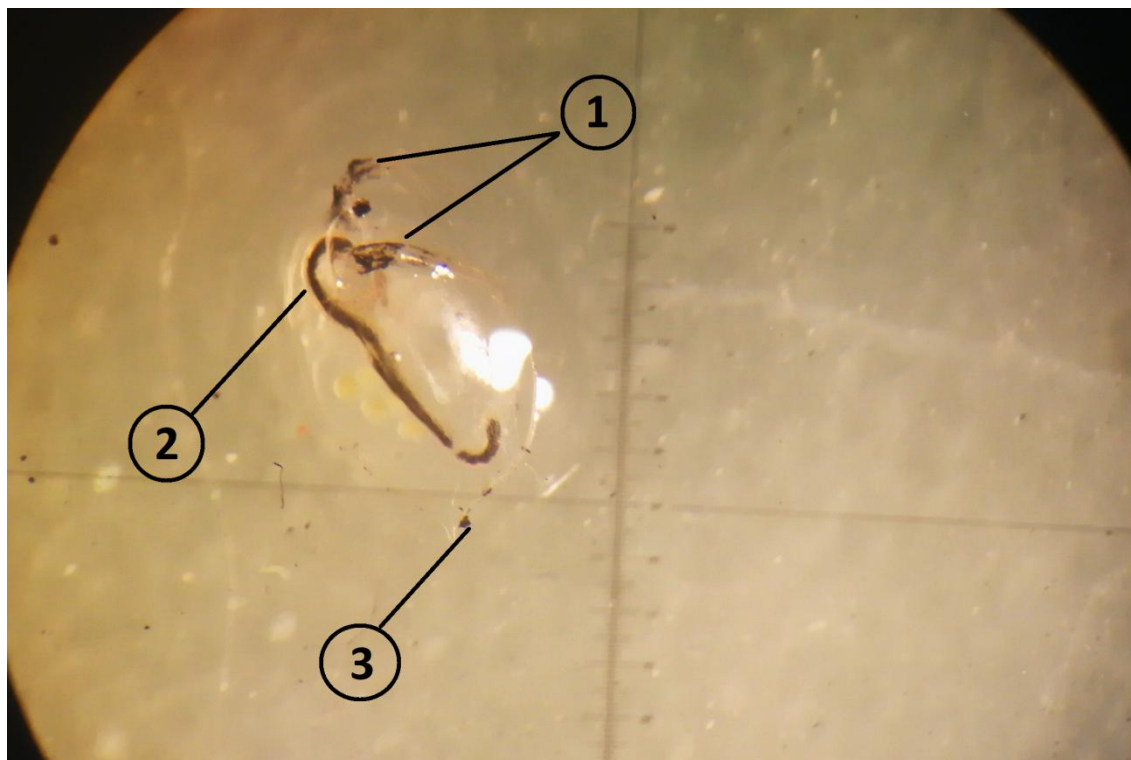
Připravila jsem tři skleněné nádoby o objemu 300 ml s koncentracemi nZVI 0,001 g/l, 0,01 g/l a 0,1 g/l. Do každé nádoby jsem umístila tři středně velké plovatky. Vodní plže jsem nechala v prostředí 24 h. Po uplynulé době jsem velmi opatrně vyjmula Pasteurovou pipetou exkrementy, které v nádobách zůstaly. Exkrementy jsem podrobila mineralizaci a analýze, jako v případě bioakumulace s jediným rozdílem – exkrementy jsem nesusila a nevážila. Tento experiment jsem provedla ve dvou opakováních.

3.5 Statistika

Získaná data byla zpracována v programu RStudio vision 1.2.5001. Obsah železa v hrotnatkách byl testován jednocestnou analýzou variance, následovanou posteriorním Tukeyho testem. Analýze variance předcházely Bartlettův test ověřující homogenitu variance. Mortalita hrotnatek byla testována neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem.

4. Výsledky

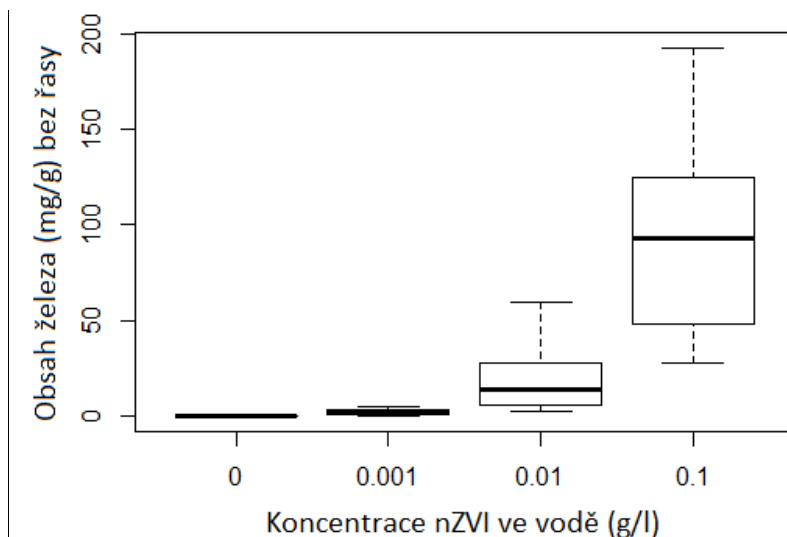
Hrotnatky vystavené nZVI v prostředí jej viditelně akumulovaly či adsorbovaly ve všech testovaných koncentracích. Bioakumulované nZVI bylo pozorováno na povrchu i uvnitř těla jedince – ve střevě (Obr. 7). Se zvyšující se koncentrací nZVI rostlo množství černých agregátů železa na hrotnatkách.



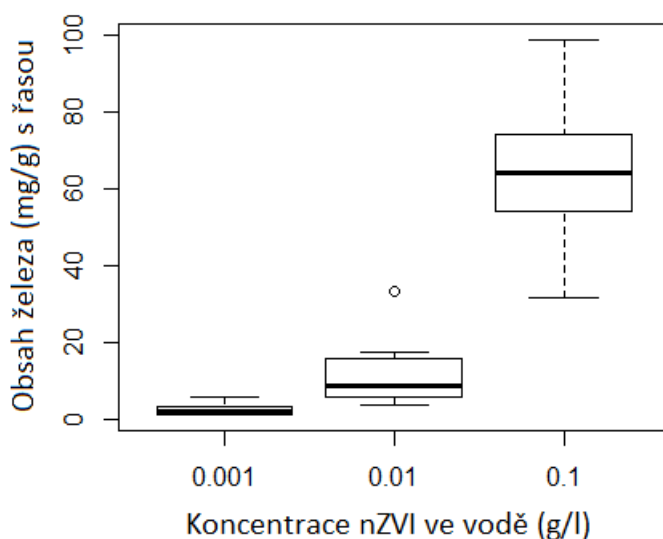
Obr. 7 Hrotnatka s akumulovaným nZVI (1) na tykadlech, (2) ve střevě, (3) na exoskeletu (foto I. Navrátilová)

4.1 Obsah bioakumulovaného železa v sušině hrotnatek

Obsah železa v sušině hrotnatek bez řasy se významně lišil ve všech testovaných koncentracích nZVI v prostředí ($F = 34.822$, $df = 3$, $p < 0,001$). Stejně tomu bylo v prostředí s řasou ($F = 108.26$, $df = 1$, $p < 0,001$). Hodnoty akumulovaného železa v sušině rostly se zvyšující se koncentrací nZVI ve vodě (Obr. 8, 9). V případě experimentu s řasou byl výsledný obsah železa nižší než v pokusu bez řasy.



