

VLIV AGLOMERACE STŘÍBRNÝCH NANOČÁSTIC NA VÝSLEDKY TESTŮ EKOTOXICITY NA VODNÍCH ORGANISMECH

JAKUB OPRŠAL^a, PETR KNOTEK^b,
MILOSLAV POUZAR^a, JIŘÍ PALAŘČÍK^a
a LADISLAV NOVOTNÝ^a

^a Ústav environmentálního a chemického inženýrství, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, Pardubice, ^b Společná laboratoř chemie pevných látek Ústavu makromolekulární chemie AV ČR a Univerzity Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 95, Pardubice
m.sc.oprsal@gmail.com

Došlo 11.3.13, přijato 28.3.13

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: ekotoxicita, kapr, embryo, stříbro, nanočástice, aglomerace

Úvod

Vývoj používání nanomateriálů a rizika s ním spojená

Rostoucí množství praktických aplikací nanomateriálů využívaných např. při výrobě kosmetických přípravků, léčiv, diagnostických látek, potravních doplňků, biosenzorů, katalyzátorů atd. vede též ke zvýšenému riziku jejich úniku do životního prostředí. Navzdory skutečnosti, že roční produkce nanomateriálů je odhadována na tisíce tun a má strmě vrůstající trend, možnosti zjišťování jejich skutečného vlivu na životní prostředí jsou velice omezené¹. Nanomateriály tvoří výrazně heterogenní skupinu a to jak z pohledu jejich chemického složení (nanomateriály byly připraveny již z více než 44 prvků²), tak i z pohledu průměrné velikosti částic a jejich distribuce, povrchového složení a náboje atd., což jsou vlastnosti, které zásadně ovlivňují chování nanomateriálů v životním prostředí a jejich toxicitu a ekotoxicitu. Voda je právě tou složkou životního prostředí, která je potenciálně nejvíce ohrožena kontaminací různými typy odpadních nanomateriálů, a přesto nelze ani v tomto případě považovat informace o osudu nanočástic ve vodním prostředí ani o jejich negativním vlivu na vodní organismy za ucelené^{3–7}.

Nano-formy stříbra jako tradiční nanomateriál

Aplikační potenciál roste zejména v souvislosti s jeho antibakteriálními účinky^{8,9}, které jej předurčují jako vhodnou součást dezinfekčních prostředků, či obvazových tkanin^{10,11}. Testy toxicity nAg byly provedeny na velkém množství organismů. Od těch nejjednodušších, jako jsou zelené řasy (*Chlamydomonas reinhardtii*¹², *Lemna minor*¹³), či terestrické trávy (*Lolium multiflorum*¹⁴) a houby¹, přes mikroorganismy (*Escherichia coli*¹⁵, *Pseudomonas putida*¹⁶), bezobratlé (*Caenorhabditis elegans*^{17,18}), obratlovce (*Danio rerio*¹⁹) až po lidské buňky (kožní keratinocyty, plicní fibroblasty, gliomy^{20,21}).

Výsledky terestrických studií i laboratorních testů ekotoxicity nAg jsou velmi nejednoznačné²², jelikož toxicita/ekotoxicita nanostříbra je ovlivněna širokou škálou faktorů²³ vnitřních (velikost částic, měrný povrch, složení solvatujících iontů ...) i vnějších (pH, iontová síla, množství iontů, přítomnost chelatujících látek, huminů, huminových a fulvinových kyselin...). Vysoké množství proměnných předurčuje komplikovanost relevantního ekotoxikologického testu. I přes to, že velikost částic je jedním z nejdůležitějších parametrů ovlivňujících toxické a ekotoxické účinky a vymezením kritických podmínek aglomerace v koloidních systémech se zabýval Peter P. von Weimarn²⁴ již roku 1908, nebývá na tyto poznatky brán zřetel.

Příprava roztoků nAg

Běžnou praxí je stabilizace připraveného koloidního systému pomocí stabilizačních činidel. Nejběžněji se používá citrát⁹, polyvinylpyrrolidon²⁵, bramborový škrob a polyakrylát¹⁹, polyvinylalkohol²⁶ či polyakrylamid²⁷. Dále je také možno použít polysacharidy jako arabská guma¹⁴, sacharidy²⁸, fosfolipidy²⁹, nebo biomolekuly¹⁹ (albumin, mastné kyseliny...). Po syntéze koloidního systému následuje provedení charakterizace připraveného materiálu před samotným ekotoxikologickým testováním.

