

Trabajo Fin de Máster

IMPLICACIONES DE NANOMATERIALES NATURALES EN PROCESOS DE CONTAMINACIÓN

Autor/es

Rubén Moreno González

Director/es

María Teresa Gómez Cotín
Juan Ramón Castillo Suárez

Facultad de Ciencias
2015

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. NANOPARTÍCULAS DE ORIGEN NATURAL	6
3. NANOPARTÍCULAS DE ORIGEN BIOLÓGICO	8
4. INTERACCIONES BIOFISICOQUÍMICAS EN LA INTERFASE NANO-BIO	20
5. UNA BREVE APROXIMACION A LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS DE CARACTERIZACIÓN Y DETECCIÓN DE NANOPARTICULAS	27
6. CONCLUSIONES	31
7. REFERENCIAS	31

1. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes se definen como “*contaminantes sintéticos o de origen natural previamente desconocidos o no reconocidos como tales cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva ni llevan asociado un control, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma*”. El concepto de “emergente” es algo difuso dependiente tanto de la perspectiva como del tiempo en el que se hace (Field et al., 2006). La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan persistir en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar con su introducción continua en el medio ambiente debido a su alta producción mundial. Para la mayoría de estos contaminantes emergentes, la incidencia, la contribución de riesgo y los datos ecotoxicológicos no están disponibles por lo que es difícil predecir qué efectos sobre la salud pueden tener en seres humanos y organismos acuáticos (Barceló, 2003a, b). Estos contaminantes son un grupo variado de compuestos químicos que se encuentran entre otros en productos de consumo e industriales los cuales no están regulados ni monitorizados y cuya presencia en el medio ambiente viene siendo constatada desde hace años a niveles traza sobre todo en aguas residuales, medio ambiente acuático y aguas de consumo. Conforme pasa el tiempo surgen nuevos contaminantes emergentes, actualmente este grupo incluye compuestos biológicamente activos como fármacos, productos de higiene personal, productos de consumo doméstico o de origen agrícola e industrial, nanomateriales (NMs) (Chow, 2005; Colvin, 2003; Klaine et al., 2008; Navarro et al., 2008; Nel et al., 2006, 2013), plásticos (Cózar et al., 2014; Wright et al., 2013) y recientemente se están incluyendo con vista al futuro cercano los líquidos iónicos y priones (Richardson y Ternes, 2014) junto con los metabolitos y productos de transformación que de todos ellos se deriven.

Los recientes avances en nanotecnología y el correspondiente aumento del uso de nanomateriales y nanopartículas (NPs) en casi todos los sectores de la sociedad han suscitado grandes incertidumbres y preocupación sobre el impacto de estos sobre el medio ambiente. El impacto de la contaminación puede ser especialmente relevante en sistemas costeros, donde se concentra una parte significativa de la actividad humana y donde van a parar la mayoría de contaminantes conocidos. Como consecuencia de las actividades antropogénicas acceden al medio ambiente y finalmente al medio marino: metales traza (minería y aplicaciones diversas), plaguicidas (agricultura, industria, aplicaciones forestales, urbanas o domésticas), aceites e hidrocarburos (vertidos directos y/o resultado

de la combustión de combustibles fósiles o materia orgánica), detergentes de uso doméstico e industrial, productos farmacéuticos (salud humana y aplicaciones veterinarias), productos de cuidado e higiene personal (cosmética, higiene, etc.), polímeros y materiales ignífugos, etc. Las NPs de origen natural (polvo atmosférico, aerosoles marinos, compuestos carbonaceos...) también se consideran contaminantes emergentes efectos toxicológicos desde un punto de vista clínico, químico, biológico, etc.

Hacia el año 2008 se estimaba que en el año 2015 el peso económico de la nanotecnología supondría unos 2,2 billones de euros (Lux Research, 2008 y en libro de Kent), y en el 2017 las ventas de productos nanotecnológicos alcance los 48.900 millones de dólares (www.bccresearch.com/report). A día de hoy algunos se cuestionan estas cifras y van más allá exponiendo que no hay ni habrá una industria nanotecnológica (www.azonano.com; www.cientifica.com/the-first-and-last-nanotech-conference/). Mientras que hace unos años los compuestos derivados del carbón eran los nanomateriales más usados a día de hoy (Figura 1) según el inventario de productos de consumo nanotecnológicos (CPI) existen 1.814 productos de consumo de 622 compañías en 32 países.

Aluminum oxide	Gold	Nickel
Boron	Graphene	Organics
Calcium	Graphite	Palladium
Carbon	Iodine	Platinum
Carbon nanotube	Iridium	Polymer
Carnauba wax	Iron	Retinol
Ceramics	Lead	Silicon
Cerium oxide	Liposome	Silver
Chromium	Lithium	Titanium
Clay	Magnesium	Tungsten disulfide
Cobalt	Manganese	Zeolite
Copper	Nano micelles	Zinc oxide
Fullerene	Nanocellulose	Zirconia

Figura 1. Nanomateriales incluidos en el CPI.

Los productos de salud y bienestar abarcan la mayoría de productos (42% de total) siendo la plata el material más empleado (24%). Sin embargo el 49% de los productos no concretan información acerca de la composición del nanomaterial empleado (Vance et al., 2015) (Figura 2). Además un alto porcentaje de los productos anteriores (71%) y de productos analizados en Singapur (Zhang et al., 2015) recientemente, no muestran la suficiente información que se están empleando nanomateriales en esos productos con el

consiguiente peligro que puede suponer un mal uso de estos, como puede suceder con cremas solares y su ingesta (Moos et al., 2010).

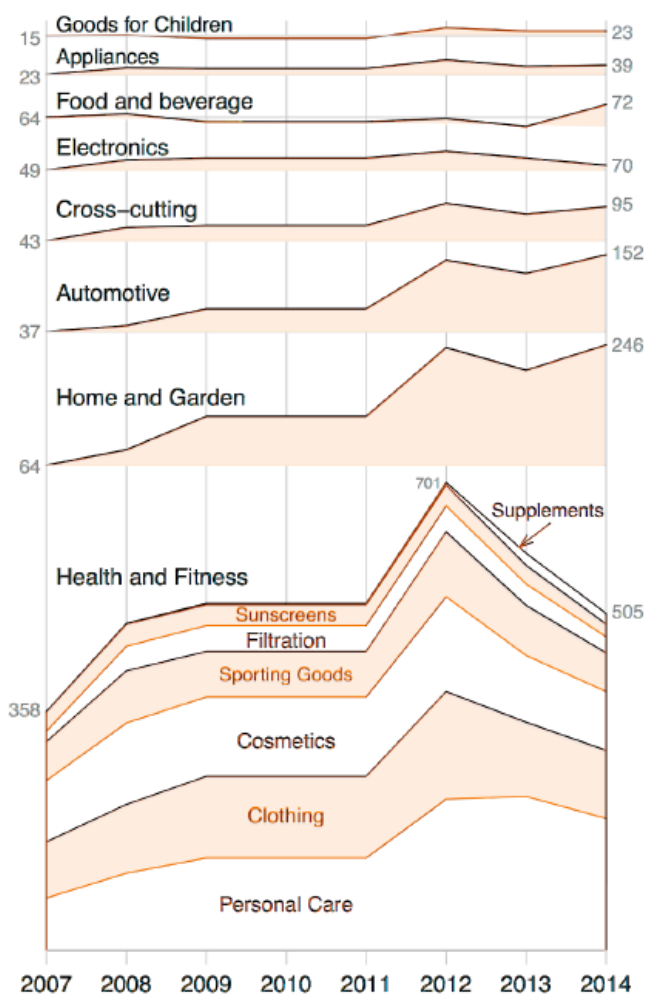


Figura 2. Productos disponibles que contienen nanomateriales desde 2007 (Vance et al, 2015).

Actualmente existen cientos de NPs/NMs en uso o en desarrollo que pueden ser clasificados de diferentes maneras; según su química, origen, morfología y estado y situación en un producto (Lead y Valsami Jones, 2014) (Figura 3).

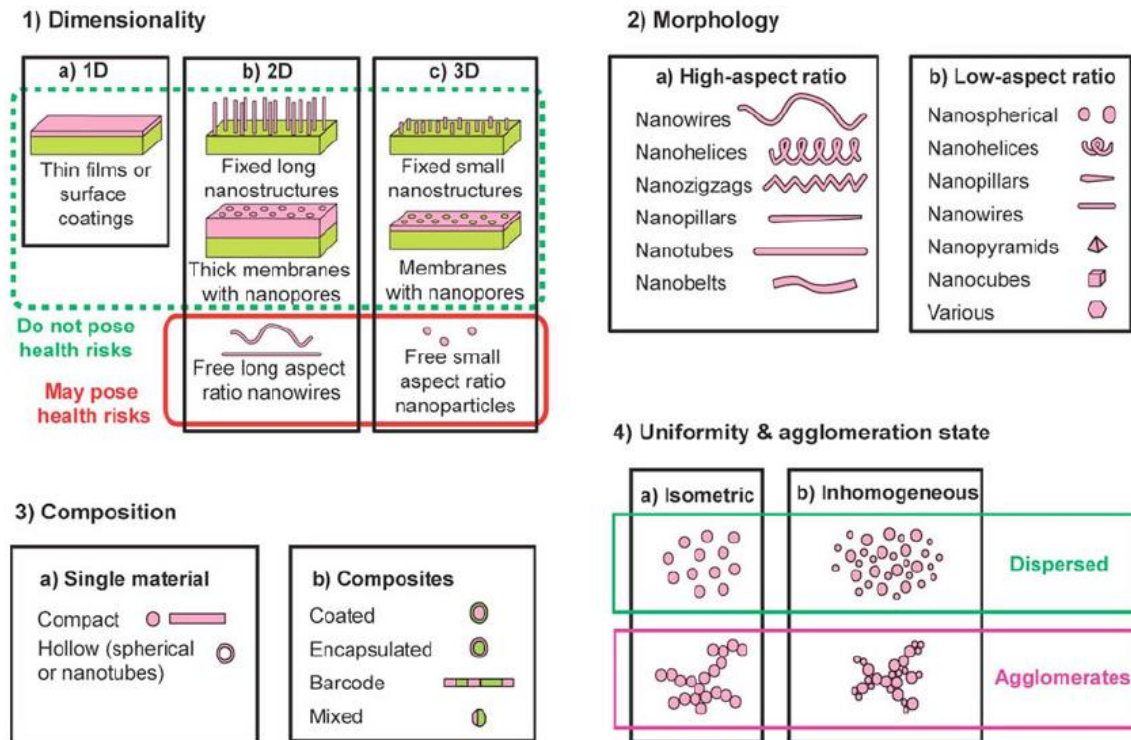


Figura 3. Clasificación de nanomateriales según su dimensión (1), morfología (2), composición (3), uniformidad y estado de agregación/aglomeración (4) (Buzea et al., 2007).

Las NPs de origen natural son más abundantes (p.ej. millones de toneladas en polvo atmosférico en un año) y son bastante más heterogéneas en tamaño que las NPs artificiales. A grandes rasgos existen dos vías de acceso de las NPs artificiales al medio ambiente. Una es intencionada como las medicinas, agentes de diagnóstico médico, cosméticos, aditivos y envases alimentarios (Serpone et al., 2007; Chaudhry et al., 2008; Thomas et al., 2009) y la otra vía es accidental como incendios forestales, erupciones volcánicas, creadas por organismos, cristales naturales, exposición laboral, uso erróneo de un producto, remediaciones, aguas residuales, incineraciones o transporte (Farré et al., 2011; Rana y Kalaichelvan, 2013). Según Matranga y Corsi (2012) para el caso de las principales fuentes de NPs artificiales hacia el medio acuático proponen tres vías:

a. Productos de cuidado personal, cosméticos y cremas solares (p. ej. NPs de ZnO y TiO₂ a modo de filtros UV en cremas solares)

b. Aguas residuales, aunque hay poca información acerca de cómo interaccionan las NPs en los procesos de depuración de aguas o si las NPs son eliminadas en tales procesos.

c. Aplicaciones *antifouling* en pinturas para prevenir la adhesión y el crecimiento de organismos acuáticos sobre los cascos de los barcos.

Debido a la elevada concentración de electrolitos en el medio marino y estuarios, las NPs diseñadas basadas en metales (quantum dots, NPs de Ag, de Au...) u óxidos metálicos (Ag_2O , TiO_2 , CeO_2 ...) es poco probable que permanezcan con sus tamaños nanométricos debido a la complejación con iones del medio (Ag^+ con Cl^-), agregación tanto por mecanismos de hetero y homo agregación o mediante interacción con materia orgánica natural con iones divalentes dando lugar a agregados de gran tamaño (micras), las cuales se depositaran en el fondo marino (Nabiul Afrooz et al., 2013; Baker et al., 2013). Algunos estudios han mostrado toxicidad en plancton marino de NPs de TiO_2 y ZnO_2 , aunque asociada a la formación de radicales OH^\bullet y a la liberación de iones Zn^{2+} y su internalización por parte de las segundas (Miller et al., 2010; Miller et al., 2012).

Para el caso de contaminantes clásicos (hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas, bifenilos policlorados, metales traza...) la incorporación de los contaminantes al medio marino puede producirse a través de fuentes puntuales y difusas. Una fuente puntual es aquella en la que existe un punto específico de descarga de contaminantes, como los vertidos urbanos, los vertidos industriales, navegación, los vertederos de residuos tóxicos y peligrosos, malas prácticas agrícolas, rebosados de alcantarillas y los vertederos industriales (Walsh, 1978, Mason, 2003). Este tipo de fuente ha sido la principal vía de entrada de plaguicidas en ríos de Alemania (Reichenberger, 2005). Las fuentes difusas son aquellas a las que no se les puede derivar de una fuente en concreto, en éstas se encuentran las escorrentías superficiales, erosión, aplicaciones en cultivos, las aguas subterráneas, la deposición atmosférica, etc. (Walsh, 1978; Reichenberger, 2005).

Este trabajo pretende poner la atención sobre el papel que pueden tener las NPs naturales, y en concreto las biológicas, sobre la contaminación en el medio marino o como primer eslabón de la contaminación marina.

2. NANOPARTÍCULAS DE ORIGEN NATURAL

Las nanopartículas naturales están presentes desde hace millones de años (Lippert y Zachos, 2007) se encuentran tanto en suelos, aire, agua (superficiales y subterráneas) y proceden de una actividad química natural o biológica. Ejemplos de NPs naturales son los filosilicatos, óxidos de metales, sustancias húmicas, alófanos e imogolita en suelos volcánicos, emisiones volcánicas, NPs derivadas de incendios forestales, o aerosoles marinos. La posible toxicidad de estas NPs viene dada tanto por los efectos que ellas mismas puedan ejercer sobre los organismos (problemas respiratorios y oculares) así como los posibles entes que puedan transportar como bacterias, hongos, virus y contaminantes químicos (Buzea et al., 2007). Las herramientas de análisis a día de hoy no sean capaces de distinguir nanopartículas naturales de nanopartículas artificiales por el hombre a bajas concentraciones en matrices medioambientales complejas (Nowack et al., 2015; Laborda et al., 2015). Para solventar este problema se emplean diferentes aproximaciones, empleo de ratios de elementos (Von der kammer et al., 2012), acoplando técnicas o por separado, en los casos que sea posible, para dilucidar el origen de las nanopartículas (Laborda et al., 2015) o bien empleando técnicas de modelado junto con técnicas analíticas; en donde las primeras proporcionan una estimación sobre la presencia de determinadas Nps artificiales y las segundas proporcionan la caracterización física de estas dando lugar a la concentración total del nanomaterial (Nowack et al., 2015). Debido a que las NPs son especies sólidas la información cuantitativa que puede requerirse de ellas puede ser en concentración en masa, molar o en número. Por otro lado la información cualitativa no solo consiste en la detección de la NP sino que también se demanda información química (composición del núcleo y del recubrimiento; si lo hay) y caracterización física (tamaño, forma, estado de agregación/aglomeración...). Además las NPs pueden estar disueltas o embebidas en una matriz sólida y pueden liberar iones o NPs libres por lo que también estas especies han de considerarse. La necesidad de toda esta información resulta ligada a la presencia, destino y toxicidad de las NPs.