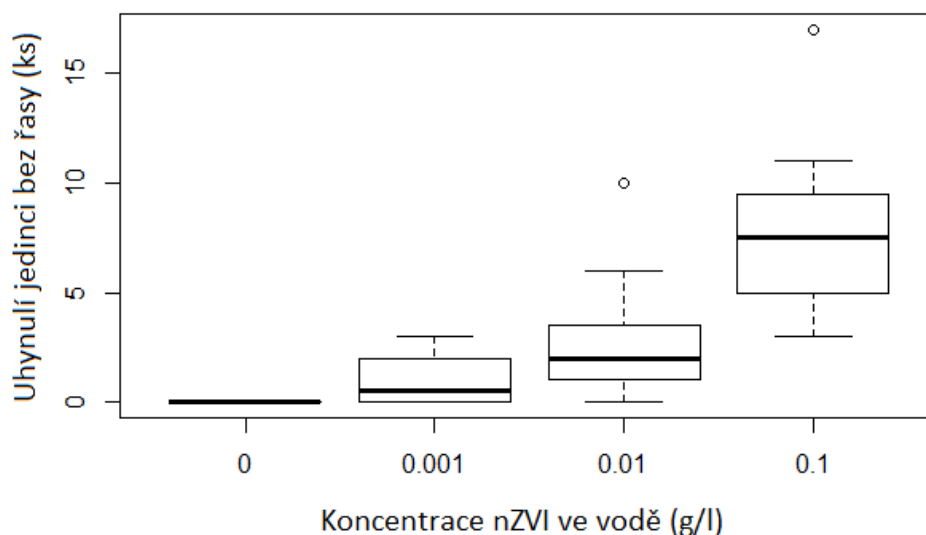
Obr. 8 Obsah železa (mg/g) v sušině bez řasy



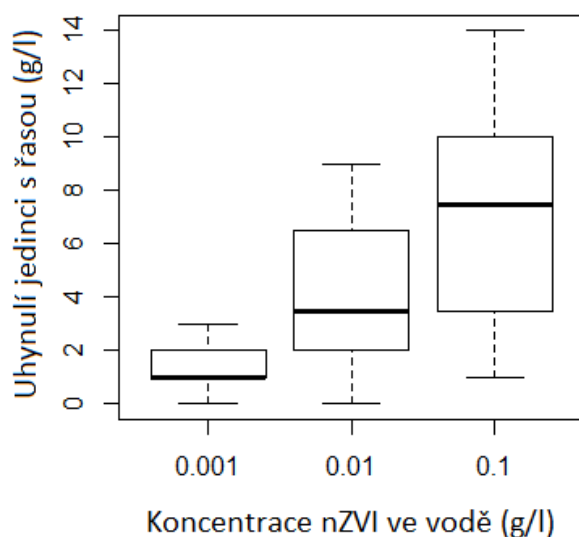
Obr. 9 Obsah železa (mg/g) v sušině s řasou

4.2 Počet uhynulých jedinců hrotnatek

Test odhalil signifikantní rozdíly v počtu uhynulých jedinců mezi jednotlivými koncentracemi nZVI v prostředí bez řasy ($\chi^2 = 36,368$, $df = 3$, $p < 0,001$) i s řasou ($\chi^2 = 9,8464$, $df = 2$, $p = 0,007276$). Počet uhynulých jedinců přímo úměrně stoupal se zvyšující se koncentrací nZVI v prostředí (Obr. 10, 11).



Obr. 10 Počet uhynulých jedinců v prostředí bez řasy



Obr. 11 Počet uhynulých jedinců v prostředí s řasou

V prostředí s nanočásticemi železa kolísala mortalita v rozmezí od 2,13 % do 15,38 % v závislosti na testované koncentraci nanoželeza. V kontrolních vzorcích byla mortalita vždy nulová (Tab. 1).

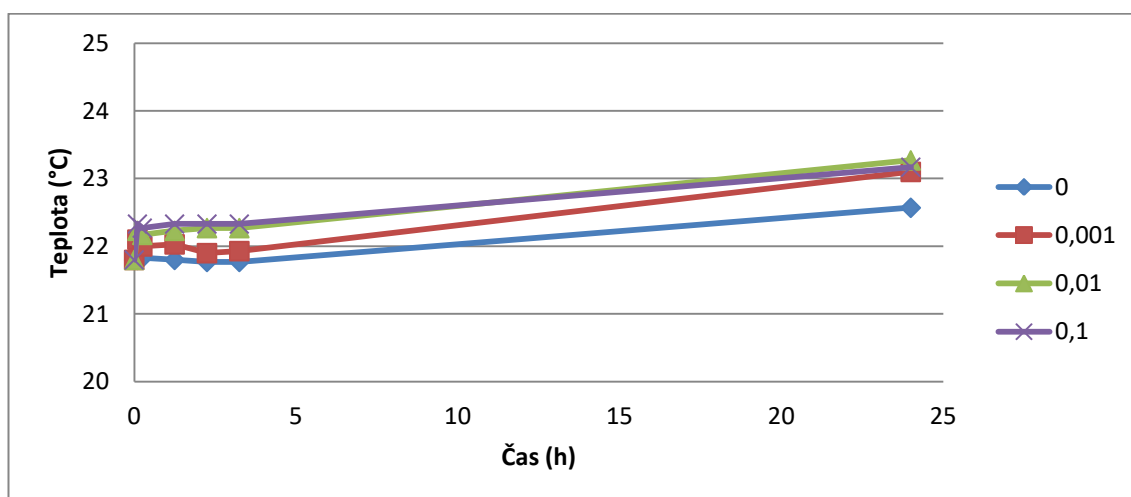
Tab. 1 Procentuální množství uhynulých jedinců

Koncentrace nanoželeza (g/l)	Uhynulí jedinci bez řasy (%)	Uhynulí jedinci s řasou (%)
0	0	–
0,001	2,13	2,75
0,01	5,63	8,25
0,1	15,38	14,25

4.3 vlastnosti vody

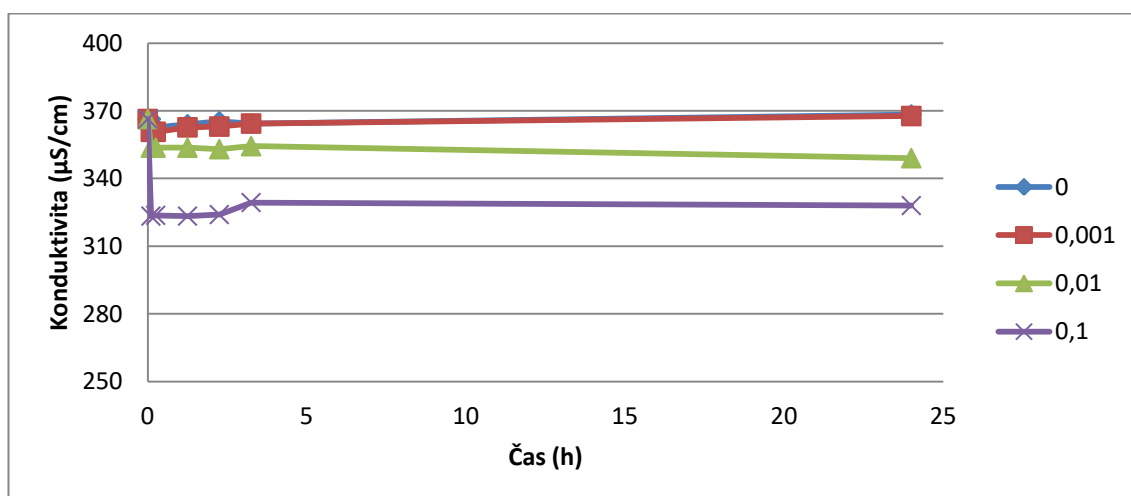
Jako bod nula v Obr. 12-16 je užitá hodnota koncentrace 0 g/l v čase 0,1 h., neboť nejlépe simuluje vlastnosti vody před přidáním nZVI.