Metody charakterizace roztoku nAg

Nejčastěji používané techniky analýzy velikosti a tvaru částic jsou transmisní/rastrovací elektronová mikroskopie (TEM, SEM). Velikost částic lze měřit též pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) a v případě kovových částic s povrchovým plasmonem je možná aplikace UV-Vis spektroskopie. Krystalická struktura částic bývá popsána pomocí rentgenové difrakce (XRD). K analýze prvkového složení koloidního systému bývá užito AAS, ICP-OES a ICP-MS. O stabilitě koloidního systému pak vypovídá hodnota ζ -potenciálu³⁰. Uvedené techniky bývají nejčastěji využívány k charakterizaci primárního koloidu, existuje však málo prací, kde by bylo hodnoceno chování nanomateriálů přímo v průběhu testů ekotoxicity po smíchání s kapalným médiem. Výjimku tvoří např. práce Cumberlandové³¹, která sice popisuje chování nAg v environmentálně relevantních podmínkách a vztah mezi iontovou silou živného média, přítomností huminových

kyselin, mocností solvatujících iontů a rychlostí aglomerace, chybí zde však jakákoliv ekotoxikologická koncovka. Také ve většině dalších ekotoxikologických prací zabývajících se ekotoxikologií stříbra je stanovena charakterizace primárního koloidního systému neprodleně po jeho syntéze, ale jeho chování v průběhu ekotoxikologického testování na živém organismu není popsáno. Tento přístup k problematice shledáváme jako nevhodný. Z dřívějších publikací³² jasně plyne, že různé formy (nano-, mikročástice, volný iont) téhož prvku vykazují značně rozdílnou toxicitu. Pro relevantní ekotoxikologické testování nanomateriálů v kapalných médiích je proto nezbytně nutné odlišit toxicitu nanočástic od toxicity aglomerátů či volných iontů.

Cíl práce

Jelikož sledovat rychlost aglomerace nAg, či uvolňování stříbrného iontu v průběhu samotného ekotoxikologického testu je prakticky nemožné, je navržen postup, při němž je možné kontrolovat velikost aglomerátů bez zásahu do probíhajícího testu periodickou výměnou kapalného média médiem o definovaných vlastnostech. Aby bylo možno uvedený postup aplikovat, je třeba formulovat vztah mezi koncentrací testovaných částic v médiu dané iontové síly a rychlostí a míry aglomerace částic a pomocí tohoto vztahu vypočítat rychlost výměny média zajišťující požadovanou střední hodnotu velikosti částic. Cílem prezentované práce je formulace uvedeného vztahu pro nAg částice v koloidních roztocích o koncentraci Ag 10 a 100 μM ředěných kapalným médiem připraveným v souladu s normou OECD 203, ověření platnosti tohoto vztahu a ověření možnosti aplikace navrhovaného postupu v podmínkách reálného testu reprodukční toxicity na plůdku kapra obecného (*Cyprinus carpio*).

Experimentální část

Syntéza roztoku nanostříbra

Nanostříbro bylo připraveno modifikovaným Tollensovým procesem²⁸. V Erlenmayerově baňce bylo smícháno 10 ml redestilované vody, 10 ml 5 mM roztoku dusičnanu stříbrného, 10 ml 25 mM roztoku amoniaku, 10 ml 50 mM roztoku hydroxidu sodného a 10 ml 50 mM roztoku glukosy. Takto vzniklá směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 15 min a poté byla slita do tmavé zásobní láhve. Koncentrace Ag v takto připraveném roztoku je 1 mM. Roztoky o nižší nominální koncentraci byly připraveny ředěním tohoto zásobního roztoku Médium 203 a jejich koncentrace byla ověřena pomocí ICP-OES.

Příprava Média 203

Médium 203 bylo připraveno podle směrnice OECD 203 (cit.³³). Koncentrace solí v tomto roztoku je 2 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgSO_4 , 0,77 mM NaHCO_3 a 0,075 mM

KCl. Připravené Médium 203 vykazovalo iontovou sílu roztoku 680 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

Hydrodynamický průměr, měrná elektrická vodivost, ζ -potenciál, AFM

Střední hydrodynamický průměr (D_H) a ζ -potenciál byly měřeny na přístroji ZetaPALS Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., USA) na základě dynamického rozptylu světla (DLS). Hodnota D_H je měřena po dobu 30 s při deseti replikacích a tato data jsou dále statisticky zpracována (střední hodnota, median a směrodatná odchylka). Měrná elektrická vodivost byla měřena konduktometrem inoLab cond 730 (WTW, Germany) s měřící celou WTW Twtracon 325. Měření bylo prováděno za laboratorní teploty.

Mikroskopie atomárních sil (AFM) byla uskutečněna na přístroji Solver Pro M (NT-MDT; Rusko) pomocí sondy HA_NC (typická rezonanční frekvence 185 kHz, $k = 4,6 \text{ N m}^{-1}$). Měření bylo uskutečněno v semikontaktním modu nastaveným na 40 % volné oscilace. Vzorky byly připraveny metodou „spin-coating“ při 2000 otáčkách za minutu na čerstvě připraveném HOPG (vysoce orientovaný pyrolytický grafit) a vysušeny za vakua³⁴.