En muestras ambientales suelen estar presentes tanto NPs naturales como artificiales, lo que supone todo un reto discernir unas de otras (Figura 4). Los métodos de marcaje (marcaje de fluorescencia, radiomarcaje, marcaje con isótopos estables) se suelen emplear para diferenciar NPs artificiales deliberadamente añadidas a una muestra ambiental. Pero al tratar con muestras reales los problemas surgen tanto con técnicas que no diferencian la naturaleza de las NPs como el DLS, pero también con técnicas que detectan NPs

compuestas de elementos específicos como la ICP-MS trabajando en modo *single particle* como acoplada a una técnica de separación en continuo o mediante el empleo de técnicas electroquímicas o sensores químicos. Por ejemplo, Von der Kammer et al, (2012) basándose en el principio por el cual las NPs naturales contienen cantidades significativas de elementos no presentes en la artificiales, propusieron el empleo de las ratios entre elementos. Por ejemplo los ratios Ti/Al y Ce/La para la identificación de TiO_2 y CeO_2 en materiales *bulk*, aunque supeditados a su combinación con AF4-ICP-MS y SP-ICP-MS. En cualquier, caso estas técnicas solo proporcionan evidencia de la presencia de uno o más elementos asociados a las NPs y no la naturaleza exacta de tales NPs.

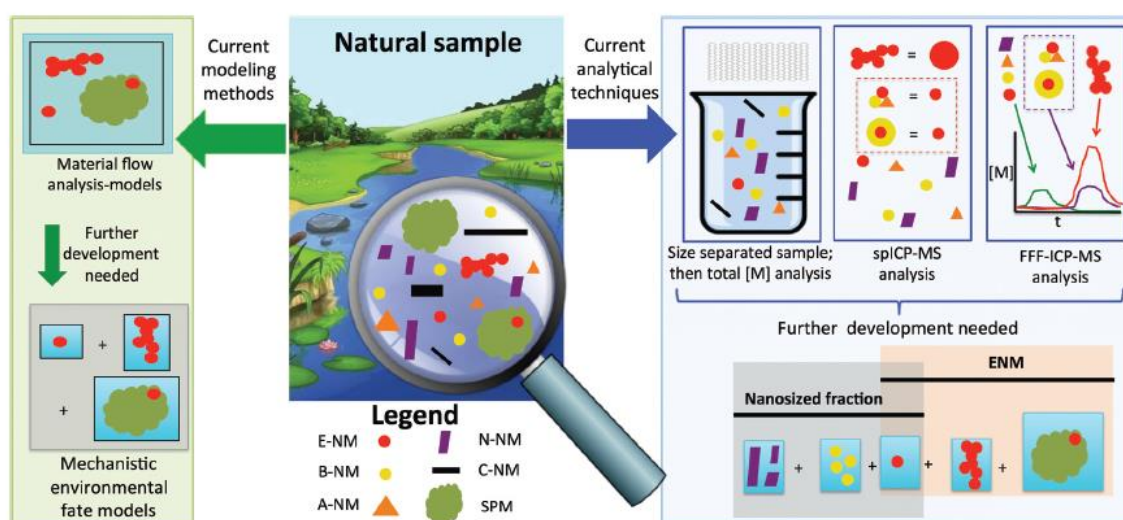


Figura 4. Esquema representando la complejidad existente a la hora de diferenciar NPs naturales de Nps artificiales y puesta en juego de técnicas analíticas junto a modelaje medioambiental (Nowack et al., 2015).

Una nanopartícula biológica natural consiste en un conjunto de moléculas o átomos sintetizados en un sistema biológico con al menos una dimensión en el rango 1-100 nm. Estas partículas incluyen estructuras intracelulares como los magnetosomas y ensamblajes extracelulares como lipoproteínas y virus (Stanley, 2014). Sus funciones son diversas entre la que se encuentran el almacenamiento de minerales, comunicación intercelular, propagación de material genético, regular el ciclo biogeoquímico, regular el ciclo de nutrientes, actuar como agentes de organomineralización, influir en la muerte del plancton, interactuar con el cambio climático o influir en la contaminación marina (Wilhelm y Suttle, 2000; Bratbak y Haldal, 2000; Rohwer y Thurber, 2009; Brussaard et al., 2008; Danovaro

et al., 2002, 2008, 2011; Suttle, 1994, 2000, 2005, 2007; Sandaa, 2008; Breitbart, 2012; Jover et al., 2014; Pacton et al., 2014; Stanley, 2014; Weitz et al., 2014). Pese a la ubicuidad y la importancia en los procesos naturales que desempeñan los virus acuáticos y en concreto el virioplancton, nuestro entendimiento sobre su papel en el océano es limitado y aún más en sistemas de agua dulce debido en parte a la inconsistencia metodológica (Liang et al., 2014; Danovaro et al., 2005; Middelboe et al., 2008b). Debido a las particularidades de estas NPs las técnicas para su caracterización suelen tener el fin de su identificación como virus o como subpoblaciones de ellos, en donde se emplean técnicas de ensayos en placa, anticuerpos, la técnica de dilución extinción en presencia del huésped adecuado o marcadores moleculares (Brusaard et al., 2010). Para eludir las dificultades que los métodos de cultivo presentan se emplean técnicas moleculares (p. ej. electroforesis en gel de campo pulsado, electroforesis en gel desnaturizante en gradiente...) las cuales dieron lugar al nacimiento de la ecología microbiana molecular proporcionando una huella de la riqueza y la dinámica de las comunidades acuáticas de los virus (Sandaa et al., 2010). En cuanto a su conteo tres técnicas son las que predominan: microscopía electrónica de transmisión (TEM) microscopía de epifluorescencia (EFM) y citometría de flujo (FCM). Pese a que los datos obtenidos por estos métodos pueden estar positivamente correlacionados, los resultados no pueden compararse entre unas técnicas y otras (p. ej. EFM suele dar valores más altos que TEM). Incluso dentro de la misma técnica el empleo de diferentes protocolos lleva a discrepancias en la precisión de los resultados (Liang et al., 2014).

3. NANOPARTÍCULAS DE ORIGEN BIOLÓGICO

Exosomas

Bajo este nombre se han agrupado otros como vesículas de membrana, vesículas de membrana externas, vesículas bacterianas...las cuales son liberadas desde bacterias, microbios eucariotas como hongos y parásitos, arquea, y plancton (Figura 5). Fueron descritos por primera vez en 1980 como nanovesículas expulsadas mediante exocitosis (Johnstone et al., 1987). Se caracterizan por tener una doble membrana lipídica externa compuesta por un alto porcentaje de colesterol y esfingolípidos en cuyo interior alojan una gran cantidad de proteínas y ácidos nucleicos y presentan un tamaño entre 50-169 nm.

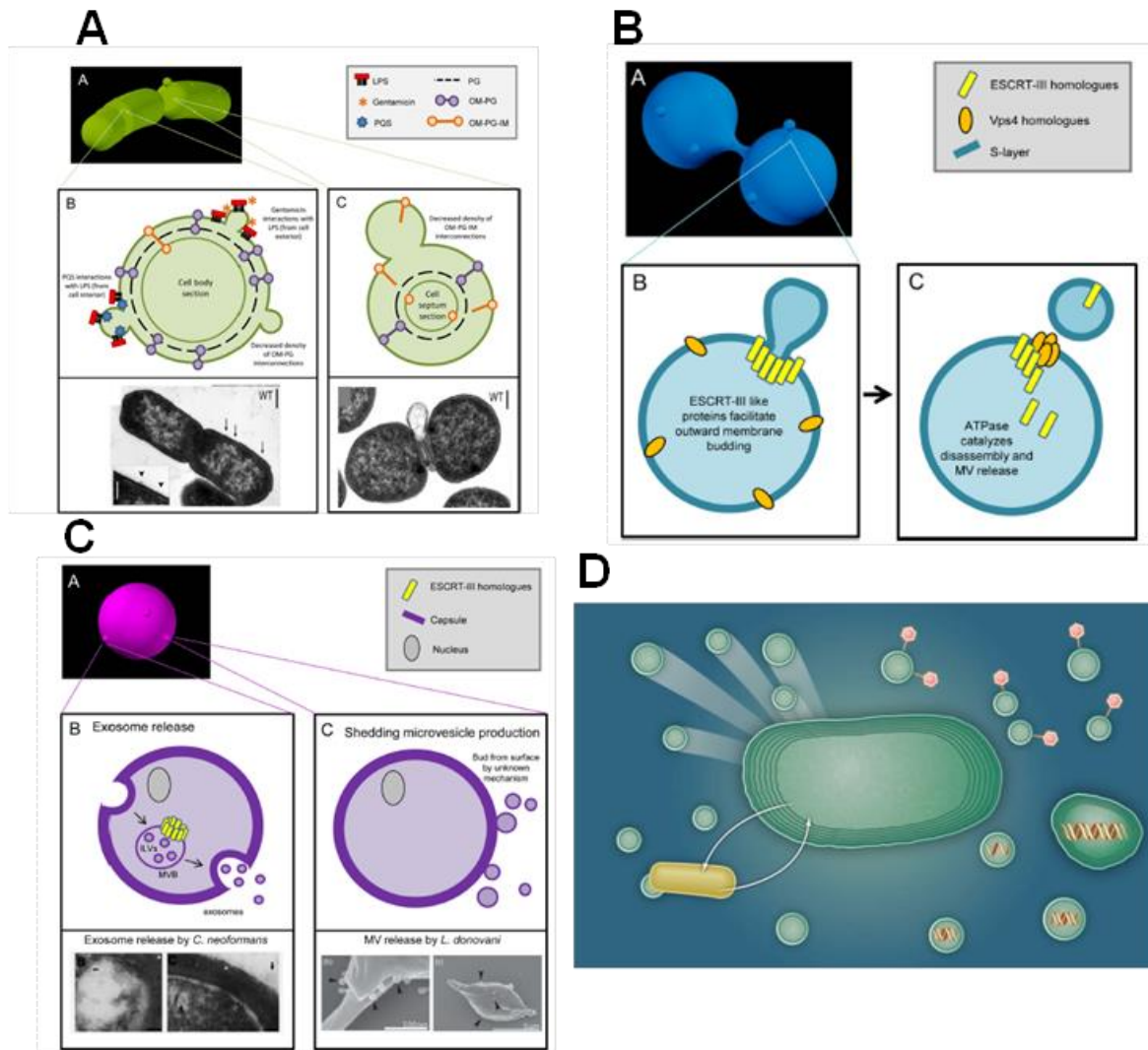


Figura 5. Exosomas liberados desde bacterias (A), arquea (B), hongos (C) y fitoplancton (*Prochlorococcus*) (D (Scanlan, 2014; Deatherage y Cookson, 2012).

Se han descrito multitud de funciones entre las que se encuentran la eliminación de proteínas de membrana, actuando en la respuesta inmune o transportando de ARN vírico (Petgel et al., 2010; Burger et al., 2013) (Figura 6). Hoy en día se están estudiando como posibles biomarcadores de enfermedades, en vacunas contra tumores o transportadores de fármacos (Viaud et al., 2010; Jang et al., 2013).

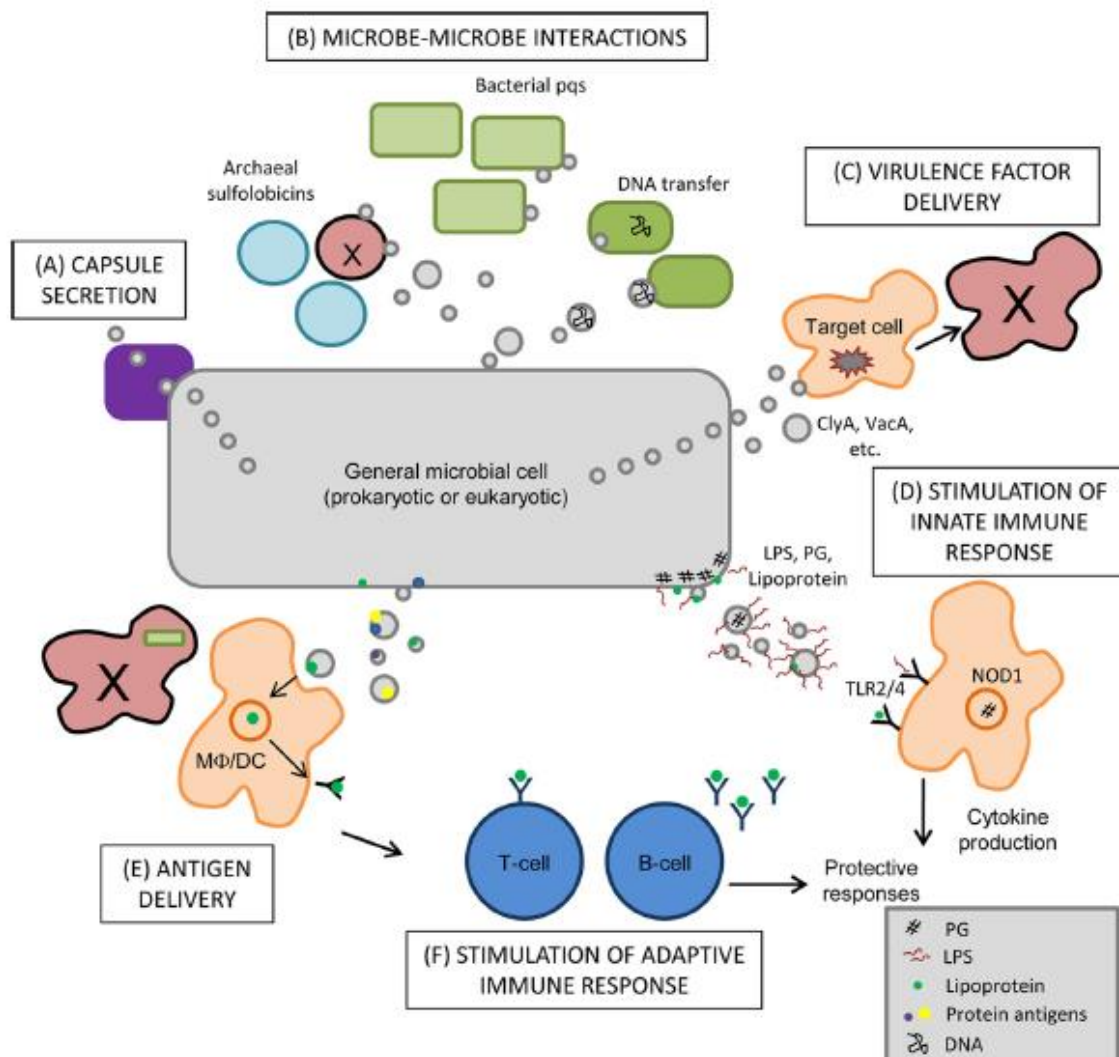


Figura 6. Impacto de la liberación de exosomas. A) liberación de polisacáridos a la superficie celular, los cuales a su vez sirven como comunicación entre bacterias y arqueas (B). C) en microbios patógenos liberación de toxinas entre otras a células huésped. D) estimulación del sistema inmune. E) y F) interacción y presentación con antígenos (Deatherage y Cookson, 2012).

