

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Studium chronické toxicity nanočástic stříbra vůči organismu
*Drosophila melanogaster***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:
Studijní program:
Studijní obor:

Miroslava Hlistová
B1407 - Chemie
Ekochemie

Vedoucí práce:

RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Olomouc 2013

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Aleše Panáčka, Ph.D. Veškeré literární prameny a zdroje informací, které jsem při zpracování využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu mé práce RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za jeho čas a cenné rady, které mi při vedení a zpracování práce ochotně poskytoval. Zároveň děkuji Mgr. Anně Balzerové za ochotnou pomoc při charakterizaci koloidní disperze a měření koncentrace na AAS a také Mgr. Janu Kolaříkovi za pomoc při stanovování obsahu stříbra za účelem zjištění jeho bioakumulace v organismu metodou AAS. Velký dík patří také Mgr. Daně Šafářové Ph.D. a Janě Veselské, za důležité informace ohledně laboratorního chovu a manipulace s organismem *Drosophila melanogaster* a dalším pracovníkům Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL za poskytnutí přátelského prostředí a prostoru pro moji práci. Můj dík patří také mé rodině a přátelům za podporu při studiu a sepisování této práce.

Bibliografická identifikace

Autor:	Miroslava Hlistová
Název práce:	Studium chronické toxicity nanočástic stříbra vůči organismu <i>Drosophila melanogaster</i>
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2013
Abstrakt:	<p>V posledních letech se výroba produktů obsahujících nanočástice stříbra prudce zvyšuje, ale jejich ekotoxické účinky stále přesně neznáme. Cílem této bakalářské práce bylo studium chronického toxického vlivu nanočástic stříbra na eukaryotický organismus <i>Drosophila melanogaster</i> (Octomilka obecná). Disperze nanočástic stříbra o průměrné velikosti 28 nm byla připravena chemickou redukcí komplexního kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltosou. Roztok byl následně zakoncentrován a stabilizován pomocí želatiny. Studium toxicity bylo provedeno přidáním koloidního stříbra do kultivačního média. Byly testovány koncentrace 0,03 mg/l; 0,3 mg/l a 3 mg Ag/l média během šesti po sobě jdoucích generací. Vyhodnocení vlivu spočívalo ve srovnávání jedinců vystavených působení stříbra s jedinci chovanými na médiu bez přídavku stříbra. Výraznější ovlivnění reprodukce, vzhledu a hmotnosti jedinců bylo pozorováno u nejvyšší koncentrace. U nižších koncentrací již nebyly zaznamenány téměř žádné změny.</p>
Klíčová slova:	nanočástice, koloidní stříbro, chronická toxicita, ekotoxicita, <i>Drosophila melanogaster</i>
Počet stran:	50
Jazyk:	Český

Bibliographic identification

- Author:** Miroslava Hlistová
- Title:** Study of the Chronic Toxicity of Silver Nanoparticles to *Drosophila Melanogaster*
- Type of thesis:** Bachelor
- Department:** Department of Physical Chemistry
- Supervisor:** RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
- The year of presentation:** 2013
- Abstract:** In the last years the manufacture of products containing silver nanoparticles has been rapidly increasing, but their ecotoxicological effects are still unknown. The aim of this bachelor thesis was to study the chronic toxic effects of silver nanoparticles on the eukaryotic organism *Drosophila melanogaster*. The dispersion of silver nanoparticles with an average size of 28 nm was prepared by the chemical reduction of complex cation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ with maltose. The dispersion was concentrated and stabilized with gelatin. The study of toxicity was performed by adding colloidal silver into the culture medium. Concentrations of 0,03 mg/l; 0,3 mg/l and 3 mg Ag /l of medium were tested on six successive generations. Evaluation of the impact lay in comparison of individuals exposed to silver with individuals bred on the medium without the addition of silver. A noticeable effect on the reproduction, appearance and weight of individuals was observed at the highest concentration. Almost no changes were noticed at lower concentrations.
- Keywords:** nanoparticles, colloidal silver, chronic toxicity, ecotoxicity, *Drosophila melanogaster*
- Number of pages:** 50
- Language:** Czech

Obsah

Úvod	7
TEORETICKÁ ČÁST	8
1. Koloidní soustavy	9
1.1. Optické vlastnosti koloidních soustav	9
1.1.1. Absorpce	10
1.1.2. Rozptyl záření	10
1.2. Metody studia koloidních soustav	11
1.3. Kinetické vlastnosti koloidních soustav	13
1.4. Elektrické vlastnosti koloidních soustav.....	13
1.5. Metody přípravy koloidního stříbra	14
2. Organismus Drosophila melanogaster (Octomilka obecná)	16
2.1. Vzhled a stavba těla	16
2.2. Rozmnožování a životní cyklus	18
2.3. Drosophila melanogaster jako pokusný objekt.....	19
3. Toxikologie	20
3.1. Ekotoxikologie.....	21
3.2. Nanotoxikologie.....	22
3.3. Chronická a subchronická toxicita stříbra	24
4. Praktické využití nanomateriálů	25
4.1. Antibakteriální vlastnosti nanočástic stříbra.....	26
4.2. Praktické využití nanočástic stříbra	27
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
5. Materiál a metody	29
5.1. Chemikálie	29
5.2. Přístrojové vybavení	29
5.3. Pracovní postupy.....	30
5.3.1. Příprava koloidní disperze stříbra	30
5.3.2. Příprava kultivačního média	31
5.3.3. Postup při mineralizaci těl a stanovení bioakumulace	32

5.4.	Průběh pokusné práce	32
6.	Výsledky	35
6.1.	Vlastnosti disperze stříbra přidávané do kultivačního média	35
6.2.	Vliv koloidního stříbra na počet vylíhnutých jedinců	36
6.3.	Vliv koloidního stříbra na hmotnost jedinců	37
7.	Diskuze	37
7.1.	Vliv koloidního stříbra na počet vylíhnutých jedinců	38
7.2.	Vliv koloidního stříbra na hmotnost jedinců	39
7.3.	Vliv koloidního stříbra na vzhled jedinců.....	40
7.4.	Vliv koloidního stříbra na délku vývojového cyklu	42
7.5.	Bioakumulace stříbra v jedincích octomilky-(<i>Drosophila melanogaster</i>)	42
Závěr	44
Summary	45
Seznam použitých zdrojů	46

Úvod

Nanoobjekty jsou odjakživa přirozenou součástí přírody a tvoří také živou hmotu - buňky a jejich části, viry i DNA (makromolekula o průměru 2 nm). V atmosféře se běžně vyskytují nanočástice vznikající fotochemicky, vlivem lesních požárů, sopečných erupcí nebo erozí půd, ale i antropogenní činností jako například spalovacími procesy a těžbou. Na výrobu umělých nanočástic se specializuje nové průmyslové odvětví - nanotechnologie. Jejich rozvoj v posledních letech nejlépe dokumentují počty publikovaných článků, které se týkají nanomateriálů. Na toto téma bylo v roce 1990 evidováno méně než 1000 publikací, nicméně do roku 2004 se tento počet zvýšil na 28 000 a rok od roku stále rapidně roste.¹ Tento trend je způsoben především zaváděním nanomateriálů do komerčních produktů, kdy jejich popularita u spotřebitelů jaksí předběhla vědecký výzkum.²

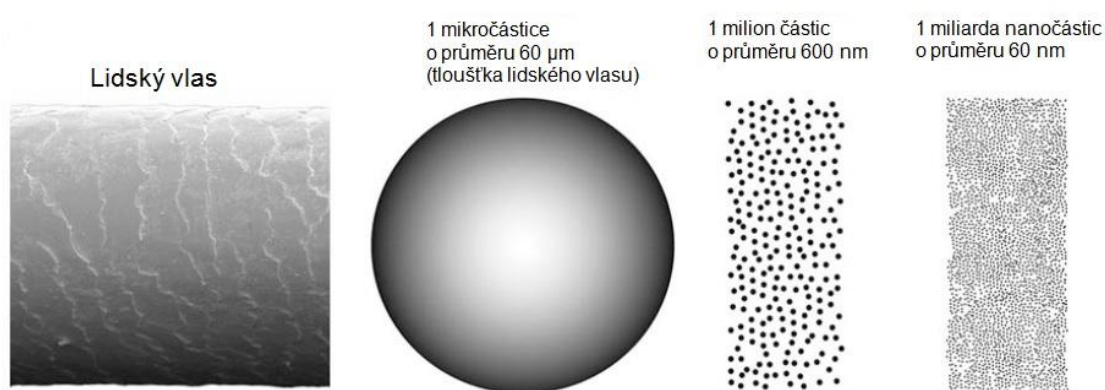
Jedním z nejčastěji přidávaných nanomateriálů do různých výrobků jsou nanočástice stříbra díky svým specifickým fyzikálně-chemickým a vynikajícím antibakteriálním vlastnostem. Nicméně stříbro patří mezi těžké kovy a může vykazovat také toxické účinky, které jsou momentálně intenzivně studovány. Kromě toho se nanočástice stříbra mohou uvolňovat ze zmiňovaných výrobků do odpadních vod a pak putovat až do vodních toků, neboť technologie v čistírnách odpadních vod stále nejsou uzpůsobeny k jejich odstranění. Takto se pak dostanou přímo do životního prostředí, kde mohou ohrožovat organismy v něm žijící.¹

Nyní se intenzivně studuje ekotoxicita nanočástic stříbra vůči mnoha druhům prokaryotických i eukaryotických organismů. Tyto studie mají vést k objasnění chování a vlivu nanočástic stříbra na živé organismy. Většina studií se z důvodu menší náročnosti zaměřuje pouze na testování akutních (krátkodobých) účinků, ale nanostříbro může na organismy v přírodě působit i dlouhodobě. Proto je nutné provádět také testy chronické toxicity. Náplní této bakalářské práce je studium účinků nanočástic stříbra právě pomocí testů chronické toxicity vůči zástupci z třídy hmyzu – Octomilce obecné (*Drosophila melanogaster*). Hlavním cílem je zjištění takové koncentrace stříbra, která již nebude mít v průběhu šesti generací žádný vliv na vzhled a životní cyklus organismu. Výzkumná část mé práce navazuje na výsledky diplomové práce Kateřiny Beníčkové,³ kde byly vůči octomilce testovány koncentrace 3 mg/l, 5mg/l a 7 mg stříbra/l média v osmi generacích. Tehdy docházelo i v nejnižší testované koncentraci k ovlivnění reprodukce, hmotnosti těla a zesvětlení zbarvení jedinců.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Koloidní soustavy

Různé typy disperzních soustav můžeme vidět velmi často v přírodě nebo laboratoři, příkladem může být např. mlha, dým, emulze, pěna nebo pravé roztoky látek. Disperzní soustavy obsahují minimálně dvě fáze nebo dvě složky, kde jedna fáze (disperzní podíl) je ve formě částic rozptýlena ve fázi druhé (disperzní prostředí).^{4,5,6} Podle velikosti rozptýlených částic je možné rozlišovat analytické ($d < 1 \text{ nm}$), koloidní ($1 \text{ nm} < d < 1 \text{ }\mu\text{m}$) a hrubé disperze ($d > 1 \text{ }\mu\text{m}$).^{4,7} Koloidní disperzní soustavy vynikají řadou specifických fyzikálně chemických vlastností, které souvisí hlavně s velkým povrchem dispergovaných částic stýkajícím se s disperzním prostředím v porovnání s vlastním objemem dispergovaných částic.⁷ Pro vysvětlení velkého povrchu koloidních částic si představme částici uhlíku o velikosti $60 \text{ }\mu\text{m}$ (přibližně šířka lidského vlasu), která má hmotnost asi $0,3 \text{ }\mu\text{g}$ a plocha jejího povrchu činí $0,01 \text{ mm}^2$. Když tuto částici dělíme, dostaneme milion částic o velikosti 600 nm a miliardu částic o velikosti 60 nm (Obr. 1), přičemž máme stále stejný objem a hmotnost hmoty. Miliarda částic má ale mnohonásobně větší povrch, v našem případě $11,3 \text{ m}^2$.(cit. 12)



Obr. 1: Srovnání velikosti a počtu částic vzniklých dělením jediné větší částice¹²

1.1. Optické vlastnosti koloidních soustav

Při průchodu světelného paprsku (elektromagnetického záření) koloidní soustavou dochází ke snížení intenzity světla v důsledku pravé absorpce a zároveň rozptylu dopadajícího záření na částicích systému. Převaha jednoho nebo druhého jevu závisí na celkovém

charakteru dané soustavy, na vlnové délce světla, ale především na velikosti rozptýlených částic.^{4,7}

1.1.1. Absorpce

K absorpci záření částicemi dochází tehdy, pokud energie dopadajícího fotonu elektromagnetického záření odpovídá rozdílu energií mezi základním a excitovaným stavem částice.⁹ Změnou těchto stavů se zvyšuje vnitřní energie molekul a ta přechází na tepelnou energii. Absorpci elektromagnetického záření látkou A charakterizuje Lambert-Beerův zákon:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon cd \quad (1)$$

kde I je intenzita záření prošlého látkou, I_0 je intenzita záření dopadajícího na látku, ε je absorpční koeficient, c je koncentrace látky a d je šířka vrstvy, kterou záření projde.

