

## Hodnocení toxicity vybraných nanočástic na *E. coli*

Mgr. Petra Škodová, Ing. Lucie Křiklavová, Ph.D., Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.

### Abstrakt

Tento příspěvek se zabývá vlivem vybraných nano-částic na bakteriální populace *Escherichia coli*, hodnocením jejich případné toxicity. Testování probíhalo ve dvou médiích, a to sójovém vývaru a BSM médiu. Nano-částice byly použity vždy v koncentraci 1 g/l. Toxicita vybraných nanočástic byla hodnocena zejména pomocí respirace a fluorescenční analýzy, která umožňuje pozorování a porovnání živých a mrtvých buněk *E. coli* ve zkoumaném vzorku. Výsledky experimentu ukázaly jako nejvíce toxické nano-částice Pr.

---

### Úvod

Nanotechnologie mají široké uplatnění v zemědělství, životním prostředí a průmyslovém odvětví. Přestože použití nanotechnologií stále vzrůstá, v posledních letech vyšly najevo vážné důsledky v různých oblastech životního prostředí. Nano-částice se uvolňují do vzduchu, vody a půdy, pravděpodobně mají také dopad na lidské zdraví. Vliv běžných kovů a materiálů na lidské zdraví a životní prostředí je velmi dobře známý, jakmile jsou však tyto kovy a materiály v podobě nano-částic, jejich následné nebezpečí, které spočívá ve tvaru a velikosti nano-částic, je třeba ještě řádně prostudovat [1].

K první interakci biologického materiálu s nano-částicemi dochází mezi buněčnou membránou a danými nano-částicemi. Tato interakce je velmi závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech nano-částic. Malá změna v jejich velikosti, tvaru, náboji nebo chemickém složení může vést k radikálně odlišným interakcím s živými systémy [2, 3].

Dosud neexistují žádné standardizované metody, které by bylo možné použít pro testování toxicity nano-částic uvolněných do různých složek životního prostředí.

### Experiment a metody

Pro hodnocení toxicity vybraných nano-částic byly použity dvě stěžejní metody, a to měření respirace buněk *E. coli* za přítomnosti nano-částic v médiu a fluorescenční analýza live/dead cells. Tyto metody byly doplněny o měření růstové křivky *E. coli* ve vzorcích s nano-částicemi měřením absorbance při 600 nm, dále byly výsledky doplněny o stanovení kultivovatelnosti bakterií, tzv. KTJ/ml (kolonie tvořící jednotka). Pro hodnocení toxicity na *E. coli* byly vybrány následující nano-částice: nanodiamanty, nano-TiO<sub>2</sub>, nano-SiO<sub>2</sub> a nano-částice Pr, Pb, Ce a Bi. Zatímco pro nanodiamanty, TiO<sub>2</sub> a SiO<sub>2</sub> byl zvolen jako médium sójový vývar, pro nano-částice Pr, Pb, Bi a Ce bylo použito BSM médium s glukosou o koncentraci 0,5 g/l. Ve všech případech bylo měření prováděno s koncentrací nano-částic 1 g/l.

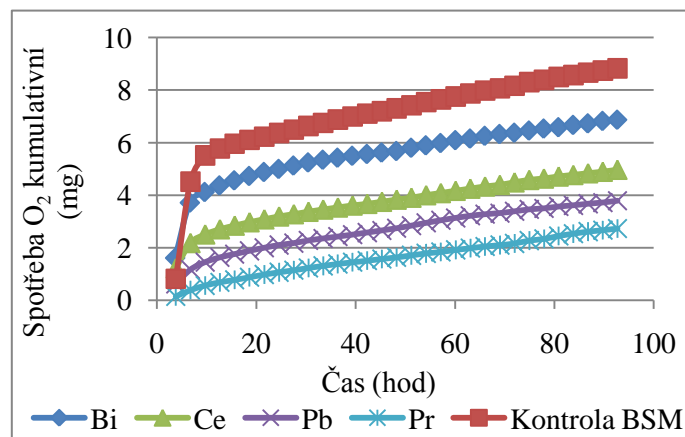
Uspořádání experimentu: 18 ml média, 2 ml fyziologického roztoku s *E. coli* o počáteční absorbanci ~ 0,93 při 600 nm, 1 g/l nano-částic.

Respirace vzorků byla měřena vždy 5 dnů. Z výsledků získaných z měření respirace je také možné stanovit růstovou křivku *E. coli* v daném prostředí. Fluorescenční analýza byla provedena před nasazením vzorků na respirometr a po jejich sundání z respirometru po 5 dnech, z čehož bylo možné porovnat, jak se změnilo zastoupení živých a mrtvých buněk ve vzorcích.

Další použitou metodou bylo stanovení KTJ/ml, tato metoda byla pouze okrajová, ačkoli stanovení KTJ/ml patří mezi běžně používané metody, její výsledky jsou pouze orientační. Bylo zjištěno, že pouze 2 % bakterií jsou kultivovatelná, proto byla zvolena tato metoda jen jako doplňková.

## Výsledky a diskuze

U všech vzorků byla měřena respirace po dobu 5 dnů, 1. a 5. den byla toxicita vzorků hodnocena také pomocí fluorescenční mikroskopie živých/mrtvých buněk. Obrázek 1 ukazuje kumulativní spotřebu kyslíku vzorků obsahujících *E. coli* a popsané nano-částice. Rozdíl v toxicitě mezi jednotlivými nano-částicemi je dobře patrný, největší vliv nano-částic na respirační aktivitu *E. coli* měly nano-částice Pr.



**Obrázek 1.** Kumulativní spotřeba kyslíku vzorků obsahujících *E. coli* a nano-částice Bi, Ce, Pb a Pr

## Závěr

Výsledky experimentu ukázaly, že nejvíce toxické pro *E. coli* byly nano-částice Pr, čemuž odpovídá také fluorescenční analýza, zatímco nejmenší toxicitu vykazují nano-částice Bi. Během experimentu však byl poměrně rychle vyčerpán zdroj uhlíku – glukosa. Bylo by dobré experiment zopakovat s vyšší koncentrací glukosy. Toxicita nanodiamantů je zatím sporná, ukázalo se, že nanodiamanty obsahovaly kromě diamantové struktury také uhlík v podobě, kterou jsou bakterie schopné využít jako C-zdroj. Bude tedy třeba zjistit čistotu nanodiamantů, dále se bude zjišťovat velikost a tvar všech testovaných nano-částic pomocí SEM mikroskopie. Aby bylo možné říci, zda je toxicita způsobena typem nano-částic (složením) nebo jsou nano-částice toxické z důvodu jejich rozměru či struktury.

## Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Janu Grégrovi, Stanislavu Nevyhoštěnému a Ing. Totka Bakalova, Ph.D. za poskytnutí nano-částic.

Tato práce byla podporována Ministerstvem školství ČR v rámci projektu SGS 21066/115 na Technické univerzitě v Liberci.

## Reference

- [1] Brar, S.K., Verma, G., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., *Waste Management*, 30: 504-520 (2010).
- [2] Mahmoudi, M., Meng, J., Xue, X., Liang, X. J., Rahman, M., Pfeiffer, Ch., Hartman, R., Gil, P. R., Pelaz, B., Parak, W. J., Pino, P., Carregal-Romero, S., Kanaras, A. G., Selvan, S. T., *Biotechnol Adv.*, (2014), in press.
- [3] Zhang, X.-Q., Xu X., Bertrand, N., Pridgen, E., Swami, A., Farokhzad, O. C., *Adv Drug Deliv Rev.*, 64: 1363–1384 (2012).