Lipoproteínas

Las lipoproteínas son estructuras autoensambladas complejas rodeadas de una monocapa compuestas por lípidos, proteínas especializadas y apolipoproteínas que transportan agua y lípidos en el medio interno acuoso de vertebrados e insectos (Figura 7).

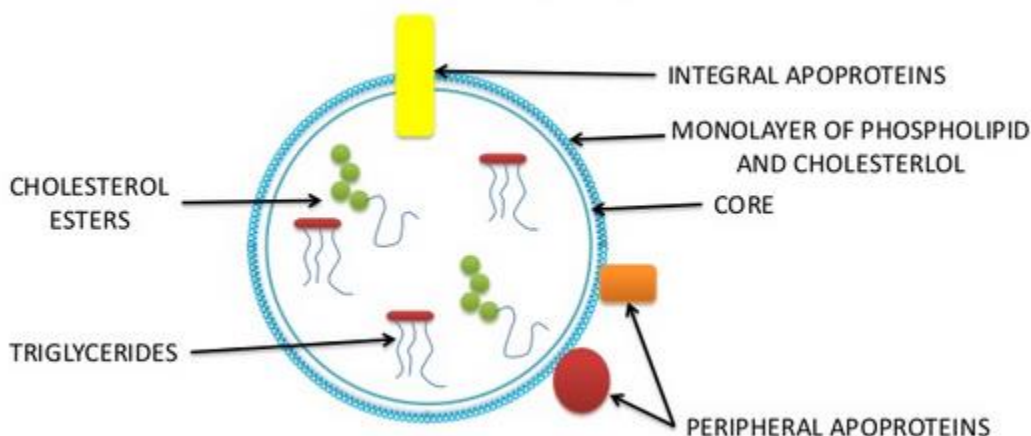


Figura 7. Estructura de una lipoproteína

(<http://www.slideshare.net/sharimycin/lipoprotein-metabolism-shariq>).

Existen cuatro tipos según su contenido proteico, tamaño y densidad: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad, lipoproteínas (de su metabolismo aparece un tipo llamado lipoproteína de densidad intermedia), de baja densidad y lipoproteínas de alta densidad (Tabla 1).

Tabla 1. Composición y tipos de lipoproteínas (Stanley, 2014).

	Size (nm)	Density (g/ml)	Total lipid content (wt%)	Cholesterol ester content (wt%)	Triacylglycerol content (wt%)	Apolipoproteins
Chylomicrons	200–600	<0.94	99	3	85	A4, B48, C1, C2, C3
Very low density lipoproteins (VLDL)	60	0.94–1.006	91	18	55	B100, C1, C2, C3
Low density lipoproteins (LDL)	25	1.006–1.063	80	50	10	B100, a
High density lipoproteins (HDL)	7–12	1.063–1.210	44	40	6	A1, A2, A5, D, E, M

La función de estas proteínas es el transporte de triacilglicéridos, ésteres de colesterol y vitaminas grasas solubles desde el hígado hacia tejidos periféricos y viceversa (HDL). Su capacidad de autoensamblaje, su capacidad para llegar a tejidos específicos y su capacidad de transporte han despertado gran interés para su uso como agentes de diagnóstico y fines terapéuticos (Lou et al., 2005; Ryan, 2010).

Ferritina

Es una nanopartícula inorgánica producida por bacterias, arqueas y eucariotas. Actúan como nanocajas proteicas sintetizando y almacenando óxidos de hierro y secuestrando iones hierro potencialmente peligrosos (Theil, 2013), además presentan propiedades magnéticas complejas. En eucariotas consta de dos partes, una exterior formando una coraza hueca (apoferritina) compuesta por 24 subunidades helicoidales; y una parte interior en donde se alojan hasta unos 4.500 átomos de hierro (Figura 8). Ambas partes tienen utilidades por separado ya que la apoferritina puede emplearse para la síntesis de nanopartículas (Yamasita et al., 2010) y el núcleo de hierro como agente de contraste (Doll et al., 2013).

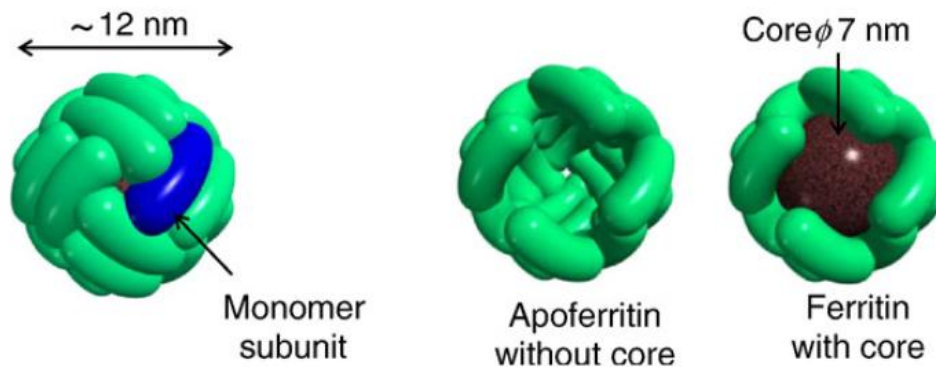


Figura 8. Representación esquemática de apoferritina y ferritina (Yamashita et al., 2010).

Magnetita

Un grupo de bacterias procariotas llamadas magnetotácticas poseen un orgánulo especializado llamado magnetosoma, compuesto por una bicapa lipídica y un núcleo magnético formado por magnetita (Fe_3O_4) o greigita (Fe_3S_4) con un diámetro entre 50-70 nm (Figura 9). Una característica que refleja que en la escala nano el “tamaño sí importa” viene dada por el hecho que los cristales de magnetita cuando son inferiores a 35 nm son superparamagnéticos y por encima de este tamaño forman un único dominio estable (Araraki et al., 2008). El magnetosoma ayuda a las bacterias a alinearse con el campo magnético de la Tierra y alcanzar regiones de mayor concentración de oxígeno (Lefevre y

Bazylinski, 2013). Aunque la magnetita también ha sido encontrada en otros organismos como tordos, abejas, moluscos y humanos.

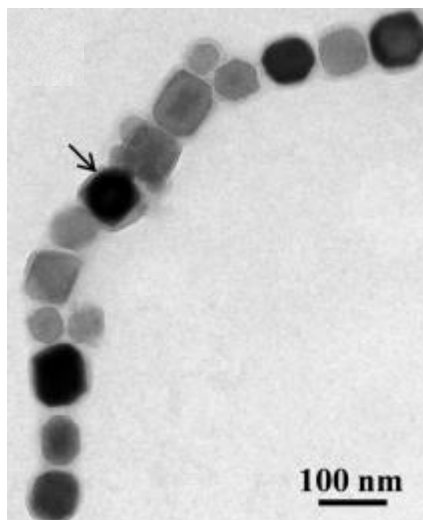


Figura 9. Micrografía TEM de una cadena magnetosoma de una célula de *Magnetococcus marinus* MC-1 mostrando los cristales de magnetita y la membrana del magnetosoma (flecha).

Virus

La historia sobre los virus marinos se remonta a la primera mitad del siglo XX cuando se observaron y aislaron los primeros bacteriófagos (fagos) marinos por primera vez (ZoBell, 1946; Spencer, 1955) (Figura 10).

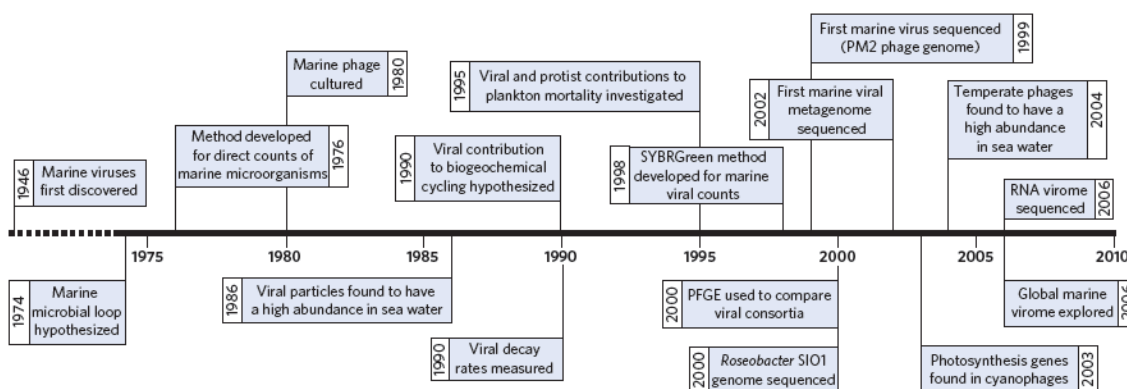


Figura 10. Esquema del desarrollo de la ecología viral (Rowher y thurber, 2009).

Aunque su presencia no fue explicada hasta la hipótesis del “ciclo marino microbiano” (Figura 11) (Pomeroy, 1974) y no fue hasta finales de los años 80 cuando se reconoció la abundancia de los virus y su impacto en los océanos (Bergh et al. 1989).

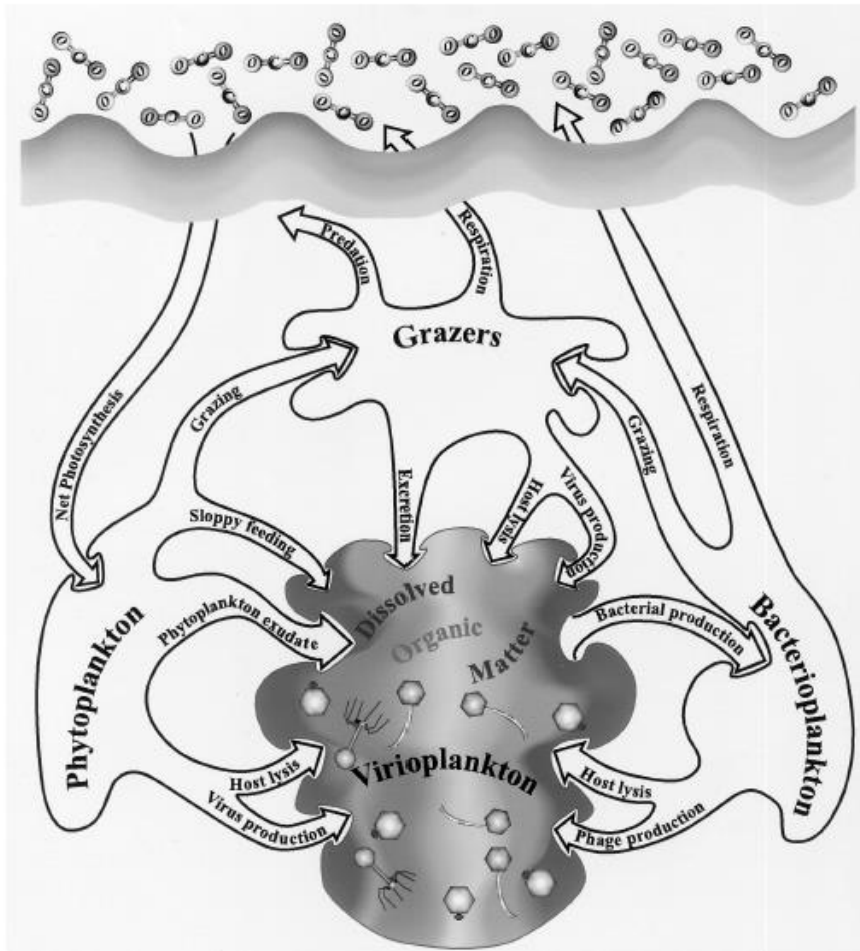


Figura 11. Virus y el ciclo microbiano, mostrando el papel de los virus como motores de la producción de materia orgánica disuelta en el medio acuático (Wommack y Colwell, 2000).

En los 90 se aprendió bastante sobre la diversidad genética de fagos y virus eucarióticos y la importancia del plancton marino. Numerosos estudios han demostrado la contribución de virus y protistas al ciclo biogeoquímico debido a la lisis del plancton (Braback et al., 1993; Fuhrman y Noble, Suttle, 1994; 1995; Glober et al., 1997; Wommack et al., 1999)

(Figura 11). A principios del siglo XXI se secuenciaron los primeros genomas de virus marinos y la genómica y metagenómica se emplearon para caracterizar la diversidad de los virus (ARN y ADN) en agua marina así como sus efectos sobre la ecología y fisiología de sus huéspedes (Rohwer y Thurber, 2009).

Se estima que existen alrededor de 10^{30} virus (virioplancton) en el océano (10^{-20} fM; 10^7 virus mL^{-1}) siendo un orden de magnitud mayor que el número de procariotas que son el segundo grupo más abundante (Wommack y Colwell, 2000) aunque en biomasa ocupan el segundo lugar detrás de los procariotas (Suttle, 2005) (Figura 12). Aunque la mayoría del virioplancton está formado por fagos (Wommack et al., 2000), en un estudio reciente se ha estimado la diversidad viral en agua de mar entorno a más de 100.000 tipos diferente de virus (Angly et al., 2014). Los fagos pueden clasificarse según su morfología en icosaédricos, filamentosos, con cola, sin cola o según sea el tipo de bacteria a la que infectan (http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Clase10_23132.pdf). Además de los fagos existen lo llamados virus parecidos a partículas (VLP), los cuales no tienen capacidad de infección. La abundancia del virioplancton generalmente es mayor en la zona eufótica (desde la superficie hasta unos 80 m) y en zonas costeras, y a partir de ahí decrece exponencialmente con la profundidad, además también se han observado variaciones estacionales en su abundancia (Cochran y Paul, 1998; Breitbart, 2012) en donde las condiciones específicas de cada región ejercen una presión selectiva para la existencia de unos virus u otros (Angly et al., 2014).

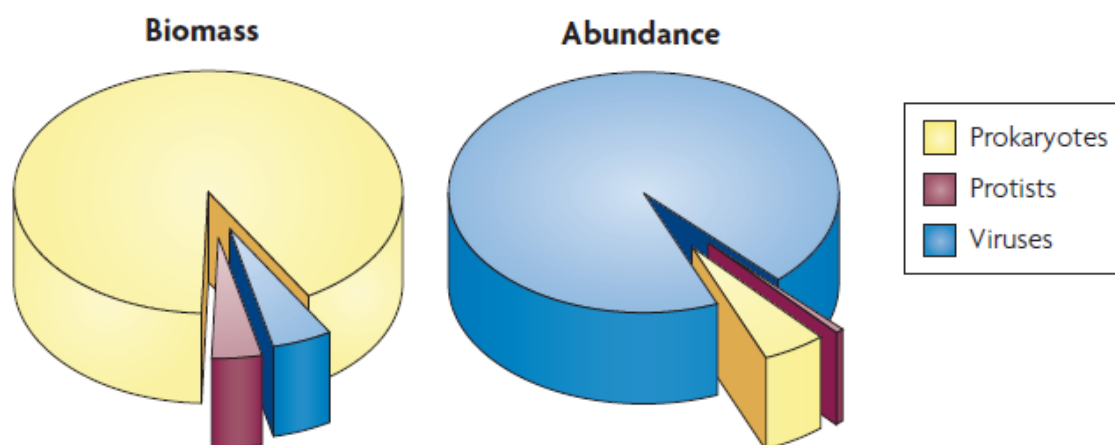


Figura 12. Biomasa y abundancia relativa de virus, procariotas y protistas (Cuttle, 2007).