U elektricky vodivých koloidních částic kovů je však tento zákon komplikován závislostí absorpce záření na velikosti částic.⁷

1.1.2. Rozptyl záření

Při rozptylu světla nedochází k žádným přechodům elektronů mezi energetickými hladinami ani ke změnám vlnové délky, ale v podstatě k elastickému odrazu fotonu od částice do všech směrů.⁷ Koloidní disperze v tenkých vrstvách se jeví v procházejícím světle jako čiré. Mírný zákal se jeví až v tlustých vrstvách, protože částice v těchto soustavách jsou stejně velké nebo menší než vlnová délka procházejícího světla a intenzita rozptýleného světla je nižší než u hrubých disperzí.¹⁰

Rozptyl světla vzniká díky polarizaci molekul účinkem kmitajícího elektrického pole. Tyto molekuly se mění v oscilující dipóly, které obklopuje periodické elektrické pole šířící se všemi směry jako vlnění. Všechny ozářené molekuly tedy vysílají záření o stejné vlnové délce, jako na ně dopadlo. Poprvé rozptyl světla takto popsal Rayleigh v roce 1871 na malých kulovitých od sebe vzdálených částicích při vyšší vlnové délce, než je jejich velikost a odvodil také vztah pro intenzitu záření rozptýleného jednotkou objemu zředěné disperzní soustavy pod úhlem θ :

$$I_{\theta} = I_0 \frac{\pi^2 \cdot \alpha^2 \cdot \nu}{\varepsilon_0^2 \cdot \lambda^4 \cdot r^2} \cdot \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{2} \quad (2)$$

kde I_0 je celková intenzita dopadajícího záření, v je počet částic v jednotce objemu soustavy, ϵ_0 je permitivita vakua, λ je vlnová délka záření dopadajícího i rozptýleného, r je vzdálenost detektoru intenzity od zdroje rozptýleného světla, θ je úhel pozorování (sevřený dopadajícím a rozptýleným paprskem), α je polarizovatelnost částice.¹⁰

1.2. Metody studia koloidních soustav

Charakteristickou vlastností disperzí nanočástic kovů je jejich intenzivní zbarvení, např. oranžovožluté koloidy stříbra nebo rubínově červené koloidy zlata. Za tuto vlastnost je zodpovědný zvláštní jev, tzv. *povrchový plasmon*.¹⁶ Můžeme jej vysvětlit jako oscilaci vodivostních elektronů kovu souběžně s fotony elektromagnetického záření. Taková soustava po dopadu světla, tuto světelnou energii silně absorbuje a tím právě vzniká charakteristické zbarvení. Vlnová délka, při které dochází k absorpci, je označována jako *absorpční pás povrchového plasmonu*. V UV/Vis spektrech koloidů stříbra se vyskytuje výrazný absorpční pík při vlnové délce 390-410 nm, což značí částice stříbra o velikosti pod 100 nm, dobře separované a neagregované.² Jednou z technik využívaných k charakterizaci koloidních roztoků je proto **molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis spektrometrie)**. Jako zdroj záření jsou zde používány pro UV oblast deuteriové a vodíkové výbojky a pro viditelnou oblast wolframové žárovky, jejichž paprsek prochází monochromátorem a poté kapalným vzorkem umístěným v kyvetě a část záření se absorbuje. Množství absorbované energie určité vlnové délky se nazývá absorbance a její závislost na vlnové délce záření vynesena do grafu se nazývá absorpční spektrum. Spektra jsou zpracována programem v počítači na základě elektrického signálu vysíleného detektorem prošlého záření.^{9,11}

Ke stanovení koncentrace mnoha kovů, tím pádem také stříbra, v roztoku se používá **atomová absorpční spektrometrie (AAS)**. Vzorek se působením vysokých teplot převede na volné atomy v plynné fázi, které absorbují záření vlnové délky nejintenzivnější pro daný kov. Jako zdroj záření se používají různé výbojky obsahující stanovovaný kov, jejichž paprsek prochází přes oblak atomů a monochromátor na detektor, který opět zaznamená intenzitu prošlého záření a přemění ji na elektrický signál pro počítač. Proměřením kalibračních roztoků se vytvoří kalibrační křivka (závislost absorbance na koncentraci), z jejíž směrnice je možné vypočítat neznámou koncentraci kovu v roztoku.¹¹

Měřením intenzity rozptýleného světla můžeme získat informace o koncentraci a velikosti částic, u makromolekul lze zjistit také relativní molekulovou hmotnost.^{7,10}

Intenzitu rozptýleného záření lze měřit přímo (nefelometricky). **Nefelometrie** je vhodná především k měření zředěných roztoků, ale konstrukce přístroje je obtížná. Častěji se měří zeslabení záření způsobené jeho rozptylem na částicích. Tato metoda se nazývá **turbidimetrie** a k měření prošlého záření lze použít obyčejný spektrofotometr. Zeslabení paprsku je výraznější u koncentrovanějších roztoků, proto je vhodná právě pro jejich měření.⁴

Dynamický rozptyl světla (DLS - Dynamic Light Scattering) je metoda využívaná ke zjišťování distribuce velikosti koloidních částic. Zdrojem koherentního záření je zde laser, jehož rozptýlené paprsky v určitých směrech interferují a dochází tedy k zesílení jejich intenzity.⁷ DLS měří časově závislé kolísání v intenzitě rozptýleného světla, které se vyskytuje v důsledku Brownova pohybu částic. Analýza těchto výkyvů intenzity umožňuje vytvoření korelační funkce pro určení difúzního koeficientu částic (následně převeden na hydrodynamický průměr částic). Odpovídající velikost částic pro tyto hydrodynamické průměry se vypočítá podle Mieho teorie.¹³

Pozorujeme-li kolmo na směr záření úzký svazek paprsků procházející koloidní nebo hrubou disperzí, rozptýlené světlo na částicích se jeví jako světelný kužel (tento jev poprvé pozoroval Tyndall, podle něj tzv. Tyndallův kužel). Na principu tohoto jevu pracuje metoda zvaná **ultramikroskopie**, kdy do objektivu přichází již rozptýlené světlo a částice se jeví jako zářící body na tmavém pozadí. Pomocí ultramikroskopu je možné částice spočítat a pozorovat jejich pohyb, což se dá využít při studiu kinetiky koagulace a rychlosti difúze. Nelze však přesně určit jejich tvar ani velikost,⁴ tento problém pak nejlépe řeší **elektronová mikroskopie**. Elektronový mikroskop používá svazek rychle letících elektronů místo klasického světla, což zaručuje vysokou rozlišovací schopnost (vlnová délka záření elektronů je velmi krátká). Principem vytvoření obrazu je rozptyl elektronů tuhými částicemi do stran, kdy tlustší vrstvy rozptylují více, takže rozptýlené elektrony opustí osu mikroskopu a obraz nevytvoří. Důsledkem toho je neprosvětlenost daných částí obrazu.¹⁰ Další moderní metodou studia objektů o rozměrech nanometrů je **mikroskopie atomárních sil** (AFM-Atomic Force Microscopy). Tato technika je nejrozšířenější odnoží skenovací tunelovací mikroskopie (STM) a pracuje na podobném principu, který však nespočívá v monitorování proudu mezi vodivým hrotem a vodivým vzorkem, ale spočívá v měření sil atomárního původu (přitažlivých nebo odpudivých) působících mezi atomy velmi ostrého hrotu a vzorku. Hrot je upevněn na pružném nosníku a pohybuje se nad vzorkem nebo se ho dotýká. Nosník se vlivem interakcí hrotu a vzorku ohýbá a podává tak

informace o povrchu vzorku, které jsou zaznamenány detektorem a následně zpracovány v obraz. Výhodou této metody je možnost měření i nevodivých vzorků.¹⁴

1.3. Kinetické vlastnosti koloidních soustav

Kinetické vlastnosti koloidních soustav jsou dány tím, že koloidní částice i molekuly disperzního prostředí konají chaotický tepelný pohyb, jehož vlivem do sebe vzájemně narážejí, mění svůj směr a pohybují se. Tento jev nazýváme **Brownův pohyb**, podle jeho prvního pozorovatele. Intenzita tohoto pohybu roste se zvyšující se teplotou, zmenšující se velikostí částic a viskozitou prostředí, závisí také na tvaru částic.^{4,6} Větší částice (okolo 4 μ m) spíše pouze vibrují kolem určitého centra, zatímco malé částice konají kromě translačního i rotačního pohybu.⁴

V soustavách, které mají v různých svých částech různé koncentrace částic (koncentrační gradient), dochází vlivem Brownova pohybu k jejich samovolnému vyrovnávání.⁷ Tento proces se nazývá **difúze** a její rychlost klesá s rostoucím poloměrem částic. V koloidních systémech je tím pádem menší, než u analytických disperzí. Difúze je popsána pomocí Fickových zákonů.⁴

Velmi podobným dějem je **osmóza**, při níž se roztoky také snaží vyrovnávat koncentrace, ale tyto roztoky jsou od sebe odděleny polopropustnou membránou. Takovou membránou procházejí pouze molekuly rozpouštědla, protože její póry mají malou velikost. Na principu osmózy jsou založeny separační děje jako *dialýza*, *elektrodialýza*, *ultrafiltrace* a *elektrofiltrace*, které se používají k oddělování nízkomolekulárních složek (nejčastěji elektrolytů) z koloidních roztoků.⁷

V důsledku gravitační síly nebo odstředivé síly v centrifuze se částice pohybují v jejím směru, tento děj se nazývá **sedimentace**. Rychlost pohybu částic je závislá na jejich vlastnostech (hmotnosti, tvaru a hustotě) a také na povaze prostředí, ve kterém se částice pohybuje (vztlaková síla a viskozitní odpor prostředí).⁷

1.4. Elektrické vlastnosti koloidních soustav

Elektrické vlastnosti koloidních soustav jsou příčinou elektrických nábojů s různým znaménkem na rozhraní mezi pevnou a kapalnou fází. V blízkosti tohoto rozhraní se, vlivem vytvořeného elektrického pole, opačně nabitě ionty uspořádají do tzv. **elektrické**

dvojvrstvy. Teorii jejího uspořádání se jako první zabýval Helmholtz, jím vytvořenou teorií později doplnili Goüy s Chapmanem, ale až Stern ve své teorii zahrnul, na rozdíl od svých předchůdců, také rozměry iontů a interakce mezi nimi.^{7,15}

Elektrická dvojvrstva se vlivem pohybu fáze s dvojvrstvou vůči roztoku rozdělí na dvě části s nábojem opačného znaménka. Dělení se uskutečňuje na tzv. pohybovém rozhraní. Toto místo má specifický elektrokinetický potenciál, nazývaný také jako **ζ-potenciál** (zeta potenciál), který je výrazně ovlivňován přidávkem elektrolytů.⁴ Díky ζ-potenciálu dochází k významným elektrokinetickým jevům. Známe čtyři druhy jevů a můžeme je rozdělit je podle toho, jaká fáze se pohybuje a jaká je v klidu. Pokud se pohybuje kapalná fáze a pevná je v klidu, jde o **elektroosmózu** nebo **potenciál proudění**, je-li tomu naopak, pak se jedná o **elektroforézu** nebo **sedimentační potenciál**. V praxi se využívá nejvíce elektroforéza a elektroosmóza.⁶

Elektroforéza je pohyb částic, majících elektrickou dvojvrstvu, v elektrickém poli. Elektroforetické metody jsou používány v lékařství i výzkumu (zejména k separaci biomakromolekul – bílkovin, DNA apod.) a k nanášení různých povlaků na elektrody tam, kde je to výhodnější, než použití klasické elektrolýzy.⁴

Elektroosmóza je transport kapaliny kapilárami (porézní hmoty), které mají na svých stěnách elektrickou dvojvrstvu. Pohyb je vyvolaný rozdílem potenciálů na obou koncích kapilár. Tento jev se využívá při elektrodialýze, což je metoda ke snižování koncentrace nízkomolekulárních elektrolytů v koloidních roztocích,¹⁵ ale také například k odvodňování porézních a práškovitých hmot nebo ve stavebnictví k vysoušení vlhkého zdiva.⁴

1.5. Metody přípravy koloidního stříbra

Koloidní soustavy se připravují buď *dispergací* (rozmělnění velkých částic dodáním práce) nebo *kondenzací* (spojováním molekul pravých roztoků), ale vždy je nutná přítomnost látek, které jsou schopny zastavit jejich růst a vzniklé částice stabilizovat.⁴

Dispergovat částice je možné fyzikálními postupy (např. laserovou ablací, mletím v kulových mlýnech, rozmělněním pomocí ultrazvuku), elektrickým proudem (elektrické rozprašování odtrháváním částic z elektrod) nebo peptizací (převedení sraženiny koloidu zpět na koloidní roztok). Kondenzace dosáhneme buď fyzikálními metodami založenými na změně rozpouštědla, ve kterém má látka nízkou rozpustnost nebo častějšími chemickými metodami. Chemicky lze koloidní soustavy připravit srážecími

nebo oxidačně-redukčními reakcemi stříbrných solí různými činidly. Oxidací je možné připravit částice nekovů (např. síry, oxidací sirovodíku kyslíkem). Redukce je oblíbeným způsobem přípravy nanočástic kovů, tím pádem také stříbra.⁷

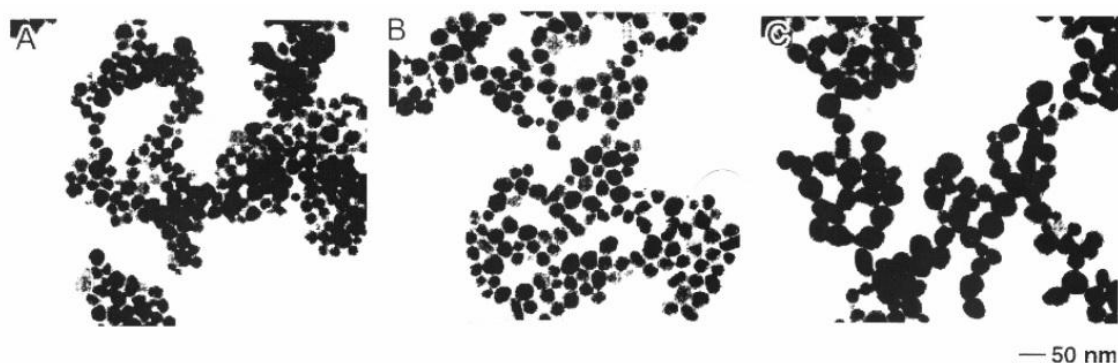
V současnosti existuje mnoho organických i anorganických činidel používaných k redukci nanočástic stříbra z jeho rozpustných sloučenin. Velkou řadou postupů lze připravovat částice různých velikostí a tvarů. Ze skupiny činidel stojí za zmínku redukce pomocí redukujících cukrů (Tollensova metoda), citrátu sodného nebo tetrahydridoboritanu sodného.

