

APLIKACE NIKLU A NANONIKLU DO TERESTRICKÉHO PROSTŘEDÍ

HANA PALKOVÁ^a, TEREZA SOVOVÁ^a, IVANA KONÍČKOVÁ^a, VLADIMÍR KOČÍ^a, VILÉM BARTŮŇEK^b a ZDENĚK SOFER^b

^a Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta technologie ochrany prostředí, ^b Ústav anorganické chemie, Fakulta chemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

hana.palkova@vscht.cz

Došlo 22.6.12, přepracováno 3.1.13, přijato 30.1.13.

Klíčová slova: nanonikl, nikl, ekotoxicita, terestrické testy

Úvod

Těžké kovy obsažené v půdě mohou vlivem působení několika faktorů, jako je např. chemické zvětrávání a vliv nízkomolekulárních organických kyselin, které jsou produkovány v oblasti rhizosféry, přecházet do ostatních složek půdy. Zvýšení obsahu kovů v půdě může snižovat počet žijících organismů a tak dochází k narušení rovnováhy a půdní systém se stává velice křehký. Půda se navíc účastní filtračních a čistících procesů, které mohou být přítomností kovů ovlivněny a rostliny pak mohou následně bioakumulovat znečišťující látky. Vzhledem k tomu, že polutanty mohou vstupovat do potravních řetězců, představují pak toxikologická rizika pro další organismy¹.

Tato studie je zaměřena na kovové nanomateriály, konkrétně na nanonikl. Nikl je označován jako středně toxický těžký kov. Nikl se chová ve stopovém množství pravděpodobně jako esenciální prvek². Ve vyšších než stopových koncentracích působí nepřímo toxicky. Mechanismy nepřímé toxicity niklu jsou dvojího druhu. V prvním případě může nikl ovlivňovat syntézu důležitých biokatalyzátorů, metaloenzymů³. V druhém případě může vyvolat oxidační stres v buňkách⁴. Projevy toxicity niklu se liší mezi jednotlivými druhy rostlin. Toxické účinky závisí na vývojovém stádiu, podmínkách pěstování, koncentraci niklu a délce expozice. Rostliny přijímají nikl přes kořenový systém pasivní difuzí nebo aktivním transportem. Poměr mezi těmito dvěma typy příjmu závisí na metabolismu dané rostliny, formě Ni, jeho koncentraci, pH prostředí, přítomnosti jiných kovů a obsahu organické hmoty. Nepřímý vliv mohou mít také další faktory jako např. geochemické vlastnosti substrátu nebo délka vegetačního období. Z biochemického hlediska příjem niklu regulují komplexy s ligandy kovů a bílkoviny vážící nikl. Nikl je kumulován ve většině semen a v některých druzích rostlin, které jsou pro svoji schopnost ukládat Ni ve vyso-

kých koncentracích (několik tisíc mg kg⁻¹, až 5 % sušiny), označovány jako hyperakumulátory. Tato skupina zahrnuje některé druhy z více než 310 čeledí rostlin (např. hvězdicovité, brukvovité, bobovité, lipnicovité, atd.), které pro svůj růst vyžadují větší množství niklu než ostatní rostliny. Na tyto druhy rostlin je upřena pozornost zejména kvůli jejich možné aplikaci ve fytořemediaci⁵. Toxické účinky niklu byly prokázány na vodních rostlinách např. okřešku *Spirodela polyrhiza*, kde byly cílovým orgánem chloroplasty⁵. Pokud se nikl vyskytuje v půdách ve vyšších koncentracích, výrazně snižuje přežití, růst a reprodukci chvostoskoků *Folsomia candida* a *Folsomia fimetaria*⁶. V případě aktivního příjmu je nikl pravděpodobně transportován do buněk, následně pak dochází k interakci s proteiny silnou vazbou na aminokyseliny a to zejména na histidin⁶.

Nanonikl je používán pro úpravy oceli, která je následně odolná vůči působení kyselin, zásad a aktivním tenzidům a zároveň je mechanicky odolná. Uměle vytvořené nanomateriály se díky své unikátní velikosti částic a struktuře povrchu vyznačují neobvyklými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Vlastností, které vedou k technickým výhodám nanotechnologií, mohou mít na druhé straně unikátní biologické účinky⁷.

Vzhledem k tomu, že nikl je běžně používán v mnoha průmyslových odvětvích a emitován do prostředí v nezanedbatelných množstvích, je proto vhodné ověřit toxicitu i jeho nanočástic.