Los virus no solo se encuentran en la columna de agua sino que también en los sedimentos y además en esta matriz su abundancia es mayor (Danovaro et al., 2005; Middelboe et al., 2008a,b). Se ha estimado que la producción viral en sedimentos costeros es una o dos veces mayor que la del virioplankton indicando que su volumen puede ser mayor en sedimentos que en la columna de agua (Hewson y Fuhrman, 2003; Mei y Danovaro, 2004, 2005).

El conocimiento actual de la ecología viral plantea bastantes cuestiones básicas sobre la distribución y actividad sobre los virus bentónicos. Los estudios sobre virus en sistemas de agua dulce han sido posteriores al del medio marino produciéndose un rápido aumento desde el año 2005 (Middelboe et al., 2008b). Esto queda reflejado por ejemplo en la paradoja aún sin resolver sobre la elevada abundancia viral (Middelboe et al., 2008a,b) y el poco impacto en sistemas bentónicos de agua dulce (Bettarel et al., 2006; Filippini et al., 2006; Weitz et al., 2014), mientras los virus en sedimentos marinos tienden a multiplicarse a elevadas velocidades (Danovaro et al., 2008; Middelboe, 2008a). Una de las posibles explicaciones sea la derivada de emplear diferentes aproximaciones y métodos para su medida como antes se comentó (Middelboe et al., 2008b; Liang et al., 2014). Pese a las abundancias de los virus en los sedimentos, estudios realizados en sedimentos marinos profundos muestran valores bajos de abundancia entre virus y bacterias (Danovaro y Serresi, 2000; Danovaro et al., 2002). Esta discrepancia entre abundancias entre sedimentos de sistemas costeros y sedimentos de zonas profundas puede deberse a las diferentes condiciones ambientales y bióticas (Danovaro et al., 2005). Sin embargo el análisis de sedimentos en perfiles de profundidad de abundancias virales muestran que existen grandes cantidades de virus en capas de sedimento profundas y donde unos estudios muestran una disminución de la abundancia en sedimentos anóxicos otros muestran un aumento con la profundidad o una mayor abundancia en sedimentos anóxicos que en sistemas oxigenados e incluso no presentan variación significativa con la profundidad (Danovaro et al., 2005; Paul et al., 1993; Drake et al., 1998; Hewson y Fuhrman, 2003; Bird et al., 2001; Middelboe et al., 2003; Mei y Danovaro, 2004; Taylor et al., 2001, 2003; Weinbauer, 2004).

Plancton

El término plancton (del griego (πλαγκτός [plagktós], ‘errantes’) incluye a aquellos organismos acuáticos que viven sin estar ligados a otros y que no tienen la capacidad de moverse en contra de las corrientes que los rodean. Es un término inusual ya que hace referencia a un medio de locomoción en lugar de su pertenencia a una u otra familia genética. Otros términos relacionados son el necton (organismos nadadores activos) y neuston (organismos que viven en la interfase agua-aire). Existen varias formas de clasificación del plancton. En una de ellas el plancton se clasifica en holoplancton (organismos que pasan todo su ciclo vital perteneciendo al plancton) y meroplancton (organismos que solo durante una parte de su vida integran la comunidad planctónica) (Figura 13), en donde además se han añadido los virus ya que la clasificación no los incluía.

Sin embargo para el objeto de este trabajo del trabajo fin del **“Máster de Nanotecnología Medioambiental”** nos centraremos en la clasificación por tamaño del plancton en la cual encontramos el nicho de este estudio. La clasificación por tamaños propuesta por (Sieburth y Smetacek, 1978) (Figura 14).

Según (Strickland, 1983) existen tres clases de interacciones entre el plancton y la contaminación. La primera es el efecto nocivo directo de los contaminantes sobre el plancton, el segundo es el efecto que produce el plancton sobre los contaminantes y el tercero y de mayor interés es el papel que juega el plancton en la biomagnificación de los contaminantes y sus efectos sobre la cadena trófica hasta llegar al ser humano. Un grado más de complejidad aparece en modelos matemáticos en donde se incluye la interacción de tres elementos zooplancton-fitoplancton-contaminante. En un estudio reciente (Rana et al., 2015) estudian el efecto de NPs sobre plancton, en donde el zooplancton actúa como predador el fitoplancton como presa y NPs son añadidas al sistema. Este es el primer modelo matemático que estudia el impacto de NPs sobre la interacción fitoplancton-zooplancton. Sus resultados mostraron que debido a la interacción NPs-fitoplancton (internalización/adsorción) disminuye la población tanto de fitoplancton como de zooplancton (desestabilización del sistema a través de una bifurcación de Hopf), y conforme las NPs son eliminadas del medio el sistema gana en estabilidad. Las NPs juegan un papel importante en un sistema simple como este por lo que la introducción de NPs al

medio acuático puede tener consecuencias no solo a nivel de primario sino sobre la cadena alimenticia.

Holoplankton

- I. *Kingdom Monera*: procaryotic cells, simple and unspecialized; single cells, some in groups or chains.
 - A. *Bacteria*: single cells, in chains or groups; autotrophic and heterotrophic, aerobic and anaerobic; important as food source and in decomposition.
 - B. *Cyanobacteria*: blue-green algae; autotrophic single cells, in chains or groups, produce some red blooms in sea; phytoplankton.
- II. *Kingdom Protista*: grouping of microscopic and mostly single-celled organisms; autotrophs (algae) and heterotrophs (protozoa).
 - A. *Phylum Chrysophyta*: golden-brown algae; yellow to golden autotrophic single cells, in groups or chains; contribute to deep-sea sediments; phytoplankton.
 1. *Class Bacillariophyceae*: diatoms.[dominate in cool/cold water] [story about raising them in lab--silica dissolution]
 2. *Class Chrysophyceae*: coccolithophores, silicoflagellates, and other flagellates. [prefer warm water]
 - B. *Phylum Pyrrophyta*: fire algae; single cells with flagella; produce most red tides; bioluminescence common; usually considered phytoplankton.
 1. *Class Dinophyceae*: dinoflagellates.
 - C. *Phylum Phaeophyta*: Brown algae *Sargassum* maintains a planktonic habit in the Sargasso Sea
 - D. *Phylum Rhodophyta*: Red algae
 - E. *Phylum Protozoa*: heterotrophic protists like dinoflagellates radiolarians, and foraminifera
- III. *Kingdom Animalia*: animals; multicellular heterotrophs with specialized cells, tissues, and organ systems; zooplankton (holoplankton). For temporary members of the zooplankton (or meroplankton), see the Meroplankton listed in V.
 - A. *Phylum Coelenterata* or *Cnidaria*: radially symmetrical with tentacles and stinging cells like Jellyfish including such colonial forms as Portuguese man-of-war.
 - B. *Phylum Ctenophore*: comb jellies; translucent; move with cilia; often bioluminescent.
 - C. *Phylum Chaetognatha*: arrow worms; free swimming, carnivorous worms. [Some species limited to specific water masses]
 - D. *Phylum Mollusca*:
 - Class Gastropoda* Snails Pteropods
 - E. *Phylum Arthropoda*: animals with paired, jointed appendages and hard outer skeletons.
 1. *Class Crustacea*: copepods and euphausiids.
 - F. *Phylum Chordata*: animals, including vertebrates, with dorsal nerve cord and gill slits at some stage in development.
 1. *Subphylum Urochordata*: saclike adults with "tadpole" larvae; salps.



Meroplankton: larval forms from the

- I. *Kingdom Animalia*
 - A. *Phylum Annelida* (segmented worms *Trochophore*),
 - B. *Phylum Mollusca* (shellfish and snails [*Veliger*]),
 - C. *Phylum Arthropoda* (crabs [*Zoea*] and barnacles [*Nauplius*]),
 - D. *Phylum Echinodermata* (starfish [*Brachiolaria*], brittle star [*Ophiopluteus*] and sea urchins), and
 - E. *Phylum Chordata* (fish).

Figura 13. Clasificación del plancton I.

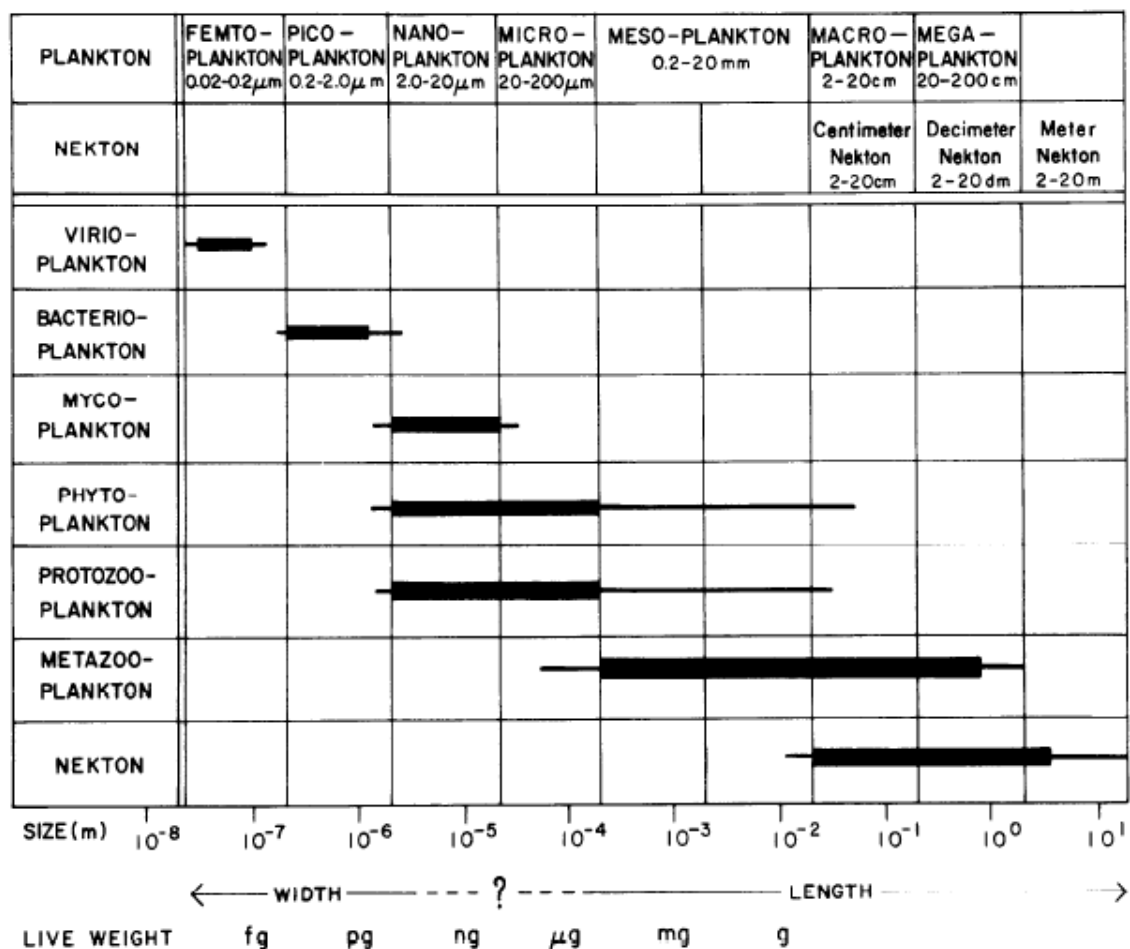


Figura 14. Distribución de los diferentes compartimentos trófico-taxonómicos del plancton (Sieburth y Smetacek, 1978).

4. INTERACCIONES BIOFISICOQUÍMICAS EN LA INTERFASE NANO-BIO

Los estudios dirigidos a las relaciones entre los contaminantes tanto clásicos como emergentes con la fracción por debajo de la barrera de los 100 nm que está presente en el medio marino (virioplancton, NPs naturales, proteínas...) inexistentes. La mayoría de ellos se encarga de las distintas fracciones superiores (picoplancton: 0,2–2,7 μm ; pico + nanoplancton: 0,2–20 μm ; microplancton: 20–50 μm ; y mesoplancton: 50–200 μm). La bioacumulación de contaminantes orgánicos persistentes (POPs) y metales traza en plancton ha sido ampliamente estudiada en diferentes zonas del planeta (Taylor et al., 1991; Broman et al., 1992; Larsson et al., 2000; Berglund et al., 2001; Abarnou et al., 2002; Okumura et al., 2004; Wang et al., 2005; Jiménez et al., 2011; Berrojalbiz et al.,

2010; Galbán-Malagón et al., 2013; Frouin et al., 2013; Marion et al., 2014; Morales et al., 2015; Echeveste et al., 2010a,b, 2012, 2014; Knauer y Martin, 1972; Kuiper, 1981a,b) (Figura 15), en donde el coeficiente de reparto entre lípidos y agua juega un papel fundamental (Swackhamer et al., 1993; Sobek et al., 2006).

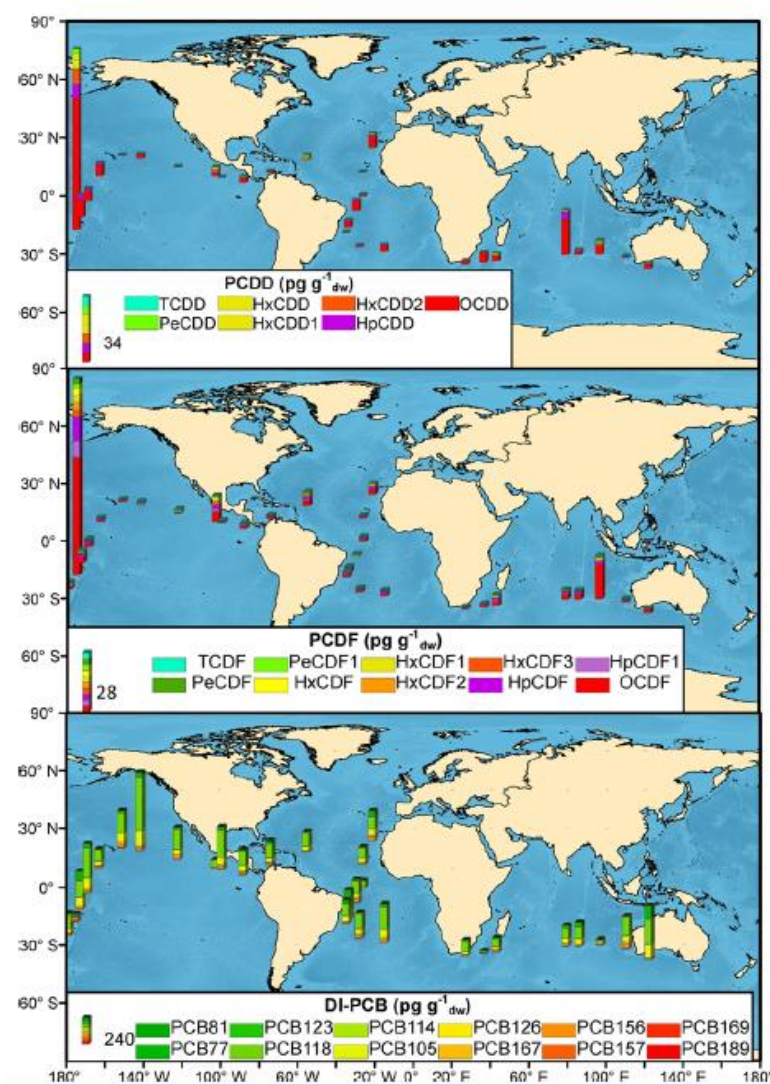


Figura 15. Distribución global de POPs. Dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (arriba), dibenzofuranos policlorados (centro) y bifenilos policlorados tipo dioxina (abajo) (Morales et al., 2015).

