

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

MODULACE TOXICITY NANOČÁSTIC ŽELEZA NULOVÉ VALENCE

KAROLÍNA PÁDROVÁ, KRISTÝNA BAJEROVÁ
a ALENA ČEJKOVÁ

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 Dejvice
padrovak@vscht.cz

Došlo 10.7.15, přijato 17.9.15.

Klíčová slova: nanočástice železa, toxicita, huminové látky, *Rhodococcus erythropolis*

Úvod

Nanočástice železa nulové valence (nZVI) disponují značným redukčním potenciálem, kterého lze úspěšně využít při remediacích kontaminovaných oblastí¹. Vysoká reaktivita je však zároveň příčinou značné toxicity nZVI a jejich přítomnost v sanovaném prostředí může mít negativní dopad na autochtonní mikroorganismy, jejichž podíl na remedičním procesu je významný². Klíčovým krokem v mechanismu toxického působení nZVI je jejich adsorpce na buněčný povrch vedoucí až k fatálnímu poškození buněčné integrity³. Navíc ve vodném prostředí v přítomnosti rozpuštěného kyslíku se nZVI ochotně oxidují za produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Reakce ROS s buněčnými komponenty pak způsobují další rozsáhlá poškození, která v konečném důsledku mohou vést až k buněčné smrti⁴.

Huminové látky (HL) jsou součástí přirozené organické hmoty zeminy a jejich protektivní účinky jsou známy i z přírody^{5,6,15}. Jejich aplikace jako protektantů je studována také v souvislosti s toxicitou nZVI (cit.^{7,8}). Huminové látky se ochotně váží na povrch buňky a mohou tak působit jako bariéra bránící přímé interakci nanočástice-buňka. V naší práci jsme se zaměřili na vliv vybraných HL na toxicitu nZVI.

Experimentální část

Chemikálie a materiál

Komerčně dostupné nanočástice nulamocného železa (Nanofer 25; Nanoiron s.r.o., Česká republika) s průměrnou velikostí 50 nm jsou distribuované ve formě vodné disperze. Testované huminové látky byly připrave-

ny ze skrývek hnědouhelných lomů České republiky (Výzkumný ústav anorganické chemie, a.s., Ústí nad Labem). Humát sodný (PAB 32) byl izolován z hnědého uhlí a huminové kyseliny SM01A1 a V00A1 z oxyhumolitu různého místa původu⁹. Použitá koncentrace HL 0,3 g l⁻¹ byla zvolena na základě výsledků pilotních experimentů, kdy bylo zjištěno, že tato koncentrace negativně neovlivňuje mikrobiální růst.

Modelový mikroorganismus

Rhodococcus erythropolis (CCM 2595) byl použit jako modelová půdní grampozitivní bakterie. Kultivace probíhala ve dvou fázích. V komplexním médiu (100 ml, živný bujón 8 g l⁻¹) byla produkována biomasa (24 h, 30 °C, 100 rpm), která po separaci (9000 g, 10 min) byla použita jako inokulum 100 ml minerálního média (g l⁻¹): KH₂PO₄ 0,17; K₂HPO₄ 0,13; (NH₄)₂SO₄ 0,71; MgCl₂·6 H₂O 0,34; MnCl₂·4 H₂O 1; CaCl₂·2 H₂O 0,26; FeSO₄·7 H₂O 0,6; Na₂MoO₄·2 H₂O 2 s 10 g l⁻¹ glukosy. Inokulace minerálního média byla provedena, na základě měření optické denzity, na počáteční hodnotu OD_{400nm} = 0,2 ± 0,005 (odpovídá 41·10⁴ ml⁻¹ buněk). Následná kultivace probíhala po dobu 27 h (30 °C, 100 rpm), poté byly buňky opět separovány a vystaveny účinkům Nanofer 25, resp. Nanofer 25 a huminových látek.

Vliv studovaných látek na zachování buněčné viability

Studium účinků HL (0,3 g l⁻¹) a Nanofer 25 (1,5 g l⁻¹) probíhalo v 10 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH 7,0), koncentrace buněk na počátku experimentu odpovídala OD_{400nm} = 0,2 ± 0,005.

Buňky byly vystaveny různým počátečním podmínkám:

1. Expozice buněk současnému působení HL a Nanofer 25
2. Inkubace buněk v prostředí HL (15 min) a následná expozice Nanofer 25.
3. Inkubace Nanofer 25 v prostředí HL (15 min) a následná expozice buněk účinkům takto modifikovaných nanočástic.