Cílem studie je srovnání a ověření toxicity práškového niklu (zrnitost <10 μm) s nanoniklem (velikost částic 10,9 nm). Obě formy niklu byly uměle zaváděny do umělé půdy. Účinky těchto dvou forem niklu byly porovnány s reálnými vzorky z průmyslové a zemědělské oblasti. Možnost porovnání kontaminace standardní půdy s přírodními vzorky umožňuje přiblížení reálným podmínkám. V přírodních podmínkách má na toxicitu vliv přirozené stárnutí půdy, biotické faktory půdního prostředí, tedy přítomné půdní organismy, biochemický koloběh látek a interakce mezi edafonem (v půdě žijící společenstva organismů) a obsaženými chemickými látkami⁸. Všechny tyto procesy bohužel nelze v laboratorní praxi realizovat. Právě pro postihnutí rozdílů toxicity v přírodních a umělé půdě byly do studie zahrnuty výše zmíněné vzorky.

Tato práce by měla rovněž směřovat k zamyšlení, jestli lze nanomateriály dále považovat za látky shodné s jejich makroskopickými ekvivalenty, nebo je nezbytné k nim přistupovat jako k odlišným chemickým elementům s rozdílnými dopady na životní prostředí.

Předvídaní ekotoxických účinků látek, nejen kovů, je velice důležité pro předcházení poškození terestrického ekosystému antropogenními činnostmi. Vzhledem k tomu, že těžké kovy jsou z matric životního prostředí obtížně odstranitelné, vyznačují se nepříznivými biologickými vlastnostmi, jsou biologicky neodbouratelné, perzistentní a mají vysoký potenciál akumulace v biotě, představují tak značné riziko pro životní prostředí i lidskou společnost.

Experimentální část

Vzorky

Tato studie je zaměřena na srovnání toxicity dvou odlišných forem kovového niklu. Srovnání bylo realizováno na niklu práškovém (zrnitost <10 μm, výrobce Merck) a jeho nanoformě (velikost částic 10,9 nm, výrobce Ústav anorganické chemie, VŠCHT Praha). Nanočástice niklu byly připraveny tepelným rozkladem glycerolátu niklu. Glycerolát niklu byl připraven pětihodinovým varem dusičnanu nikelnatého s glycerolem. Po ukončení varu byla reakční směs vylita do destilované vody a vzniklá sraženina byla následně mnohokrát vyprána v destilované vodě a nakonec vysušena na vzduchu. Amorfni povaha produktu byla potvrzena RTG práškovou difrakcí. Vzniklý nesstechiometrický glycerolát byl následně rozkládán v trubkové peci při 400 °C po dobu jedné hodiny při atmosféře 50 % H₂ a 50 % N₂. Vzniklý niklový prášek byl charakterizován RTG difrakcí a dále uchováván v destilované vodě odplyněné pomocí ultrazvukové lázně. RTG prášková difrakce byla provedena při pokojové teplotě na difraktometru PANalytical X'Pert PRO použitím CuKα radiace ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, $U = 40 \text{ kV}$, $I = 30 \text{ mA}$). K vyhodnocení naměřených dat byl použit program X'Pert HighScore Plus a pro výpočet průměrných velikostí nanočástic byla použita známá Scherrerova rovnice. Pro srovnání byly zároveň otestovány reálné vzorky průmyslové a zemědělské zeminy. Vzorek průmyslové půdy byl odebrán v areálu akciové společnosti Kovohutě Příbram nástupnická, a.s., Středočeský kraj, obec Příbram. Jednalo se o odběr prostý, odebrána byla svrchní část půdy do hloubky 15 cm. Vzorek zemědělské půdy byl odebrán ze zahrádkářské oblasti Březové Hory, obec Příbram. Opět se jednalo o prostý odběr z povrchu do hloubky 15 cm. Vzorek průmyslové půdy byl na základě své textury zařazen dle stupnice Nováka mezi hlinitopísčité půdy, vzhledem k tomu že obsahoval 10 až 20 % částic <0,01 mm. Vzorek zemědělské půdy obsahoval 20–30 % částic <0,01 mm, jednalo se o půdu písčitohlinitou⁹. Vzorky půd byly sušeny při laboratorní teplotě, následně byly přesítovány přes síto o velikosti ok 4 mm. Vzhledem k historii a současnému průmyslu v oblasti byly zjištěny v odebraných vzorcích pomocí sekvenční extrakce nadlimitní koncentrace niklu. Sekvenční extrakce byla použita z hlediska odhadu biodostupnosti kovu pro organismy. Použitá extrakční činidla jsou slabší než čini-

dla uvedená pro rozklad nebo vyluhování v legislativě. Pro srovnání jsou v tab. I uvedeny přípustné obsahy Ni v půdách stanovené vyhláškou MŽP č. 13/1994 Sb. Obsahy niklu jsou získány vyluhováním v 2M HNO₃ nebo rozkladem v lučavce královské⁹.