En el extenso trabajo realizado por González-Dávila (1995) se pone de manifiesto la interacción de metales traza con el fitoplancton y la importancia de la liberación de materia

extracelular para complejarlos y disminuir su toxicidad. Aunque según con qué tipo de contaminantes nos encontremos esta materia extracelular (EPS) no es capaz de disminuir la toxicidad de *quantum dots* aunque sí poder desestabilizarlos (Zhang et al., 2012). Existen muy pocos trabajos en los que se ha puesto de manifiesto la presencia de metales unidos a fracciones de plancton del rango de las NPs trabajos en los que se pone de manifiesto la presencia de metales unidos a materia extracelular de diatomeas (Alvarado-Quiroz et al., 2006; Zhang et al., 2008), la asociación de determinados metales (Cd, Cr, Cu, y Zn con proteínas de rangos de tamaño diferentes procedentes de plancton (García-Otero et al., 2013a,b,c,d) o con materia disuelta orgánica de menos de 100 nm (García-Otero et al., 2015).

La lisogenia es el proceso por el cual un virus mantiene una simbiosis estable con su huésped al contrario que la replicación lítica. El ADN inyectado en el huésped se denomina profago y se replicará durante la división normal de la célula/bacteria (Figura 16). Este estado “lisogénico” continuará hasta que el profago es activado espontáneamente debido a la inducción de un agente mutagénico como la radiación ultravioleta (UV-C; <300 nm) o la mitomicina C (Ackermann y DuBow 1987).

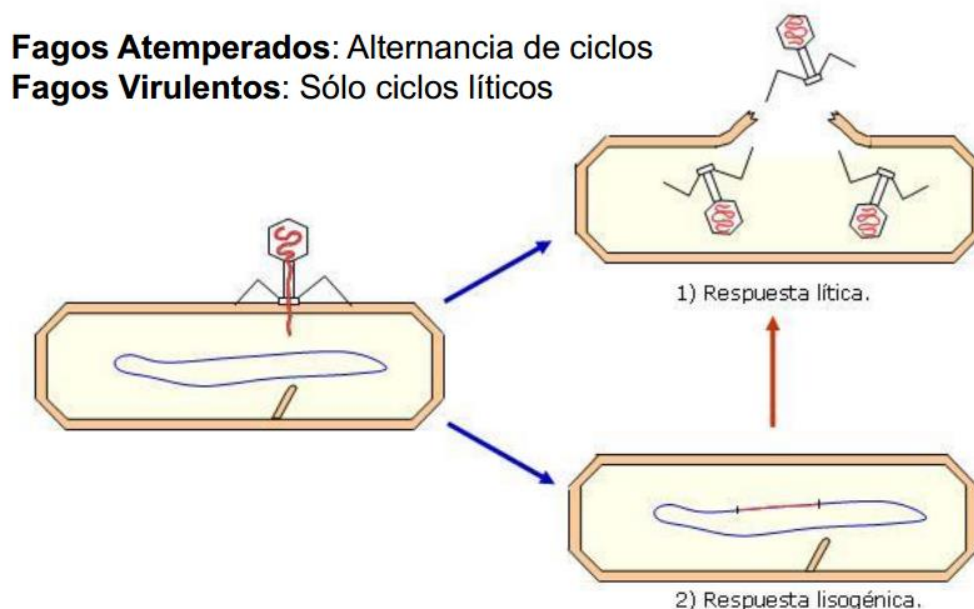


Figura 16. Ciclo lítico y ciclo lisogénico

(http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Clase10_23132.pdf).

Por otro lado no todas las bacterias son propensas a esta inducción (pseudolisogenia) y estos dos agentes inductivos no se suelen encontrar en medios marinos. La pseudolisogenia

no supone una interacción tan estable entre virus y el huésped como ocurre en la lisogenia sino que el ADN del fago no se replica y se segrega por igual en toda la progenie, y no puede ser estimulada por agentes inductores químicos o físicos (Wommack et al., 2000). Este mecanismo se formuló para poder explicar la alta producción sostenida de virioplancton pese a condiciones medioambientales pobres en nutrientes (Wommack et al., 2000). Sin embargo en el medio acuático existe una enorme variedad de compuestos (PAHs, PCBs, pesticidas, surfactantes, fármacos, nanopartículas...) que podrían ejercer esta función inductiva. Los trabajos llevados a cabo por (Cochran y Paul, 1998; Jiang y Paul, 1996) mostraron que PAHs, PCBs y pesticidas tienen la capacidad de inducir lisogenia con un aumento del número de virus (profagos) (128,8% - 1336% incluidos porcentajes de ambos artículos) en diferentes zonas marinas. Contaminantes emergentes como las cremas y aceites solares han demostrado también inducir un aumento en la cantidad de virus marinos presentes en el medio además de inducir en diferente proporción el ciclo lítico (Danovaro y Corinalesi, 2003; Danovaro et al., 2003).

Las interacciones entre contaminantes NPs y organismos a grandes rasgos (para una visión más detallada ver “*understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*” Nel et al., 2009) pueden ser: entre contaminante y organismo, entre NPs y organismo, disminución de la concentración del contaminante por sorción con las NPs, ingesta de NPs con contaminantes sorbidos (Figura 17).

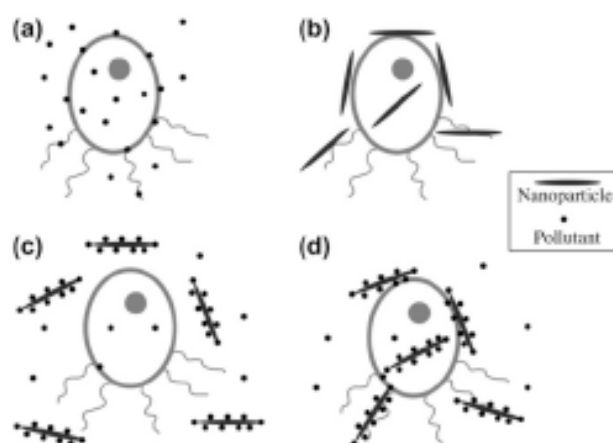


Figura 17. Vías de interacción entre NPs, contaminantes y organismos; a) entre contaminantes y organismo, b) entre NPs y organismo, c) disminución de la concentración del contaminante por sorción con las NPs y d) ingesta de NPs con contaminantes sorbidos (Nowack y Bucheli, 2007).

Las NPs diseñadas como los fullerenos, zeolitas, nanotubos de carbono o NPs de hierro ya llevan siendo tiempo estudiadas como vectores de contaminación llevando asociadas diferentes tipos de contaminantes (metales traza, dioxinas, PAHs, DDTs, PBDEs, PCBs, pesticidas y fármacos) en diferentes compartimentos ambientales (Biswas y Wu, 2005; Wigginton, 2007; Christian et al., 2008; Nowack y Bucheli, 2007; Burger et al., 2009; Chen et al., 2014). Pero también las nanopartículas naturales son objeto de estudio así como su rol como transportadores de contaminantes (Trivedi et al., 2003; Hasselov et al., 2008; Bakshi et al., 2015) o vectores de contaminación en el suelo; sirva como ejemplo el proyecto europeo (*Natural nanoparticles in soils as possible environmental vectors for contaminants; BMBF MOE 09/R51*). Holden et al, (2014) analizaron más de 600 artículos entre 2008-2013, de los cuales 271 trataban sobre las consecuencias de las concentraciones de exposición en organismos acuáticos, aunque sin tener en cuenta a los virus por considerarlos que no tenían repercusión medioambiental, algo que no se corresponde con la importancia de los virus marinos en el medio ambiente como ya hemos visto.

Como ya se ha perfilado antes los virus juegan papeles de gran importancia en los ecosistemas marinos y fruto de ello son las numerosas recopilaciones y estudios sobre ellos. Uno de sus más importantes roles es el que desempeñan en el ciclo biogeoquímico, debido a la infección y posterior lisis de sus huéspedes liberando y añadiendo desde la fase particulada a la fase disuelta tanto nutrientes (fósforo, nitrógeno, hierro...) como contaminantes y sus metabolitos los cuales son captados por plancton, bacterias, diatomeas.....incorporándose de nuevo a la cadena trófica, el llamado *viral shunt* (Figura 18).

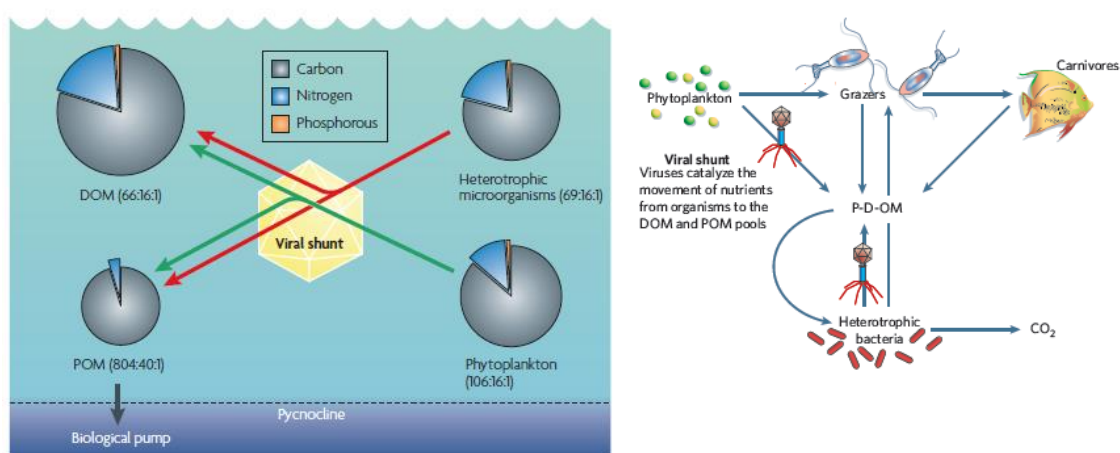


Figura 18. Viral shunt (Suttle, 2005, 2007).

Las interacciones tanto de virus eucariotas como procariotas han sido largamente estudiadas (Figura 19), sin embargo, supone un interrogante su posible contribución a la dispersión y o transferencia de contaminantes tanto a los huéspedes infectados como al provocar la lisis de organismos que ya posean esos contaminantes y pasen a la fase disuelta desde fase particulada. Además actualmente existen estudios dirigidos a nuevas formas de repercusión de los virus marinos sobre el cambio climático en cuanto al posible rol que los virus puedan tener con el ciclo del metanol en aguas costeras ([http://www.pml.ac.uk/pmlsite/media/PMLMedia/Documents/Marine_Viruses_and_Alcohol](http://www.pml.ac.uk/pmlsite/media/PMLMedia/Documents/Marine_Viruses_and_Alcohol_in_seawater_final.pdf) ol_in_seawater_final.pdf

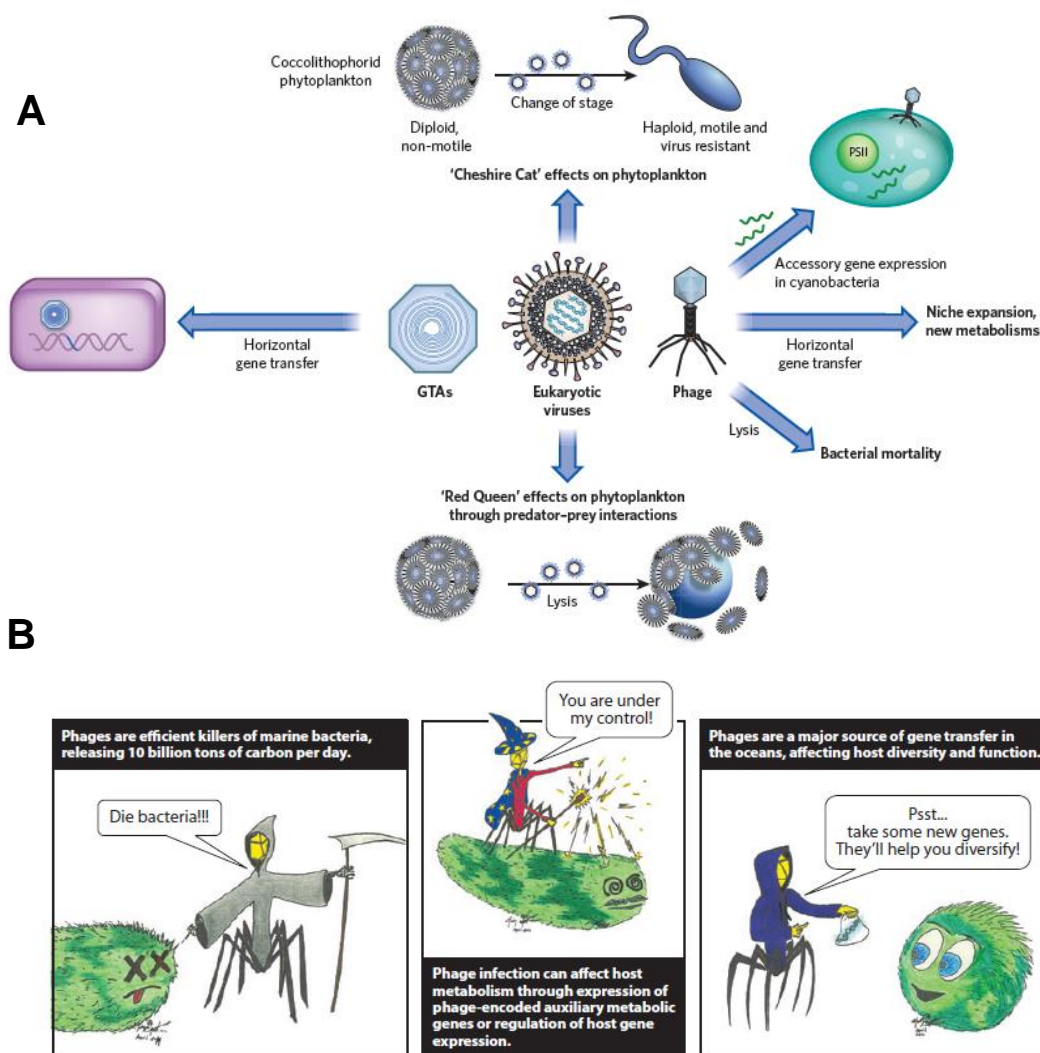


Figura 19. Diferentes interacciones entre virus marinos y sus huéspedes (A; Rohwer y Vega y B)Breitbart, 2012) .