Kvantifikace obsahu uvolněného Ag^+

Koncentrace rozpuštěného stříbrného iontu byla měřena v supernatantu vzniklém centrifugací 15 ml zkoumaného koloidního roztoku při 6000 otáčkách za minutu. Připravené koloidní roztoky nAg o koncentracích Ag 10 a 100 μM byly ponechány po dobu 6 h aglomerovat v Médium 203 při podmínkách testu a poté centrifugovány po dobu 30 min. Po uplynutí této doby bylo odebráno z každé centrifugační nádoby 10 ml supernatantu a koncentrace Ag v takto připravených vzorcích byla stanovena pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) na přístroji INTEGRA XL 2 (GBC, Dandenong Australia).

Expozice biologickému účinku nanočástic

Pokusným organismem byly jikry kapra obecného (*Cyprinus carpio*). V Petriho misce, která byla naplněna Médium 203 nebo koloidním roztokem nAg o příslušné koncentraci Ag, se nacházela vždy jedna jikra a pro každý experiment bylo použito 30 jiker. Pro udržení zadaného hodnoty stupně aglomerace částic stříbra byl po 6 hodin denně periodicky měněn roztok obsahující stříbro, na zbytek dne byl organismus umístěn zpět do čistého Média 203, které neobsahovalo žádné nAg. Experiment byl proveden pro dvě úrovně koncentrace Ag a to 10 a 100 μM . Pro koncentraci 10 μM byly tedy zvoleny maximální velikosti aglomerátů 200 a 300 nm a pro koncentraci 100 μM 400 a 600 nm. Pro dosažení maximální velikosti 200 nm při koncentraci 10 μM bylo nutné měnit roztok po 42 min, pro 300 nm po 137 min. Pro koncentraci 100 μM byla

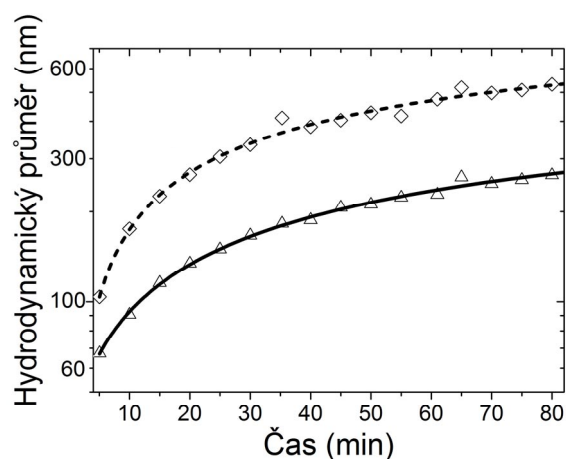
nutná výměna živného roztoku po 42 min, aby bylo dosaženo maximální velikosti aglomerátů 400 nm. Pro velikost 600 nm to bylo 184 min. Nárůst velikosti aglomerátů během experimentu při různé rychlosti výměny kapalného média o koncentraci nAg 10 μ M je znázorněn na obr. 3. Pro obě koncentrace byl proveden i semistatický test v uspořádání, kdy docházelo k výměně koloidního roztoku nAg v Médii 203 každý nový den, tak jak je běžnou praxí u standardního testu akutní toxicity pro chemikálie (OECD 203, cit.³³). Kontrolní skupiny byly kultivovány v Médii 203 bez přídavku nAg a tento roztok jim byl měněn se stejnou frekvencí, jako byla frekvence výměny Média 203 s přídavkem nAg, pro každou testovací skupinu embryí. K tomuto opatření bylo přistoupeno z důvodu minimalizace dopadu manipulace s plůdky na výsledky ekotoxikologického testu. Ten byl ukončen sedmý den, jelikož u kontrolní skupiny došlo k vstřebání žloutkového vaku, což je považováno za konečnou fázi experimentu.

Výsledky

Charakterizace koloidů a popis aglomeračního procesu

Primární koloidní systém nAg vykazoval vysokou časovou stabilitu (hodnota ζ -potenciálu -47 mV). V průběhu skladování po dobu jednoho měsíce od syntézy se hodnoty D_H pohybovaly v rozmezí 40 ± 2 nm. Sféricita nAg byla ověřena pomocí AFM (obr. 1) a velikost částic byla touto metodou stanovena v rozmezí 35–50 nm odpovídající výsledkům získaným pomocí DLS.