Průměrná teplota vody ve všech případech stoupla cca o 1 °C (Obr. 12). Nejnížší celková průměrná teplota byla zaznamenána u koncentrace 0 g/l a nejvyšší u koncentrace 0,1 g/l.



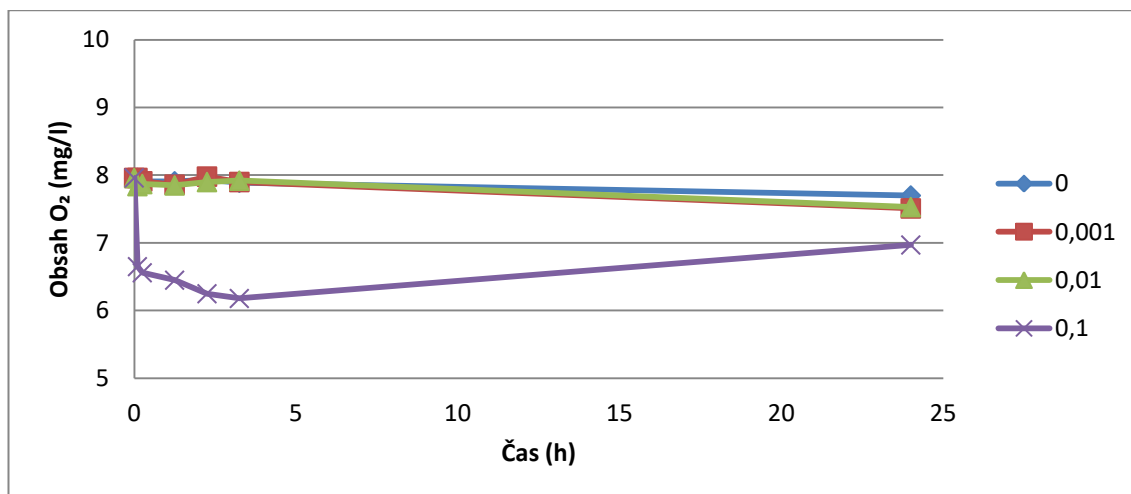
Obr. 12 Vývoj teploty vody během experimentu v závislosti na čase (průměr z pěti opakování)

Konduktivita vody, tedy schopnost vést elektrický proud, od aplikace nZVI téměř nekolísala (obr. 13). Bylo pozorováno pouze snížení s přibývajícím množstvím železa o desítky jednotek.

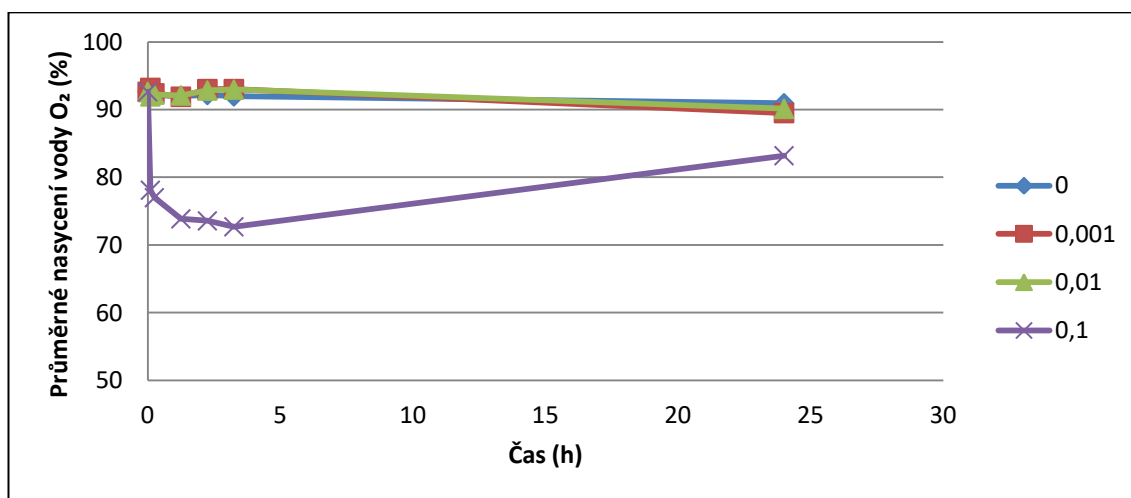


Obr. 13 Vývoj konduktivity během experimentu v závislosti na čase (průměr z pěti opakování)

Obsah kyslíku se během experimentu držel v rozmezí 6-8 mg/l (Obr. 14). Při nejvyšší koncentraci v prvních hodinách prudce klesl. U Ostatních koncentrací zůstal prakticky konstantní. Průměrné nasycení vody O₂ se u koncentrací 0 g/l, 0,001 g/l a 0,01 g/l pohybovalo kolem 90 %. Při koncentraci 0,1 g/l nasycení zpočátku kleslo o téměř 20 % (Obr. 15).

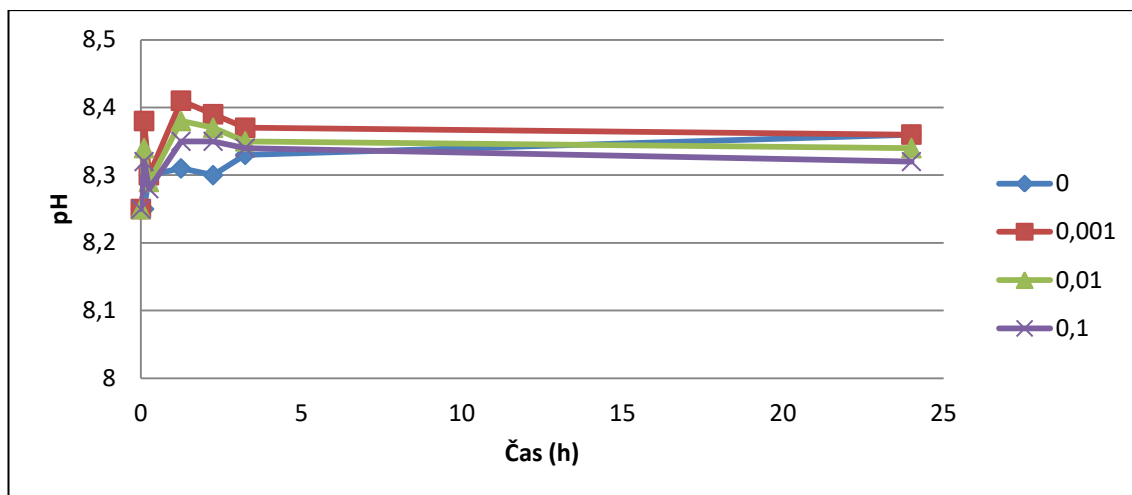


Obr. 14 Vývoj obsahu O₂ (ml/l) v závislosti na čase (průměr z pěti opakování)



Obr. 15 Vývoj nasycení vody O₂ (%) v závislosti na čase (průměr z pěti opakování)

Průměrná hodnota pH byla ve všech případech vyšší než 8, tzn. slabě zásaditá (Obr. 16). Hodnoty kolísaly pouze v rámci desetinných čísel.



Obr. 16 Vývoj hodnoty pH během experimentu v závislosti na čase (průměr z pěti opakování)

4.4 Plovatky

Vzhledem k nízkému počtu opakování a nemožnosti kvantifikace sušiny exkrementů nelze vytvořit statistiku. Z důvodu technické chyby nebylo možné změřit jednu z hodnot. Výsledky měření přesto dokazují přítomnost železa v exkrementech plovatek (Tab. 2).