La superficie vírica posee dominios tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, en donde en estas últimas se ha observado un importante papel en medios porosos (Bales et al., 1991; Sobsey y Meschke, 2003). La hidrofobicidad viene dada por el balance de grupos amino en la superficie, por lo que algunos virus son más hidrofóbicos que otros. Para la solubilización de una sustancia hidrofóbica en agua ha de vencerse una barrera termodinámica en donde los puentes de hidrógeno del agua han de reorganizarse al máximo para rodear a la sustancia hidrofóbica. La presencia de los llamados agentes caotrópicos permiten la solubilización de estos compuestos hidrofóbicos en agua. Un agente caotrópico es un compuesto de pequeño tamaño que perturba esta barrera por medio de la disminución de la estructura ordenada del agua. Por otro lado un agente anticaotrópico actúa de forma contraria aumentando la estructura ordenada aumentando la barrera e impidiendo la solubilización de compuestos hidrofóbicos en agua (Gerba y Goyal, 1992). Otro posible mecanismo de adsorción sobre la superficie de los virus es mediante el enlace covalente o iónico. Este tipo de unión suele provocar inactivación en los virus o bien provocar la liberación de su contenido mediante cambios conformacionales en la cápsida (Yeager y O'Brien, 1979). Existen otros factores que pueden afectar a la adsorción tales como el potencial zeta, la fuerza iónica, punto isoeléctrico o el pH aunque estos dos últimos en sistemas marinos tendrán menor importancia debido a la poca variación que en mar abierto experimentan. La versatilidad para formar enlaces que ofrecen las cápsidas están siendo empleadas en virus de humanos, animales y plantas para la obtención desde nanocomposites, sensores o sondas fluorescentes (Capek, 2015).

De esta forma los virus no solo reciclan estos compuestos sino que también liberan otros de que de otra forma no estarían presentes por procesos naturales. Aunque queda bastante por saber desde su repercusión sobre la diversidad de sus huéspedes (Middelboe et al., 2008b) al impacto total de los virus sobre los procesos a escala global (cómo las funciones fisiológicas codifican dentro de los ciclos biogeoquímicos la influencia de genomas víricos), qué es lo que controla su actividad (Weitz et al., 2014) e incluso aún persiste el debate sobre si considerarlos organismos vivos o no (Bratbak y Haldal, 2000; Brusaard et al., 2008), sin embargo, no cabe duda que la influencia que estos ejercen sobre el resto de organismos los hace los últimos reguladores a nivel nanométrico de la vida.

5. UNA BREVE APROXIMACION A LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS DE CARACTERIZACIÓN Y DETECCIÓN DE NANOPARTICULAS

El desarrollo y los avances en la generación de nuevas NPs ha llevado también asociada la necesidad de desarrollar las técnicas necesarias para su detección y caracterización. A día de hoy las NPs puras se pueden caracterizar mediante técnicas como la ultracentrifugación, difracción de rayos-X o dispersión de rayos-X en ángulo pequeño, etc. Los últimos avances en la detección y caracterización de NPs artificiales consideran no solo el nanomaterial puro sino también las especies químicas que de él puedan derivarse en el sistema de estudio. Excepto cuando se trata de un nanomaterial puro la mayoría de las muestras requieren algún tipo de preparación anterior a su análisis. Estos tipos de pretratamientos de la muestra pueden ser: digestión (ácida, básica o enzimática), separación/preconcentración (centrifugación, filtración, ultrafiltración, diálisis, extracción en fase líquida, extracción en fase sólida con los correspondientes pasos de purificación o *clean up*). Mediante la digestión se puede llegar a la disolución del nanomaterial (algunos requieren condiciones especiales como el agua regia para el oro, peróxido de hidrógeno para el CeO₂ o el ácido fluorhídrico para el TiO₂) y la matriz en la que está contenido ya sea un alimento o un tejido biológico (Tadjiki et al., 2009; Wagner et al., 2015). Para el caso de las digestiones básicas se suele empelar hidróxido de tetrametilamonio para degradar a matrices orgánicas (Loeschner et al., 2014) mientras que las digestiones enzimáticas hacen uso de proteasas y pectinas las cuales solubilizan las proteínas y las paredes celulares (Peters 2014, 2015). En el caso de las etapas de separación/preconcentración la centrifugación es el método más simple para aislar NPs tanto de suspensiones acuosas, de especies disueltas y NPs asociadas a compuestos de alto peso molecular como la materia orgánica disuelta cuando la ultracentrifugación falla (Unrine et al., 2012).

Las técnicas principales hoy en día para la detección y caracterización de NPs artificiales son: microscopía electrónica (microscopía electrónica de barrido o SEM, microscopía electrónica de transmisión o TEM, espectroscopía de pérdida de energía electrónica o EELS, espectroscopía dispersiva de rayos-X...), técnicas de dispersión de la radiación (difracción láser de partículas o LD, dispersión de

radiación estática o SLS, dispersión de radiación en multiángulo o MALS, dispersión de la radiación dinámica o DLS y análisis de rastreo de partículas), técnicas de espectrometría atómica (espectrofotometría de absorción atómica electrotermica o ET-AAS, espectrometría de emisión óptica mediante acoplamiento inductivo de plasma o ICP-OES, análisis de partículas individuales mediante espectrometría de masas mediante acoplamiento inductivo o *single particle* ICP-MS y espectroscopía de absorción de rayos-X), técnicas de separación en continuo (fraccionamiento de flujo en campo o FFF con sus diferentes modalidades: SdFFF, FIFFF o AF4 , electroforesis y sus diferentes modalidades: electroforesis en gel o GE, electroforesis en gel de poliacrilamida o PAGE, cromatografía hidrodinámica o HDC....), técnicas electroanalíticas (voltametría de partículas inmovilizadas o VIP y coulombimetría de colisión de partículas o PCC) y sensores químicos (sensores basados en resonancia de plasmón superficial, sensores fluorescentes, piezoeléctricos...) (Richardson y Ternes, 2014; Laborda et al., 2015; Bakshi et al., 2015; Nowack et al., 2015).

La microscopía electrónica se considera como la herramienta más poderosa para el análisis de nanomateriales debido a su capacidad de visualizar NPs, y por consiguiente obtener información acerca de su tamaño, forma, estado de agregación así como la interpretación de los resultados obtenidos por otras técnicas (Calzolari y Rossi, 2012; Sadik et al., 2014). Entre las diferentes técnicas de microscopía electrónica, la SEM alcanza la mayoría de los requisitos necesarios para la caracterización de NMs en matrices complejas. En algunos casos la TEM se emplea para el estudio de determinados recubrimientos de las NPs (Lewicka et al., 2011). De las técnicas de dispersión de la radiación mencionadas la DLS es la técnica más comúnmente empleada para la medición del tamaño de NPs en suspensiones acuosas mediante la medida del movimiento Browniano a través de fluctuaciones dependiente del tiempo en la intensidad de la radiación dispersada causada por interferencias destructivas y constructivas. Esta técnica es susceptible a errores en la medida debido a la polidispersidad de muestras medioambientales por lo que suele acoplarse a un detector tipo FFF o HDC. El empleo del MALS acoplado a FFF o HDC proporciona información sobre la forma. El rastreo de NPs es una técnica emergente de dispersión de la radiación capaz de obtener la distribución de tamaños y la concentración de NPs diseñadas en muestras medioambientales (Brar y Verma, 2011; Gallego-Urrea et al., 2011). Las técnicas de espectrometría atómica

empleadas en solitario no son específicas para NPs a excepción del *single particle* ICP-MS. Esta técnica es capaz de proporcionar información sobre la concentración en número de una suspensión de NPs así como el contenido en masa elemental por NP. La disposición de información adicional acerca de la naturaleza de las NPs (forma, composición y densidad) se puede calcular el tamaño del núcleo de las NPs así como su distribución en número (Laborda et al., 2014). Esta técnica ha sido empleada para detectar la liberación de NPs desde envoltorios de comidas, la presencia de NPs en suplementos alimentarios, aguas residuales, tejidos biológicos o sangre (Mitrano et al, 2012; Reed et al 2014; Echegoyen y Nerín, 2013; Peters et al., 2015; Jenkins et al., 2015). La espectroscopía de absorción de rayos-X es una técnica que no requiere preparación, o muy poca, de la muestra específica de elementos capaz de proporcionar información cualitativa específica de especies metálicas/metaloides así como su distribución en cantidad, siendo su principal limitación su sensibilidad (mg kg^{-1}) (Laborda et al., 2015). Las diferentes técnicas de separación en continuo han demostrado ser una herramienta útil para la separación de NPs basándose en su tamaño, superficie, densidad y carga. Su acoplamiento a técnicas de detección selectivas proporcionan una base sólida para la resolución de problemas en matrices complejas (Howard, 2010). El fraccionamiento el flujo por campo comprende una serie de técnicas de separación, en donde esta tiene lugar en un canal fino, alargado y sin fase estacionaria, debida a la acción de un campo externo perpendicular al flujo. Según sea la naturaleza del campo externo aparecen las diferentes técnicas (campo centrífugo = SdFFF, flujo = FIFFF, flujo asimétrico = AF4...). Nanopartículas de Ag Au, Se, SiO₂, TiO₂ and ZnO en diferentes matrices como cremas solares, comida, productos de consumo, medioambiental o biológicas han sido realizadas con éxito (Contado y Pagnoni, 2008; Heroult et al., 2014; Peters et al., 2014; Koopmans et al., 2015; Somchue et al., 2014). Las técnicas electroforéticas están basadas en la migración de especies cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico, en donde la GE y la PAGE son las dos técnicas de separación y caracterización (tamaño, forma y funcionalización de la recubierta) de NPs más empleadas, siendo su uso en muestras reales aún escaso. La ventaja de emplear electroforesis en gel respecto a otras técnicas de separación es la alta resolución alcanzable y la capacidad de analizar tanto especies iónicas y NPs (Surugau y Urban, 2009; Fedotov et al., 2011; López-Lorente et al., 2011). La cromatografía hidrodinámica basa su separación en el diferente gradiente

de velocidades, que se establece a través de una columna con relleno no poroso, entre los diferentes tamaños de las especies a separar. Su aplicación para la determinación de NPs diseñadas en matrices complejas es aún escasa, limitándose hasta la fecha a la identificación de NPs diseñadas y naturales de TiO_2 , SiO_2 , Al_2O_3 , Fe_2O_3 , Ag y Au en aguas procedentes de lodos de plantas depuradoras, ríos, aguas sintéticas y cremas solares (Mitreveli et al., 2014; Tiede et al., 2009; 2010; Proulx y Wilkinson, 2014; Philippe y Schaumann, 2014).

Las técnicas electroanalíticas suponen una alternativa eficiente y barata para la detección, caracterización del tamaño del tamaño y cuantificación de las NPs. Mientras que la VIP es sensible al estado de oxidación de los elementos que pueden componer una muestra, y se puede obtener el tamaño y la concentración en masa la PCC es capaz de proveer información específica (distribución de tamaños y concentraciones en número) sobre NPs en un modo similar al SP-ICP-MS. Hasta la fecha estas técnicas han sido aplicadas a NPs de Ag, Au, Cu, Ni, Pt, Pd, CeO_2 , CuO, Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , IrO, NiO, TiO_2 , y CdSe (Laborda et al., 2015). En cuanto a los sensores químicos, su bajo coste, sensibilidad de respuesta, portabilidad y simpleza los hace adecuados para el monitoreo de NPs diseñadas, aunque el número de ellos desarrollados y aplicados para el análisis de muestras reales es bajo y aún está lejos de tener éxito en su aplicación para muestras reales (Sadik et al., 2009). En el caso de encontrarnos con el análisis de nanopartículas en el aire los retos suponen su conteo y la medida de su tamaño en donde para lo primero se emplean el contador de partículas condensadas (CPC) en donde el tamaño de las partículas detectables más pequeñas se puede ajustar regulando la temperatura de condensación, y el electrómetro de copa de Faraday (FCE) y para el segundo propósito se emplea un analizador de movilidad diferencial(DMA) (<http://www.invasat.gva.es/documents/161660384/161741789>). Después de la toma de las muestras los análisis pueden llevarse a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases (GC) o mediante ICP-MS. Las principales aplicaciones de estos métodos están destinadas a medir la polución originada por fuentes primarias como el tráfico (sulfatos, hidrocarburos, metales...) o los ambientes laborales (carbón, metales...) (Charron y Harrison, 2009). En ambientes naturales los estudios son muy escasos habiéndose encontrado que la composición de la atmósfera marina hasta en un 60% estaba formada por NPs de sal marina (Clarke et al., 2006).

6. CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo bibliográfico se ha puesto de manifiesto la importancia que las nanopartículas naturales y en concreto la de las biológicas como es el virioplancton, en un contexto científico actual muy enfocado hacia la síntesis y caracterización de nanopartículas en todo tipo de sistemas y las posibles aplicaciones que están puedan tener. Con este trabajo pretendemos poner un foco de atención y un posible nuevo campo de estudio específico sobre el posible impacto que los nanomateriales pueden tener como primer eslabón de la contaminación marina y por ende global.

REFERENCIAS

Abarnou, A., Loizeau, V., le Guellec, A.-M., Jaouen-Madoulet, A., 2002. Contaminants in marine foodwebs. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 152; 6: 425–432

Ackermann, H.W., Du Bow M.S., 1987. *Viruses of prokaryotes Vol 1 General properties of bacteriophages*. CRC Press, Boca Raton

Alvarado Quiroz, N.G., Hung, C.C., Santschi, P.H., Binding of thorium (IV) to carboxylate, phosphate and sulfate functional groups from marine exopolymeric substances (EPS). *Marine Chemistry*, 100: 337–353

Angly, F.E., Felts, B., Breitbart, M., Salamon, P., Edwards, R.A., Carlson, C., Chan, A.M., Haynes, M., Kelley, S., Liu, H., Mahaffy, J.M., Mueller, J.E., Nulton, J., Olson, R., Parsons, R., Rayhawk, S., Suttle, C.A., Forest Rohwer, F., 2014. The Marine Viromes of Four Oceanic Regions *PLoS Biol*, 4; 11: e368. DOI: 10.1371/journal.pbio. 0040368

Arakaki A, Nakazawa H, Nemoto M, Mori T, Matsunaga T., 2008. Formation of magnetite by bacteria and its application. *Journal of the Royal Society Interface*, 5: 977-999