Modifikovaná Tollensova metoda je založena na redukci amoniakálního komplexu stříbra redukujícím cukrem. Je možné použít jak disacharidy (maltosa, laktosa), tak i monosacharidy (glukosa, fruktosa, galaktosa). Výběrem redukujícího cukru, úpravou pH, teploty a koncentrace amoniaku jako komplexotvorného činidla lze řídit velikost vznikajících částic stříbra v rozmezí od 25 až po 75 nm (viz Obr. 2). Nanočástice připravené touto metodou mají dobré katalytické a antibakteriální účinky a navíc nejsou tak cytotoxické jako iontové stříbro. Nevýhodou je nutnost takto připravenou disperzi stabilizovat proti agregaci.⁸

Borohydridová metoda přípravy stříbra podle Creightona, Blatchforda a Albrechta spočívá v redukci dusičnanu stříbrného silným redukčním činidlem (tetrahydridoboritanem sodným) ve vodném prostředí, kdy vzniká disperze stabilní až několik měsíců. Tímto postupem vznikají nanočástice o velikosti 5 - 20 nm. Velikost a povrchový náboj částic je možné u této metody řídit změnou poměru dusičnanu a borohydridu.²

Citrátová metoda podle Lee a Meisela využívá jako redukční činidlo citrátový anion (citrát sodný), který rovnou vznikající nanočástice stříbra stabilizuje. Redukce probíhá za varu a výsledkem jsou částice stříbra s větší velikostí (30 – 120 nm) i polydisperzitou, než je tomu u předchozí metody. Stabilita této disperze je ale menší než u borohydridové metody.²

K přípravě nanočástic stříbra lze rovněž použít řadu dalších redukčních činidel jako je vodík, peroxid vodíku, hydroxylamin, hydrazin, formaldehyd a jeho deriváty, kyselina askorbová, EDTA i jednoduché cukry.²



Obr. 2: Snímky z transmisního elektronového mikroskopu zobrazující nanočástice stříbra připravené Tollensovým postupem při různých teplotách. A) 27 °C, ~20 nm, B) 30 °C, ~30 nm a C) 35 °C, ~40 nm.(cit. 2)

2. Organismus *Drosophila melanogaster* (Octomilka obecná)

Larvy rodu *Drosophila* se živí ovocem, zeleninou nebo houbami, které prochází kvašením (v důsledku kvasinek nebo bakteriální kontaminace). Díky tomu jde o druhy synantropní – drží se v blízkosti lidských obydlí. Proto jsou octomilky rozšířeny téměř po celém světě s výjimkou území s extrémní nadmořskou výškou nebo šířkou.^{17,18} Celosvětově je popsáno již přes tisíc druhů a v ČR se běžně vyskytuje okolo 60 druhů.¹⁹

2.1. Vzhled a stavba těla

Octomilka obecná je drobná muška, dosahující velikosti 1,8-2,5 mm. Tělo je zbarveno žlutohnědě s tmavými kresbami.¹⁹ Sameček je vždy o něco menší než samička. Tělo tvoří tři základní části: hlava, hrud' a zadeček.

Hlava nese jeden pár výrazně červených složených očí, jeden pár vícečlánekových tykadél s čichovými a hmatovými receptory a lízavě savé ústní ústrojí.

Hlava velmi široce přisedá k hrudi,²⁰ která je tříčláneková.

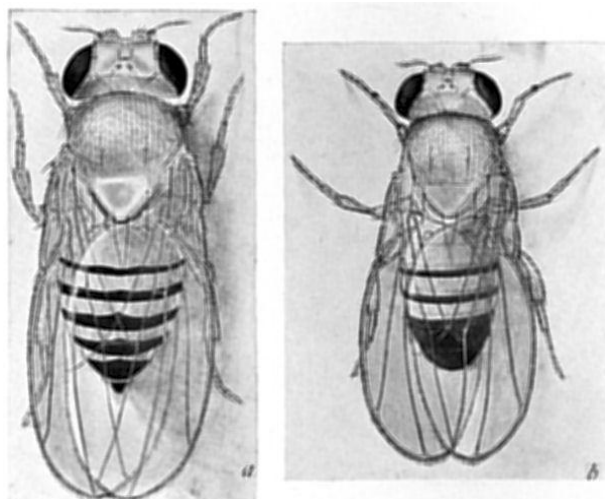
Hrud' nese tři páry končetin a křídla. Avšak plně vyvinutý je pouze první pár křídel, druhý zakrněl a přeměnil se v kyvadélka (haltery) sloužící k udržování rovnováhy při letu.

Křídla jsou celoplošně protkána žilnatinou, která je tvořena trachejemi, nervy a kanálky a proudí jí hemolymfa.

Zadeček octomilek je článkovaný, není zřetelně oddělen od hrudi²⁰ a nejsou na něm žádné končetiny. Na tergitech zadečku jsou příčné tmavé pruhy, uprostřed nepřerušené a stejnoměrně široké.²¹

Samička se liší od samečka několika znaky: *velikostí* (sameček je o něco menší než samička), *hmotností* (sameček váží okolo 0,8 mg a samička okolo 1,5 mg), *počtem facet ve složených očích* (sameček má zhruba 740, samička 780) a *zbarvením hřbetní strany zadečku* (sameček má celistvou tmavou skvrnu na zakulaceném zadečku, samička je tmavě pruhovaná se zašpičatělým zadečkem, viz obr. 3). Sameček má navíc na pátém článku předních končetin výrazný černý štětinovitý hřebínek (sex comb), který slouží k přidržování samičky při páření.²² Nicméně bylo zjištěno, že odstranění těchto hřebínek má jen malý vliv na úspěch při páření.¹⁷

Samičky se mohou pářit až za 12 hodin po vylíhnutí z kukly, samečci již za několik málo hodin. Samička si v sobě uchovává spermie, kterými později oplodní velké množství vajíček. Zhruba za 10 dnů je jich pak schopná naklást až 300. Samičky po narkotizaci kladou vajíčka později.²²



Obr. 3: Rozdílný vzhled samičky (vlevo) a samečka (vpravo)²⁵

Trávicí soustavu tvoří ústa, hltan, jícen, žvýkací žaludek a střevo, na která navazuje konečník a řitní otvor. Jako vylučovací orgán fungují maphigické trubice filtrující zplodiny z hemolymfy, které jsou vylučovány ve formě moči.

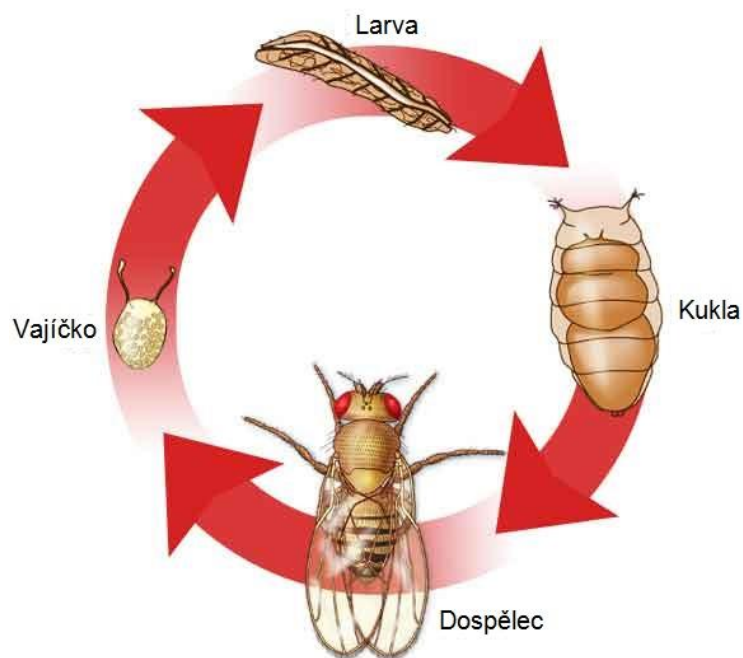
V otevřené cévní soustavě dominuje hřbetní céva. Tato céva je označovaná také jako srdce, neboť pulzuje a s pomocí dalších svalů zajišťuje cirkulaci hemolymfy.²¹

Dýchací soustavu tvoří trubicovité vchlípeniny pokožky (vzdušnice, tracheje) vyztužené chitinem. Tracheální systém se otevírá na povrchu těla párovými průduchy, zvanými stigmata. Z tracheálních chodeb vycházejí užší vzdušnice, které se mnohokrát větví až k jednotlivým orgánům a tkáním, kde končí ve speciálních buňkách (tracheoblastech).

Nervovou soustavu tvoří velká nadhltanová a podhltanová uzlina, které vznikly zvětšováním a splýváním uzlin v hlavě. Tykadla mají nejen velmi dobré chemoreceptory, ale i mechanoreceptory, které jsou rozvrstveny téměř po celém těle. Oči jsou složeny z šestihranných rohovek (facet), je tedy předpokládáno mozaikové vidění.²¹

2.2. Rozmnožování a životní cyklus

Octomilka během svého života prochází čtyřmi stádii vývoje, jsou to: vajíčko, larva, kukla a dospělec (imago),²² jak je znázorněno na obr. 4.



Obr. 4: Životní cyklus *Drosophily melanogaster*²³

Laboratorní teplota při chovu je nejčastěji 25 °C, následující doby vývoje jsou proto vztaženy na tuto teplotu. Při 18 °C se doba vývoje zdvojnásobí. Oplozené samičky kladou

bílá, asi 0,5 mm dlouhá vajíčka na povrch kultivačního média. Embryonální vývoj ve vajíčku trvá asi 24 hodin, vylíhnuté larvy pak zalézají do kultivačního média, které konzumují.²² Následují tři larvální instary (tato období jsou od sebe oddělena svlékáním),^{21,22} které trvají zhruba 4 dny. V posledním instaru je larva dlouhá až 4,5 mm a lze rozeznat samečky pomocí preparačního mikroskopu podle zřetelných samčích gonád. Larvy v tomto stádiu vylézají z média na stěny nádoby²² a mění se v kuklu (pupa), což je klidové stádium, kdy dochází ke kompletní přestavbě larvy na dospělce (imago). Tento typ vývoje se nazývá přeměna dokonalá (holometabolie).^{17,21} Vývoj v kukle trvá 4-5 dní. Kukla je zpočátku bílá a postupně hnědne. Po 10 dnech se z kukel líhnou dospělí jedinci, kterým se během několika málo hodin napnou křídla a doplní pigmentace zadečků.²²

Prvních 8-10 hodin po vylíhnutí se samičky ještě nejsou schopny pářit, což má velmi praktický význam pro křížení. Neoplozené (virginelní) samičky mohou být odebrány a použity k řízenému křížení s vybranými samečkami.¹⁷ Doba života dospělého se pohybuje v rozmezí 40-50 dní.²²

2.3. *Drosophila melanogaster* jako pokusný objekt

Domovem předků octomilek byla nejspíš tropická západní Afrika. Odtud se rozšířily do Euroasie asi před 6 000 - 10 000 lety. Do Ameriky se dostaly teprve asi před 500 lety, pravděpodobně na otrokářských lodích.¹⁷

Drosophila melanogaster popsal ve vědecké literatuře poprvé v roce 1830 německý entomolog Johann Wilhelm Meigen (1764 -1845). První experimentální studie s *D. melanogaster* byly provedeny jen něco málo před sto lety, vědci Carpenterem a Castlem na Harvardu. Šlo o studium účinků křížení příbuzných jedinců na plodnost. Tato práce ukázala, že *D. melanogaster* je vhodný organismus pro vědecké bádání.¹⁷

Thomas Hunt Morgan (embryolog na Kolumbijské univerzitě v New Yorku) zaručil octomilce obecné popularitu tím, že ji v roce 1911 začal systematicky používat jako základní modelový organismus pro studium genetiky.^{17,24} Jeho práce s tímto druhem objasnily například strukturu chromozomu a princip uložení vloh (1926 Nobelova cena).²⁴ Během následujících třiceti let položil Morgan a jeho kolegové základy klasické genetiky.