Testy toxicity a jejich provedení

K podrobnému testování toxicity v terestrickém prostředí byly vybrány testy s organismy, které jsou pro tuto matici charakteristické a to jsou testy na konzumentech – s roupicemi *Enchytraeus crypticus* dle ISO 16387 (cit.¹¹) a s chvostokoky *Folsomia candida* dle ČSN ISO 11267 (cit.¹²) a na vyšších rostlinách – salát *Lactuca sativa* dle ISO 11269-1a (cit.¹³).

Standardní testování toxicity obou forem niklu probíhalo v umělé připravené půdě. Ta byla připravena dle OECD 207 (cit.¹⁴) a ISO 11268-2 (cit.¹⁵). Chemické látky čerstvě vpravené do této půdy obvykle vykazují vyšší toxicitu v důsledku stárnutí půdy, než jejich stejná množství v reálných podmínkách. Pro větší přiblížení realitě by bylo vhodné podrobit standardní půdu podobnému procesu stárnutí, jaký probíhá v přirozeném prostředí¹⁶. Z tohoto důvodu byly pro srovnání použity vzorky reálné, v tomto případě byla standardní půda využita jako ředící médium. Parametry standardní půdy a jednotlivých reálných vzorků jsou blíže popsány v následující kapitole v tab. IV. Koncentrační řada práškového niklu a nanoniklu byla volena dle předběžných testů. Do standardní zeminy o slabě kyselém pH byl zaváděn nikl v kovové formě, nikoliv sůl niklu. Z tohoto důvodu byla zvolena poměrně široká koncentrační řada. Pro roupice a chvostokoky byl vybrán koncentrační rozsah 250, 500, 1000, 1500 a 2000 mg kg⁻¹. Vzhledem k tomu, že dosavadní výzkumy ukazují nižší citlivost vyšších rostlin na obsah těžkých kovů oproti ostatním organismům¹⁷, byla v případě salátu zvolena koncentrační řada v širším rozsahu 500, 1000, 2000, 3000 a 4000 mg kg⁻¹. Ve všech testech bylo paralelně testováno kontrolní nasazení s nulovou koncentrací. Roztoky kontaminantu o výše uvedených koncentracích byly těsně před zavedením do standardní půdy po dobu 15 min sonifikovány pro lepší rozptýlení a homogenizování niklu v roztoku. pH jednotlivých roztoků nebylo dále upravováno.

Na reálných vzorcích byly provedeny stejné terestrické testy jako u vzorků uměle kontaminovaných.

Tabulka I

Maximální přípustné hodnoty Ni [mg kg⁻¹] v půdách stanovené vyhláškou MŽP č. 13/1994 Sb (cit.¹⁰)

Nikl	Lehké půdy ^a	Ostatní půdy
Výluh 2 M HNO ₃ ^b	15,0	25,0
Celkový obsah (rozklad lučavkou královskou)	60,0	80,0

^aLehkými půdami se rozumí písčité a hlinitopísčité půdy podle analytické metody prof. Nováka (Komplexní metodika výživy rostlin č. 1/1990, vydaná Ústavem vědeckotechnických informací v zemědělství, Praha)⁹, ^bvýluh roztokem 2M HNO₃ při poměru půdy k vyluhovačce 1:10

Sekvenční extrakce

Vzhledem k tomu, že toxicita kovů nezávisí pouze na jejich celkové koncentraci, ale také na formě, v jaké jsou vázány v horninovém prostředí, byly vzorky z průmyslové a zemědělské oblasti podrobeny speciální analýze. Díky této speciaci lze získat informace o původu, způsobu výskytu, fyzikálně-chemické a biologické dostupnosti, mobility a dopravě kovů v zemině. Mobilita závisí na povrchových vlastnostech částic, na druhu vazeb a jejich pevnosti a na vlastnostech roztoku, který je v kontaktu s pevnou maticí. Ionty kovů obsažené v půdě jsou rozděleny do specifických frakcí, kterými jsou organická hmota, oxidy železa, hliníku a manganu, minerály na bázi oxidů křemíku, uhlíkaty a sulfidy. Jednotlivé specifické frakce lze získat selektivně pomocí příslušné chemikálie¹⁸. Metoda sekvenční extrakce napomáhá odhadnout biodostupné podíly kovů pro organismy¹⁹. Dnes je jednou z nejpoužívanějších sekvenčních extrakcí metoda nazývaná BCR. Ta vznikla v rámci vytváření standardních metodik při programu Standards, Measurement and Testing Program (dříve