- Bales, R.C. Stephen, R., Hinkle, Kroeger, T., and Kristen Stocking, K., 1991. Bacteriophage adsorption during transport through porous media: Chemical perturbations and reversibility. *Environmental Science and Technology*, 25; 12: 2088-2095
- Bakshi, S., He, Z.L., and Willie G. Harris, W.G., 2015. Natural Nanoparticles: Implications for Environment and Human Health. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45: 861–904
- Barceló, D., 2003a. Emerging pollutants in water analysis. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 22, Pages xiv-xvi
- Barceló, D., Ayora, C., Carrera, J., Castaño, S., Folch, M., García Calvo, E., Gómez-Alday, J.J., Guasch, H., Jofre, J., Lema, J.M., López de Alda, M.J., Lucena, F., Moreno-Amich, R., Muñoz, I., Nieto, J.M., Omil, F., Ortiz, I., Romaní, A., Sabater, S., Salgot, M., Sánchez-Vila, X., Sanz, D., Sonia Suárez, S., Torrens, A., 2003b. *Aguas continentales Gestión de recursos hídricos, tratamiento y calidad del agua*. ISBN: 978-84-00-08664-0
- Bergh, Ø., Børsheim, K.Y., Bratbak, G., Helda, IM., 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340: 467–68
- Baker, T.J., Tyler, C.R., Tamara S. Galloway, T.S., 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution*, 186: 257-271
- Berglund, O., Larsson, P.; Ewald, G., Okla, L., 2001. The effect of lake trophy on lipid content and PCB concentrations in planktonic food webs. *Ecology*, 82; 4: 1078–1008
- Berrojalbiz, N.; Dachs, J.; del Vento, S.; Ojeda, M. J.; Valle, M.C.; Castro-Jiménez, J., Mariani, G., Wollgast, J., Hanke, G., 2011. Persistent organic pollutants in Mediterranean seawater and processes affecting their accumulation in plankton. *Environmental Science and Technology*, 45; 10: 4315–4322
- Berrojalbiz, N., Dachs, J., Ojeda, M.J., Valle, M.C., Castro- Jiménez, J., Wollgast, J., Ghiani, M., Hanke, G., Zaldivar, J.M., 2011. Biogeochemical and physical controls on concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and plankton of the Mediterranean and Black seas. *Global Biogeochemical Cycles*, 25; 4 n/a10.1029/2010GB003775

Bettarel, Y., Bouvy, M., Dumont, C., & Sime-Ngando T., 2006. Virus-bacterium interactions in water and sediment of West African inland aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5274–5282

Bird, D.F., Juniper, S.K., Ricciardi-Rigault, M., Martineu, P., Prairie, Y.T., and Calvert, S.E., 2001. Subsurface viruses and bacteria in Holocene/Late Pleistocene sediments of Saanich Inlet, BC: ODP Holes 1033B and 1034B, Leg 169S. *Marine Geology*, 174: 227–239

Biswas, P., & Wu, C.Y., 2005. Nanoparticles and the Environment. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 55:7 08-746

Broman, D., Näf, C., Rolff, C., Zebühr, Y., Fry, B., Hobbie, J., 1992. Using ratios of stable nitrogen isotopes to estimate bioaccumulation and flux of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in two food chains from the northern Baltic. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11: 331–345

Brar, S.K., Verma, M., 2011. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30: 4–17

Bratbak, G., Egge, J. K. & Heldal, M. 1993. Viral mortality of the marine alga *Emiliania huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Marine Ecology Progress Series*, 93: 39–48

Breitbart, M., 2012. Marine Viruses: Truth or Dare. *Annual Review of Marine Science*, 4:425-448

Brussaard, C.P.D., Payet, J.P., Winter, C., and Weinbauer, M.G., Quantification of aquatic viruses by flow cytometry. Chapter 11, S.W. Wilhelm, M.G. Weinbauer, and C.A. Suttle [eds.] 2010. *Manual of Aquatic Viral Ecology*. Waco, TX: American Society of Limnology and Oceanography. doi:10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7

Burger, L., Furrer, G., 2009. Effects of man-made nanoparticles on the aquatic biosphere. Term paper in Biogeochemistry and Pollutant Dynamics Master Studies in Environmental Sciences

Buzea, C., Pacheco, I.I., and Kevin Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2; 17. doi: 10.1116/1.2815690

Charron, A., and Roy M. Harrison, R.M., 2009. Atmospheric nanoparticles; chapter 5 in *Environmental and Human Health Impacts of Nanotechnology* (eds) Jamie Lead and Emma Smith, ISBN978—1-4051-7634-7

Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M. & Hofmann, T., 2008. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*, 17: 326-343

Contado, C., Pagnoni, A., 2008. TiO₂ in commercial sunscreen lotion: Flow field-flow fractionation and ICP-AES together for size analysis. *Analytical Chemistry*, 80: 7594–7608

Danovaro, R., and Serresi, M., 2000. Viral abundance and virus-to-bacterium ratio in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 1857–1861

Danovaro, R., Manini, E., and Dell’Anno, A., 2002. Higher abundance of bacteria than of viruses in deep Mediterranean sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 1468–1472

Danovaro, R., Corinaldesi, M.C., 2003. Sunscreen Products Increase Virus Production Through Prophage Induction in Marine Bacterioplankton. *Microbial Ecology*, 45: 109–118

Danovaro, R., Armeni, Corinaldesi, M.C., Mei, M.L., 2003. Viruses and marine pollution *Marine Pollution Bulletin*, 46: 301–304

Danovaro, R., Corinaldesi, C., Dell’Anno, A., M. Fabiano, M., and Corselli, C., 2005. Viruses, prokaryotes and DNA in the sediments of a deep-hypersaline anoxic basin (DHAB) of the Mediterranean Sea *Environmental Microbiology*, 7; 4: 586–592 doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00727.x

Danovaro, R., Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Magagnini, M., Noble, R., Tamburini, C., & Weinbauer, M., 2008. Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems. *Nature*, 454; 28. Doi:10.1038/nature07268

Danovaro, R., Corinaldesi, C., Dell'Anno, A., Fuhrman, J.A., Jack J. Middelburg, J.J., Noble, R.T., & Suttle, C.A., 2011. Marine viruses and global climate change *FEMS Microbiology Reviews*, 35: 993–1034. DOI:10.1111/j.1574-6976.2010.00258.x

Deatherage, B.L., and Cookson, B.T., 2012. Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life *Infection and Immunity*, p. 1948–1957 doi:10.1128/IAI.06014-11

Burger, D., Schock, S., Thompson, C.S., Montezano, A.C., Hakim, A.M., Touyz, R.M., 2013. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)*, 124: 423–441

Capek, I., 2015. Viral nanoparticles, noble metal decorated viruses and their nanoconjugates. *Advances in Colloid and Interface Science* 222:119–134

García-Otero, N., Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, A., 2013a. Size exclusion and anion exchange high performance liquid chromatography for characterizing metals bound to marine dissolved organic matter. *Analytica Chimica Acta* 760: 83–92

Calzolari, L., Gilliland, D., Rossi, F., 2012. Measuring nanoparticles size distribution in food and consumer products: a review, *Food Additives and Contaminants. Part A*, 29; 1183–1193

Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L., Aitken, R., Watkins, R., 2008. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives and Contaminants. Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. 25: 241–258

Chen, O., Yin, D., Hu, X., Wang, R., Zhang, C., 2014. The effect of nC60 on tissue distribution of ibuprofen in *Cyprinus carpio*. *Science of the Total Environment* 496: 453–460

Cheng, L.C., Jiang,X., Wang, J., Chen C., and Liu, R.S., 2013. Nano–bio effects: interaction of nanomaterials with cells. *Nanoscale*, 5; 3547

Clarke, A.D., Owens, S.R., and Jingchuan, Z., 2006. An ultrafine sea-salt flux from breaking waves: Implications for cloud condensation nuclei in the remote marine atmosphere. *Journal of Geophysical Research*, 111: 1-2

Cochran, P.K., Paul, J.H., 1998. Seasonal Abundance of Lysogenic Bacteria in a Subtropical Estuary. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2308–2312

Danovaro, R., Corinaldesi, C., Filippini, M., Fischer, U.R., Gessner, M.O., Jacquet, S., Magagnini, M. & Velimirov, B., 2008. Viriobenthos in freshwater and marine sediments: a review. *Freshwater Biology*, 53:1186–1213

Doll, T.A.P.F., Raman, S., Dey, R., Burkhard, P., 2013 Nanoscale assemblies and their biomedical applications. *Journal of the Royal Society Interface*, 10; 80: 20120740

Drake, L.A., Choi, K.H., Haskell, A.G.E., and Dobbs, F.C., 1998. Vertical profiles of virus-like particles and bacteria in the water column and sediments of Chesapeake Bay, USA. *Aquatic Microbial Ecology*, 16: 17–25

Echegoyen, Y., Nerín, C., 2013. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food and Chemical. Toxicology*, 62C: 16–22

Echeveste, P., Berrojalbiz, N., Dachs, J., Agustí, S., 2010a. Decrease in the abundance and viability of oceanic phytoplankton due to trace levels of organic pollutants. *Chemosphere*, 81: 161-168

Echeveste, P., Agustí, S., Dachs, J., 2010b. Cell size dependence of additive versus synergetic effects of UVR and PAHs on oceanic phytoplankton. *Environmental Pollution*, 159: 1307-1316

Echeveste, P., Agustí, S., Tovar-Sánchez, A., 2012. Toxic thresholds of cadmium and lead to oceanic phytoplankton: cell size and ocean basins dependent effects. *Environmental and Toxicological Chemistry*, 31: 1887-1894

Echeveste, P., Tovar-Sánchez, A., S. Agustí, S., 2014. Tolerance of polar phytoplankton communities to metals. *Environmental Pollution*, 185: 188-195

Farré, M., Gajda-Schranz, K., Kantiani, L., Barceló, D., 2009. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393: 81-95

Fedotov, P.S., Vanifatova, N.G., Shkinev, B. Y. Spivakov, Y., 2011. Fractionation and characterization of nano- and microparticles in liquid media. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 40: 1787–1804

Filippini, M., Buesing, N., Bettarel Y., Sime-Ngando, T.. & Gessner, M.O., 2006. Infection paradox: high abundance but low impact of viruses on freshwater benthic prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4893–4898

Frouin, H., Dangerfield, N., Macdonald, R. W., Galbraith, M., Crewe, N., Shaw, P., Mackas, D., Ross, P. S. 2013. Partitioning and bioaccumulation of PCBs and PBDEs in marine plankton from the Strait of Georgia, British Columbia, Canada. *Progress in Oceanography*. 115, 65–75

Fuhrman, J. A. & Noble, R. T. 1995. Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnol. Oceanogr*, 40: 1236–1242

Galbán-Malagón, C.J., del Vento, S., Berrojalbiz, N., Ojeda, M. J., Dachs, J., 2013. Polychlorinated biphenyls, hexachlorohexanes and hexachlorobenzene in seawater and phytoplankton from the Southern Ocean (Weddell, South Scotia, and Bellingshausen Seas). *Environmental Science and Technology*, 47; 11: 5578–5587

Gallego-Urrea, J.A., Tuoriniemi, J., Hassellöv, M., 2011. Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples, *TrAC Trends in Analytical. Chemistry*, 30: 473–483

García-Otero, N., Peña-Vázquez, E., Carmen Barciela-Alonso, M., Bermejo-Barrera, P., and Moreda-Piñeiro, A., 2013b. Two-Dimensional Isoelectric Focusing OFFGEL and

Microfluidic Lab-on-Chip Electrophoresis for Assessing Dissolved Proteins in Seawater. *Analytical Chemistry*, 85: 5909–5916. [dx.doi.org/10.1021/ac400669c](https://doi.org/10.1021/ac400669c)

García-Otero, N., Herbello-Hermelo, P., Domínguez-Gonzalez, R., Aboal-Somoza, M., Moreda Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P., 2013c. Evaluation of tangential flow ultrafiltration procedures to assess trace metals bound to marine dissolved organic matter. *Microchemical Journal*, 110: 501–509

García-Otero, N., Barciela-Alonso, M.C., Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, A., Jiménez, M.S., Gómez, M.T., Castillo, J.R., 2013d. Assessment of metals bound to marine plankton proteins and to dissolved proteins in seawater. *Analytica Chimica Acta*, 804: 59–65

García-Otero, N., Alonso-Lorenz, J., Barciela-Alonso, M.C., Pilar Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, A., 2015. Developments on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for identifying dissolved and particulate proteins in seawater after two-dimensional sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. *Microchemical Journal*, 122: 50–56

Gerba, C.P. and Goyal, S.M., 1992. *Methods in Environmental Virology*, 392pp. Marcel Dekker, New York

Gobler, C.J., Hutchins, D.A., Fisher, N.S., Cosper, E.M. & Sanudo-Wilhelmy, S.A., 1997. Release and bioavailability of C, N, P, Se, and Fe following viral lysis of a marine chrysophyte. *Limnology and Oceanography*, 42: 1492–1504

González-Dávila, M., 1995. The role of phytoplankton cells on the control of heavy metal concentration in seawater. *Marine Chemistry*, 48: 215-236

Hassellöv, M., and Kammer, F. V. D., 2008. Nanogeoscience: Iron oxides as geochemical nanovectors for metal transport in soil-river systems. *Elements*, 4: 6: 401–406

Heroult, J., Nischwitz, V., Bartczak, D., Goenaga-Infante, H., 2014. The potential of asymmetric flow field-flow fractionation hyphenated to multiple detectors for the

quantification and size estimation of silica nanoparticles in a food matrix. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406: 3919–3927

Hewson, I., and Fuhrman, J.A., 2003 Viriobenthos production and virioplankton sorptive scavenging by suspended sediment particles in coastal and pelagic waters. *Microbial Ecology*, 46: 337–347

Howard, A.G., 2010. On the challenge of quantifying man-made nanoparticles in the aquatic environment, *Journal of Environmental Monitoring*, 12: 135–142

Jang, S.C., Kim, O.Y., Yoon, C.M., Choi, D.S., Roh, T.Y., Park, J., Nilsson, J., Lotvall, J., Kim, Y.K., Gho, Y.S., 2013. Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors. *ACS Nano*, 7; 9: 7698-7710

Jenkins, S.V., Qu H., Mudalige, T., Ingle, T.M., Wang, R., Wang, F., Howard, P.C., Chen, J., Zhang, Y., 2015. Rapid determination of plasmonic nanoparticle agglomeration status in blood, *Biomaterials*, 51: 226–237

Jiang, SC., Paul, J.H., 1994. Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. *Marine Ecology Progress Series*, 104; 163-172

Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., Turbide, C., 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 262: 9412-9420

Jover, L.F., Effler, T.C., Buchan, A., Wilhelm, S.W., and Weitz, J.S., 2014. The elemental composition of virus particles: implications for marine biogeochemical cycles. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 519–528 doi:10.1038/nrmicro3289

Knauer, G.A., Martin, J.H., 1972. Mercury in a marine pelagic food chain. *Limnol. Oceanography*, 17: 868-876

Koopmans, G.F., Hiemstra, T., Regelink, I.C., Molleman, B., Comans, R.N.J., 2015. Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation of Manufactured Silver Nanoparticles Spiked into Soil Solution, *Journal of Chromatography A*, 1392: 100–109

Kuiper, J., 1981a. Fate and effects of cadmium in marine plankton communities in experimental enclosures. *Marine Ecology Progress Series*, 6: 161-174

Kuiper, J., 1981b. Fate and effects of mercury in marine plankton communities in experimental enclosures. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 5: 106-134

Laborda, F., Bolea, E., Jiménez-Lamana, J., 2014. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: A powerful tool for nanoanalysis, *Analytical Chemistry*, 86: 2270–2278

Laborda, F., Bolea, E., Cepriá, G., Gómez, M.T., Jiménez, M.S., Pérez-Arantegui, J., Castillo, J.R., 2015. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytica Chimica Acta* (en revisión)

Larsson, P., Andersson, A., Broman, D., Nordbäck, J., Lundberg, E. 2000. Persistent Organic Pollutants (POPs) in Pelagic Systems. *Ambio*, 29; 4–5: 202–209

Lead, J.R., Valsami-Jones, E., 2014. *Nanoscience and the environment*. Elsevier, Radarweg 29, PO Box 211, 1000 AE Amsterdam, Netherlands. The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK 225 Wyman street, Waltham, MA 02451, USA. ISBN: 978-0-08-099408-6

Lewicka, Z.A., Benedetto, A.F., Benoit, D.N., Yu, W.W., Fortner, J.D., Colvin, V.L., 2011. The structure, composition, and dimensions of TiO₂ and ZnO nanomaterials in commercial sunscreens, *Journal of Nanoparticles Research*, 13: 3607–3617.