Buněčná viabilita byla vyhodnocena na základě stanovení počtu kolonií tvořících jednotky na pevném médiu (živný agar) po 48 h kultivace (30 °C) a vyjádřena jako KTJ ml⁻¹.

Peroxidace lipidů a karbonylace proteinů

Rozsah oxidativního stresu byl stanoven jako hladina produktů oxidace lipidů (malondialdehyd) a proteinů (karbonylované deriváty proteinů). Přítomnost malondialdehydu (MDA), jednoho z hlavních produktů oxidace

mastných kyselin, jsme detegovali spektrofotometrickým stanovením barevného aduktu (532 nm), který vzniká reakcí MDA s kyselinou 2-thiobarbiturovou. Míra lipoperoxidace je vyjádřena v jednotkách TBARS (z angl. thiobarbituric acid reactive substances = látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou)¹⁰.

Karbonylované deriváty jsme určili spektrofotometrickým stanovením produktu (375 nm) vzniklého derivatizací karbonylové skupiny dinitrofenylhydrazinem (dle protokolu OxiSelect™ Protein Carbonyl Spectrophotometric Kit; Cell Biolabs, INC.).

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

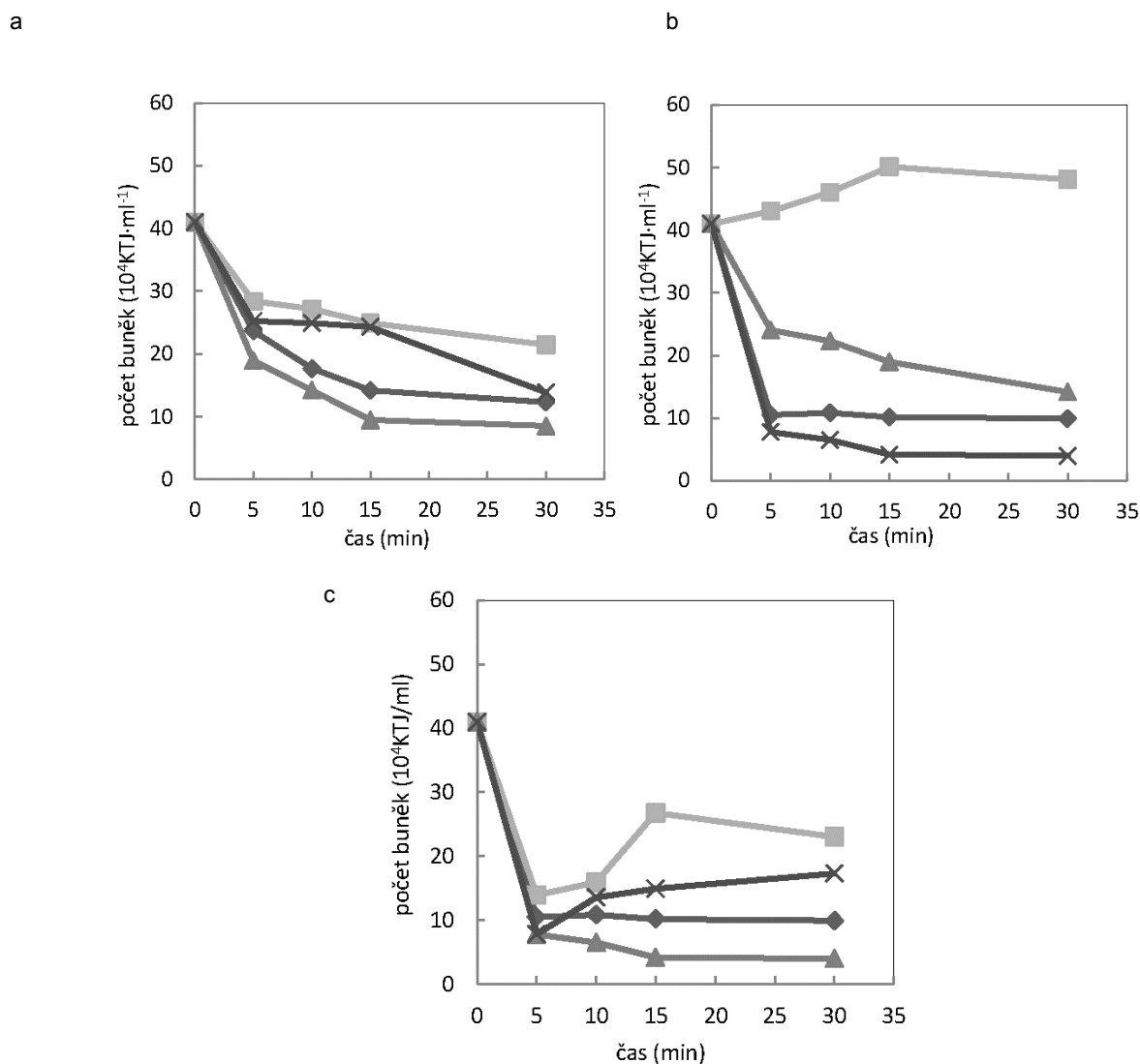
Schopnost HL vázat se na buněčný povrch byla sledována metodou SEM. Buňky byly sledovány po 15 min