Po syntéze a ověření stability primárního koloidu, byla stanovena časová závislost růstu D_H v Médii 203 pro koncentrace 10 a 100 μ M (obr. 2). Pro obě zkoumané koncentrace Ag v koloidních roztocích nAg dochází díky aglomeračnímu procesu k růstu střední hodnoty D_H v čase. Rychlost aglomerace částic je vyšší pro koloidní roztok s vyšší koncentrací Ag. I v méně koncentrovaném koloid-

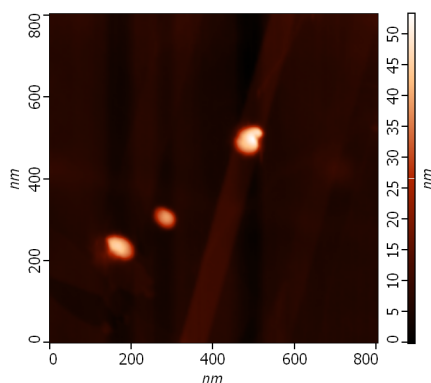


Obr. 2. Časová závislost růstu střední hodnoty D_H nanočástic Ag v Médii 203 ; Δ 10 μ M, $\diamond$ 100 μ M

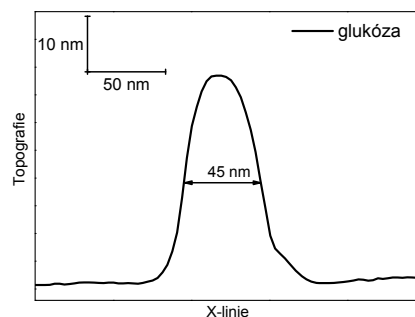
ním roztoku dojde po 12 minutách k překročení mezní hranice 100 nm (cit.¹) a lze předpokládat, že většina Ag přítomného v experimentálním systému pozbývá vlastností nanomateriálu. V případě koncentrovanějšího systému je rychlost růstu D_H ještě výraznější a čas potřebný k překročení hranice 100 nm se zkracuje. Experimentální data splňují závislost popsanou rovnicí (1) převzatou z práce³⁵

$$D_H^t = D_H^{\text{inf}} + (D_H^0 - D_H^{\text{inf}}) \cdot e^{-kt} \quad (1)$$

kde k odpovídá rychlostní konstantě a D_H^{inf} hydrodynamickému průměru v ustáleném stavu. Hodnoty D_H vypočtené dle rovnice (1) dobře korelují s experimentálními hodnotami naměřenými pomocí DLS (obr. 2), což potvrzují i hodnoty korelačního koeficientu r^2 shrnuté v tab. I. Parametr



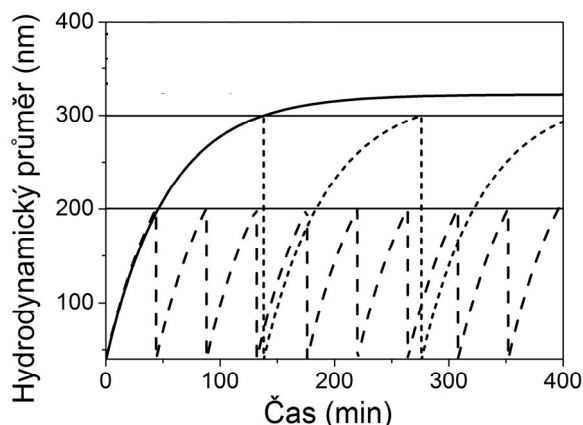
Obr. 1. Syntetizované nanostříbro zobrazené pomocí AFM



Tabulka I
Kinetické údaje pro aglomeraci částic stříbra v Médii 203

c_{Ag} [μM]	k [h^{-1}]	D_H^{inf} [nm]	r^2
10	1,3	310	0,972
100	2,3	700	0,931

^a k rychlostní konstanta, D_H^{inf} hydrodynamický průměr v ustáleném stavu, r korelační koeficient



Obr. 3. Vypočtená závislost velikosti aglomerátů na frekvenci výměny Média 203 s nAg pro koncentraci Ag 10 μM ; — bez výměny média, --- výměna po 42 min, - - - výměna po 137 min

D_H^0 byl přitom určen extrapolací experimentálně zjištěných hodnot D_H^t pro čas t blížící se nule (podobně jako při extrapolaci adsorpčních závislostí s účastí agregace pro koncentraci c blížící se nule⁴¹). Jeho velikost činila jak pro 10 μM tak pro 100 μM přibližně $D_H^0 = 30$ nm.

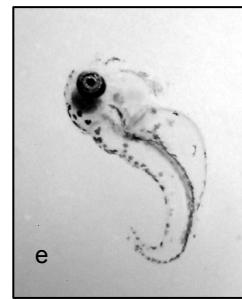
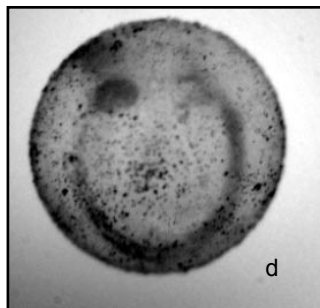
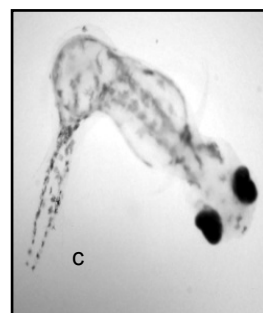
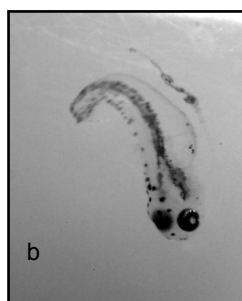
Na základě takto získaných dat je možné určit dobu, za kterou dojde k nárůstu velikosti aglomerátů pro danou koncentraci a konstruovat ekotoxikologický experiment tak, aby byl testovaný organismus vystaven pouze aglomerátům o předem zvolené maximální velikosti. V rámci provedeného experimentu jsme zvolili pro dvě koncentrační úrovně (10 a 100 μM) dvě úrovně maximální velikosti aglomerátů (200 a 300, resp. 400 a 600 nm).