Liang, Y., Li, L., Luo, T., Zhang, Y., Zhang, R., Jiao, N., 2014. Horizontal and Vertical Distribution of Marine Virioplankton: A Basin Scale Investigation Based on a Global Cruise *PLoS ONE* 9(11): e111634. doi:10.1371/journal.pone.0111634

Lippert, P.C., Zachos, J.C., 2007. A biogenic origin for anomalous finegrained magnetic material at the Paleocene–Eocene boundary at Wilson Lake, New Jersey. *Paleoceanography*, 22:A4104

López-Lorente, A.I., Simonet, B.M., Valcárcel, M., 2011. Electrophoretic methods for the analysis of nanoparticles, *Trends in Analytical Chemistry*, 30: 58–71

Lou, B., Liao, X., Wu, M., Cheng, P., Yin, C., Fei, Z., 2005 High-density lipoprotein as a potential carrier for delivery of a lipophilic antitumoral drug into hepatoma cells. *World Journal of Gastroenterology*, 11:954-959

Lux Research, 2008. Nanomaterials State of the Market Q3 2008: Stealth Success, Broad Impact. Report. https://portal.luxresearchinc.com/research/document_excerpt/3735

Marion, T., Tronczynski, J., Harmelin-Vivien, M., Tixier, C., Carlotti, F., 2014 PCB concentrations in plankton size classes, a temporal study in Marseille Bay, Western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 89; 1–2: 331–339

Mason, P., 2003. Point source contamination of surface waters by pesticides: implications for management. Thesis Doctoral, Coventry University

Mei, M.L., and Danovaro, R., 2004. Viral production and life strategies in aquatic sediments. *Limnology Oceanography*, 49: 459–470

Metreveli, G., Philippe, A., Schaumann, G.E., 2015. Disaggregation of silver nanoparticle homoaggregates in a river water matrix, *Science of the Total Environment*, 535; 1: 35–44

Middelboe, M., Glud, R.N., and Finster, K., 2003. Distribution of viruses and bacteria in relation to diagenetic activity in an estuarine sediment. *Limnology Oceanography* 48: 1447–1456

Middelboe, M., 2008a. Microbial disease in the sea: effects of viruses on marine carbon and nutrient cycling. In: *Infectious Disease Ecology: Effects of Ecosystems on Disease and of Disease on Ecosystems* (Eds R.S. Ostfeld, F. Keesing & V.T. Eviner), pp. 242–259. Princeton University Press, Princeton, NJ

Middelboe, M., Jacquet, S., and Weinbauer, M., 2008b. Viruses in freshwater ecosystems: an introduction to the exploration of viruses in new aquatic habitats. *Freshwater Biology* 53, 1069–1075 doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02014.x

Miller R, Lenihan H, Muller E, Tseng N, Hanna S, et al., 2010. Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Environmental Science and Technology*, 44: 7329–7334

Miller, R.J., Bennett, S., Keller, A.A., Pease, S., Lenihan, H.S., 2012. TiO₂ Nanoparticles Are Phototoxic to Marine Phytoplankton. *PLoS ONE*, 7; 1: e30321.doi:10.1371/journal.pone.0030321

Mitrano, D.M., Leshner, E.K., Bednar, A., Monserud, J., C.P. Higgins, C.P., Ranville, F.J., 2012. Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 115–121

Nabiul Afrooz, A.R.M., Khan, I.A., Hussain, S.M., and Saleh, N.B., 2013. Mechanistic Heteroaggregation of Gold Nanoparticles in a Wide Range of Solution Chemistry. *Environmental Science and Technology*, 47: 1853–1860. dx.doi.org/10.1021/es3032709

Nanotechnology: a realistic market assessment. Available from www.bccresearch.com/report/nanotechnology-market-applications-products-nan031e.html. Accessed 25 September 2015

Nowack, B., Baalousha, M., Bornhöft, N., Chaudhry, Q., Cornelis, G., Cotterill, J., Gondikas, A., Hassellöv, M., Lead, J., Mitrano, D.M., von der Kammer, F., and Wontner-Smith, T., 2015. Progress towards the validation of modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials by analytical measurements. *Environmental Science Nano*, 2; 421

Okumura, Y., Yamashita, Y., Kohno, Y. 2004. Bioaccumulation of PCDD/Fs and Co-PCBs in lower-trophic-level organisms in Sendai Bay, Japan. *Water, Air, and Soil Pollution*, 159; 1: 291–312

Pacton, M., Wacey, D., Corinaldesi, C., Tangherlini, M., Kilburn, M.R., Gorin, G.E., Danovaro, R., & Vasconcelos, C., 2014. Viruses as new agents of organomineralization in the geological record. *Nature Communications*, 5: 4298. DOI: 10.1038/ncomms5298

Pegtel D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A., Hopmans E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Wurdinger, T., Middeldorp, J.M., 2010. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedures of Natural Academy of Sciences USA*, 107: 6328-6333

Paul, J.H., Rose, J.B., Jiang, S.C., Kellog, C.A., and Dickson, L., 1993. Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 718–724

Peters, R.J.B., Van Bommel, G., Herrera-rivera, Z., Helsper, J.P.F.G., Hans, J.P., Weigel, S., Tromp, P.C., Oomen, A.G., Rietveld, A.G., Bouwmeester, H.M., 2014. Characterisation of titanium dioxide nanoparticles in food products: Analytical methods to define nanoparticles, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 6285–6293

Peters, R., Herrera-Rivera, Z., Undas, A., van der Lee, M., Marvin, H., Bouwmeester, H., Weigel, S., 2015. Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30: 1274–1285

Philippe, A., Schaumann, G.E., 2014. Evaluation of hydrodynamic chromatography coupled with uv-visible, fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry detectors for sizing and quantifying colloids in environmental media. *PLoS One*, 9: 1–9

Pomeroy, L.R., 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience*, 24: 499–504

Proulx, K., Wilkinson, K.J., 2014. Separation, detection and characterisation of engineered nanoparticles in natural waters using hydrodynamic chromatography and multi-method detection (light scattering, analytical ultracentrifugation and single particle ICP-MS). *Environmental Chemistry*, 11: 392–401

Reichenberger, S., 2005. Field-scale risk assessment for diffuse-source pesticide inputs into German surface waters. *Tesis Doctoral*, Justus-Liebig-Universität Giessen

Reed, R.B., Faust, J.J., Yang, Y., Doudrick, K., Capco, D.G., Hristovski, K., Westerhoff, P., 2014. Characterization of nanomaterials in metal colloid-containing dietary supplement drinks and assessment of their potential interactions after ingestion, *ACS Sustainable Chemical Engineer*, 2: 1616–1624

Richardson, S.D., and Ternes, T.A., 2014. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*, 86, 2813–2848. [dx.doi.org/10.1021/ac500508t](https://doi.org/10.1021/ac500508t)

Ryan, R.O., 2010. Nanobiotechnology applications of reconstituted high density lipoprotein. *Journal of Nanobiotechnology*, 8: 28

Sadik, O.A., Zhou, A.L., Kikandi, S., Du, N., Wang, Q., Varner, K., 2009. Sensors as tools for quantitation, nanotoxicity and nanomonitoring assessment of engineered nanomaterials. *Journal of Environmental Monitoring*, 1: 1782–800

Sadik, O.A., Du, N., Kariuki, V., Okello, V., Bushlyar, V., 2014, Current and emerging technologies for the characterization of nanomaterials. *ACS Sustainable Chemical Engineer*, 2: 1707–1716

Sandaa, R.A., 2008. Burden or benefit? Viruse host interactions in the marine environment *Research in Microbiology*, 159: 374-381

Sandaa, R.A., Payet, J.P., Winter, C., and Weinbauer, M.G., 2010. Quantification of aquatic viruses by flow cytometry. Chapter 11, S.W. Wilhelm, M.G. Weinbauer, and C.A. Suttle [eds.] 2010. *Manual of Aquatic Viral Ecology*. Waco, TX:American Society of Limnology and Oceanography, [doi:10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7](https://doi.org/10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7)

Scanlan, D., 2014. Bacterial Vesicles in the Ocean, [10.1126/science.1248566](https://doi.org/10.1126/science.1248566)

Serpone, N., Dondi, D., Albini, A., 2007. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganic Chimica Acta*, 360: 794–802

Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O.C., Langer, R., 2010. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Letters*, 10: 3223-3230

Sobek, A.; Reigstad, M.; Gustafsson, O. 2006. Partitioning of polychlorinated biphenyls between arctic seawater and size-fractionated zooplankton. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 1720–1728

Sobsey, M.D., Meschke, J.S., 2003. Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin. WHO, Geneva, Switzerland.http://www.unc.edu/courses/2008spring/envr/421/001/WHO_VirusSurvivalReport_21Aug2003.pdf

Somchue, P.M-M. W., Shiowatana, J., Siripinyanond, A., 2014. Flow field-flow fractionation for particle size characterization of selenium nanoparticles incubated in gastrointestinal conditions. *Food and Research International*, 57: 208–209

Spencer, R.A., 1955. Marine bacteriophage. *Nature*, 175: 690–691

Surugau, N., Urban, P.L., 2009. Electrophoretic methods for separation of nanoparticles, *Journal of Separation Science*, 32: 1889–1906

Suttle, C.A., 1994. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microbial Ecology*, 28: 237–243

Suttle, C.A. 2000. The ecological, evolutionary and geochemical consequences of viral infection of cyanobacteria and eukaryotic algae. Chapter 6 (pp. 248–286) in *Viral Ecology*, C.J. Hurst (ed.), Academic Press, London, 639 pp

Suttle, C.A., 2005. Viruses in the sea. *Nature*, 437: 356–61

Suttle, C.A., 2007. Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature Reviews of Microbiology*, 5: 801–12

Swackhamer, D.L., Skoglund, R.S. 1993. Bioaccumulation of PCBs by algae: Kinetics versus equilibrium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 831–838

Taylor, W.D., Carey, J.H., Lean, D.R.S., McQueen, D.J., 1991. Organochlorine concentrations in the plankton of lakes in Southern Ontario and their relationship to plankton biomass. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 48: 1960–1966

Taylor, G., Iabichella, M., Ho, T.-Y., Scranton, M., Thunell, R., Muller-Karger, F., and Varela, R., 2001. Chemoautotrophy in the redox transition zone of the Cariaco basin: a significant midwater source of organic carbon production. *Limnology Oceanography*, 46: 148–163

Taylor, G.T., Hein, C., and Iabichella, M., 2003. Temporal variation in viral distribution in the anoxic Cariaco Basin. *Aquatic and Microbial Ecology*, 30: 103–116

Theil EC., 2013. Ferritin: the protein nanocage and iron biomineral in health and in disease. *Inorganic Chemistry*, 52: 12223-12233

Thomas, T., Bahadori, T., Savage, N., Thomas, K., 2009. Moving toward exposure and risk evaluation of nanomaterials: challenges and future directions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 1; 4:426-33. doi: 10.1002/wnan.34

Tiede, K., Boxall, AB.A., Tiede, D., Tear, S.P., David, H., Lewis, J., 2009. A robust size characterisation methodology for studying nanoparticle behaviour in "real" environmental samples, using hydrodynamic chromatography coupled to ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24: 964–72

Tiede, K., Boxall, A.B.A., Wang, X., Gore, D., Tiede, D., Baxter, M., David, H., Tear, S.P., Lewis, J., 2010. Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25: 1149–54

Trivedi, P., Dyer, J. A., and Sparks, D. L., 2003. Lead sorption onto ferrihydrite. A macroscopic and spectroscopic assessment. *Environmental Science and. Technology*, 37: 908–914

Viaud S, Thery C, Ploix S, Tursz T, Lapierre V, Lantz O, Zitvogel L, Chaput N., 2010. Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next?. *Cancer Research*, 70: 1281-1285

Von der Kammer, F., Ferguson, P.L., Holden, P.A., Masion, A., Rogers, K.R., Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., Unrine, J.M., 2012. Analysis of engineered nanomaterials in

complex matrices (environment and biota): general considerations and conceptual case studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 32–49

Walsh, G.E., 1978. Toxic Effects of Pollutants on Plankton. Chapter 12 Principles of Ecotoxicology *Edited by: G. C. Butler - Director, National Research Council, Division of Biological Sciences, Ottawa, Canada, Published on behalf of the: Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE) of the International Council of Scientific Unions (ICSU) in collaboration with the United Nations Environment Programme; by: JOHN WILEY & SONS Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Copyright 1978: Scientific Committee on Problems of the Environment*

Wan, Y., Hu, J.; Yang, M., An, L., An, W., Jin, X.; Hattori, T., Itoh, M., 2005. Characterization of trophic transfer for polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, non- and mono-ortho polychlorinated biphenyls in the marine food web of bohai bay, North China. *Environmental Science and Technology*, 39; 8: 2417–2425

Weinbauer, M.G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 127–181

Weitz, J.S., Stock, C.A., Wilhelm, S.W., Bourouiba, L., Coleman, M.L., Buchan, A., Follows, M.J., Fuhrman, J.A., Jover, L.F., Lennon, J.T., Middelboe, M., Sonderegger, D.L., Suttle, C.A., Taylor, B.P., Thingstad, T.F., Wilson, W.H., and Wommack K.E., 2014. A multitrophic model to quantify the effects of marine viruses on microbial food webs and ecosystem processes. *The ISME Journal*, 1–13

Wigginton, N. S., Haus, K. L. & Hochella, M. F. Jr., 2007. Aquatic environmental nanoparticles. *Journal of Environmental Monitoring*, 9: 1306-1316

Wilhelm, S.W., Suttle, C.A., 2000. Viruses as regulators of nutrient cycles in aquatic environments. In: C.R Bell, M Brylinsky, P Johnson Green (eds) *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proc VIII Int Symp Microb Ecol*, Halifax, Canada, pp 551–556

Wilhelm, S., & Weinbauer, M. 2014. Marine viruses. Retrieved from <http://www.eoearth.org/view/article/154482>

Wommack, K. E., Ravel, J., Hill, R. T., Chun, J. S. & Colwell, R. R., 1999. Population dynamics of Chesapeake bay virioplankton: total-community analysis by pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 231–240

Wommack, K.E., Colwell, R.R., 2000. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 69–114

Yamashita H, Iwahori K, Kumagai S., 2010. Ferritin in the field of nanodevices. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800; 8: 846-857

Yeager, J.G. & O'Brien, R.T., 1979. Structural Changes Associated with Poliovirus Inactivation in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 38; 4: 702-709

Zhang, S., Jiang, Y., Chen, C.S., Spurgin, J., Schwehr, K.A., Quigg, A., Wei-Chun Chin,§ W., and Peter H. Santschi, P.H., 2012. Aggregation, Dissolution, and Stability of Quantum Dots in Marine Environments: Importance of Extracellular Polymeric Substances. *Environmental Science and Technology*, 46: 8764–8772 [dx.doi.org/10.1021/es301000m](https://doi.org/10.1021/es301000m)

ZoBell, C.E. 1946. *Marine Microbiology*. Chronica Botanica Co: Waltham, MAxv, 240pp