Dnes se zabývá studiem základních problémů v biologii asi 7500 výzkumníků, kteří pracují s *Drosophilou*.¹⁷ Z toho důvodu je octomilka po včele medonosné pokládána za nejlépe probádaný druh celé hmyzí říše.¹⁸

Volba toho živočišného objektu velmi urychlila další rozvoj studia dědičnosti proto, že ve srovnání s vyššími rostlinami je generační doba drozofily (10 až 12 dní) mnohonásobně kratší. Dalšími výhodami tohoto modelového organismu je především dostatečně početné potomstvo, snadné a ekonomicky nenáročné množení a křížení v laboratorních podmínkách, možnost poskytnutí velkého počtu snadno pozorovatelných genetických odchylek (barva očí a těla, tvar křídel atd.) a v neposlední řadě relativně malý a dostatečně probádaný genom. *Drosophila* má pouze čtyři páry chromozomů X / Y a tři páry autozomů. Velikost genomu je asi 165 milionů bazí a obsahuje zhruba 14 tisíc genů (pro srovnání: lidský genom má 3400 milionů bazí a může mít asi 22 500 genů). Její genom byl téměř kompletně sekvencován v roce 2000.(cit. 26) Sekvence genů je volně přístupná na internetu.²⁷

Dnes se již octomilka nepoužívá pro biologický výzkum pouze v oblastech genetiky, ale později se jí začalo využívat i k šetření základních problémů z oblasti ekologie nebo neurobiologie.¹⁷ V toxikologii je vhodná k určování stopových množství reziduí insekticidů extrahovaných z rostlin a potravin.²⁸

3. Toxikologie

Toxikologie je věda zabývající se vzájemným působením chemických látek a živého organismu. Základ této disciplíny položil v 16. století renesanční učenec Paracelsus, který konstatoval, že každá látka může být jedem, ale její účinky závisí na dávce. Jako jed (toxická látka) je brána taková látka, která může vyvolávat nepříznivé účinky při podání již malých dávek. Dávku můžeme chápat jako množství látky, které se dostane do organismu.²⁹ Některé organismy v sobě akumulují chemické látky z okolí nebo potravy. Tento proces se nazývá bioakumulace a výsledkem je vyšší obsah kontaminantu v živé hmotě, než v prostředí, kde organismus žije.³⁰

Pro testování toxicity se používají živé organismy nebo organismální systémy, které jsou vystavovány různým dávkám toxických látek po krátkou nebo delší dobu. Testy s organismy jsou obecně označovány jako biotesty. Testy s jednorázovou, krátkodobou expozicí a obvykle vysokou dávkou testované látky se nazývají akutní testy, při nichž se ihned po expozici objevují akutní účinky od změn chování a vzhledu organismu, až po smrtící působení. Akutní toxicitu můžeme charakterizovat pomocí toxikologických indexů,

jako jsou letální dávka (LD) nebo letální koncentrace (LC). Hodnoty LD₅₀ a LD₁₀₀ značí dávku toxické látky, při které zahyne 50 nebo 100 % testovaných organismů. Přejdem mezi testy akutními a chronickými jsou testy subchronické (subakutní). Dlouhodobým testům, kdy jsou organismy vystavovány nízkým dávkám testované látky, říkáme chronické testy. Tyto testy slouží k určení hodnot NOAEL (dávka, která ještě nevykazovala škodlivý účinek) a LOAEL (nejnižší dávka, při níž byl pozorován škodlivý účinek). Chronické účinky se mohou objevit až později (v dalších generacích) a přetrvávat dlouhou dobu. Typickými chronickými účinky jsou mutageneze či genotoxicita.^{29,30}

Toxicitu látek ovlivňují jejich *fyzikálně-chemické vlastnosti* (koncentrace, rozpustnost ve vodě a tucích, struktura látky), *doba a způsob expozice*, *environmentální faktory* (teplota, vlhkost, intenzita světla), *interakce mezi toxickými látkami* (toxicita zůstane stejná, zvýší se nebo naopak sníží), *biologické faktory a výživa organismu*.³⁰

V průběhu vývoje toxikologie vzniklo mnoho aplikovaných odvětví jako např. predikční toxikologie (odhad toxicity látky z její struktury), klinická (diagnosa a léčba otrav) a průmyslová toxikologie (prevence a léčba otrav v průmyslu), toxikologie potravin a aditiv, agrochemikálií (hnojiv, pesticidů), ekotoxikologie, nanotoxikologie a mnoho dalších.²⁹

3.1. Ekotoxikologie

Zatímco klinická toxikologie zkoumá účinky látek pouze na jeden biologický druh, na člověka, ekotoxikologie se zaměřuje na sledování účinků toxických látek na organismy, populace i společenstva a zároveň se zabývá monitorováním toxických látek v prostředí. Cílem ekotoxikologických testů je ochrana a zachování čistého životního prostředí. V ekotoxikologických biotestech je využíváno velké množství různých druhů modelových organismů (vodních i suchozemských).³⁰

Jedním z modelových organismů v ekotoxikologii je *Octomilka obecná* (*Drosophila melanogaster*), použitá k hodnocení toxicity stříbra v této práci. Octomilky jsou s oblibou používány nejen v genetice, ale také ke studiu toxicity kovů. Například byly použity ke studiu neurotoxicky biokovů Fe, Cu a Mn, které jsou spojovány s Parkinsonovou chorobou. Při akutní (15 mM po dobu až 5 dnů) nebo chronické (0,5 mM, až 15 dnů) expozici těmto kovům byla výrazně snížena životnost a pohybová aktivita *Drosophil*. V jejím mozku byla určena vysoká koncentrace těchto kovů. Pochopení účinků

biokovů na tomto modelovém organismu může poskytnout pohled na toxické účinky iontů kovů a účinnější terapeutické přístupy k parkinsonismu.³¹

Al-Momani a Massadeh aplikovali v první práci na octomilky Cu, Cd, Zn a Pb ve dvou generacích. Do koncentrace 100 ppm kovů v živném médiu nedošlo k výraznému snížení počtu přežívajících kukel nebo dospělců. Nad koncentrací 500 ppm těchto prvků došlo k výrazné redukci růstu a vývoje, snížení velikosti těla, včetně redukce křídel a snížila se schopnost jedinců přeměnit se z kukly v dospělé. Nejméně toxické bylo olovo, následoval zinek, měď a nevyšší toxicitu vykazovalo kadmium. Ve druhé generaci se projevil mírný úbytek jedinců u kadmia a zinku již při koncentraci 100 ppm. Při vyšších koncentracích byly počty kukel a dospělců mírně nižší než v první generaci.³² Stejní autoři v další práci studovali míru výskytu těžkých kovů v půdě v okolí frekventovaných silnic a jejich vliv na životní cyklus octomilek. Posuzovány byly opět Pb, Cd, Cu, a Zn o koncentracích 624, 1243, 242 a 874 $\mu\text{g/g}$ půdního vzorku (odebrány v blízkosti silnic ve městě Irbid v Jordánsku). Těmto vzorkům byly vystaveny dvě generace octomilek, přičemž první generace vykazovala výrazné snížení počtu a zmenšení těla jedinců pro všechny kovy. K také výraznému poklesu počtu a problémům s dokončením vývoje došlo i ve druhé generaci.³³

Bahadorani zkoumal biologické účinky železa, mědi, zinku a kadmia na *D. melanogaster*. Došel k obdobným výsledkům a navíc prokázal zkrácení životnosti dospělé mouchy.³⁴ Akins a jeho kolegové studovali vliv tří sloučenin těžkých kovů (chlorid triethylolovnatý, octan olovnatý a chlorid kademnatý) na letalitu, vývoj a chování octomilek. V rámci pokusu byly stanoveny larvální LC_{50} pro chlorid triethylolovnatý 0,09 mM, octan olovnatý 6,6 mM a chlorid kademnatý 0,42 mM. Každá z testovaných koncentrací způsobovala zpoždění ve vývoji larev závislé na dávce.³⁵

Na octomilkách byly zkoumány také genetické a buněčné mechanismy karcinogeneze chromu a niklu, což jsou dva lidské karcinogeny spojené s průmyslovou expozicí.³⁶

3.2. Nanotoxikologie

Díky vzrůstajícímu využívání nanoproduktů a obavám o jejich dopad na životní prostředí a zdraví člověka, se vyvinuly nové obory jako je nanotoxikologie a nanobezpečnost. Nanobezpečnost se věnuje prevenci a ochraně před nebezpečnými účinky nanomateriálů (objekty s jedním nebo více rozměry menšími než 100nm) na lidské zdraví a životní

prostředí na základě nanotoxikologických výzkumů. Nanotoxikologie zkoumá vlastnosti nanostruktur a jejich interakce s biologickými systémy a jejich toxikologickou odpověď.¹

Nyní si uvedme pár studií týkajících se toxicity převážně nanočástic stříbra vůči modelovým vodním a suchozemským organismům. Například byla srovnávána akutní toxicita nanočástic stříbra a stříbrných iontů vůči organismu *Danio pruhoané* (*Danio rerio*), vystaveném stříbru po dobu 48 hodin. V rámci pokusu byla stanovena LC₅₀ pro iontové stříbro 84 µg/l a pro stříbrné nanočástice 25 µg/l. Při vizuální kontrole byl pozorován zvýšený pohyb ryb a povrchní dýchání po expozici nanočásticím, což prokazuje toxicitu nanočástic stříbra na dýchací soustavu této ryby.³⁷

Gubbinsová zjistila, že nanočástice stříbra o velikosti okolo 20 nm a 100 nm způsobují inhibici růstu *Okřehku* (*Lemna minor*) a to již při koncentraci 5 µg/l. S delší dobou expozice se tento účinek ještě zvýšil a byla zjištěna lineární závislost odpovědi na dávce po čtrnáctidenní expozici. Touto studií bylo potvrzeno, že nanočástice stříbra mohou představovat významné potencionální riziko pro životní prostředí.⁵⁴

Na *perloočky* bylo aplikováno stříbro ve formě prášku, koloidních disperzí i iontové stříbro. Všechny tyto druhy způsobily nadměrné plavání a také úmrtnost pokusných organismů.³⁸

Na jednobuněčný eukaryotický organismus *Trepku velkou* (*paramecium caudatum*) byly také aplikovány nanočástice stříbra. Bylo zjištěno, že stříbrné nanočástice nevykazují toxicitu pod 25 mg/l, na rozdíl od iontového stříbra (toxické i při 0,4 mg/l). Kromě toho bylo dokázáno, že povrchově aktivní látky mohou toxicitu stříbra zvyšovat.³⁹

El-Temsah testoval rozdílnou biodostupnost kovů na různých typech půd pomocí testu klíčivosti na *Jilku*, *Ječmenu* a *Lnu* vystavených nanočásticím železa a stříbra o velikosti 1 - 20 nm. Nanočástice stříbra inhibovaly klíčení při nižších koncentracích než železo, ale neprojevila se klasická závislost na velikosti částic, takže testy klíčení semen se jeví jako méně vhodné pro odhad dopadu stříbra na životní prostředí.⁴⁰

Na *žížale* (*Eisenia foetida*) byl prováděn test subchronické toxicity za použití AgNO₃ a nanočástic stříbra pokrytých polyvinylpyrrolidonem a kyselinou olejovou. Koncentrace, při které byly pozorovány účinky AgNO₃, byla 94,21 mg/kg, což odpovídá nejvyšší koncentraci nalezené v odpadních kalech z čistíren ve Spojených státech, v těchto žížalách byla také zaznamenána nejvyšší akumulace. U nanočástic hodnota překročila 700 mg/kg. Mezi částicemi pokrytými různými látkami nebyl zaznamenán výrazný rozdíl v toxicitě.⁴¹

Kateřina Beníčková a Jana Richtrová již dříve studovaly na Katedře fyzikální chemie chronickou a akutní toxicitu nanočástic stříbra vůči octomilkám. Pro studium akutní

toxicity bylo použito práškové stříbro i klasická koloidní disperze a byly testovány koncentrace od 10 do 100 mg/l. V případě chronické toxicity byly testovány koncentrace stříbrných nanočástic 3, 5 a 7 mg/l v průběhu 8 generací. Akutní toxický účinek byl pozorován od koncentrace 20 mg/l, kdy 50 % jedinců nebylo schopných opustit kuklu a dokončit vývoj. V případě chronické toxicity byl v prvních třech generacích zaznamenán pokles plodnosti jedinců, ale postupně si organismy začaly zvykat na expozici a jejich počet stoupal až na úroveň kontrolních. Ve všech zkoumaných koncentracích bylo zaznamenáno světlé zbarvení jedinců.⁴²

3.3. Chronická a subchronická toxicita stříbra

Testy chronické toxicity jsou časově a ekonomicky náročnější, proto jsou prováděny méně často než testy akutní toxicity. Přesto existuje pár dlouhodobějších studií účinků stříbra na organismy.

Například byla testována orální toxicita nanočástic stříbra (56 nm) po dobu 13 týdnů vůči *potkanům* starým 5 týdnů. Potkani byli vystaveni nízké (30 mg/kg), střední (125 mg/kg) a vysoké dávce (500 mg/kg). Po 4 týdnech expozice došlo k úbytku hmotnosti samců, i když nebyly pozorovány žádné změny v příjmu potravy. Přišlo se na to, že cílovými orgány jsou játra a byla zjištěna dvojnásobná akumulace stříbra v ledvinách u samic. NOAEL byla stanovena 30 mg/kg a LOAEL 125 mg/kg.⁴³

Osm týdnů staré krysy byly použity ke stanovení inhalační subchronické toxicity nanočástic stříbra (18-19 nm). Zvířata byla vystavena nanočásticím vždy 6 hodin denně 5 dní za týden při celkovém trvání pokusu 13 týdnů. Cílovými orgány pro nanostříbro zde byly plíce a játra, byl potvrzen výskyt zánětů.⁴⁴

V další studii odhalili akutní a chronickou toxicitu nanočástic stříbra a jeho bioakumulaci ve sladkovodním organismu *perloočky* (*Daphnia magna*). Žádná úmrtnost nebyla pozorována u testu 48-h akutní toxicity, kdy byly perloočky vystaveny až 500 µg/l Ag. Nejvyšší akumulace nanočástic byla zaznamenána při nejvyšší testované koncentraci (500 µg /l). Naproti tomu byla perloočka velmi citlivá na volné ionty Ag⁺ přidané ve formě AgNO₃, které měly největší vliv na reprodukci, LD₅₀ byla stanovena 2,51 µg/l . Nanočástice měly vliv spíše na inhibici růstu. K významnému zpoždění a snížení reprodukce perloočky došlo v koncentraci Ag⁺ při 0,1 µg / l a také nanočástic stříbra při 5

$\mu\text{g/l}$ a 50 g/l . Chronické účinky nanočástic byly pravděpodobně způsobeny nízkou kvalitou potravy perlooček spojenou s obsahem stříbra.⁴⁵

Existuje dokonce test akutní a subchronické dermální toxicity koloidního stříbra vůči morčatům. Částicím o velikosti pod 100 nm byly vystaveny samečkové o hmotnosti $350\text{-}400\text{g}$. Pro hodnocení akutní toxicity byli vystaveni koncentracím 1000 a $10\,000 \mu\text{g/ml}$, pro chronickou 100 , 1000 a $10\,000 \mu\text{g/ml}$. V pitevních studiích nedošlo během akutní zkoušky ke změnám hmotnosti orgánů nebo makroskopickým změnám na nich. Nicméně v závislosti na dávce byly pozorovány abnormality na kůži, játrech a slezině. Zvířata podrobená subchronickým testům vykazovala větší tkáňové abnormality než u akutních testů. Zdá se tedy, že koloidní stříbro může být toxické v cílových orgánech v závislosti na dávce a čase.⁴⁶

4. Praktické využití nanomateriálů

Přestože používání nanomateriálů s sebou nese určitá zdravotní rizika, musíme si přiznat, že v mnoha oblastech je jejich používání velkou výhodou. Jejich jedinečné vlastnosti je předurčují k používání v medicíně, elektronice nebo environmentálních vědách. V elektronice se nanomateriály mohou použít k výrobě displejů, hard-disků, mikroprocesorů, baterií s dlouhou životností a vysoce citlivých senzorů.