BCR) odvozením od Tessierovy metodiky. Z Tessierovy metodiky vychází všechny sekvenční extrakce. Metodika je založena na postupném působení extrakčních činidel se vzrůstající extrakční silou. Původní SEA dle Tessiera a spol. se dělí do pěti základních kroků, ve kterých je vzorek sedimentu nebo půdy o hmotnosti 1 g loužen tak, aby byly získány cílové frakce, které jsou včetně podmínek uvedeny v tab. II (cit.^{18,19}). Sekvenční extrakce BCR je zjednodušená třikroková extrakce. Právě tato extrakce sjednocuje a zjednodušuje odlišné metodické pokusy extrakcí. Extrakční činidla použitá v SEA BCR jsou jedna z nejvhodnějších pro koncovou analytickou kvantifikaci pomocí ICP-MS a ICP-AES. Podmínky a cílové frakce jsou uvedeny v tab. III. Pro sekvenční extrakci byl použit 1 g vzorku průmyslové a zemědělské půdy. Ke vzorku bylo přidáno 40 ml kyseliny octové a suspenze vzorku s činidlem se nechala třepat po dobu 16 h při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby třepání byla suspenze přefiltrována. Filtrační koláč byl sušen při laboratorní teplotě a následně byl kvantitativně převeden do extrakční nádoby společně se 40 ml NH₂OH·HCl. Postup třepání byl opako-

Tabulka II

Metodika sekvenční extrakce dle Tessiera a spol.^{18,19}

Krok	Extrakční činidlo	Podmínky	Popis frakce
1	1 M MgCl ₂	1 h, 25 °C	vyměnitelná frakce
2	1 M CH ₃ COONa pH 5 upraveno pomocí CH ₃ COOH	5 h, 25 °C	frakce vázaná na karbonáty
3	0,04 M NH ₂ OH·HCl ve 25 % CH ₃ COOH (při 96 °C)	6 h, 96 °C	frakce vázaná na oxidy Fe a Mn
4	HNO ₃ /H ₂ O ₂ (při 85 °C), H ₂ O ₂ 30 % poté CH ₃ COONH ₄ ve 20 % HNO ₃	2h, 85 °C 3h, 85 °C 30 min, 25 °C	frakce vázaná na organickou hmotu a sulfidy
5	HClO ₄ /HF (celkový rozklad)	reziduální frakce	reziduální frakce

Tabulka III

Sekvenční extrakce standardizované metodiky BCR (cit.^{18,19})

Krok	Extrakční činidlo	Podmínky	Popis frakce	Cílové fáze
1	0,11 M CH ₃ COOH	16 h, 25 °C	vyměnitelná frakce a frakce vodou rozpustná a kyselinou rozpustná	rozpustné a vyměnitelné kationty, kationty vázané na karbonáty
2	0,5 M NH ₂ OH·HCl, pH 1,5	16 h, 25 °C	redukovatelná frakce	oxidy Fe a Mn
3	30% H ₂ O ₂ / 1 M CH ₃ COONH ₄	H ₂ O ₂ – 1 h, 25 °C H ₂ O ₂ – 1 h, 85 °C 16 h, 25 °C	oxidovatelná frakce	organická hmota a sulfidy
(4) ^a	lučavka královská		reziduální frakce	–

^a Přestože není výluh lučavkou královskou samostatným krokem BCR, doporučuje se provést tento rozklad na vylouženém reziduu a zároveň porovnat výsledek s lučavkovým výluhem provedeným na čerstvém vzorku