inkubace v přítomnosti HL a bez přítomnosti HL. Fixace buněk probíhala v roztoku 4 % glutaraldehydu v kakovylátovém pufru po dobu 4 h (4 °C). Následně byly buňky pomocí ethanolu odvodněny, umístěny na oboustrannou lepicí pásku a pokryty tenkou vrstvou směsi zlata a palladia. Mikroskopické snímky byly pořízeny při 1000násobném zvětšení (skenovací elektronový mikroskop Hitachi S 4700, Japonsko).

Výsledky a diskuse

Toxicita nanočástic a možnosti její modulace

Koncentrace nZVI, která je v průběhu sanačního procesu aplikována do kontaminovaného prostředí, se pohy-

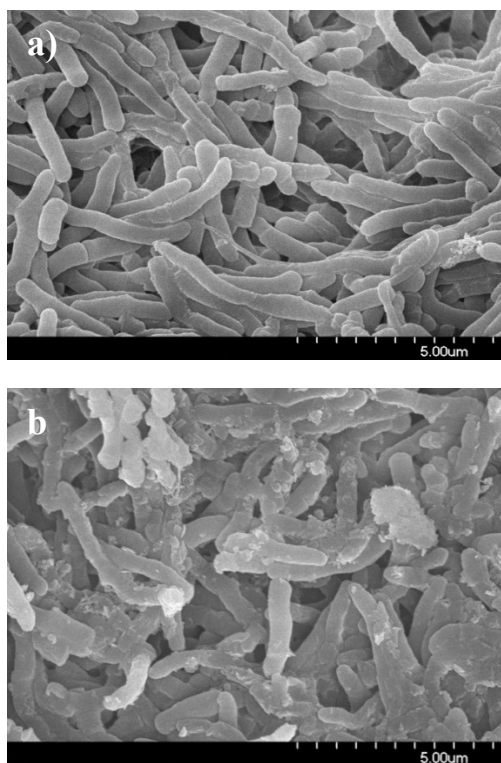


Obr. 1. Modulace toxicity nanoFe vůči *Rhodococcus erythropolis* aplikací huminových látek (HL) V00A1 (a), SM01A1 (b), PAB 32 (c); koncentrace HL 0,3 g l⁻¹; ◆ nanoFe (1 g l⁻¹), ▲ nanoFe (5 g l⁻¹), ■ nanoFe (1 g l⁻¹) + HL, × nanoFe (5 g l⁻¹) + HL

buje v rozmezí 1–10 g l⁻¹. Takto vysoké koncentrace jsou však pro většinu původních mikroorganismů letální¹¹. Toxické účinky nZVI byly popsány např. u *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* nebo *Bacillus subtilis*^{3,8,12}. Námí naměřené testy viability rovněž dokládají vysokou toxicitu tohoto typu nanočástic. Po 15 min expozice buněk *R. erythropolis* účinkům Nanofer 25 (1 g l⁻¹) byl zaznamenán výrazný pokles počtu životaschopných buněk, o 70 až 77 % (obr. 1, 3).

Schopnost studovaných huminových látek vázat se na buněčný povrch, kde by mohly působit jako bariéra bránící interakci nanočástice-buňka, dokládají fotografie pořízené skenovací elektronovou mikroskopií (obr. 2b). Po 15 min inkubace *R. erythropolis* v prostředí humátu sodného PAB 32 je na buněčném povrchu patrná souvislá vrstva této látky.