V biomedicíně najdou uplatnění jako antimikrobiální prášky a nátěry, při regeneraci buněk a orgánů, jako nanotrubičkové membrány k oddělování proteinů, doprava léků k cílovým orgánům, časově omezené uvolňování léku atd. Nanomateriály se také použijí jako tzv. samočistící a vodoodpudivé vrstvy na fasády, okna nebo tkaniny, v péči o životní prostředí pak díky jejich reaktivitě k odstranění znečišťujících látek z půdy a vody.¹²

V poslední době došlo k ohromnému rozruchu v oblasti nano-biotechnologií ve studiu syntézy nanočástic. Mnoho studií nyní posuzuje biologickou syntézu nanočástic stříbra z listů různých rostlin pomocí roztoku AgNO_3 a aktivitu těchto částic vůči buněčným liniím různých lidských karcinomů. Biosyntetizované částice mají velikost okolo 31 nm a kulovitý tvar. Byla u nich prokázána toxicita vůči buňkám karcinomů v závislosti na dávce. Zatím byly použity například extrakty z těchto rostlin: *Suaeda monoica*⁴⁷ a *Citrullus colocynthis*.⁴⁸

4.1. Antibakteriální vlastnosti nanočástic stříbra

Klasická antibiotika používaná dnes jsou často neúčinná, protože mnohé bakteriální kmeny jsou schopny si vůči nim vytvořit rezistenci. Výzkumy v oblasti antibakteriální aktivity látek dokazují, že nanočástice stříbra účinně inhibují růst bakterií nebo je dokonce zabíjejí, navíc nebylo zaznamenáno vytváření rezistence.⁴⁹ Mechanismus jejich antibakteriálního účinku nebyl doposud přesně objasněn, takže bylo navrženo několik možností. Jednou z nich je oxidační stres vytvořený vznikem reaktivních forem kyslíku, které se mohou vytvářet na povrchu nanočástic, další je pronikání nanočástic přes buněčnou membránu bakterií a jejich možná interakce se sírou a fosforem ve skupinách enzymů a proteinů, které pak negativně ovlivňují buněčné dýchání a transport iontů přes membrány, což způsobí buněčnou smrt.^{49,50} Nanočástice mohou údajně také destabilizovat vnější membránu bakterií a snižovat hladinu adenosintrifosfátu, který je hlavní formou energie pro buňku.¹² Studií zabývajících se antibakteriálními vlastnostmi nanočástic stříbra je velké množství, proto si uvedeme pouze pár vybraných.

Antibakteriální účinky nanočástic stříbra připravených modifikovanou Tollensovou metodou s použitím různých redukujících cukrů byly studovány vůči rezistentním druhům běžných bakterií prostřednictvím stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Částice s menší velikostí vykazovaly vyšší antibakteriální aktivitu. Ta byla pozorována již při nízké koncentraci stříbra pod 2 $\mu\text{g/ml}$. Při použití maltosy jako redukčního činidla byla stanovena MIC 3,38 $\mu\text{g/ml}$ pro většinu bakterií. Výsledky ukázaly, že koloidní stříbro zabránilo množení gram-pozitivních, gram-negativních i multirezistentních kmenů bakterií.⁴⁹

Vůči známé gram-negativní bakterii *Escherichii coli* byly zkoumány antibakteriální účinky nanočástic stříbra různých tvarů. Ve srovnání s kulovými a tyčinkovitými nanočásticemi i iontovým stříbrem, měly nejsilnější biocidní účinek částice ve tvaru trojúhelníku. Snímky z elektronového mikroskopu ukázaly značné změny buněčných membrán ovlivněných bakterií.⁵¹

Nanočástice stříbra připravené modifikovaným Tollensovým postupem prokázaly také antifungální aktivitu vůči kvasinkám (*Candida*). Současně byla stanovena cytotoxicita těchto částic vůči lidským fibroblastům. MIC nanostříbra u kvasinek *Candina albicans II* byla stanovena 0,21 mg/l . Inhibiční účinek nanočástic stříbra byl zlepšen jejich stabilizací (např. dodecylsulfátem sodným). Získané MIC nanočástic byly srovnatelné nebo lepší než

MIC běžných antimykotik, a také byly pod limitem cytotoxicity vůči fibroblastům. MIC iontového stříbra však byla srovnatelná s cytotoxickou koncentrací.⁵²

Sotiriou a Pratsinis studovali antibakteriální aktivitu nanostříbra proti gram-negativní bakterii *Escherichii coli* v závislosti na velikosti nanočástic. Nanostříbro bylo navázáno na nanostrukturních částicích oxidu křemičitého. Bylo zjištěno, že nanočástice menší než 10 nm uvolňují vysoké koncentrace stříbrných iontů a antibakteriální aktivita je jimi ovládána. V opačném případě, kdy jsou nanočástice větší, koncentrace uvolněných iontů je nižší a částice samotné mají vliv na antibakteriální aktivitu.⁵³

4.2. Praktické využití nanočástic stříbra

Spotřební nanotechnologie se staly rostoucím odvětvím průmyslu. Nanočástice stříbra jsou nejčastější nanomateriály přidávané do komerčně dostupných výrobků, především díky jejich antibakteriálním a antimykotickým účinkům. Používají se v rozmanité škále výrobků, jako jsou ponožky, polštáře, obuv, pleťové masky, vlhčené ubrousky, mycí prostředky, mýdla, šampony, zubní pasty, vzduchové filtry, nátěry ledniček, vysavače, pračky, dózy na potraviny a další.

Je známo, že stříbro má příznivý antibakteriální účinek při použití ve výrobcích používaných k ošetření ran, protože tlumí zánět a usnadňuje hojení.¹² Díky těmto vlastnostem nacházejí nanočástice stříbra uplatnění v medicíně, kde se vytvářejí antibakteriální povlaky na lékařských pomůckách, impregnují se gázy, obvazy a v budoucnu se počítá i s kloubními náhradami pokrytými stříbrem z důvodu zamezení pooperačních komplikací vlivem bakterií.²

Optických a katalytických vlastností nanostříbra a přítomnosti povrchového plasmonu lze využít v mnoha dalších oblastech, jako jsou elektronika, informační technologie nebo analytické metody. Za zmínku stojí především nová analytická metoda povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS), která umožňuje studium struktury a zároveň citlivou detekci molekul a iontů i při velmi nízkých koncentracích.²

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5. Materiál a metody

5.1. Chemikálie

Koloidní roztok nanočástic stříbra byl připraven za použití těchto chemikálií: *dusičnan stříbrný* (Fagron), *amoniak* (vodný roztok, 28-30%, Sigma-Aldrich), *hydroxid sodný* (p. a., Lach-Ner), *D(+)-maltosa monohydrát* (Sigma-Aldrich). K ředění roztoku a doplňování do odměrných baněk byla použita *destilovaná voda*.

Ke zkoncentrování roztoku nanočástic stříbra byly použity *dialyzační membrány* (Sigma-Aldrich), do kterých se nasypal sorbent *polyakrylát–polyalkohol* (Sigma-Aldrich). Ke stabilizaci roztoku byla použita *želatina* (Penta).

Živné médium pro chov octomilek bylo připraveno z těchto ingrediencí: *kukuřičný šrot*, *agar* (Serva), *sušené pekařské droždí* (Labeta), *krystalový cukr*, *destilovaná voda*, *desinfekční roztok* (dodaný Katedrou buněčné biologie a genetiky UP). K narkotizaci hmyzu se používal *diethylether* (p.a. Lachema).

Mineralizace probíhala za použití *kyseliny dusičné* (p.a., vodný roztok, 65%, Lach-Ner) a *peroxidu vodíku* (p.a., vodný roztok, 30%, Penta).

5.2. Přístrojové vybavení

Velikost nanočástic stříbra v připravené disperzi byla měřena metodou dynamického rozptylu světla pomocí přístroje 90 Plus Particle Size Analyser (Brookhaven Instruments Co.). UV/Vis spektra koloidních roztoků byla zaznamenána spektrofotometrem Specord S 600 (Analytik Jena, Germany).

Obsah stříbra ve zkoncentrovaném roztoku byl stanoven pomocí atomového absorpčního spektrometru ContrAA 300 (Analytik Jena, Germany). Stejným přístrojem byly na závěr stanoveny obsahy naakumulovaného stříbra v tělech much.

Veškeré pozorování pohlaví a změn na tělech octomilek bylo prováděno pomocí binokulárního Zoom Stereo Mikroskopu SZ30 (Olympus) a digitální fotografie octomilek byly pořízeny fotoaparátem Olympus.

5.3. Pracovní postupy

5.3.1. Příprava koloidní disperze stříbra

Koloidní disperze nanočástic stříbra byla připravena modifikovaným Tollensovým procesem, kde principem je redukce diamin-stříbrného komplexu maltosou v zásaditém vodném prostředí.

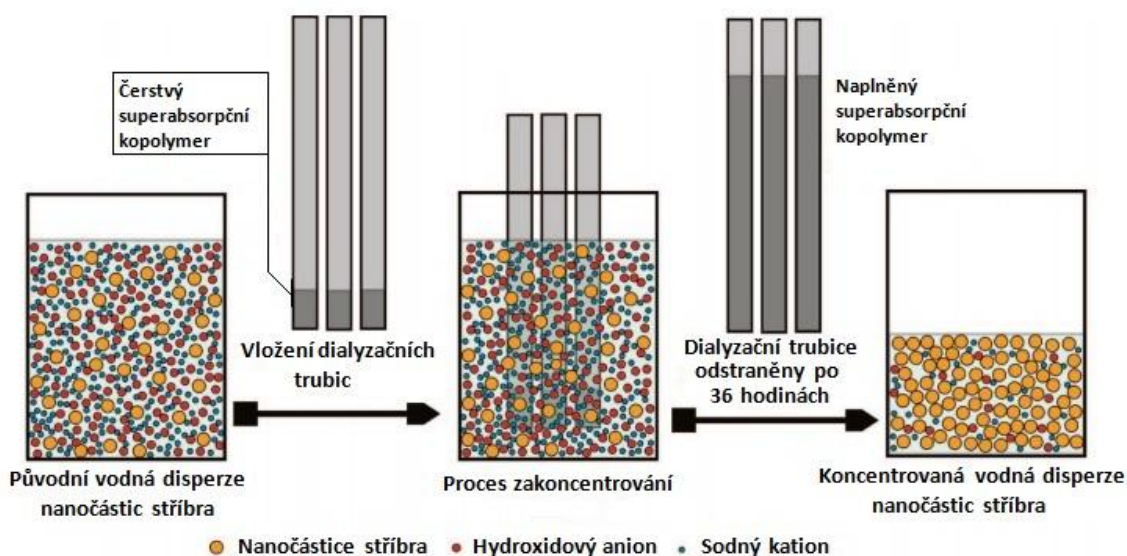
Nejprve byla připravena dostatečná množství odměrných roztoků. Na magnetické míchadlo se postavila kádinka o objemu 2 litry a do ní se z odměrných roztoků odměřily tyto objemy:

- 200 ml $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dusičnanu stříbrného
- 50 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ amoniaku
- 510 ml destilované vody
- 40 ml $0,24 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného
- 200 ml $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ maltosy.

Redukce probíhala 5 minut za neustálého míchání. Tímto způsobem byl vyroben 1 litr koloidní disperze o koncentraci stříbra 108 mg/l. Po umíchání koloidu byla změřena odlitím do kyvety velikost částic a pro získání UV/Vis spektra byl tento roztok do kyvety ještě desetkrát zředěn destilovanou vodou.

Disperze má po přípravě dosti nízký obsah stříbra, alkalické pH (okolo 10) vlivem hydroxidových aniontů a není zcela stabilní. Tyto vlastnosti jsou pro přidávání do živného média nežádoucí. Je proto nutné disperzi zkoncentrovat a zastabilizovat proti agregaci. Zkoncentrování bylo provedeno pomocí superabsorpčního kopolymeru polyakrylátu-polyalkoholu, který se nasypal do celulózových membrán a vložil do kádinky s koloidem (viz obr. 5). Sorbent v membránách absorboval vodu a ionty a cca po 24 hodinách byl vyměněn nebo úplně odstraněn z roztoků podle potřeby. Na závěr byl koncentrát stabilizován pomocí roztoku želatiny tak, aby koncentrace želatiny v koloidu stříbra byla 0,1 %. Čtyřprocentní roztok želatiny byl připraven neustálým mícháním a zahříváním 2 g želatiny v 50 ml destilované vody, dokud se směs nerozpustila. Poté se za míchání přidalo 2,5 ml této želatiny ještě za tepla do 97,5 ml disperze koloidu stříbra a míchání pokračovalo ještě 5 minut. Následně bylo změřeno absorpční spektrum koloidu a část celkového připraveného objemu disperze stříbra byla zředěna pomocí odměrných baněk na požadované nižší koncentrace, aby přídavek disperze stříbra do média neměl příliš velký objem. V mém případě byla koncentrovaná koloidní disperze ředěna destilovanou vodou do tří odměrných baněk na koncentraci nanočástic stříbra 75 mg/l; 7,5 mg/l a 0,75 mg/l tak,

aby přidáním 1 ml každého roztoku k 24 ml média vzniklo 25 ml média o pokusných koncentracích 3 mg/l; 0,3 mg/l a 0,03 mg/l.