Výsledky ekotoxikologického testu

Embrya z kontrolních skupin vykazovala po celou dobu testu normální růst a nebyly u nich pozorovány abnormality v chování ani v růstu (obr. 4a). Mortalita u kontrolních skupin nepřesahovala sedmý den experimentu hodnotu 3 %, zvýšená frekvence výměny média a s tím spojená častější manipulace s emryi neměla pozorovatelný vliv na vývoj, chování, růst ani mortalitu embryí.

Z tohoto důvodu dále (obr. 5) uvádíme pouze výsledky kontroly s největší frekvencí výměny média (po 42 min), výsledky kontrol s výměnou média po 137 a 184 minutách i po 24 hodinách byly zcela srovnatelné.

Při kultivaci embryí v koloidním roztoku nAg o koncentraci Ag 10 μM s frekvencí výměny média jedenkrát za 24 hodin (dále semistatický test) byla 7. den experimentu výsledná mortalita 30 %. U takto kultivovaných embryí nebyly pozorovány deformace, ani žádné abnormality ve fenotypu dříve pozorované např. při testech ekotoxicity nAg prováděných na plůdku Dánia pruhovaného³⁶. Bylo-li kultivační médium o koncentraci Ag 10 μM měněno s frekvencí jedenkrát za 137 min, což zajistilo výskyt aglomerátů o maximální velikosti 300 nm, byla celková mortalita o něco nižší (27 %). V případě takto provedeného experimentu však bylo možné pozorovat výrazné abnormality ve fenotypu (obr. 4c). U plůdků byly zjištěny zejména deformace páteře a ocasu. Při frekvenci výměny uvedeného média jedenkrát za 42 min a maximální velikosti aglomerátů 200 nm celková mortalita výrazně stoupla (50 %)



Obr. 4. Příklad vlivu stříbra na vývoj plůdku: a) kontrola, b) 10 μM , 200 nm, c) 10 μM , 300 nm, d) 100 μM semistatický pokus, e) 100 μM semistatický pokus

a byly též pozorovány deformace plůdků (obr. 4b). Mezi pozorované abnormality patřil zejména edém srdce, zálomky ocasu a snížená pohyblivost.

Při semistatickém testu prováděném v kulturačním médiu s přidavkem nAg o koncentraci Ag 100 μM byla 7. den zjištěna stejná mortalita jako v případě použití média o koncentraci Ag 10 μM – tedy 30 %. Při testu prováděném s použitím koncentrovanějšího koloidu byl však pozorován pomalejší vývoj embryí. 3. den od oplození se v koloidu o koncentraci Ag 100 μM vykulo pouze 7 % embryí, zatímco v koloidu o koncentraci Ag 10 μM to bylo 27 % a kontroly již 67 % embryí. Jikry byly na povrchu chorionu obaleny vrstvou aglomerátů stříbra (obr. 4d) a některé tyto aglomeráty byly pozorovány i uvnitř chorionu. U plůdků byly pozorovány deformace ocasu a páteře, edém srdce (obr. 4e) a neschopnost plůdků vykult se z chorionu. V několika případech došlo pouze k částečnému vykultu, kdy hlava plůdku zůstala v chorionu. V případě experimentu s frekvencí výměny média jedenkrát za 184 min a maximální velikostí aglomerátů 600 nm byla celková mortalita 60 %. U embryí byl opět pozorován pomalejší vývoj a vykult 3. den od oplození proběhlo u 3 % embryí. Jikry byly pokryty aglomeráty nanočástic stříbra. U plůdků byly pozorovány deformace jako zakrnlý ocas a zálomky ocasu. Byla-li frekvence výměny média jedenkrát za 42 min a maximální velikost aglomerátů 400 nm, dosáhla celková úmrtnost embryí úroveň 70 % a vývoj embryí byl v tomto případě ještě pomalejší než v předchozím případě. U plůdků byly pozorovány deformace jako zakrnlý ocas a zálomky ocasu. Výsledky popsanych experimentů jsou přehledně shrnuty na obr. 5.