Tab. 2 Obsah železa v exkrementech plovatek

Koncentrace (g/l)	Opakování č. 1 (mg/l)	Opakování č. 2 (mg/l)
0,001	5,268	–
0,01	33,216	31,386
0,1	439,721	106,012

5. Diskuze

Cílem této práce bylo posoudit, zda se nanočástice nulavalentního železa (nZVI) bioakumulují ve sladkovodních bezobratlých, především v hrotnatce velké (*Daphnia magna*) a plovatce balenní (*Lymnaea stagnalis*). Pro experiment jsem zvolila tři koncentrace nZVI: 0,001 g/l, 0,01 g/l a 0,1 g/l po vzoru Baumann et al. (2014) a délku expozice 24 h. Oba druhy prokázaly potenciál akumulovat ve svém těle nanočástice železa.

Při pozorování stereomikroskopem jsem potvrdila akumulaci nanočástic u všech testovaných koncentrací nZVI ve střevě hrotnatek i adsorpci částic železa na jejich exoskelet a tykadla. Pozorovala jsem rovněž trend zvyšujícího se obsahu O₂ v sušině hrotnatek s rostoucí koncentrací nZVI vpraveným do prostředí. Bohužel jsem kvůli technické náročnosti nemohla stanovit zvlášť množství železa ve střevě a zvlášť množství na vnější schránce, což by mohlo vést k hlubšímu pochopení toxicity.

S dosavadními znalostmi se domnívám, že velkou roli na mortalitu hrotnatek mají částice a jejich aglomeráty adsorbované na jejich vnější schránku. V krátkém čase totiž dochází k výrazné imobilizaci jedinců zapříčiněné adsorpcí nanoželeza na exoskelet i filtrační aparát (Baumann et al. 2014). Zatížení částicemi může také zvýšit energetickou náročnost a narušit fyzickou zdatnost během plavání (Dabrunz et al. 2011). Během experimentu jsem v nejvyšší koncentraci přidaného nZVI pozorovala jedince, kteří byli obaleni nanočásticemi v takové míře, že klesli ke dnu a nebyli schopni návratu do vodního sloupce.

Nejvyšší průměrnou úmrtnost hrotnatek 15,38 % jsem zaznamenala v prostředí s koncentrací nZVI 0,1 g/l bez řasy, což mohu vyhodnotit jako prostředí nejméně příznivé. S tímto závěrem souhlasí i měření obsahu železa v jejich tělech, neboť ve výše zmíněných podmínkách bylo naměřeno nejvíc železa. Tento výsledek mě překvapil, jelikož jsem se domnívala, že v prostředí s nZVI a řasou přijme hrotnatka volné nanočástice ve vodě a zároveň nanoželezo adsorbované na řasách (Navarro et al. 2008). Řasy, které adsorbovaly nanočástice, však pravděpodobně klesly ke dnu a byly tak pro hrotnatky hůře dosažitelné, či neatraktivní (Schiwy et al. 2016). Pokud k tomu skutečně došlo, ve vodním sloupci se snížil obsah nanoželeza a proto se ho dostalo méně do hrotnatek. Jestliže hrotnatky preferovaly filtraci řas před železem, mohlo dojít

k pročištění střeva řasou a vypuzení nanočástic ze střeva (Lv et al. 2018). Podobná situace by mohla být pozorována v prostředí *in situ*, kde jedinci nejsou vystaveni pouze účinku nZVI, ale působí tam daleko víc proměnných.

Dalším, pro mě neviditelným faktorem, je patrně cytotoxicita. Ta nebyla prokázána, ale lze ji očekávat. S výskytem nZVI v prostředí se pojí oxidační stres, což je situace způsobená vysokými intracelulárními koncentracemi reaktivních druhů kyslíku, které vznikají při přeměně nZVI (Davies 2000). Buňky, vystavené vysokým koncentracím těchto oxidů, se s nimi nejsou schopny vypořádat a mohou vykazovat různé dysfunkce membránových lipidů, proteinů a DNA (Sevcu & Cernik 2010).

Přítomnost nanočástic železa ve vodě ovlivňuje živé organismy nejen přímým působením, ale také mírnými změnami kvality vody (Sevcu & Cernik 2010). Se zvyšujícími se koncentracemi testovaného nZVI jsem např. zaznamenala pokles konduktivity o desítky $\mu\text{S}/\text{cm}$. To je důsledek značné reaktivity a velkého měrného povrchu částic nZVI. Nanočástice železa odšťáňují ionty, díky kterým je voda vodivá (Crane & Scott 2012). Při experimentu šlo pravděpodobně o velké ionty vápníku a hořčíku, na které je kohoutková voda v laboratoři bohatá. Nepředpokládám však, že by měl tento efekt významný vliv na mortalitu hrotnatek.

Jeden z nejvíce překvapivých výsledků jsem zaznamenala při měření obsahu kyslíku ve vodě. Pokles koncentrace O_2 o téměř 20 % během cca 3 hodin při nejvyšší koncentraci železa patrně způsobila rychlá oxidace nZVI. Nulavalentní železo ve vodě rychle stárne a reaguje s rozpuštěným kyslíkem i s vodou, koroduje (Calderon & Fullana 2015). Opět mohu vyloučit, že by tato změna ohrozila hrotnatky. *Daphnia magna* totiž není ovlivněna koncentracemi O_2 nad 3 mg/l (Heisey & Porter 1977), ba dokonce dokáže přežít v anoxickém prostředí až 3 h (Herbert 1954).

Drobné zvýšení teploty bylo nejspíše zapříčiněno ohřátím okolního vzduchu v laboratoři. Nutno zohlednit také možnou chybu přístroje. Hodnota pH během měření kolísala (s ohledem na zkoumané měřítko) téměř nepozorovatelně. Drobné kolísání je v rámci tolerované odchylky měřicího přístroje. Změny teploty i pH hodnotím jako nepodstatné. Výsledky měření vlastností vody mi celkově nepřinesly příliš významné informace. Vzhledem k velké ekologické nuce hrotnatek, tedy schopnosti snášet velké rozmezí hladin faktorů, nebyly žádné měřené vlastnosti vody v životu ohrožujících hodnotách.

Vzhledem k faktu, že perloočky jsou neselektivní filtrátoři, vpraví do svého střeva všechny částice v okolí, nehlédě na jejich povahu či původ. Podloženo mým výzkumem, jedna hrotnatka dokáže během 24 h v koncentraci 0,1 g/l akumulovat průměrně 0,08 mg železa. Hrotnatky jsou běžnou potravou čolků či drobných ryb. Pokud by čolek zkonzumoval 300 takto infikovaných hrotnatek, vpravil by do sebe až 24 mg nanočástic železa, což by mohlo vést ke změnám v jeho střevní mikroflóře či úhynu jedince. Schiwy et al. (2016) stanovil hodnotu EC50 pro toxicitu nanoželeza ve vodním prostředí, jež se pohybuje od 165 mg/l pro hrotnatky do 458 mg/l pro ryby dánío. Nicméně jde pouze o modelovou situaci, je prakticky nemožné docílit tak vysoké koncentrace mimo laboratorní podmínky. V přírodních podmínkách se k dekontaminaci vod aplikují suspenze obsahující až 10 g/l nanočástic. Zde se však předpokládá rozptýlení částic v takové míře, až koncentrace nanoželeza poklesne na 1 mg/l či méně (Mueller et al. 2012).

Dílčí experiment s plovatkami nebylo možné dokončit v plném rozsahu kvůli mimořádným opatřením, jež vyvolala pandemie onemocnění Covid-19. Ze dvou provedených opakování se navíc kvůli technické chybě povedlo získat kompletní výsledky jen jednoho opakování. Navzdory tomu se podařilo zdokumentovat jistý obsah železa v jejich exkrementech, což považuji za nepřímý důkaz vniknutí nanočástic do jejich trávicího traktu. Přímá úměra mezi zvyšujícím se obsahem nanočástic v prostředí a v plovatkách již byla pozorována u nanostříbra (Oliver et al. 2014). Nanočástice usazené na dně nádrže mohou kontaminovat potravu plovatek a dostat se do jejich těla další cestou, než jen přímo z prostředí. Domnívám se, že bentické druhy by mohly akumulovat daleko větší množství nanočástic železa než nekton, neboť sedimentace nanočástic je poměrně rychlá a částice ze dna bez vnějšího vlivu nikam nezmizí.