Obr. 5: Schéma zakoncentrování koloidního roztoku³⁹

5.3.2. Příprava kultivačního média

Živné médium bylo připravováno pro 12 chovných baněk, připravovaný objem činil tedy zhruba 300 ml. Příprava byla započata navážením 26,1 g kukuřičného šrotu, 4,5 g agaru, 7,5 g instantního droždí a 15 g krystalového cukru. Kukuřičný šrot byl nasypán do půllitrové kádinky a zalit 240 ml destilované vody. Za občasného promíchání se tato směs pozvolna vařila na vodní lázni 90 minut. Poté byly přidány kvasnice, cukr a agar předem namočený v 60 ml destilované vody. Tato směs se vařila ještě 30 minut, nakonec byla vodní lázeň odstavena z plotýnky a do živného média bylo zamícháno 12 ml desinfekčního roztoku.

Do Erlenmayerových baněk o objemu 100 ml bylo ještě za tepla nalito po 25 ml čistého média (pro kontrolní baňky bez stříbra). Pro přidávání roztoku stříbra se 24 ml média nejprve nalévalo do kádinky, kde se nechalo mírně zchladnout (na teplotu pod 50 °C) a za stálého míchání tyčinkou byl přidán 1 ml koloidního roztoku zředěného na požadovanou koncentraci (75 mg/l; 7,5 mg/l nebo 0,75 mg/l). Z kádinky bylo médium přelito do vysterilizovaných erlenek, které se opět zazátkovaly alobalem a nechaly vychladnout. Po vychladnutí bylo již médium tuhé a baňky se mohly uložit do chladničky.

5.3.3. Postup při mineralizaci těl a stanovení bioakumulace

Těla octomilek byla ihned po vyhodnocení zamrazena pro pozdější zjišťování bioakumulace v tělech. K tomuto účelu bylo použito, z každé koncentrace (včetně kontrol), v každé generaci vždy 10 sameček a 10 samiček, kteří byli uloženi do mrazáku. Před mineralizací byly octomilky ihned po rozmrazení zváženy a vloženy do kádinky, kde byly zality 3 ml koncentrované kyseliny dusičné. Kádinka byla přikryta hodinovým sklíčkem, aby nedocházelo ke ztrátám z důvodu odpařování, a zahřívala se zvolna na vařiči. Roztok po úplném rozpuštění viditelných částí těl zežloutl, v této chvíli byl asi ještě 20 minut zahříván, než byl jen mírně nažloutlý. Pak se kádinky s obsahem na chvíli odstavily z vařiče a byly do nich přidány 2 ml peroxidu vodíku, obsah kádinek se stal čirým. Kádinky byly ještě asi na 15 minut vráceny zpět na vařič, který však už nesměl být příliš rozehrátý (směs s peroxidem by mohla vypěnit). Poté byly kádinky odstaveny mimo vařič a nechaly se vychladnout. Obsahy kádinek byly na závěr kvantitativně převedeny výplachem 5% roztokem kyseliny dusičné do odměrných baněk o objemu 10 ml a doplněny po rysku destilovanou vodou. V takto připravených vzorcích byly následně stanoveny obsahy stříbra metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS). Hodnoty koncentrace stříbra ve vzorku v jednotkách mg/l získané z přístroje, byly na závěr pomocí hmotnosti mineralizovaných těl přepočteny na jednotku g/g (hmotnost stříbra v gramech na gram mineralizovaných těl).

5.4. Průběh pokusné práce

Média připravena způsobem popsáním výše byla v chladničce ponechána obvykle do druhého dne, kdy byly použity k pokusu. Před umístěním octomilek do těchto baněk bylo nutné setřít ze stěn baněk zkondenzovanou vodu (pomocí sterilního filtračního papíru a pinzety). Nakonec byl do baněk vložen poskládaný kousek filtračního papíru pro lezení hmyzu, byly do nich přepuštěny octomilky a baňka se uzavřela sterilní vatovou zátkou.

Všechny nástroje a pomůcky používané při přípravě, jako baňky, zátky, filtrační papíry a pinzety, musí být sterilní (sterilizace 30 minut při 160 °C), aby nedošlo ke kontaminaci plísněmi nebo jinými nežádoucími mikroorganismy a úhynu octomilek.

Před založením první generace bylo nutné si připravit skupinu stejně starých mušek. Toho bylo docíleno tak, že z chovných baněk, kde byly mouchy různých generací, byli tito jedinci přepuštěni přímo (bez narkotizace) do baněk s čistým médiem, byli tam ponecháni zhruba 7 dní, během kterých samičky nakladly vajíčka, a poté byli všichni

jedinci odpuštění. Přibližně za týden se v těchto baňkách vylíhli zakladatelé první generace. Z těchto baněk bylo do čisté baňky bez média nejprve přepuštěno menší množství jedinců poklepem o molitanovou podložku, baňky byly k sobě připojeny hrdly a po celou dobu bylo nutné je pevně držet u sebe, aby mušky neuletěly. Baňka s přepuštěnými octomilkami byla ucpána zátkou lehce namočenou v diethyletheru (zmíněné pomůcky pro manipulaci – viz obr. 6). Po zhruba minutě mušky začaly skládat křídla k tělu a posléze přestaly lézt. Po dvou minutách se již nehýbaly, tudíž bylo možné s nimi manipulovat. Nechávat je v baňce s etherem delší dobu by nebylo dobré, protože zhruba po 4 minutách působení výparů začínají někteří jedinci hynout, což se projevuje postavením křídel kolmo k tělu.



Obr. 6: Pomůcky pro manipulaci s octomilkami – diethylether, molitanová podložka a prázdná baňka s vatovou zátkou



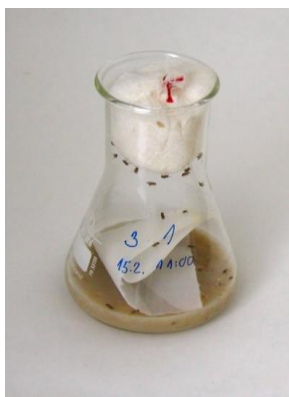
Obr. 7: Stereolupa Olympus SZ-30

Znarkotizované octomilky byly vysypány na kolečko filtračního papíru a vloženy pod objektiv binokulární lupy (obr. 7), pomocí níž byli analyzováni, třídění a vybírání štětečkem. Vybraní jedinci byli následně přemístěni do prázdné erlenmayerovy baňky utěsněné zátkou. Po pár minutách se opět začínali probouzet a lézt. Do pokusných erlenmayerových baněk s médiem byly poté přepuštěny plně probuzené octomilky, protože znarkotizované by se mohly k vlhkému médiu přilepit a uhynout. Takto připravené chovné baňky (Obr. 8) byly inkubovány ve tmě v biologickém termostatu při konstantní teplotě

21,5 °C. Vývojový cyklus jedinců byl průběžně sledován. Po 7 dnech, kdy se první larvy začínaly kuklit, byli odpuštěni rodičovští jedinci a baňky byly vráceny do termostatu, kde se zhruba za 6 dní začali líhnout jejich potomci.

Aby byla zajištěna co nejlepší spolehlivost výsledků pokusu, byl vývoj octomilek sledován pro každou koncentraci stříbra včetně kontrol (0 mg/l), vždy ve třech opakováních, jedinců s jedinci, že bylo celkově sledováno 12 pokusných baněk v každé generaci.

Samotné vyhodnocování vlivu stříbra na octomilky spočívalo v porovnávání kontrolních (neovlivněných) jedinců s jedinci vyvíjejícími se na médiu s přísadkou nanočástic stříbra. Přitom ve všech sledovaných variantách byli příslušníci stejné generace. Vyhodnocování jsem poprvé prováděla po 24 hodinách od začátku líhnutí, kdy jsem veškeré vylíhnuté jedince přepustila do nové baňky, kde byly narkotizováni. Z nich jsem pomocí binokulární lupy odebrala 10 samečků a 10 samic, kteří se po předání na nové médium stali zakladateli další generace. Zbylé octomilky jsem vrátila do baňky s etherem, kde byly usmrceny. Usmrcené octomilky určené k hodnocení byly přesypány do Petriho misek (Obr. 9). Pokud nebylo možné s nimi ihned pracovat, byly misky uzavřeny parafilmem a uloženy do lednice, aby těla jedinců nevysychala. Při samotném vyhodnocování byli následně jedinci pomocí binokulární lupy rozděleni podle pohlaví, spočítáni a hodnoceny u nich byly i další parametry jako je velikost těla, změny zbarvení těla a možné anatomické anomálie. Spočítání jedinci byli co nejdříve zváženi na analytických vahách, protože usmrcení jedinci na vzduchu velmi rychle vysychají. V neposlední řadě byla sledována celková životaschopnost jedinců od stádia larvy až po dospělého jedince nebo také délka vývojového cyklu. Všechny tyto parametry byly sledovány v rámci každé generace.



Obr. 8: Pokusná baňka před uložením do termostatu

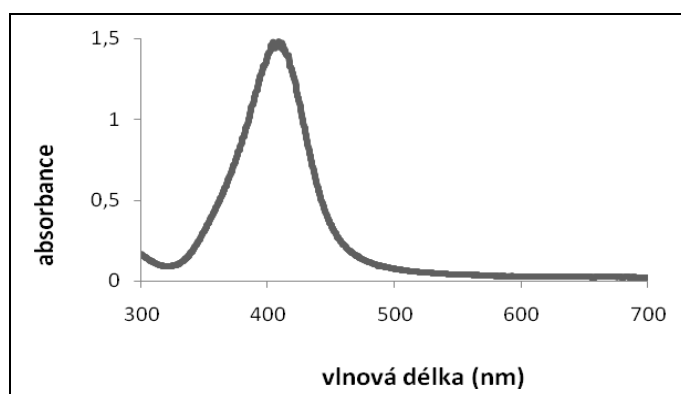


Obr. 9: Petriho misky s usmrcenými jedinci

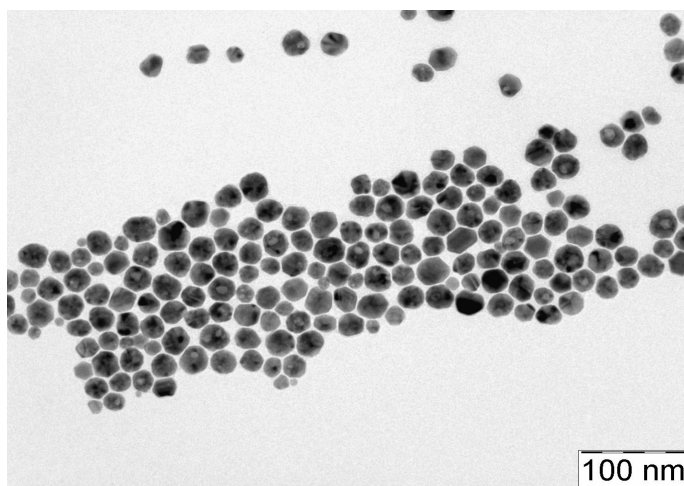
6. Výsledky

6.1. Vlastnosti disperze stříbra přidávané do kultivačního média

Koloidní disperze nanočástic stříbra přidávaná v různých koncentracích do kultivačního média byla připravena modifikovanou Tollensovou metodou, která spočívá v redukcí diamin-stříbrného komplexu maltosou. Průměrná velikost takto připravených nanočástic činila 28 nm, což potvrzuje snímek z transmisního elektronového mikroskopu (Obr. 11). Absorpční maximum tohoto roztoku nastává při vlnové délce 405 nm (Obr. 10). Vzniklý roztok byl ještě zakonzentrován pomocí dialyzačních membrán naplněných sorbentem. Jeho objem při tomto procesu poklesl z 500 ml na 190 ml a koncentrace nanočástic stříbra tím vzrostla ze 108 mg/l na 241 mg/l (stanoveno pomocí AAS). Na závěr byl roztok stabilizován přidávkem čtyřprocentního roztoku želatiny.



Obr. 10: UV/Vis spektrum vodného roztoku koloidního stříbra připraveného modifikovanou Tollensovou metodou



Obr. 11: Snímek nanočástic stříbra připravených modifikovanou Tollensovou metodou

6.2. Vliv koloidního stříbra na počet vylíhnutých jedinců

Tabulka 1 obsahuje počty vylíhnutých jedinců v jednotlivých baňkách s rozlišením samečků (♂) a samic (♀) v průběhu šesti generací. Pro získání takovýchto hodnot byli usmrcení jedinci tříděni a počítáni přibližně po 48 hodinách od začátku líhnutí, tzn. od doby, kdy první jedinci opustili kukly.

Tab. 1: Počty vylíhnutých samečků a samic v jednotlivých baňkách a generacích

Generace		1	2	3	4	5	6
Kontrola (0 mg/l)	♂	72	65	73	71	70	72
		68	68	58	69	77	77
		69	61	71	65	79	69
	♀	88	80	85	85	74	76
		81	79	76	75	81	81
		85	84	81	73	84	79
0,03 mg/l	♂	79	64	74	77	84	74
		67	75	79	81	78	72
		67	66	82	72	83	75
	♀	89	81	77	73	83	82
		82	83	83	78	75	78
		84	78	87	71	81	80
0,3 mg/l	♂	71	63	78	75	69	72
		66	68	75	69	65	64
		69	59	71	72	71	67
	♀	80	77	83	81	81	78
		83	74	80	76	78	75
		86	69	78	78	74	70
3 mg/l	♂	61	49	45	52	55	55
		62	41	43	51	56	43
		59	45	49	45	63	62
	♀	78	60	57	61	63	62
		83	54	53	57	65	57
		71	55	64	56	59	61

6.3. Vliv koloidního stříbra na hmotnost jedinců

V tabulce 2 jsou uvedeny průměrné hodnoty hmotností 100 jedinců v gramech. Tabulka obsahuje hmotnosti v každé ze šesti generací zvlášť pro samečky (♂) a zvlášť pro samičky (♀).