ván dle prvního kroku extrakce (16 h, 25 °C), filtrace a sušení. Při třetím kroku extrakce byl suchý vzorek půdy kvantitativně převeden do Petriho misky společně s 10 ml 30% H₂O₂. Po odpaření peroxidu při laboratorní teplotě bylo přidáno dalších 10 ml peroxidu, ten byl odpařen v sušárně při teplotě 85 °C. Po vysušení a vychlazení byl vzorek kvantitativně převeden společně s 50 ml posledního extrakčního činidla CH₃COONH₄ do extrakční nádoby a byl opakován postup třepání dle 1. a 2. kroku extrakce s následnou filtrací. Filtráty získané z jednotlivých kroků extrakce byly analyzovány emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES). Pro potřeby studie je nejdůležitější obsah Ni získaný v prvním kroku extrakce. Cílem prvního kroku je rozpustit karbonátovou frakci, neboť karbonáty ve svých krystalových strukturách mohou obsahovat stopová množství těžkých kovů. Tato fáze je velmi citlivá na změny pH, proto se zde jako extrakční činidla používají slabé kyseliny. Tato frakce může simulovat interakci s dešťovou vodou, která má pH přibližně 5,6. Těžké kovy obsažené v kyselinou rozpustné frakci jsou považovány za snadno a potenciálně biodostupné²⁰.

Statistické hodnocení

Výstupem z testů toxicity jsou hodnoty EC₅₀ s příslušným intervalem spolehlivosti. Hodnota EC₅₀ byla zjištěna využitím nelineární regrese v programu GraphPad Prism 5. Pro podrobnější porovnání uměle kontaminovaných vzorků byly odvozeny hodnoty NOEC a LOEC, které byly získány zpracováním dat pomocí standardní metody ANOVA následované Dunnettovým testem pomocí programu GraphPad InStat. Rozdíly byly statisticky významné, když $P < 0,05$. V případě standardní metody ANOVA se jedná o statistický test, který testuje nulovou hypotézu o shodě středních hodnot pro více výběrů. Dunnettův test patří mezi metody mnohonásobného porovnání, kdy se porovnávají jednotlivé skupiny se skupinou kontrolní.

Tabulka IV

Parametry jednotlivých druhů půdy

Označení půdy	Vodní kapacita půdy [%]	pH	Celkový organický uhlík [%]
Standardní	41,0	6,4	6,2
Průmyslová	46,0	4,7	10,4
Zemědělská	64,0	6,2	11,7

Tabulka V

Obsahy Ni v jednotlivých půdách zjištěné sekvenční extrakcí s ICP-AES v mg kg⁻¹

Frakce BCR	Druhy půd		
	standardní	průmyslová	zemědělská
Rozpustná kyselinami	15,2	162	72,9
Redukovatelná	26,0	68,0	83,5
Oxidovatelná	24,5	114	48,1

Výsledky

Dvě strukturálně odlišné formy niklu byly zaváděny do uměle připravené půdy. Vzorky reálných půd byly odebrány ze dvou odlišných oblastí v Příbrami. Parametry jednotlivých půd včetně standardní půdy jsou uvedeny v tab. IV. Vzorky zemědělské a průmyslové půdy byly podrobeny sekvenční extrakci, která byla prováděna podle upravené metodiky BCR¹⁹. Výsledky extrakce jsou uvedeny v tab. V. Přehled výsledků kontaktních testů je uveden v tab. VI.

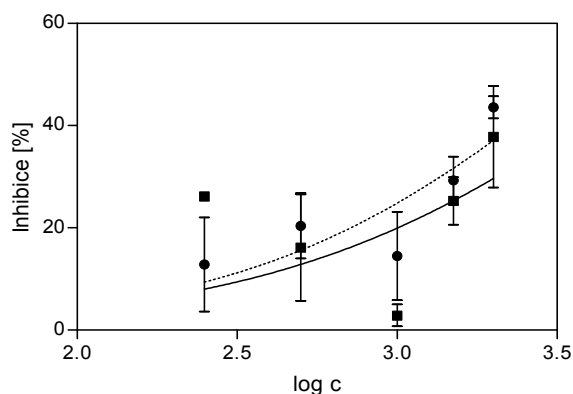
Závislost inhibice reprodukce roupic a chvostoskoků na dekadickém logaritmu koncentrace toxikantu je znázorněna na obr. 1 a 2. Závislost inhibice růstu kořene na dekadickém logaritmu koncentrace toxikantu je zobrazena na obr. 3.

