

**UNIVERZITA PARDUBICE**

**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**ÚSTAV ENVIRONMENTÁLNÍHO A CHEMICKÉHO INŽENÝRSTVÍ**

**VLIV FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ  
NANOMATERIÁLŮ A EXPOZIČNÍCH MÉDIÍ  
NA VÝSLEDKY TESTŮ EKOTOXICITY**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**AUTOR PRÁCE: Ing. Jakub Opršal**

**VEDOUCÍ PRÁCE: doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.**

**2016**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
**INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL AND CHEMICAL ENGINEERING**

**IMPACT OF PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES  
OF NANOMATERIALS AND EXPOSURE MEDIA  
ON RESULTS OF ECOTOXICITY TESTS**

**DISSERTATION**

**AUTOR: Ing. Jakub Opršal**

**SUPERVISOR: assoc. prof. Miloslav Pouzar**

**2016**

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1. 8. 2016

Jakub Opršal

Na tomto místě bych rád vyjádřil svůj velký dík lidem, kteří se podíleli na vzniku této odborné kvalifikační práce, která se zdá být posledním krokem k možnosti dosažení nejvyššího vysokoškolského vzdělání.

Nejprve bych rád poděkoval nejen špičkovým odborníkům, ale vývojem života i dobrým přátelům. Vedoucímu mé disertační práce doc. Ing. Miloslavu Pouzarovi, Ph.D. a klíčovému konzultantovi dosažených výsledků Ing. Petru Knotkovi, Ph.D. Bez jejich vedení, konzultací a množství času, který věnovali nejen formování mé vědecké činnosti, ale i mé osobnosti, by nic z prezentovaného nebylo možno naplnit. Petru Knotkovi patří navíc zvláštní dík za měření AFM.

Další dík patří doc. Ing. Ludvíku Benešovi, CSc. za měření XRD spekter, Ing. Milanu Vlčkovi, CSc. za pořizování SEM fotografií a Naděždě Špácové za měření ICP-OES.

Velký dík patří mamince. Díky ní vím, že člověk prohraje až poté, co se vzdá.

A poslední dík patří mé ženě. Její důvěra, pochopení, povzbuzování a klid, s kterým obrušuje můj neklid, byly zcela zásadní.

# OBSAH

OBSAH .....	5
CÍLE PRÁCE.....	16
Dílčí cíl 1 – syntéza a charakterizace chování nanočástic.....	16
Dílčí cíle 2 – modifikace stávajících testů ekotoxicity .....	17
2a) – testy s řízenou velikostí aglomerátů .....	17
2b) – testy v půdních matricích.....	18
Dílčí cíl 3 – modifikace povrchu nanočástic a buněčné testy .....	19
ÚVOD .....	20
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	21
1.1 Parametry ovlivňující ekotoxicitu nanomateriálů .....	21
1.1.1 Nanočástice ve vodním prostředí .....	23
1.1.2 Nanočástice v půdách.....	28
1.2 Způsoby charakterizace nanomateriálů .....	29
1.2.1 Dynamický rozptyl světla.....	30
1.2.2 Spektroskopie ve viditelné a ultrafialové části spektra .....	34
1.2.3 Mikroskopie atomárních sil .....	38
1.2.4 Elektronová mikroskopie.....	39
1.2.5 Rentgenová strukturní analýza .....	40
1.2.6 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem .....	41
1.3 Modelové organismy .....	42
1.3.1 Buněčná kultura střevního epitelu pstruha duhového - RTgutGC .....	43
1.3.2 Hrotnatka velká ( <i>Daphnia magna</i> ).....	44
1.3.3 Dáňio pruhované ( <i>Danio rerio</i> ) .....	45
1.3.4 Kapr obecný ( <i>Cyprinus carpio</i> ).....	46
1.3.5 Roupice ( <i>Enchytraeus crypticus</i> ) .....	48