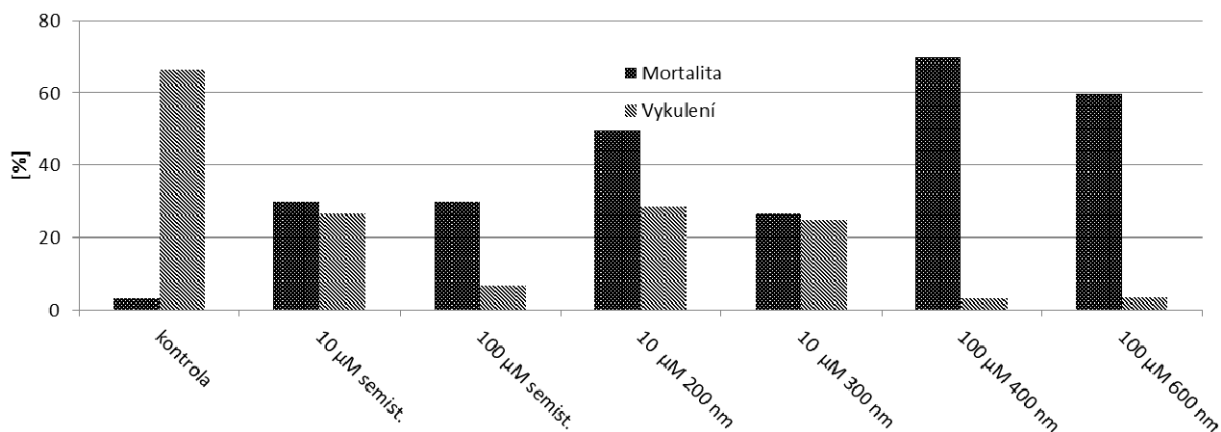
Kvantifikace obsahu uvolněného Ag^+

Metoda ICP OES použitá pro stanovení Ag v odstředěných koloidních roztocích nAg měla mez detekce určenou 7 $\mu\text{g l}^{-1}$. V žádném z testovaných vzorků nepře-

kročila zjištěná koncentrace Ag hranici detekčního limitu. Jelikož koncentrace nižší než 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ nepůsobuje žádné pozorovatelné změny ve vývoji dania pruhovaného³⁷, byl efekt rozpuštěného stříbrného iontu v této práci zcela vynechán.

Diskuse a závěr

Z výše prezentovaných dat vyplývá, že změna frekvence výměny média a tím i regulace maximální velikosti aglomerátů stříbra, jimž je testovaný organismus vystaven v průběhu experimentu, vede k ovlivnění výsledků testů ekotoxicity. V případě obou testovaných koloidních roztoků nAg (10 a 100 μM Ag) byla zjištěna vyšší mortalita a pomalejší vývoj embryí v případě vyšší frekvence výměny média. Při zajištění srovnatelné maximální velikosti aglomerátů (např. 300 nm pro 10 μM Ag a 400 nm pro 100 μM Ag) byla vyšší toxicita zjištěna pro koloid s vyšší koncentrací Ag. Je tedy možné předpokládat, že vliv rychlosti a míry aglomerace nanočástic na výsledky testů ekotoxicity by bylo možné do určité míry eliminovat řízením maximální velikosti aglomerátů prostřednictvím rozdílné rychlosti výměny kapalného média pro koloidní roztoky s různou koncentrací testovaných nanomateriálů. Tímto způsobem by patrně bylo možné získat spolehlivěji závislost toxicity daného nanomateriálu (přesněji daného systému s normalizovaným obsahem volných nanočástic a aglomerátů zvolených vlastností) na jeho koncentraci v koloidním roztoku, což zjevně není možné v případě semistatického pokusu, kde výměna média probíhá se stejnou frekvencí pro všechny studované koncentrace nanomateriálu (viz výsledky semistatického pokusu pro koloidy s 10 a 100 μM Ag). Námi prezentované výsledky je však nutné chápat pouze jako nezbytný první krok při ověřování aplikovatelnosti navrhovaného postupu. Nutnost provádět určité minimální množství opakování každého z experimentů při omezené kapacitě laboratoře nám neu-



Obr. 5. Celková mortalita 7. den experimentu a procento vykultu 3. den experimentu pro jednotlivá experimentální uspořádání