Tab. 2: Hmotnosti samečků a samiček v jednotlivých generacích

Generace		1	2	3	4	5	6
Kontrola (0 mg/l)	♂	0,0923	0,0918	0,0936	0,0922	0,0892	0,0853
	♀	0,1175	0,1168	0,1188	0,1195	0,1181	0,1165
0,03 mg/l	♂	0,0903	0,0899	0,0914	0,0885	0,0874	0,0857
	♀	0,1169	0,1155	0,1184	0,1166	0,1154	0,1158
0,3 mg/l	♂	0,0916	0,0892	0,0944	0,0899	0,0861	0,0825
	♀	0,1172	0,1181	0,1201	0,1156	0,1144	0,1139
3 mg/l	♂	0,0881	0,0879	0,0908	0,0869	0,0843	0,0763
	♀	0,1138	0,1133	0,1166	0,1146	0,1139	0,1123

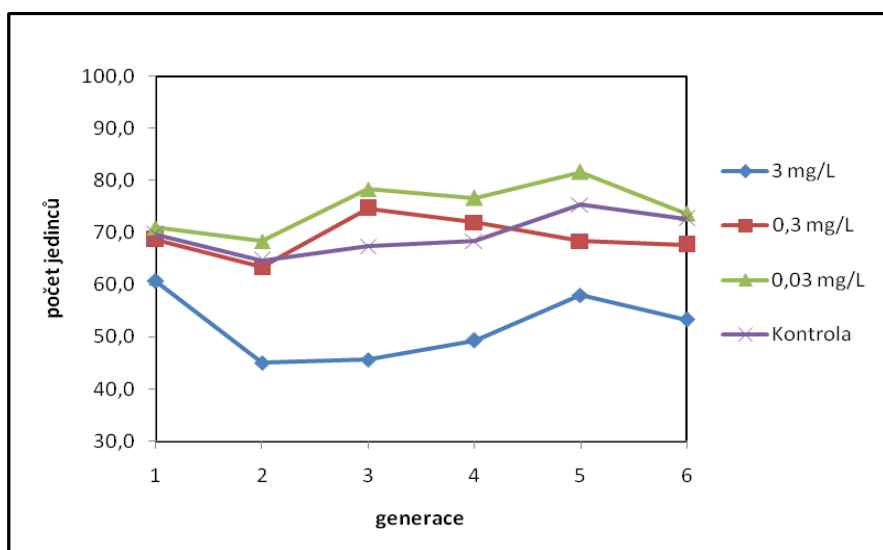
7. Diskuze

Na základě výsledků předchozích prací, hodnotících akutní a chronickou toxicitu nanočástic stříbra vůči octomilce obecné, byla pro tuto práci vybrána koncentrační řada 3; 0,3 a 0,03 mg nanočástic stříbra na litr živného média. Těmto koncentracím bylo vystaveno celkově šest po sobě jdoucích generací octomilek. Hodnocení vlivu nanočástic na octomilky spočívalo v porovnávání jedinců stříbra vystavených s tzv. kontrolními jedinci, kteří nikdy nepřišli do styku s nanočásticemi stříbra.

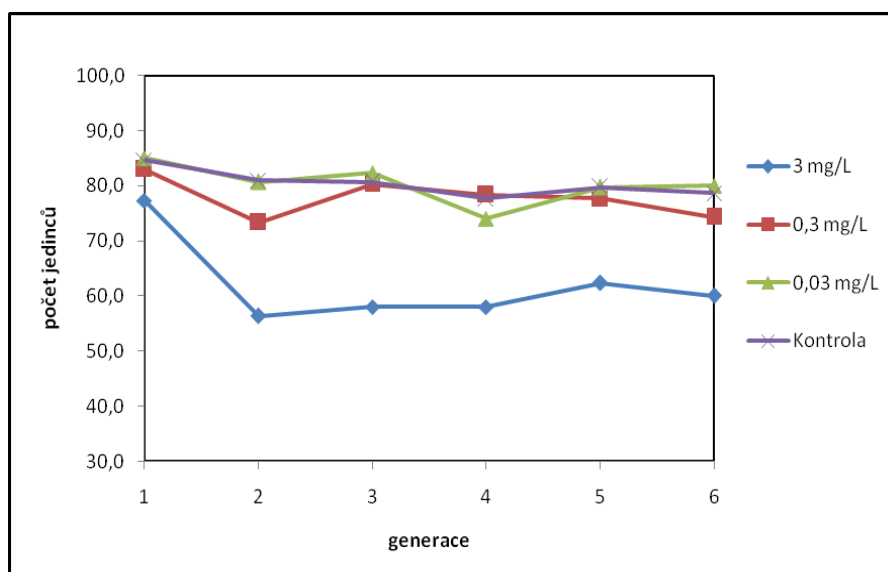
7.1. Vliv koloidního stříbra na počet vylíhnutých jedinců

Během testování vlivu nanočástic stříbra vůči octomilkám, neměla přítomnost nanočástic v médiu téměř žádný vliv na vývoj a reprodukci jedinců. Nebyly zaznamenány žádné odchylky od normálního vývoje. Počty samic i samečků vylíhnutých v baňkách s koncentracemi 0,03 a 0,3 mg Ag/l byly víceméně srovnatelné s hodnotami pro kontrolu, což je patrné z grafů 1 a 2. Jinak tomu bylo u koncentrace 3 mg/l, kde je patrné od druhé generace u obou pohlaví snížení počtu jedinců oproti počtům jedinců ovlivněných nižšími koncentracemi.

Graf 1: Změny počtu vylíhnutých samečků během šesti generací



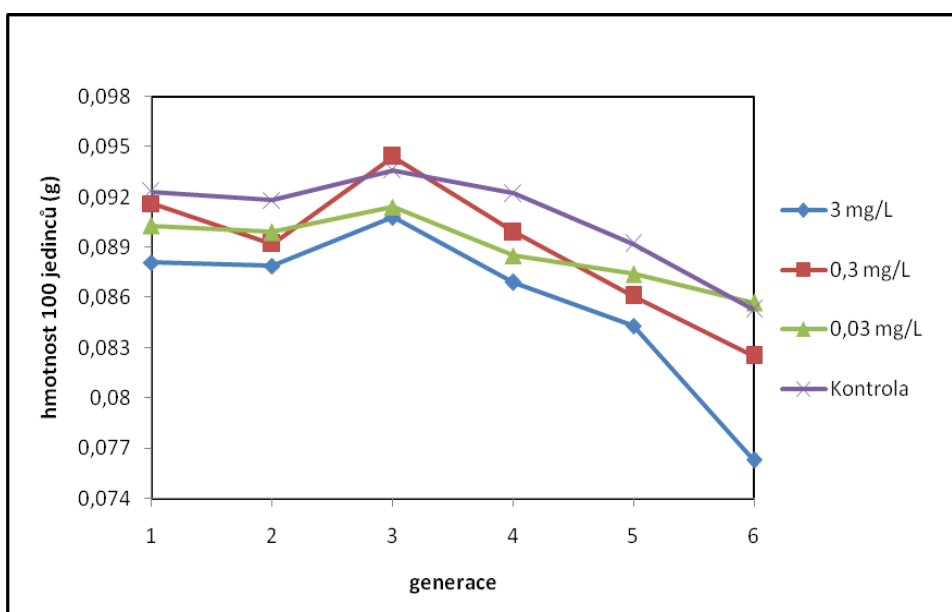
Graf 2: Změny počtu vylíhnutých samic během šesti generací



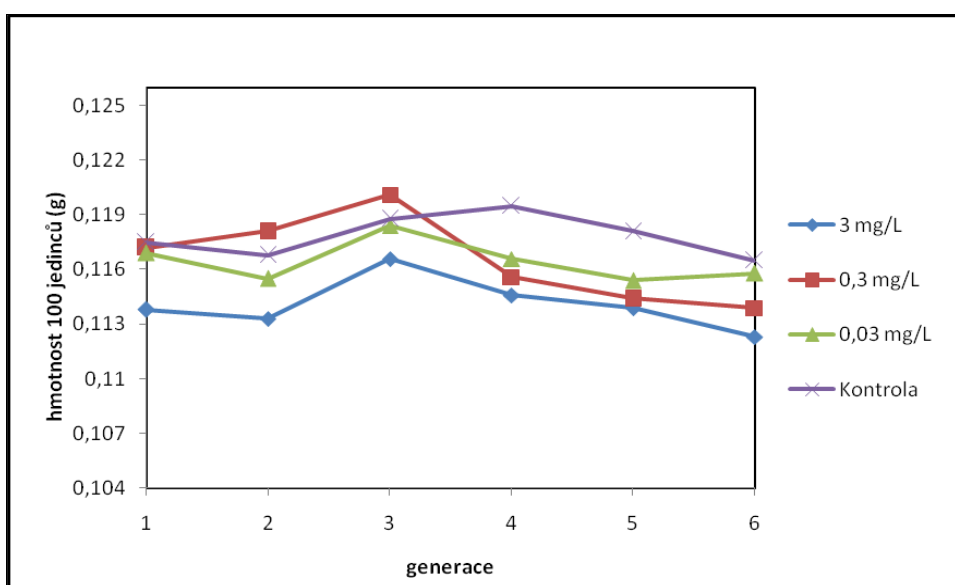
7.2. Vliv koloidního stříbra na hmotnost jedinců

Z grafů 3 a 4 je zřejmé, že rozdíly mezi hmotnostmi jedinců z kontroly a jedinců ovlivněných koncentrací 0,03 mg/l jsou zanedbatelné jak u samečků, tak u samiček. Jinak je tomu u koncentrací 0,3 a 3 mg/l, kde je u každého pohlaví znatelný mírný pokles hmotnosti, zejména mezi 3. a 4. generací. Hmotnosti samečků ve všech koncentracích od třetí generace klesají více prudce než u samiček, u kterých je pokles opravdu pozvolný. U samečků byl v 6. generaci také zaznamenán prudký pokles hmotnosti v koncentraci 3 mg/l.

Graf 3: Změny hmotnosti samečků během šesti generací



Graf 4: Změny hmotnosti samiček během šesti generací



7.3. Vliv koloidního stříbra na vzhled jedinců

Během pokusu nebyly zaznamenány v žádné z generací jakékoliv změny zbarvení ani velikosti těla při koncentracích 0,03 a 0,3 mg Ag/l média. Tito jedinci vypadali naprosto stejně jako jedinci kontrolní. Octomilky ovlivněné koncentrací 3 mg/l byly světleji zbarvené než kontrolní neovlivnění jedinci a byly nepatrně menší, což se projevilo i na jejich hmotnosti. Světlejší zbarvení spočívalo v zesvětlení hnědočerných proužků na zadečcích samic a skvrn na zadečcích samečků. Porovnání vzhledu exponovaných jedinců vůči kontrolním můžeme vidět na obrázku č. 12 a v detailu shora na obrázku č. 13.



Obr. 12: Srovnání vzhledu samečků (nahore) a samic (dole). Jedinci jsou uspořádáni takto: zleva kontrolní, z koncentrace 0,03 mg/l, z koncentrace 0,3 mg/l a vpravo z koncentrace 3 mg/l



Obr. 13: Srovnání kontrolního jedince (vpravo) a jedince z koncentrace 3 mg/l (vlevo). Dvojice vlevo jsou samečkové, dvojice vpravo samičky.

Během šesti generací se neobjevily žádné anatomické anomálie, které by byly způsobeny účinky nanočástic stříbra přítomných v živném médiu. Pouze v šesté – poslední generaci se v baňce s médiem o koncentraci nanočástic 3 mg/l, objevila u jednoho samečka deformace 3. a 4. zadečkového článku (viz Obr. 13). Jelikož se takový sameček nacházel pouze v jedné baňce a více takových případů nebylo zjištěno, není možné tuto mutaci přisuzovat účinkům stříbra, faktor, který vedl k této deformaci, není znám.



Obr. 13: Vlevo sameček s deformovaným zadečkem a vpravo sameček bez deformace

7.4. Vliv koloidního stříbra na délku vývojového cyklu

Ve variantách, kdy byl sledován účinek nanočástic koloidního stříbra o koncentracích 0,03 mg/l a 3 mg/l nedošlo v první a druhé generaci ke změnám v délce vývojového cyklu, byl stejný jako v neovlivněné kontrole. Při použití nanočástic o koncentraci 0,3 mg/l ale započalo líhnutí dospělců asi o jeden den dříve ve srovnání s kontrolou.

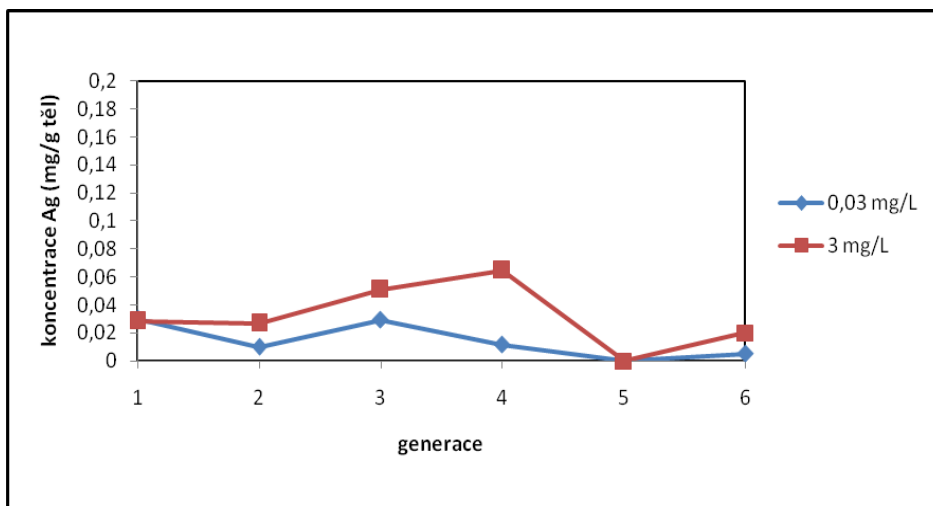
Ve třetí generaci došlo k urychlení vývojového cyklu octomilek ovlivněných koncentracemi 0,03 mg/l a 0,3 mg/l, a to přibližně o půl dne. Kontrolní baňky a koncentrace 3 mg/l se chovaly stejně. Ve čtvrté generaci došlo ke zpoždění jedinců vystavených koncentraci 3 mg/l o celý jeden den oproti kontrole. Délka vývojového cyklu octomilek vystavených koncentracím 0,03 a 0,3 mg/l byla v této generaci srovnatelná s kontrolou. V páté generaci se vývoj jedinců z koncentrace 3 mg/l opozdil jen mírně vůči kontrole a konečně v šesté generaci byla délka vývojového cyklu jedinců ve všech baňkách srovnatelná.