Diskuse

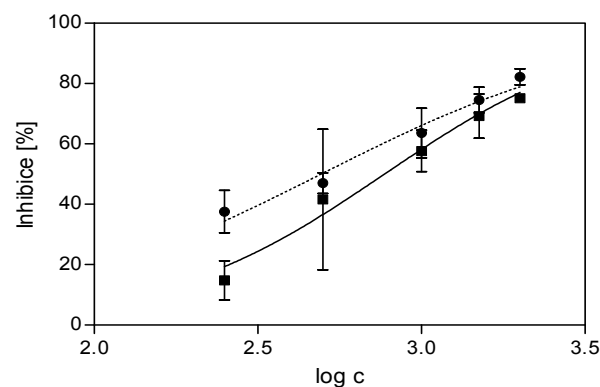
Dle tab. VI je patrné, že v případě roupic a salátu nebylo možné pro práškový nikl a nanonikl s dostatečnou spolehlivostí určit hodnoty EC₅₀. Pro možnost srovnání toxicity byly stanoveny hodnoty NOEC a LOEC. Z obr. 1 a 2 je možné pozorovat mírně vyšší toxické působení práškového niklu (bNi – bulk forma) na reprodukci roupic a chvostoskoků. Rozdíl toxicity práškového niklu a nanoniklu (nNi – nano forma) však není statisticky významný. Vzhledem k rozdílu velikosti částic může být nanonikl adsorbován do struktury kaolinu nebo jílu, nebo může být navázán na organickou hmotu (rašelina). Z tohoto důvodu může být snížena biodostupnost nanoniklu pro organismy²⁰. U roupic jsou patrné rozdíly hlavně ve vyšších koncentracích. Roupice se v tomto testu jeví ve srovnání s chvostoskoky jako odolnější. V případě chvostoskoků byly pozorovány mírné rozdíly inhibic v nižších koncentracích. Zjištěná hodnota EC₅₀ práškového niklu

Tabulka VI
Přehled výsledků terestrických testů

Organismus	Vzorek	EC50 [mg kg ⁻¹]	Interval spolehlivosti 95 %	LOEC [mg kg ⁻¹]	NOEC [mg kg ⁻¹]
<i>Enchytraeus crypticus</i>	nikl	>2000	–	2000	1500
	nanonikl	>2000	–	>2000	>2000
	prům. půda	56,7	31,9–100	–	–
	zem. půda	nejvyšší zjištěná stimulace 64 %			
<i>Folsomia candida</i>	nikl	477	386–633	250	<250
	nanonikl	771	501–1186	500	250
	prům. půda	97,1	74,7–126	–	–
	zem. půda	nejvyšší zjištěná stimulace >100 %			
<i>Lactuca sativa</i>	nikl	>4000	–	2000	1000
	nanonikl	>4000	–	3000	2000
	prům. půda	inhibice <50%		–	–
	zem. půda	nejvyšší zjištěná stimulace 9 %			



Obr. 1. Závislost reprodukce roupic (*Enchytraeus crypticus*) na koncentraci práškového niklu (● bNi) a nanoniklu (■ nNi).



Obr. 2. Závislost reprodukce chvostoskoků (*Folsomia candida*) na koncentraci práškového niklu (● bNi) a nanoniklu (■ nNi).

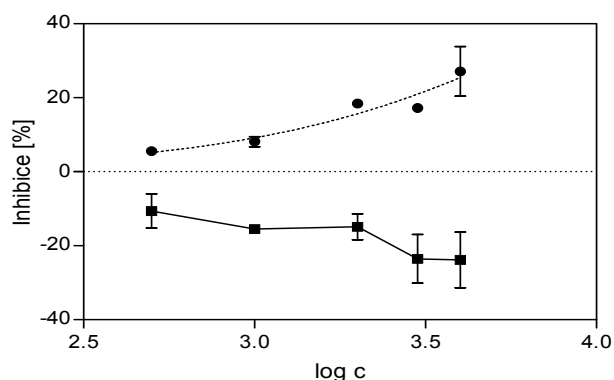
(476 mg kg⁻¹) odpovídá hodnotě uváděné v literatuře²¹ (CI95 % 347–671 mg kg⁻¹).

Vzhledem k tomu, že čeleď *Asteraceae* patří mezi rostliny schopné ve větší míře akumulovat nikl bez negativního vlivu na růst a vývoj, byl použit pro testy širší koncentrační rozsah⁷. I přes použití širokého koncentračního rozsahu nedošlo k překročení 50% inhibice. Přítomnost niklu v koncentraci 4000 mg kg⁻¹ nezpůsobovala ani 30% inhibici a nanonikl vyvolával stimulaci reprodukce a růstu organismů (obr. 3).

Hodnoty LOEC a NOEC byly v případě práškového niklu nižší než pro nanonikl. Tyto výsledky opět potvrzují možnost adsorpce nanoniklu a snížení jeho dostupnosti pro organismy. U dlouhodobých testů může dojít ke stárnutí nanomateriálu nebo jeho transformačním reakcím a tím

i ovlivnění výsledné hodnoty toxicity. Způsob sledování těchto transformačních změn a jejich vlivu na praktické výsledky v průběhu dlouhodobého testování dosud není znám².