Testy viability zaměřené na schopnost modulace toxicity Nanofer 25 odhalily odlišný účinek jednotlivých huminových látek na zachování viability *R. erythropolis*. Nejnižší protektivní účinek prokázal vzorek humátu sodného (obr. 1c). Odlišnou schopnost ovlivnit toxicitu Nanofer 25 jsme pozorovali u huminových kyselin V00A1 a SM01A1, které byly získány z oxidovaných forem huminových látek – oxyhumolitů, různého původu. U obou látek byl sice zachován téměř stejný poměr O/C a H/C, ale prvkové zastoupení anorganického podílu bylo zcela odliš-



Obr. 2. SEM *Rhodococcus erythropolis* (a) po 15 min (b) inkubaci v prostředí humátu sodného PAB 32 (0,3 g l⁻¹)

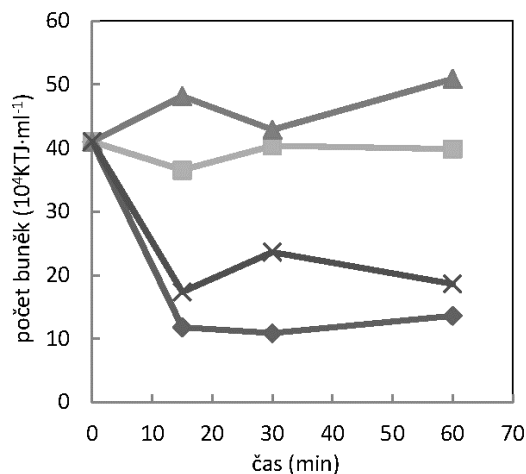
né. Mechanismus modulace (redukce) toxicity nZVI aplikací HL tak není dán pouze vznikem aditivní vrstvy na povrchu buněk, ale do značné míry jejím kvalitativním složením.

Nejvýraznější protektivní charakter prokázala huminová kyselina SM01A1 (obr. 1b). Během trvání experimentu (30 min), za podmínek současného působení Nanofer 25 (1 g l⁻¹) a této HL (0,3 g l⁻¹), nebyl pozorován žádný pokles počtu životaschopných buněk. Z dat je patrné, že protektivita HL vůči nZVI závisí i na použité koncentraci nanočástic. Huminová kyselina SM01A1 v případě vyšší koncentrace Nanofer 25 (5 g l⁻¹) toxické působení nanočástic jen zmírnila, ale po 30 min působení klesl počet životaschopných buněk o 90 %.