Z těchto pozorování plyne, že se délka vývojového cyklu vlivem zkoumaných koncentrací nanočástic koloidního stříbra nijak zvlášť neodchylovala od délky vývoje kontrolních jedinců, až na koncentraci 3 mg/l, kde došlo ve čtvrté generaci ke zkrácení cyklu o celý jeden den.

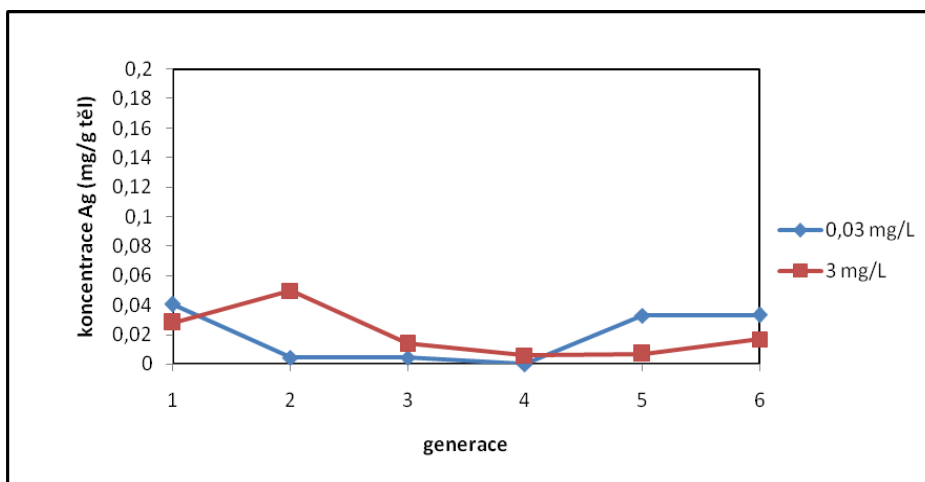
7.5. Bioakumulace stříbra v jedincích octomilky-(*Drosophila melanogaster*)

V rámci pokusu bylo také stanovováno množství stříbra naakumulovaného v tělech jedinců octomilky. Vzhledem k nízkým obsahům stříbra v médiu, které bylo konzumováno larvami, by se dala předpokládat velmi nepatrná nebo nulová bioakumulace stříbra v tělech dospělců. Tento předpoklad byl podle výsledků splněn, avšak hodnoty naměřené metodou AAS se ve většině případů pohybovaly pod mezí detekce přístroje, proto ve výsledkové části neuvádím přesné hodnoty, které nejsou z těchto důvodů příliš spolehlivé. Pouze pro ilustraci uvádím tyto hodnoty zanesené v grafech 5 a 6. Z výsledků v nich plyne, že hodnoty naakumulovaného stříbra u sameček ani u samiček většinou nepřekračovaly mez 0,05 mg Ag/ g těl.

Graf 5: Bioakumulace v tělech sameček



Graf 5: Bioakumulace v tělech samiček



Závěr

Tato práce se zabývala studiem chronické toxicity nanočástic stříbra vůči organismu *Drosophila melanogaster*. Vzhledem k poznatkům z předchozích testů toxicity, byly k testování vybrány nízké koncentrace stříbra 0,03 mg/l; 0,3 mg/l a 3 mg/l za účelem zjištění takové koncentrace, při níž nebudou zaznamenány jakékoliv změny ovlivněných jedinců v porovnání s kontrolními. Při testu chronické toxicity byla použita koloidní disperze stříbra s částicemi o velikosti 28 nm, která byla připravena modifikovanou Tollensovou metodou. Tato vodná disperze stříbra byla vždy přimíchána do živného média v chovných baňkách pro octomilky. Výsledky ukázaly, že jedinci vystaveni koncentracím nanočástic 0,03 mg/l a 0,3 mg/l nevykazovali výrazné odchylky od jedinců kontrolních (chovaných na médiu bez přídavku koloidu) v průběhu všech šesti generací. Nebyla ovlivněna jejich reprodukce, nedocházelo ke snižování hmotnosti a intenzity zbarvení těla, ani k větším změnám délky vývojového cyklu. Rovněž se v důsledku ovlivnění těmito koncentracemi neprojeví žádné mutace a abnormality na tělech octomilek. Mírně větší odchylky byly zaznamenány u jedinců chovaných na koncentraci 3 mg/l. Ti byli již na první pohled světlejšího zbarvení, byla ovlivněna jejich reprodukce a nepatrně také hmotnost a délka vývojového cyklu. Jakékoliv mutace a změny na tělech jedinců vlivem nanočástic stříbra nebyly ani u této koncentrace potvrzeny. Bioakumulace stříbra v tělech octomilek rovněž nebyla u takto nízkých koncentrací prokázána. Závěrem lze konstatovat, že koncentrace 0,03 mg/l a 0,3 mg/l nevykazují jakýkoliv toxický účinek vůči organismu *Drosophila melanogaster*.

Summary

This thesis focuses on the chronic toxicity of silver nanoparticles to the organism *Drosophila melanogaster*. According to the findings of previous toxicity tests, low silver concentration of 0,03 mg/l; 0,3 mg/l and 3 mg/l were chosen in order to determine such concentration at which there will be not observed any changes of the affected individuals in comparison to the controlled ones . The chronic toxicity test uses colloidal disperse of silver with a particle size of 28 nm, which was prepared by the modified Tollens method. This aqueous dispersion of silver was incorporated into the culture medium in the culture flasks for *Drosophila*. The results show that individuals exposed to the concentrations of nanoparticles 0,03 mg/l, 0,3 mg/l showed no significant deviation from the controlled subjects (bred on a medium without colloid) during all six generations. Their reproduction was not affected. There were no intensity of body coloration or weight reductions, neither any major changes in the length of the development cycle. There were also no mutations or abnormalities on the bodies of fruitflies due to the influence of these concentrations. Slightly larger deviations were observed on individuals exposed to the concentration of 3 mg/l. These were of lighter color and their reproduction was affected as well as their weight and the length of their development cycle. Any mutations or changes on the bodies of the individuals due to the silver nanoparticles were not discovered. Bioaccumulation of silver in the bodies of fruit flies did not appear at such low concentrations. It can be concluded that the concentration of 0,03 mg/l and 0,3 mg/l did not show any toxic effects on the organism *Drosophila melanogaster*.

Seznam použitých zdrojů

1. SKŘEHOT, P. A.; RUPOVÁ, M. *Nanobezpečnost*. Praha: Výzkumný ústav bezpečnosti práce, 2011.
2. KVÍTEK, L. *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra*, habilitační práce. Olomouc: Univerzita Palackého, 2008.
3. BENÍČKOVÁ, K. *Studium toxicity nanočástic koloidního stříbra na organismu octomilky obecné*, diplomová práce. Olomouc: PŘF UP, 2009.
4. NOVÁK, J. a kol. *Fyzikální chemie bakalářský a magisterský kurz*. Praha: VŠCHT Praha, 2009.
5. POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha: VŠCHT Praha, 2008.
6. FISCHER, O. a kol. *Fyzikální Chemie*. Praha: Státní Pedagogické Nakladatelství, 1983.
7. KVÍTEK, L.; PANÁČEK, A. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007.
8. KVÍTEK, L.; PRUCEK, R.; PANÁČEK, A.; SOUKUPOVÁ J. *Nanočástice stříbra – příprava, vlastnosti a aplikace*. Rožnov pod Radhoštěm: NANOCON 2009, 2009.
9. KRÍŽENECKÁ, S. *Základy analytické chemie*. Ústí nad Labem: UJEP, 2007.
10. BARTOVSKÁ, L.; ŠIŠKOVÁ, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Praha: VŠCHT Praha, 2005.
11. OPEKAR, F. a kol. *Základní analytická chemie*. Praha: Karolinum, 2003.
12. BUZEA, C.; BLANDINO I. P.; ROBBIE, K. *Biointerphases*. 2007, 2, MR17-MR172.
13. WANG, X. Z. et al. *Chemical Engineering Research and Design*. 2009, 87, 874-884.
14. MACHALA, L.; VŮJTEK, M.; KUBÍNEK, R., MAŠLÁŇ, M. *Mikroskopie skenující sondou*. [online], [cit. 24. 4. 2013]. Dostupné z: <<http://atmilab.upol.cz/mss/>>.

15. VOJUCKIJ, S. S. *Kurs koloidní chemie*, Praha: SNTL, 1984.
16. KVÍTEK, L. *Nanotechnologie dneška - koloidní stříbro*. [online], [cit. 15. 4. 2013]. Dostupné z: <<http://fch.upol.cz/vyzkum/srozum/nanotechnologie.pdf>>.
17. *Encyclopedia of Life - Drosophila melanogaster* [online], poslední aktualizace 2008 [cit. 1. 4. 2013]. Dostupné z: <<http://eol.org/pages/733739/details>>.
18. HANZÁK, J.; MOUCHA, J.; ZAHRADNÍK, J. *Světlem zvířat V (2. část): Bezobratlí*. Praha: Albatros, 1979.
19. ČEPELÁK, J. *Klíč zviřeny ČSSR Díl 5: Dvoukřídlí*. 1. vyd. Praha: Academia, nakladatelství Československé akademie věd, 1977.
20. JAVOREK, V. *Kapesní atlas dvoukřídleho hmyzu*. 2. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1978.
21. SEDLÁK, E. *Zoologie bezobratlých*. 2. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005.
22. ŠAFÁŘOVÁ, D.; VÁLOVÁ, P.; UVÍROVÁ L. *Praktická cvičení z obecné genetiky*. [online], poslední aktualizace 2012 [cit. 2. 4. 2013]. Dostupné z: <<http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=201&t=0>>.
23. <http://www.neosci.com/demos/10-1201_ap%20lab%207/Presentation_2.html> (staženo 2. 4. 2013)
24. JELÍNEK, J.; ZICHÁČEK, V. *Biologie pro gymnázia*. 8. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2006.
25. <<http://www.gutenberg.org/files/30701/30701-h/30701-h.htm>> (staženo 2. 4. 2013)
26. MANNING, G. *A quick and simple introduction to Drosophila melanogaster* [online], poslední aktualizace 2008 [cit. 2. 4. 2013]. Dostupné z: <<http://ceolas.org/VL/fly/intro.html>>.
27. *FlyBase - A Database of Drosophila Genes and Genomes* [online], poslední aktualizace 2013 [cit. 2. 4. 2013]. Dostupné z: <<http://flybase.org/>>.
28. SKUHRAVÝ, V. a kol.: *Metody chovu hmyzu*. Praha: ACADEMIA, 1968.
29. HORÁK, J.; LINHART, I.; KLUSOŇ, P. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Praha: VŠCHT Praha, 2004.

30. KOČÍ, V.; MOCO VÁ, K. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Praha: VŠCHT Praha, 2009.
31. BONILLA-RAMIREZ, L.; JIMENEZ-DEL-RIO, M.; VELEZ-PARDO, C. *BioMetals*. 2011, 24, 1045-1057.
32. AL-MOMANI, FA; MASSADEH, AM. *Biol Trace Elem Res*. 2005, 108, 217-7.
33. MASSADEH, AM; AL-MOMANI, FA; ELBETIEHA, A. *Biol Trace Elem Res*. 2008, 122, 292-9.
34. BAHADORANI, S.; HILLIKER, A. J. *J Insect Behav*. 2009, 22, 399-411.
35. AKINS, J. M.; SCHROEDER, J. A.; BROWER, D. L.; APOSHIAN, H. V. *BioMetals*, 1992, 5, 111-120.
36. CHIU, A.; KATZ, A. J.; BEAUBIER, J; CHIU, N.; SHI, X. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004, 255, 181-194.
37. BILBERG, K.; HOVGAARD, M. B.; BESENBACGER, F.; BAATRUP, E. *J Toxicol*. 2012.
38. ASGHARI, S. et al. *Journal of Nanobiotechnology*. 2012, 10.
39. KVÍTEK, L. et al. *J Phys Chem*. 2009, 113, 4296–4300.
40. EL-TEMSAH, Y. S.; JONER, E. J. *Environmental Toxicology*, 2012, 27, 42-49.
41. SHOULTS-WILSON, W. A. et al. *Nanotoxicology*. 2011, 5, 432-444.
42. PANÁČEK, A.; BENÍČKOVÁ, K.; RICHTROVÁ, J. et al. *Environ Sci Technol*. 2011, 45, 4974-4979.
43. KIM, Y. S. et. al. *Particle and Fibre Toxicology*. 2010, 7.
44. SUNG, J. H. et al. *Toxicological Sciences*. 2009, 108, 452-461.
45. ZHAO, C. M.; WANG, W. X. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2011, 30, 885-892.
46. KORANI, M. et al. *International Journal of Medicine*. 2011, 6, 855-862.
47. SATYAVANI, K. et al. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2012, 4, 35-39.

48. SATYAVANI, K.; GURUDEEBAN, S.; RAMANATHAN, T.; BALASUBRAMANIAN, T. *J Nanobiotechnology*. 2011, 9.
49. PANÁČEK, A. et al. *J Phys Chem B*. 2006, 110, 16248-16253.
50. LEVARD, C. et al. *Environmental Science and Technology*. 2012, 46, 6900-6914.
51. PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73, 1712-1720.
52. PANÁČEK, A. et al. *Biomaterials*. 2009, 30, 6333-6340.
53. SOTIRIOU, G. A.; PRATSINIS, S. E. *Environmental Science and Technology*. 2010, 44, 5649-5654.
54. Gubbins, E. J.; Batty, L. C.; Lead, J. R. *Environmental pollution*. 2011, 159, 1551-1559.