Pro přiblížení realitě byly otestovány i vzorky z průmyslové oblasti a zemědělské oblasti. Vzorek průmyslové půdy obsahoval celkově 344 mg kg⁻¹ (tab. V). Toto množství je menší než v literatuře zjištěná hodnota EC50 pro nikl. Přesto byla experimentálně zjištěná hodnota EC50 pro reprodukci roupic a chvostoskoků výrazně nižší pro tuto půdu. V tab. IV jsou uvedeny parametry jednotlivých půd, v případě průmyslové půdy se jedná o velmi kyselou půdu. Nízké pH půdy může vést ke zvýšené mobilitě niklu v půdách a zároveň i ke změně jeho chemické podstaty²².



Obr. 3. Závislost inhibice růstu kořene salátu (*Lactuca sativa*) na koncentraci práškového niklu (● bNi) a nanoniklu (■ nNi).

V kyselých půdách se nikl vyskytuje ve formě Ni^{2+} , NiSO_4 a NiHPO_4 . Dle tabulky V obsahuje průmyslová půda nejvyšší množství biologicky dostupného podílu niklu, který byl získán v prvním kroku SEA. Právě vysoká variabilita přírodních půd může změnit biodostupnost niklu. Nikl může být pak v půdě přítomen v různých modifikacích a ty mohou být pro organismy biodostupnější než v případě kovového niklu. Vysoký obsah Ni může iniciovat vyšší toxické působení na organismy vzhledem k nízkému pH zeminy.

V případě zemědělské půdy byla převážná část Ni získána v druhém kroku SEA. Při pH 5–9 se nikl sorbuje na oxidy železa a manganu nebo tvoří komplexní sloučeniny s anorganickými ligandy, tato skutečnost koresponduje s pH vzorku zemědělské půdy i výsledky SEA. U výše zmíněného vzorku nedošlo k překročení inhibice 50 %, naopak tento vzorek vykazoval ve všech třech případech stimulaci. Celkové množství niklu zjištěné sekvenční extrakcí bylo $204,5 \text{ mg kg}^{-1}$, biodostupný podíl získaný z první frakce této extrakce obsahoval $72,9 \text{ mg kg}^{-1}$ (tab. V). Pokud porovnáme vzorek zemědělské půdy s hodnotami v tab. I, je zjištěný obsah niklu dvojnásobně vyšší i přesto, že v sekvenční extrakci bylo použito slabší extrakční činidlo. pH tohoto vzorku bylo totožné s pH standardní půdy (tab. IV). Ovšem množství celkového organického uhlíku bylo téměř jednou tak vysoké. Projevená stimulace byla v případě salátu nejmenší, ovšem v případě roupic a chvostokoků překračovala 50 %. Takto vysokou stimulaci lze již považovat za nežádoucí účinek.

Závěr

Provedenými testy toxicity bylo zjištěno, že nikl a jeho nanoforma mohou způsobovat odlišné toxické účinky. Z pohledu biologických účinků nelze nikl a nanonikl

považovat za zcela totožná chemická individua. Nižší toxicitu nanoniklu mohlo způsobit pevnější navázání nanoniklu na organickou složku půdy nebo shlukování a transformace nanočástic v půdě. Půdní organismy byly schopné přežít i ve vysokých koncentracích niklu. U roupic a salátu nebyla dosažena 50% inhibice ani v nejvyšších testovaných koncentracích. Nejcitlivěji z půdních organismů reagoval chvostokok *Folsomia candida*, rozdíl toxicity obou forem niklu však nebyl statisticky významný. V případě průmyslové půdy se nejcitlivěji projevily roupace a chvostokoci. Hodnoty EC_{50} byly velmi nízké. Naopak zemědělská půda vyvolala stimulační účinky pro všechny testované organismy. V případě roupic a chvostokoků se jednalo o velmi vysokou stimulaci, kterou lze považovat rovněž z pohledu ekologické rovnováhy za nežádoucí efekt.

Ekotoxikologické testování nanomateriálů je stále ve fázi vývoje. Je zde mnoho oblastí výzkumu (složitá matrice, sledování transformačních změn NM), na které je potřeba se v budoucnosti zaměřit. Ze studie vyplývající skutečnosti naznačují, že pro půdní prostředí jsou limity pro emisi niklu do životního prostředí relevantní i pro jeho nanoformu.