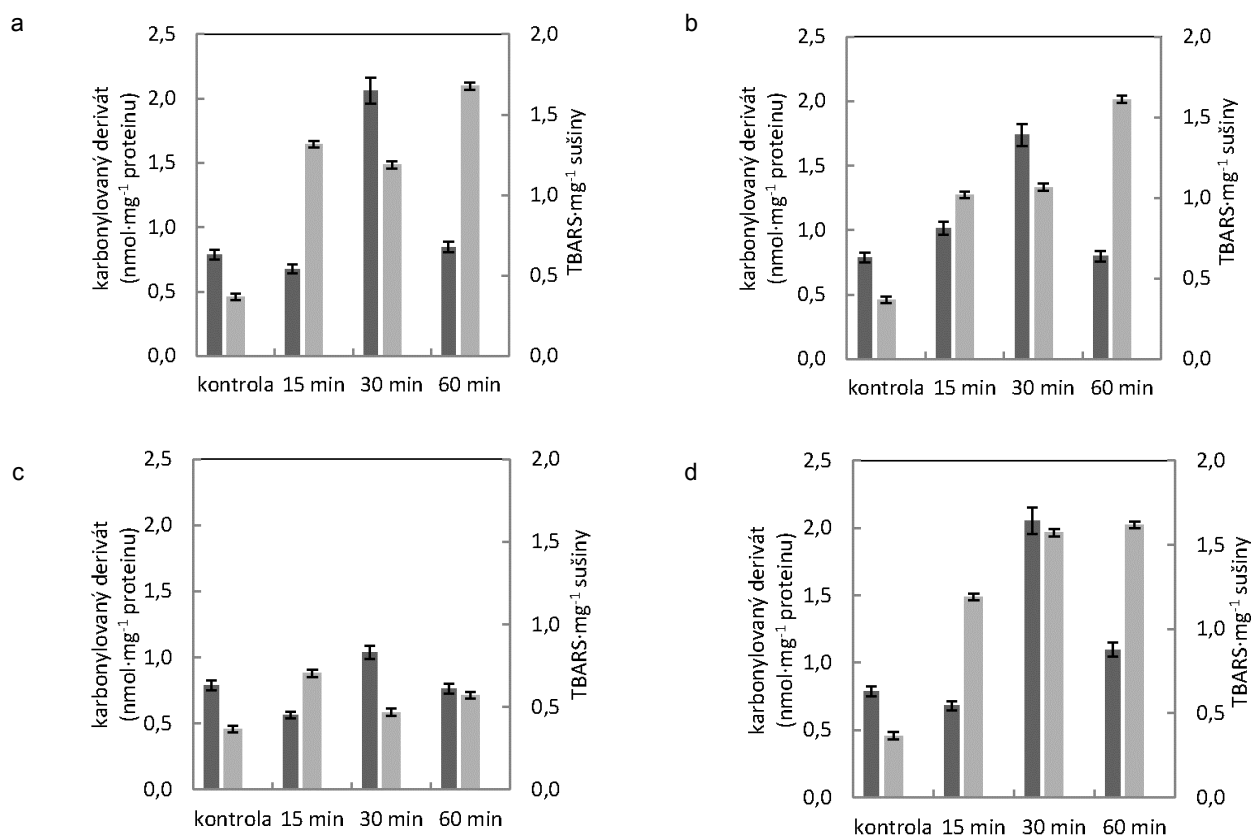
Naše výsledky dále dokazují, že významný vliv na modulaci toxicity nZVI má také pořadí, ve kterém jsou buňky vystaveny účinkům huminových látek a nanočásticím (obr. 3). Z naměřených dat je zřejmé, že reprodukční aktivita nebyla výrazně ovlivněna u buněk vystavených simultánnímu působení Nanofer 25 (1 g l⁻¹) a SM01A1 (0,3 g l⁻¹). Nejvýraznější protekce buněk je dosaženo v případě, kdy interakce s huminovou kyselinou předchází působení Nanofer 25. Po 60 min byl v tomto případě pozorován dokonce nárůst KTJ o 24,5 %. Naopak toxické účinky Nanofer 25 (1 g l⁻¹) se nijak nezmění, pokud před interakcí s buňkami byly nanočástice pre-inkubovány s huminovou kyselinou (SM01A1). Tyto poznatky se shodují s Chen a spol.⁸, kteří sledovali vliv huminových látek na účinnost redukční dehalogenace trichlorethylenu pomocí nZVI.

Oxidativní stres

V důsledku expozice buněk *R. erythropolis* nZVI jsme pozorovali značné oxidativní poškození proteinů



Obr. 3. Vliv uspořádání experimentu na omezení toxických účinků Nanofer 25 (1 g l⁻¹); HL – huminová kyselina SM01A1 (0,3 g l⁻¹); ◆ nano Fe, ■ současné působení nanoFe + HL, ▲ preinkubace buněk HL, × preinkubace nanoFe HL



Obr. 4. Porovnání míry karbonylace proteinů ■ a peroxidace lipidů ■ *R. erythropolis* v čase po a) vystavení účinkům nanoFe 25 (1 g l^{-1}), b) současném působení nanoFe 25 (1 g l^{-1}) a HL, c) preinkubaci buněk s HL a následné expozici nanoFe 25 (1 g l^{-1}), d) expozici preinkubovaným nanoFe 25 (1 g l^{-1}) s HL; HL – huminová kyselina SM01A1 ($0,3 \text{ g l}^{-1}$)

a lipidů (obr. 4a). Po 30 min působení Nanofer 25 (1 g l^{-1}) došlo k výraznému nárůstu hladiny karbonylovaných proteinů, oproti kontrolní populaci (z $0,79$ na $1,99 \text{ nmol mg}^{-1}$ proteinu). Množství TBARS bylo zvýšeno z $0,4$ na $1,7 \text{ TBARS mg}^{-1}$ sušiny.

Výrazné navýšení TBARS po expozici nanočásticím železa (50 mg l^{-1}) popsali Li a spol.¹³ u embryí *Oryzias latipes*. Oxidaci ROS podléhají především nenasycené mastné kyseliny, jejichž vysoká koncentrace je vázána v lipidických složkách buněčné membrány. Při interakci buněk s nanočásticemi tak dochází k primárnímu poškození především buněčných membrán, což má za následek porušení funkce membrány, v extrémních případech až ztrátě buněčné integrity a buněčné smrti^{4,14}.