6. Závěr

Ve své práci jsem testovala vliv nanočástic nulvalentního železa (nZVI) na sladkovodní bezobratlé – hrotnatku velkou (*Daphnia magna*) a plovatku bahenní (*Lymnaea stagnalis*). Provedla jsem experimenty, při kterých byly hrotnatky vystaveny pouze nZVI (16 opakování) a nZVI + řasám r. *Desmodesmus* (8 opakování). Plovatky jsem vystavila pouze nZVI (2 opakování). Jednalo se o krátkodobou expozici 24 h. Ve všech případech jsem použila koncentrace nZVI 0,001 g/l, 0,01 g/l a 0,1 g/l.

Samotnému testování předcházela rešerše o problematice nanočástic a nanoželeza v životním prostředí. V souladu s očekáváním prokázala analýza dat bioakumulaci železa v hrotnatkách i přítomnost železa v exkrementech plovatek, z čehož vyvozují přítomnost železa v jejich trávicím traktu. Četné testy potvrdily též negativní vliv nZVI na hrotnatky, měřený počtem uhynulých jedinců.

Dosavadní data budou použita pro článek „Nanočástice železa a jejich potenciální vliv na vodní ekosystémy“, jenž bude otištěn v časopise Vodní hospodářství. V budoucnu by bylo vhodné pokračovat s experimenty na bentických organismech a umožnit kvantifikaci dat. Dále je žádoucí výzkum v delším časovém horizontu a testování vlivu dlouhodobé expozice nZVI na testované organismy. Další experimenty by mohly směřovat k objasnění otázky potenciální akumulace ve vyšších úrovních potravního řetězce, zkoumané na obojživelnících či rybách.

7. Literatura

- Baumann, J., Köser, J., Arndt, D., & Filser, J. (2014). Science of the Total Environment
The coating makes the difference : Acute effects of iron oxide nanoparticles on
Daphnia magna. Science of the Total Environment, The, 484, 176–184.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.023>
- Baun, A., Hartmann, N. B., Grieger, K., & Kusk, K. O. (2008). Ecotoxicity of
engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: A brief review and
recommendations for future toxicity testing. Ecotoxicology, 17(5), 387–395.
<https://doi.org/10.1007/s10646-008-0208-y>
- Brandeburová, P., Grenčíková, A., & Tomáš, M. (2019). Nanočástice – Ekotoxické
účinky na životné prostredie. Chemické Listy, 113, 97–103.
- Bundschuh, M., Seitz, F., Rosenfeldt, R. R., & Schulz, R. (2016). Effects of
nanoparticles in fresh waters : risks , mechanisms and interactions. Freshwater
Biology, 61, 2185–2196. <https://doi.org/10.1111/fwb.12701>
- Calderon, B., & Fullana, A. (2015). Heavy metal release due to aging effect during zero
valent iron nanoparticles remediation. Water Research, 83, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.06.004>
- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., & Gallo, G. (2012).
Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. Marine
Environmental Research, 76, 16–21.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.06.005>
- Chen, P. J., Su, C. H., Tseng, C. Y., Tan, S. W., & Cheng, C. H. (2011). Toxicity
assessments of nanoscale zerovalent iron and its oxidation products in medaka
(*Oryzias latipes*) fish. Marine Pollution Bulletin, 63(5–12), 339–346.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.045>
- Cheng, Y., Dong, H., Lu, Y., Hou, K., Wang, Y., Ning, Q., ... Zeng, G. (2019).
Toxicity of sulfide-modified nanoscale zero-valent iron to *Escherichia coli* in
aqueous solutions. Chemosphere, 220, 523–530.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.159>

- Čiháková, P., Říhová Ambrožová, J., Zuzáková, J., & Baumruková, L. (2017). Nanočástice a jejich působení v akvatickém ekosystému. *Vodní Hospodářství*, 67(1), 5–12.
- Crane, R. A., & Scott, T. B. (2012). Nanoscale zero-valent iron: Future prospects for an emerging water treatment technology. *Journal of Hazardous Materials*, 211–212, 112–125. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.11.073>
- Dabrunz, A., Duester, L., Prasse, C., Seitz, F., Rosenfeldt, R., Schilde, C., ... Schulz, R. (2011). Biological surface coating and molting inhibition as mechanisms of TiO₂ nanoparticle toxicity in *Daphnia magna*. *PLoS ONE*, 6(5), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020112>
- Davies, K. J. A. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50(4–5), 279–289. <https://doi.org/10.1080/15216540051081010>
- Feitz, A. J., Joo, S. H., Guan, J., Sun, Q., Sedlak, D. L., & Waite, T. D. (2005). Oxidative transformation of contaminants using colloidal zero-valent iron. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 265(1–3), 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.01.038>
- Filip, J., Kolařík, J., Petala, E., Petr, M., Šrámek, O., & Zboril, R. (2019). Nanoscale Zerovalent Iron Particles for Treatment of Metalloids. In *Nanoscale Zerovalent Iron Particles for Environmental Restoration* (pp. 157–199). https://doi.org/10.1007/978-3-319-95340-3_4
- Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995–4021. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>
- Guzmán, K. A. D., Taylor, M. R., & Banfield, J. F. (2006). Environmental risks of nanotechnology: National nanotechnology initiative funding, 2000-2004. *Environmental Science and Technology*, 40(5), 1401–1407. <https://doi.org/10.1021/es0515708>
- Handy, R. D., Owen, R., & Valsami-Jones, E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and

future needs. *Ecotoxicology*, 17(5), 315–325. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0206-0>

Hayden, S. C., Zhao, G., Saha, K., Phillips, R. L., Li, X., Miranda, O. R., ... Bunz, U. H. F. (2012). Aggregation and interaction of cationic nanoparticles on bacterial surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 134(16), 6920–6923. <https://doi.org/10.1021/ja301167y>

Heisey, D., & Porter, K. G. (1977). The effect of ambient oxygen concentration on filtering and respiration rates of *Daphnia galeata mendotae* and *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography*, 22(5), 839–845. <https://doi.org/10.4319/lo.1977.22.5.0839>

Herbert, M. R. (1954). The tolerance of oxygen deficiency in the water by certain Cladocera. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 8, 97–107.

Hughes, M. F., Long, T. C., Boyes, W. K., & Ramabhadran, R. (2012). Whole-body retention and distribution of orally administered radiolabelled zerovalent iron nanoparticles in mice. *Nanotoxicology*, 7(6), 1064–1069. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.700337>

Hund-Rinke, K., & Simon, M. (2006). Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids. *Environmental Science and Pollution Research*, 13(4), 225–232. <https://doi.org/10.1065/espr2006.06.311>

Jang, M., Lim, M., & Hwang, Y. S. (2014). Potential environmental implications of nanoscale zero-valent iron particles for environmental remediation. *Environmental Health and Toxicology*, 29, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.5620/eh.t.e2014022>

Keller, A. A., Garner, K., Miller, R. J., & Lenihan, H. S. (2012). Toxicity of Nano-Zero Valent Iron to Freshwater and Marine Organisms. *PLoS ONE*, 7(8), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043983>

Kellogg, C. A., & Griffin, D. W. (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends in Ecology and Evolution*, 21(11), 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.07.004>