možnila použít kratší frekvenci výměny média než 42 min. Díky tomu se nám nepodařilo zajistit shodnou velikost aglomerátů pro systémy s různou koncentrací Ag. Tento problém by bylo teoreticky možné odstranit zpomalením rychlosti aglomerace. Většina autorů k tomuto účelu využívá různá činidla stabilizující koloidní systémy nAg, jako jsou např. citráty²⁰ či polyvinylpyrrolidon³⁸. Použití těchto činidel však prakticky neumožňuje provedení testu ekotoxicity za environmentálně relevantních podmínek (tedy tak, aby výsledky testu vypovídaly o toxicitě nanomateriálů v reálných přírodních podmínkách) a často je také těžké odlišit, jaká část zjištěné toxicity odpovídá testovanému nanomateriálu, jaká stabilizačnímu činidlu a jaká jejich synergickému působení na testovaný organismus. Jinou cestou, jak výrazně zpomalit aglomeraci nanočástic Ag, je snížení iontové síly kapalného média, v němž je test ekotoxicity prováděn³⁹. Využití této cesty však bude vyžadovat optimalizaci složení kapalného média tak, aby nebyl negativně ovlivněn životní cyklus pokusného organismu. Snaha navrhnout experimentální postup tak, aby bylo v budoucnu možné testy ekotoxicity provádět za environmentálně relevantních podmínek, nás vedla též k volbě pokusného organismu. Zvolen byl kapr obecný (*Cyprinus carpio*), což je pravděpodobně první domestikovaná ryba v historii a nejvýznamnější druh využívaný v akvakultuře a vodohospodářství ve střední Evropě⁴⁰. Volba tohoto organismu však s sebou přinesla další omezení, které souvisí s nízkou dostupností jeho embryí v průběhu roku. Z tohoto důvodu nebylo možné provést experimenty v širším rozsahu koncentrací Ag.

Znalosti o ekotoxicitě nanomateriálů jsou i přes veškerou snahu v současné době dosti omezené. Testování se v minulosti soustředilo na normované akvatické testy pro chemikálie, které jsou mezinárodně uznávané (ISO, OECD...) a jejichž provedení je relativně běžně dostupné. Nanomateriály, zvláště pak ty kovové, však vyžadují odlišný přístup. Nejedná se totiž o chemická individua, ale v drtivé většině případů jde ve vodném prostředí o směs nanomateriálů, jeho aglomerátů a případně i jeho iontové formy. A právě ona zmiňovaná velikost aglomerátů může být považována za klíčový parametr ovlivňující toxicitu. Z provedených experimentů vyplývá, že velikost aglomerátů nAg hraje významnou roli v jeho toxicitě. Z těchto výsledků jasně plyne, že současný přístup k testování nanomateriálů způsobem klasických akvatických testů není korektní a hledat tímto způsobem vztah mezi dávkou a účinkem postrádá smysl. Nejedná se totiž o ekotoxikologické testování nanomateriálu, nýbrž o testování aglomerátů neznámé velikosti.

Popsaný akvatický ekotoxikologický test, založený na fyzikálně-chemické charakterizaci chování koloidního stříbra v testovaném médiu, by mohl v budoucnu naznačit možnosti provádění a porovnávání testů ekotoxicity materiálů obdobných struktur jako použité koloidní stříbro. Takové žádoucí a dosud stále chybějící informace o ekotoxicitě nanomateriálů by doplňovaly výsledky již aplikovaných normovaných (ISO, OECD) a relativně běžně dostupných akvatických chemických testů.

Tato práce vznikla za podpory grantového projektu MPO TIP č. FR-TI3/288.

LITERATURA

1. Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N. B., Filscher J., Miao A. J., Quigg A., Santschi P. H., Sigg L.: *Ecotoxicology* 17, 372 (2008).
2. Kahru A., Dubourguier H. C., Blinova I., Ivask A., Kasemets K.: *Sensors* 8, 5153 (2008).
3. Franklin N. M., Rogers N. J., Apte S. C., Batley G. E., Gadd G. E., Casey P. S.: *Environ. Sci. Technol.* 41, 8484 (2007).
4. Griffitt R. J., Luo J., Gao J., Bonzongo J. C., Barber D. S.: *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1972 (2008).
5. Blaise C., Gagne F., Ferard J. F., Eullaffroy P.: *Environ. Toxicol.* 23, 591 (2008).
6. Crane M., Handy R. D., Garrod J., Owen R.: *Ecotoxicology* 17, 421 (2008).
7. Klaine S. J., Alvarez P. J. J., Batley G. E., Fernandes T. F., Handy R. D., Lyon D. Y., Mahendra S., McLaughlin M. J., Lead J. R.: *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1825 (2008).
8. Lara H. H., Ayala-Nunez N. V., Turrent L. D. I., Padilla C. R.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 615 (2010).
9. Lee S. M., Song K. C., Lee B. S.: *Korean J. Chem. Eng.* 27, 688 (2010).
10. Yoon K. Y., Byeon J. H., Park J. H., Hwang J.: *Sci. Total Environ.* 373, 572 (2007).
11. Tian J., Wong K. K. Y., Ho C. M., Lok C. N., Yu W. Y., Che C. M., Chiu J. F., Tam P. K. H.: *ChemMedChem* 2, 129 (2007).
12. Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N., Sigg L., Behra R.: *Environ. Sci. Technol.* 42, 8959 (2008).
13. Gubbins E. J., Batty L. C., Lead J. R.: *Environ. Pollut.* 159, 1551 (2011).
14. Yin L. Y., Cheng Y. W., Espinasse B., Colman B. P., Auffan M., Wiesner M., Rose J., Liu J., Bernhardt E. S.: *Environ. Sci. Technol.* 45, 2360 (2011).
15. Dror-Ehre A., Mamane H., Belenkova T., Markovich G., Adin A.: *J. Colloid Interface Sci.* 339, 521 (2009).
16. Fabrega J., Renshaw J. C., Lead J. R.: *Environ. Sci. Technol.* 43, 9004 (2009).
17. Roh J. Y., Sim S. J., Yi J., Park K., Chung K. H., Ryu D. Y., Choi J.: *Environ. Sci. Technol.* 43, 3933 (2009).
18. Meyer J. N., Lord C. A., Yang X. Y. Y., Turner E. A., Badireddy A. R., Marinakos S. M., Chilkoti A., Wiesner M. R., Auffan M.: *Aquat. Toxicol.* 100, 140 (2010).
19. Asharani P. V., Wu Y. L., Gong Z. Y., Valiyaveetil S.: *Nanotechnology* 19 (2008).
20. Lu W. T., Senapati D., Wang S. G., Tovmachenko O., Singh A. K., Yu H. T., Ray P. C.: *Chem. Phys. Lett.* 487, 92 (2010).
21. AshaRani P. V., Mun G. L. K., Hande M. P., Va-