V případě oxidativního poškození se prokázalo, že pre-inkubace buněk (obr. 4c) s huminovou kyselinou SM01A1 před vlastní expozicí Nanofer 25 (1 g l^{-1}) je nejúčinnější varianta jejich ochrany (obr. 4c). Nárůst úrovně karbonylace proteinů byl, v porovnání s kontrolní populací, pouze o $0,2 \text{ nmol mg}^{-1}$ proteinu. Podobný trend jsme pozorovali i ve vývoji TBARS, o $0,3 \text{ TBARS mg}^{-1}$ sušiny. Simultánní působení (obr. 4b) huminové kyseliny SM01A1 a Nanofer 25 mělo za následek pouze mírné

snížení rozsahu oxidativního stresu. Souhrnně lze říci, že pre-inkubace buněk s huminovou kyselinou SM01A1 má pozitivní vliv nejen na snížení oxidativního poškození, ale v konečném důsledku také na zvýšení reprodukční aktivity populace *R. erythropolis* (obr. 3).

Závěr

Aplikaci vhodných huminových látek lze modulovat toxicitu nanočástic železa nulové valence. Základem je tvorba aditivní vrstvy na povrchu buněk jako fyzické bariéry bránící interakcím nanočástic s buňkou. Podrobný mechanismus však zatím nebyl zcela objasněn. Je zřejmé, že významný vliv na protektivní charakter HL má rovněž chemické složení molekuly. Z námi studovaných HL prokázala schopnost zcela omezit toxicitu nanočástic vůči bakterii *R. erythropolis* pouze huminová kyselina SM01A1.

LITERATURA

1. Li X. Q., Elliott D. W., Zhang W. X.: *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* 31, 111 (2006).
2. Tilston E. L., Collins C. D., Mitchell G. R., Princivalle J., Shaw L. J.: *Environ. Pollut.* 173, 38 (2013).
3. Lee C., Kim J. Y., Lee W. L., Nelson K. L., Yoon J., Sedlak D. L.: *Environ. Sci. Technol.* 42, 4927 (2008).
4. Ševců A., El-Temsah Y. S., Joner E. J., Černík M.: *Microbes. Environ.* 26, 271 (2011).
5. Kudryasheva N. S., Tarasova A. S.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 155 (2015).
6. Kulikova N., Stepanova E., Koroleva O., v knize: *Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice* (Perminova I., Hatfield K., Hertkorn N., ed.), Mitigating activity of humic substances: direct influence on biota. Springer, Amsterdam 2005.
7. Li Z., Greden K., Alvarez P. J. J., Gregory K. B., Lowry G. V.: *Environ. Sci. Technol.* 44, 3462 (2010).
8. Chen J., Xiu Z., Lowry G. V., Alvarez P. J.: *Water Res.* 45, 1995 (2011).
9. Novák J., Kozler J., Janoš P., Čežíková J., Tokarová V., Madronová L.: *React. Funct. Polym.* 47, 101 (2001).
10. Gajewska E., Sklodowska M.: *Biometals* 20, 27 (2007).
11. Grieger K. D., Fjordboge A., Hartmann N. B., Eriksson E., Bjerg P. L., Baun A.: *J. Contam. Hydrol.* 118, 165 (2010).
12. Diao M., Yao M.: *Water Res.* 43, 5243 (2009).
13. Li H., Zhou Q., Wu Y., Fu J., Wang T., Jiang G.: *Eco-toxicol. Environ. Saf.* 72, 684 (2009).
14. Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 668 (2005).
15. T. Cyrusová, R. Podlipná, T. Vaněk: *Chem. Listy* 109, 276 (2015).

K. Pádrová, K. Bajarová, and A. Čejková
(*Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Modulation of the Toxicity of Zero-valent Iron Nanoparticles**

Zero-valent iron nanoparticles (nZVI) are used in remediation technologies. However, their high reactivity is responsible for the nZVI toxicity against autochthonal microorganisms whose participation on a remediation process is important. The aim of this study was to investigate the application of humic substances as a potential protective agent. The activity of nZVI and protective effect of humic substances were studied on gram-positive soil bacteria *Rhodococcus erythropolis* (CCM 2595). The effectiveness of the humic substances under study was evaluated by the measurement of the cell viability and by tests characterizing the oxidative stress, lipid peroxidation and protein carbonylation.