- Kim, S., Lee, S., & Lee, I. (2012). Alteration of phytotoxicity and oxidant stress potential by metal oxide nanoparticles in *Cucumis sativus*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(5), 2799–2806. <https://doi.org/10.1007/s11270-011-1067-3>
- Li, H., Zhou, Q., Wu, Y., Fu, J., Wang, T., & Jiang, G. (2009). Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): Antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3), 684–692. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.09.027>
- Li, X. Q., Elliott, D. W., & Zhang, W. X. (2006). Zero-valent iron nanoparticles for abatement of environmental pollutants: Materials and engineering aspects. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 31(4), 111–122. <https://doi.org/10.1080/10408430601057611>
- Li, Z., Lowry, G. V, Fan, J., Liu, F., & Chen, J. (2018). Science of the Total Environment High molecular weight components of natural organic matter preferentially adsorb onto nanoscale zero valent iron and magnetite. *Science of the Total Environment*, 628–629, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.038>
- Lin, S., Zhao, Y., Ji, Z., Ear, J., Chang, C. H., Zhang, H., ... Nel, A. E. (2014). Zebrafish High Throughput Screening to Study the Impact of Dissolving Metal Oxide Nanoparticles on the Hatching Enzyme, ZHE1. *Small*, 9, 1776–1785. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Lv, X., Yang, Y., Tao, Y., Jiang, Y., Chen, B., Zhu, X., ... Li, B. (2018). A mechanism study on toxicity of graphene oxide to *Daphnia magna*: Direct link between bioaccumulation and oxidative stress. *Environmental Pollution*, 234, 953–959. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.034>
- Ma, S., & Lin, D. (2013). The biophysicochemical interactions at the interfaces between nanoparticles and aquatic organisms: adsorption and internalization. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15, 145–160. <https://doi.org/10.1039/c2em30637a>
- Manabe, M., Tatarazako, N., & Kinoshita, M. (2011). Uptake, excretion and toxicity of nano-sized latex particles on medaka (*Oryzias latipes*) embryos and larvae.

- Aquatic Toxicology, 105(3–4), 576–581.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.020>
- Marsalek, B., Jancula, D., Marsalkova, E., Mashlan, M., Safarova, K., Tucek, J., & Zboril, R. (2012). Multimodal action and selective toxicity of zerovalent iron nanoparticles against cyanobacteria. *Environmental Science and Technology*, 46(4), 2316–2323. <https://doi.org/10.1021/es2031483>
- Moore, M. N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32, 967–976.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.06.014>
- Mueller, N. C., Braun, J., Bruns, J., Černík, M., Rissing, P., Rickerby, D., & Nowack, B. (2012). Application of nanoscale zero valent iron (NZVI) for groundwater remediation in Europe. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(2), 550–558. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0576-3>
- Murr, L. E., Esquivel, E. V., Bang, J. J., De La Rosa, G., & Gardea-Torresdey, J. L. (2004). Chemistry and nanoparticulate compositions of a 10,000 year-old ice core melt water. *Water Research*, 38(19), 4282–4296.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.08.010>
- Nano Iron. (2009). NANO FER 25P. SDS No. 1907/2006. Rajhrad, Czech Republic.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., ... Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5), 372–386.
<https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., ... Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*, 8(7), 543–557.
<https://doi.org/10.1038/nmat2442>
- Nguyen, N. H. A., Moos, N. R. Von, Slaveykova, V. I., Mackenzie, K., Meckenstock, R. U., Thümmel, S., ... Ševců, A. (2018). Biological effects of four iron-containing nanoremediation materials on the green alga *Chlamydomonas sp.* *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154(February), 36–44.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.027>

- Nguyen, N. H. A., Špánek, R., Kasalický, V., Ribas, D., Vlková, D., Řeháková, H., ... Ševců, A. (2018). Different effects of nano-scale and micro-scale zero-valent iron particles on planktonic microorganisms from natural reservoir water. *Environmental Science: Nano*, 5(5), 1117–1129. <https://doi.org/10.1039/c7en01120b>
- Nováková, T., Šváb, M., & Švábová, M. (2009). Využití nanočástic v dekontaminačních technologiích: současný stav. *Chemické Listy*, 103, 524–532.
- Nowack, B., & Bucheli, T. D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150(1), 5–22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.006>
- Nurmi, J. T., Tratnyek, P. G., Sarathy, V., Baer, D. R., Amonette, J. E., Pecher, K., ... Driessen, M. D. (2005). Characterization and properties of metallic iron nanoparticles: Spectroscopy, electrochemistry, and kinetics. *Environmental Science and Technology*, 39(5), 1221–1230. <https://doi.org/10.1021/es049190u>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Office of the Science Advisor. (2007). *Nanotechnology White Paper*. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- Oliver, A. L. S., Croteau, M. N., Stoiber, T. L., Tejamaya, M., Römer, I., Lead, J. R., & Luoma, S. N. (2014). Does water chemistry affect the dietary uptake and toxicity of silver nanoparticles by the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*? *Environmental Pollution*, 189, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.02.010>
- Peng, L., Liu, Y., Gao, S. H., Dai, X., & Ni, B. J. (2015). Assessing chromate reduction by dissimilatory iron reducing bacteria using mathematical modeling. *Chemosphere*, 139, 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.090>
- Schiwy, A., Maes, H. M., Koske, D., Flecken, M., Schmidt, K. R., Schell, H., ... Hollert, H. (2016). The ecotoxic potential of a new zero-valent iron nanomaterial ,

designed for the elimination of halogenated pollutants , and its effect on reductive dechlorinating microbial communities *. *Environmental Pollution*, 216, 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.051>

Scown, T. M., van Aerle, R., & Tyler, C. R. (2010). Review: Do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? *Critical Reviews in Toxicology*, 40(7), 653–670. <https://doi.org/10.3109/10408444.2010.494174>

Sevcu, A., & Cernik, M. (2010). Oxidative stress in microorganisms exposed to iron nanoparticles. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, 141 PII, 97–107. <https://doi.org/10.2495/BF100091>

Ševců, A., El-temsah, Y. S., Filip, J., Joner, E. J., Bobčíková, K., & Černík, M. (2017). Zero-valent iron particles for PCB degradation and an evaluation of their effects on bacteria , plants , and soil organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 21191–21202. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9699-5>

Sovová, T., & Kočí, V. (2012). Ekotoxikologie nanomateriálů. *Chemické Listy*, 106, 82–87.

Staub, R. (1961). Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der pknktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. *Schweizerische Zeitschrift Für Hydrologie*, 23, 82–198. <https://doi.org/10.1007/BF01535092>

Su, Y., Qian, D., Adeleye, A. S., Zhang, J., Zhou, X., Jassby, D., & Zhang, Y. (2018). Impact of ageing on the fate of molybdate-zerovalent iron nanohybrid and its subsequent effect on cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) growth in aqueous media. *Water Research*, 140, 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.037>

The European Commission. (2011). Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. 275, 38–40. <https://doi.org/10.7748/ns.24.26.6.s4>

The Royal Society. (2004). *Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties*. London: Royal Society.

Xie, Y., Dong, H., Zeng, G., Tang, L., & Jiang, Z. (2017). The interactions between nanoscale zero-valent iron and microbes in the subsurface environment : A review.

Journal of Hazardous Materials, 321, 390–407.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.09.028>

Xue, W., Huang, D., Zeng, G., Wan, J., & Cheng, M. (2018). Performance and toxicity assessment of nanoscale zero valent iron particles in the remediation of contaminated soil : A review. *Chemosphere*, 210, 1145–1156.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.118>

Zhang, W. X. (2003). Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *Journal of Nanoparticle Research*, 5(3–4), 323–332.

<https://doi.org/10.1023/A:1025520116015>

Zhang, Y., Zhu, L., Zhou, Y., & Chen, J. (2015). Accumulation and elimination of iron oxide nanomaterials in zebrafish (*Danio rerio*) upon chronic aqueous exposure. *JES*, 30, 223–230.