Seznam použitých zkratk

ASTM	American Society for Testing and Materials
BCR	Community Bureau of Reference (European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Belgium)
bNi	bulk-forma niklu
EC_{50}	efektivní koncentrace pro 50 % jedinců
EPA	Environmental Protection Agency
$\text{IC}_{50\%}$	interval spolehlivosti na hladině významnosti 50 %
ICP-AES	atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ISO	International Organization for Standardization
LOEC	nejnižší koncentrace, která už způsobí toxický efekt, (lowest observed concentration)
MŽP	Ministerstvo životního prostředí
NM	nanomateriály
nNi	nanonikl
NOEC	nejvyšší koncentrace toxikantu, která nezpůsobí toxický efekt, (no observed effect concentration)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
SEA	sekvenční extrakční analýza

Práce vznikla s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy v rámci účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (Rozhodnutí č. 21/ 2011) a v rámci grantu MSM 6046137308.

LITERATURA

- Boluda R., Roca-Pérez L., Marimón L.: *Chemosphere* 84, 1 (2011).
- Griffitt R. J., Weil R., Haman K. A., Denslow N. D., Powers K., Taylor D., Barber R. S.: *Environ. Sci. Technol.* 41, 8178 (2007).
- Chen C., Huang D., Liu J.: *Clean* 37, 304 (2009).
- Kafka Z., Punčochářová J.: *Chem. Listy* 96, 611 (2002).
- Appenroth K. J., Krech K., Keresztes Á., Fischer W., Koloczek H.: *Chemosphere* 78, 216 (2010).
- Brouse M., van Gestel C. A. M.: *Chemosphere* 79, 953 (2010).
- Arora S., Rajwade J. M., Paknikar K. M.: *Toxicol. Appl. Pharmacology* 258, 151 (2012).
- Weng L. P., Wolthoorn A., Lexmond T. M., Temminghoff E. J. M., van Riemsdijk W. H., Weng L. P.: *Environ. Sci. Technol.* 38, 156 (2004).
- Ústav vědeckotechnických informací v zemědělství Praha: Komplexní metodika výživy rostlin č. 1/1990.
- Vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 13/1994 Sb. kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu.
- ISO 16387: *Soil quality – Effects of pollutants on Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) – Determination of effects on reproduction and survival* (ISO 2004).
- ČSN ISO 11267: *Kvalita půdy-Inhibice reprodukce chvostoků (Folsomia candida) látkami znečišťujícími půdu*, (ČSN ISO 2010).
- ISO 11269-1a: *Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth* (ISO 1993).
- OECD Guideline: *Earthworm acute toxicity tests* 1984, 207.
- ISO 11268-2: *Soil quality: Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida), Part 2: Determination of effects on reproduction*, (ISO 1998).
- Kočí V., Mocová K.: *Ekotoxikologie pro chemiky*. Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha 2009.
- Wang W.: *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 409 (1987).
- Tessier A., Campbell P. G. C., Bisson M.: *Anal. Chem.* 51, 844 (1979).
- Filgueiras A. V., Lavilla I., Bendicho C.: *JEM* 4, 823 (2002).
- Ettler V.: *Moderní analytické metody v geologii*. VŠCHT Praha, Praha 2008.
- Babich H., Stotzky G.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 3, 82 (1983).
- Lock K., Janssen C.: *Chemosphere* 46, 197 (2002).
- International Programme on Chemical Safety: *Nickel – Environmental Health Criteria 108*. WHO, (IPCS 1991).

H. Palková^a, T. Sovová^a, I. Koníčková^a, V. Kočí^a, V. Bartůněk^b, and Z. Sofer^b (^aDepartment of Environmental Chemistry, ^bDepartment of Inorganic Chemistry, Institute of Chemical Technology Prague): **Application of Nickel and Nanonickel in Terrestrial Environment**

Nanomaterials have been extensively used almost in all sectors of human activities. We used powdery Ni, nanonickel as well as real samples containing Ni for testing and comparison. Toxicities of the first two forms of Ni were tested in three organisms – in worms (*Enchytraeus crypticus*), springtails (*Folsomia candida*) and lettuce seeds (*Lactuca sativa*). The main aim was a comparison of the impacts of the Ni metal in different forms and different particle composition and thus with different features. This study should decide to approach nanomaterials in the same way as their macroscopic equivalents or whether it is appropriate to pay more attention to these chemicals not only in ecotoxicology and environmental impacts.