- liyaveettil S.: ACS Nano 3, 279 (2009).
22. Oberdorster E.: Environ. Health Perspect. 112, 1058 (2004).
23. Romer I., White T. A., Baalousha M., Chipman K., Viant M. R., Lead J. R.: J. Chromatogr., A 1218, 4226 (2011).
24. von Weimarn P. P.: Zeitschrift für Chemie und Industrie der Kolloide 2, 246 (1908).
25. Stebounova L. V., Guio E., Grassian V. H.: J. Nanopart. Res. 13, 233 (2011).
26. Choi O., Hu Z. Q.: Environ. Sci. Technol. 42, 4583 (2008).
27. Morones J. R., Frey W.: Langmuir 23, 8180 (2007).
28. Tolaymat T. M., El Badawy A. M., Genaidy A., Scheckel K. G., Luxton T. P., Suidan M.: Sci. Total Environ. 408, 999 (2010).
29. Singh S., Patel P., Jaiswal S., Prabhune A. A., Ramana C. V., Prasad B. L. V.: New J. Chem. 33, 646 (2009).
30. Fabrega J., Luoma S. N., Tyler C. R., Galloway T. S., Lead J. R.: Environ. Int. 37, 517 (2011).
31. Cumberland S. A., Lead J. R.: J. Chromatogr., A 1216, 9099 (2009).
32. Zhang Q. W., Kusaka Y., Zhu X. Q., Sato K., Mo Y. Q., Kluz T., Donaldson K.: J. Occup. Health 45, 23 (2003).
33. OECD guideline for testing chemicals No. 203 – Fish acute toxicity test.
34. Bilkova E., Sedlak M., Imramovsky A., Charova P., Knotek P., Benes L.: Int. J. Pharm. 414, 42 (2011).
35. Lee B. T., Ranville J. F.: J. Hazard. Mater. 213, 434 (2012).
36. Asharani P. V., Wu Y. L., Gong Z. Y., Valiyaveettil S.: Nanotechnology 19, 255102 (2008).
37. Powers C. M., Slotkin T. A., Seidler F. J., Badireddy A. R., Padilla S.: Neurotoxicol. Teratol. 33, 708 (2011).
38. Suresh A. K., Pelletier D. A., Wang W., Moon J. W., Gu B. H., Mortensen N. P., Allison D. P., Joy D. C., Phelps T. J., Doktycz M. J.: Environ. Sci. Technol. 44, 5210 (2010).
39. Yang X. Y., Gondikas A. P., Marinakos S. M., Auffan M., Liu J., Hsu-Kim H., Meyer J. N.: Environ. Sci. Technol. 46, 1119 (2012).
40. Vandeputte M.: Aquat. Living Resour. 16, 399 (2003).
41. Novotný L.: *Disertační práce*. AV ČR, Praha 1998.

J. Opršal^a, P. Knotek^b, M. Pouzar^a, J. Palarčík^a, and L. Novotný^a (^a *Institute of Environmental and Chemical Engineering, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice*, ^b *Joint Laboratory of Solid State Chemistry of the Institute of Macromolecular Chemistry of Academy of Sciences of the Czech Republic and University of Pardubice*): **Impact of the Silver Nanoparticles Agglomeration on the Results of Ecotoxicity Tests on Aquatic organisms**

A new approach, which reduces the impact of rate and extent of nanoparticle agglomeration on results of aquatic toxicity tests, is proposed. A variable rate of periodic exchange of colloidal solution was used to control the maximum size of agglomerates in liquid medium prepared according to OECD 203. The exchange frequency is derived from the time dependence of the medium agglomerates size for two nanoparticle concentrations. The proposed method was checked in the ecotoxicity test of non-stabilized 40-nm Ag nanoparticles performed with *Cyprinus carpio* embryos.