<https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.08.024>

Zuykov, M., Pelletier, E., Belzile, C., & Demers, S. (2011). Alteration of shell nacre micromorphology in blue mussel *Mytilus edulis* after exposure to free-ionic silver and silver nanoparticles. *Chemosphere*, 84(5), 701–706.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.021>

8. Přílohy

Příloha č. 1 – Výroba Z média

Příloha č. 2 – Bioakumulace v prostředí bez řasy

Příloha č. 3 – Bioakumulace v prostředí s řasou

Příloha č. 4 – Mortalita

Příloha č. 5 – Vlastnosti vody

Příloha č. 1 – Výroba Z média

Pro vytvoření „Z média“ jsem nejdříve připravila zásobní roztoky (Staub, 1961). Do uzavíratelných lahví DURAN jsem v destilované vodě jednotlivě rozpustila následující chemikálie v odpovídajícím množství: 46,7 g/1000 ml dusičnanu sodného (NaNO_3), 5,9 g/1000 ml tetrahydrátu dusičnanu vápenatého ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 3,1 g/1000 ml hydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4), 2,5 g/1000 ml heptahydrátu síran hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 2,1 g/1000 ml uhličitanu sodného (Na_2CO_3). Pro výrobu 1000 ml „Z“ média jsem použila 10 ml každého z pěti výše zmíněných roztoků, 0,2 ml Fe EDTA, 0,08 ml Gaffronova roztoku mikroprvků a 949,72 ml destilované vody.

Příloha č. 2 – Bioakumulace v prostředí bez řasy

Koncentrace nZVI (g/l)	Uhynulé kusy	Váha sušiny (mg)	Obsah Fe (mg/g)
0	0	2,94	0,633304
0	0	3,47	0,390292
0	0	2,07	0,279832
0	0	4,07	0,390292
0	0	3,29	0,508116
0	0	4,53	0,434476
0,001	2	4,24	1,922004
0,001	1	2,85	2,72468
0,001	0	2,90	3,763004
0,001	3	3,78	2,260748
0,001	0	3,80	3,05606
0,001	3	5,20	5,655552
0,001	0	0,86	2,444848
0,001	1	2,94	1,855728
0,001	0	3,35	2,3933
0,001	0	1,84	3,90292
0,001	0	3,80	3,925012
0,001	0	2,50	1,266608
0,001	2	1,54	0,714308
0,001	3	2,58	0,9205
0,001	0	3,47	3,674636
0,001	2	2,24	1,25188

0,01	3	4,88	18,66774
0,01	0	3,26	30,6637
0,01	2	2,62	9,97822
0,01	2	3,84	22,49702
0,01	2	2,43	59,21392
0,01	6	4,34	59,65576
0,01	10	3,12	8,262408
0,01	4	2,36	5,464088
0,01	3	3,92	25,24379
0,01	2	4,74	30,57533
0,01	1	4,53	18,7782
0,01	1	3,53	6,126848
0,01	3	2,03	5,935384
0,01	4	3,33	6,634964
0,01	1	2,82	9,109268
0,01	1	3,60	2,65104
0,1	17	2,54	47,49044
0,1	11	2,26	28,29249
0,1	9	2,56	37,17347
0,1	11	3,21	126,3073
0,1	8	1,40	33,74185
0,1	8	7,19	117,9566
0,1	3	3,92	106,3214
0,1	5	3,00	84,94374
0,1	3	3,73	54,37578
0,1	7	2,74	94,13401
0,1	10	4,10	49,39035
0,1	4	3,69	192,5612
0,1	7	3,46	123,4796
0,1	6	3,74	127,9863
0,1	9	3,36	92,41084
0,1	5	4,81	137,3386

Příloha č. 3 – Bioakumulace v prostředí s řasou

Koncentrace nZVI (g/l)	Uhynulé kusy	Váha sušiny (mg)	Obsah Fe (mg/g)
0,001	0	2,69	1,58326
0,001	1	3,40	1,2887
0,001	1	2,44	1,80418
0,001	1	2,65	2,385936
0,001	2	3,81	3,254888
0,001	1	6,33	1,494892
0,001	3	2,97	6,023752
0,001	2	5,88	4,0502
0,01	0	1,76	6,88534
0,01	3	2,58	3,836644
0,01	2	3,33	6,796972
0,01	2	3,55	10,67044
0,01	4	3,51	33,19691
0,01	9	5,09	17,73988
0,01	6	4,35	5,206348
0,01	7	3,60	14,24934
0,1	4	2,85	62,8812
0,1	1	1,66	31,80512
0,1	3	2,26	50,73796
0,1	14	2,32	57,46129
0,1	10	4,83	98,8617
0,1	7	2,90	65,70897
0,1	8	2,78	65,13458
0,1	10	2,54	82,75663

Příloha č. 4 – Mortalita

Koncentrace nZVI (g/l)	Mortalita bez řasy (%)	Mortalita s řasou (%)
0	0	–
0	0	–
0	0	–
0	0	–
0	0	–
0	0	–
0,001	1	0
0,001	0,5	0,5
0,001	0	0,5
0,001	1,5	0,5

0,001	0	1
0,001	1,5	0,5
0,001	0	1,5
0,001	0,5	1
0,001	0	–
0,001	0	–
0,001	0	–
0,001	0	–
0,001	1	–
0,001	1,5	–
0,001	0	–
0,001	1	–
0,01	1,5	0
0,01	0	1,5
0,01	1	1
0,01	1	1
0,01	1	2
0,01	3	4,5
0,01	5	3
0,01	2	3,5
0,01	1,5	–
0,01	1	–
0,01	0,5	–
0,01	0,5	–
0,01	1,5	–
0,01	2	–
0,01	0,5	–
0,01	0,5	–
0,1	8,5	2
0,1	5,5	0,5
0,1	4,5	1,5
0,1	5,5	7
0,1	4	5
0,1	4	3,5
0,1	1,5	4
0,1	2,5	5
0,1	1,5	–
0,1	3,5	–
0,1	5	–
0,1	2	–
0,1	3,5	–
0,1	3	–
0,1	4,5	–
0,1	2,5	–

Příloha č. 5 – Vlastnosti vody

Čas (h)	Koncentrace (g/l)	Teplota (°C)	Konduktivita (μS/cm)	Koncentrace (g/l)	Průměr teploty (°C)	Průměr konduktivity (μS/cm)
0,1	0,001	22,2	355	0,001	22,10	360,67
0,1	0,001	22,1	361			
0,1	0,001	22	366			
0,1	0,01	22	349	0,01	22,23	353,67
0,1	0,01	22,4	349			
0,1	0,01	22,3	363			
0,1	0,1	22,2	320	0,1	22,33	323,33
0,1	0,1	22,5	317			
0,1	0,1	22,3	333			
0,1	0	21,9	367	0	21,80	366,33
0,1	0	21,8	367			
0,1	0	21,7	365			
0,25	0,001	21,8	352	0,001	22,00	360,67
0,25	0,001	22,1	365			
0,25	0,001	22,1	365			
0,25	0,01	21,9	348	0,01	22,17	353,67
0,25	0,01	22,4	350			
0,25	0,01	22,2	363			
0,25	0,1	22,1	319	0,1	22,27	323,67
0,25	0,1	22,4	321			
0,25	0,1	22,3	331			
0,25	0	21,9	364	0	21,83	362,67
0,25	0	21,8	362			
0,25	0	21,8	362			
1,25	0,001	21,8	362	0,001	22,03	362,67
1,25	0,001	22,1	364			
1,25	0,001	22,2	362			
1,25	0,01	21,9	350	0,01	22,23	353,67
1,25	0,01	22,4	350			
1,25	0,01	22,4	361			
1,25	0,1	22,1	321	0,1	22,33	323,33
1,25	0,1	22,5	319			
1,25	0,1	22,4	330			
1,25	0	21,9	367	0	21,80	364,00
1,25	0	21,8	362			
1,25	0	21,7	363			
2,25	0,001	21,4	357	0,001	21,90	363,00
2,25	0,001	22,1	365			
2,25	0,001	22,2	367			
2,25	0,01	21,8	349	0,01	22,27	353,00
2,25	0,01	22,5	350			
2,25	0,01	22,5	360			
2,25	0,1	22	319	0,1	22,33	324,00
2,25	0,1	22,6	320			

2,25	0,1	22,4	333			
2,25	0	21,9	366	0	21,77	365,33
2,25	0	21,7	365			
2,25	0	21,7	365			
3,25	0,001	21,4	362	0,001	21,93	364,33
3,25	0,001	22,1	365			
3,25	0,001	22,3	366			
3,25	0,01	21,7	354	0,01	22,27	354,33
3,25	0,01	22,5	349			
3,25	0,01	22,6	360			
3,25	0,1	21,9	338	0,1	22,33	329,33
3,25	0,1	22,6	320			
3,25	0,1	22,5	330			
3,25	0	21,9	367	0	21,77	364,33
3,25	0	21,7	363			
3,25	0	21,7	363			
24	0,001	23,1	363	0,001	23,10	367,67
24	0,001	23	371			
24	0,001	23,2	369			
24	0,01	22,9	325	0,01	23,27	349,00
24	0,01	23,4	356			
24	0,01	23,5	366			
24	0,1	22,9	325	0,1	23,17	328,00
24	0,1	23,4	323			
24	0,1	23,2	336			
24	0	22,7	370	0	22,57	368,33
24	0	22,5	367			
24	0	22,5	368			

Čas (h)	Konc. (g/l)	Obsah O ₂ (mg/l)	Nasycení vody O ₂ (%)	Konc. (g/l)	Průměr obsahu O ₂ (mg/l)	Průměrné nasycení vody O ₂ (%)
0,1	0,001	8,06	94,6	0,001	7,96	93,20
0,1	0,001	7,88	92,3			
0,1	0,001	7,94	92,7			
0,1	0,01	7,93	92,6	0,01	7,84	91,97
0,1	0,01	7,85	92,3			
0,1	0,01	7,75	91			
0,1	0,1	6,71	78,6	0,1	6,65	78,10
0,1	0,1	6,71	79			
0,1	0,1	6,53	76,7			
0,1	0	7,95	92,6	0	7,96	92,63
0,1	0	7,97	92,7			
0,1	0	7,97	92,6			
0,25	0,001	8,01	93,2	0,001	7,91	92,40
0,25	0,001	7,88	92,1			
0,25	0,001	7,85	91,9			
0,25	0,01	7,89	92	0,01	7,87	92,23

0,25	0,01	7,84	92,3			
0,25	0,01	7,88	92,4			
0,25	0,1	6,65	77,8	0,1	6,56	77,00
0,25	0,1	6,62	77,9			
0,25	0,1	6,41	75,3			
0,25	0	7,83	91,3	0	7,91	92,13
0,25	0	7,93	92,3			
0,25	0	7,98	92,8			
1,25	0,001	7,98	92,9	0,001	7,86	91,90
1,25	0,001	7,82	91,5			
1,25	0,001	7,79	91,3			
1,25	0,01	7,88	91,8	0,01	7,85	92,10
1,25	0,01	7,83	92,2			
1,25	0,01	7,85	92,3			
1,25	0,1	6,77	73,3	0,1	6,45	73,87
1,25	0,1	6,41	75,6			
1,25	0,1	6,18	72,7			
1,25	0	7,82	91,2	0	7,91	92,00
1,25	0	7,94	92,3			
1,25	0	7,97	92,5			
2,25	0,001	8,27	95,5	0,001	7,98	93,03
2,25	0,001	7,83	91,7			
2,25	0,001	7,84	91,9			
2,25	0,01	8	93	0,01	7,90	92,83
2,25	0,01	7,84	92,5			
2,25	0,01	7,87	93			
2,25	0,1	6,23	72,8	0,1	6,25	73,57
2,25	0,1	6,36	75,2			
2,25	0,1	6,17	72,7			
2,25	0	7,83	91,3	0	7,93	92,17
2,25	0	7,97	92,6			
2,25	0	7,98	92,6			
3,25	0,001	8,27	95,4	0,001	7,98	93,03
3,25	0,001	7,85	91,9			
3,25	0,001	7,81	91,8			
3,25	0,01	8,01	92,9	0,01	7,92	92,97
3,25	0,01	7,89	93,1			
3,25	0,01	7,87	92,9			
3,25	0,1	6,3	73,5	0,1	6,18	72,70
3,25	0,1	6,32	74,6			
3,25	0,1	5,93	70			
3,25	0	7,76	90,4	0	7,89	91,97
3,25	0	7,93	92,9			
3,25	0	7,98	92,6			
24	0,001	7,63	91	0,001	7,51	89,50
24	0,001	7,44	88,5			
24	0,001	7,45	89			

24	0,01	7,67	91,2	0,01	7,53	90,13
24	0,01	7,39	88,7			
24	0,01	7,53	90,5			
24	0,1	6,97	82,7	0,1	6,97	83,20
24	0,1	7,05	84,5			
24	0,1	6,89	82,4			
24	0	7,65	90,5	0	7,70	90,93
24	0	7,69	90,7			
24	0	7,77	91,6			

Čas (h)	Koncentrace (g/l)	pH	Koncentrace (g/l)	Průměr pH
0,1	0,001	8,52	0,001	8,38
0,1	0,001	8,36		
0,1	0,001	8,27		
0,1	0,01	8,41	0,01	8,34
0,1	0,01	8,36		
0,1	0,01	8,24		
0,1	0,1	8,39	0,1	8,32
0,1	0,1	8,32		
0,1	0,1	8,25		
0,1	0	8,22	0	8,25
0,1	0	8,26		
0,1	0	8,26		
0,25	0,001	8,39	0,001	8,30
0,25	0,001	8,26		
0,25	0,001	8,25		
0,25	0,01	8,36	0,01	8,29
0,25	0,01	8,27		
0,25	0,01	8,23		
0,25	0,1	8,31	0,1	8,28
0,25	0,1	8,26		
0,25	0,1	8,28		
0,25	0	8,27	0	8,30
0,25	0	8,31		
0,25	0	8,32		
1,25	0,001	8,59	0,001	8,41
1,25	0,001	8,32		
1,25	0,001	8,33		
1,25	0,01	8,46	0,01	8,38
1,25	0,01	8,34		
1,25	0,01	8,33		
1,25	0,1	8,4	0,1	8,35
1,25	0,1	8,34		
1,25	0,1	8,32		
1,25	0	8,28	0	8,31
1,25	0	8,31		
1,25	0	8,33		

2,25	0,001	8,56	0,001	8,39
2,25	0,001	8,31		
2,25	0,001	8,31		
2,25	0,01	8,44	0,01	8,37
2,25	0,01	8,34		
2,25	0,01	8,33		
2,25	0,1	8,38	0,1	8,35
2,25	0,1	8,34		
2,25	0,1	8,32		
2,25	0	8,3	0	8,30
2,25	0	8,3		
2,25	0	8,31		
3,25	0,001	8,52	0,001	8,37
3,25	0,001	8,32		
3,25	0,001	8,28		
3,25	0,01	8,4	0,01	8,35
3,25	0,01	8,34		
3,25	0,01	8,32		
3,25	0,1	8,35	0,1	8,34
3,25	0,1	8,34		
3,25	0,1	8,34		
3,25	0	8,28	0	8,33
3,25	0	8,34		
3,25	0	8,36		
24	0,001	8,47	0,001	8,36
24	0,001	8,34		
24	0,001	8,26		
24	0,01	8,42	0,01	8,34
24	0,01	8,32		
24	0,01	8,29		
24	0,1	8,35	0,1	8,32
24	0,1	8,29		
24	0,1	8,33		
24	0	8,36	0	8,36
24	0	8,36		
24	0	8,36		