2	PRAKTICKÁ ČÁST .....	49
2.1	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - Plnění dílčích cílů 1.....	49
2.1.1	Syntéza Ag NPs .....	49
2.1.2	Charakterizace Ag NPs.....	51
2.1.3	Testy dle OECD – hrotnatka velká.....	55
2.1.4	Testy dle OECD – dánío pruhované.....	57
2.2	VÝSLEDKY A DISKUZE - Plnění dílčích cílů 1 .....	58
2.2.1	Charakterizace Ag NPs.....	58
2.2.2	Testy dle OECD – hrotnatka velká.....	71
2.2.3	Testy dle OECD – dánío pruhované.....	74
2.3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - Plnění dílčích cílů 2a .....	79
2.3.1	Vliv snížení iontové síly expozičního média na přežití embryí .....	79
2.3.2	Modifikace testu vývojové toxicity Ag NPs – dánío pruhované.....	80
2.3.3	Modifikace testu vývojové toxicity Ag NPs – kapr obecný .....	83
2.4	VÝSLEDKOVÁ ČÁST - Plnění dílčích cílů 2a .....	84
2.4.1	Vliv snížení iontové síly expozičního média na přežití embryí .....	84
2.4.2	Modifikace testů vývojové toxicity Ag NPs – dánío pruhované.....	85
2.4.3	Modifikace testu vývojové toxicity Ag NPs – kapr obecný .....	88
2.5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - Plnění dílčích cílů 2b .....	93
2.5.1	Nanočástice a modelový organismus .....	95
2.5.2	Příprava expozičních gelů.....	96
2.6	VÝSLEDKOVÁ ČÁST - Plnění dílčích cílů 2b.....	98
2.6.1	Charakterizace nanočástic.....	98
2.6.2	Test toxicity Zn <sup>2+</sup> .....	104
2.6.3	Testy toxicity ZnO NPs.....	105

2.7	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - Plnění dílčích cílů 3 .....	108
2.7.1	Syntéza Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs .....	109
2.7.2	Testy toxicity .....	111
2.8	VÝSLEDKOVÁ ČÁST - Plnění dílčích cílů 3.....	116
2.8.1	Charakterizace Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs.....	116
2.8.2	Testy cytotoxicity.....	121
2.8.3	Akumulace a prostup.....	123
3	ZÁVĚR.....	127
4	SEZNAM LITERATURY .....	131
	PŘÍLOHY .....	140

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Osud a transformace nanomateriálů v životním prostředí.....	21
Obrázek 2: Znázornění pohybu částic prostředím v závislosti na jejich velikosti.....	32
Obrázek 3: Schéma typické sestavy pro měření DLS.....	33
Obrázek 4: Znázornění difrakčního obrazce DLS.....	33
Obrázek 5: Rozptýlený světelný paprsek dopadající na detektor .....	34
Obrázek 6: Rezonance povrchového plazmonu.....	36
Obrázek 7: Rozličné tvary UV-Vis spekter Ag NPs.....	38
Obrázek 8: Životní cyklus organismu <i>Daphnia magna</i> .....	44
Obrázek 9: Chov <i>Enchytraeus crypticus</i> v CETA VÚOS a.s.....	48
Obrázek 10: Část protokolu z měření hydrodynamického průměru Ag NPs.....	53
Obrázek 11: Topologické obrazy Ag NPs získané pomocí AFM .....	66
Obrázek 12: SEM snímek Ag NPs.....	68
Obrázek 13: SEM snímek Ag NPs.....	68
Obrázek 14: SEM snímek Ag NPs.....	69
Obrázek 15: Deformace ocasní ploutve a edém páteře při testování toxicity Ag NPs .....	76
Obrázek 16: Grafické znázornění růstu hydrodynamického průměru aglomerátů Ag NPs ....	82
Obrázek 17: Shrnutí nejběžnějších deformací plůdků dávného pruhovaného .....	88
Obrázek 18: Histogramy distribucí hydrodynamických průměrů aglomerátů .....	89
Obrázek 19: Znázornění distribuce velikostí částic vodné disperze ZnO NPs .....	98
Obrázek 20: Znázornění distribuce velikostí částic vodné disperze ZnO NPs.....	99
Obrázek 21: SEM snímky agarového gelu s obsahem ZnO NPs.....	101
Obrázek 22: Výstup z ED XRF analýzy vzorků agaru s NPs .....	102
Obrázek 23: Výsledky z měření hydrodynamického průměru Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs.....	110
Obrázek 24: Přeměna nefluorescentního resazurinu na fluorescentní resofurin.....	112
Obrázek 25: Konverze acetylmethyl-5-karboxyfluoresceinu na karboxyfluorescein ...	112
Obrázek 26: Protonace barviva NeutralRed.....	113
Obrázek 27: Schématické znázornění aparatury pro měření TEER.....	115
Obrázek 28: Návrh mikroaparatury určené pro výzkum zachytu a transportu nanočástic...	115
Obrázek 29: AFM sken testovaných Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs .....	119
Obrázek 30: SEM snímky syntetizovaných Ag NPs a z nich sulfidizovaných Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs...	120
Obrázek 31: Rentgenový difraktogram Ag NPs a Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs.....	121
Obrázek 32: Porovnání obsahu stříbra v jednotlivých kompartmentech mikroaparatury.....	125



## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Hodnoty absorpčních pásů lokalizovaného povrchového plazmonu .....	37
Graf 2: Ukázka dekonvoluce UV-Vis spektra Ag NPs.....	52
Graf 3: Chování syntetizovaných Ag NPs v demineralizované vodě.....	58
Graf 4: Chování syntetizovaných Ag NPs v M <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	59
Graf 5: Porovnání rychlosti aglomerace při ozařování vzorku Ag NPs .....	60
Graf 6: Nárůst hydrodynamického průměru Ag NPs při ředění demineralizovanou vodou .....	61
Graf 7: Závislost změny $\zeta$ -potenciálu koloidních systémů o různé koncentraci Ag .....	62
Graf 8: Růst průměru Ag NPs v závislosti na koncentraci částic v M <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	64
Graf 9: Růst průměru Ag NPs v závislosti na konduktivitě M <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	65
Graf 10: Porovnání výřezů z rentgenových difraktogramů .....	70
Graf 11: Výsledek testu reprodukční toxicity Ag NPs na hrotnatce velké. ....	73
Graf 12: Závislost korigovaného procenta přežití na koncentraci Ag NPs.....	77
Graf 13: Shrnutí výsledků testování embryonální a vývojové toxicity Ag NPs.....	92
Graf 14: Míra rozpouštění ZnO NPs během testování ekotoxicity .....	103
Graf 15: Logaritmičké vyjádření korigované mortality rouspice <i>E. crypticus</i> .....	107
Graf 16: Výsledky měření velikosti hydrodynamického průměru a $\zeta$ -potenciálu nanočástic... ..	118
Graf 17: Porovnání metabolických odpovědí při testování cytotoxicity Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs. ....	121

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Kompozice média M4 a koncentrace jednotlivých složek.....	56
Tabulka 3: Souhrn výsledků testu reprodukční toxicity Ag NPs na hrotnatce velké .....	72
Tabulka 4: Výsledky testování reprodukční a vývojové toxicity AgNO <sub>3</sub> .....	75
Tabulka 5: Hodnoty LC <sub>50</sub> získané z testování reprodukční a vývojové toxicity AgNO <sub>3</sub> .....	75
Tabulka 6. Korigované procento přežití edánie testování toxicity Ag NPs.....	77
Tabulka 7. Hodnoty LC <sub>50</sub> testování Ag NPs. ....	79
Tabulka 8: Doba výměny jednotlivých expozičních koloidů Ag NPs.....	83
Tabulka 9: Korigované procento přežití v závislosti na míře naředění M203 .....	85
Tabulka 10: Korigované procento přežití v závislosti na koncentraci Ag NPs .....	87
Tabulka 11: Shrnutí dostupných dat testování toxických účinků Zn <sup>2+</sup> na půdní organismy....	104
Tabulka 12: Výsledky hydrodynamických průměrů a ζ-potenciálů Ag a Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs.....	117
Tabulka 13: Hodnoty EC <sub>50</sub> Ag a Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs pro RTgutGC .....	122
Tabulka 14: Výsledky měření epitelální bariérové integrity RTgutGC .....	124

## SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Vysvětlení zkratky
AB	barvivo AlamarBlue
AFM	mikroskopie atomárních sil
Ag@Ag <sub>2</sub> S	core-shell systém stříbro/sulfid stříbrný
CETA VÚOS	Centrum ekologie, toxikologie a analytiky, Výzkumný ústav organických syntéz
CFDA-AM	barvivo acetoxymethylester karboxyfluoresceindiacetát
DH	hydrodynamický průměr
DLS	dynamický rozptyl světla
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	fetální bovinní sérum
ICP – OES	emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
L-15	Lebowitzovo médium 15
M203	médium připravené dle normy OECD 203
M203/75	médium připravené dle normy OECD 203 naředěné na 75 % demineralizovanou vodou
M4	médium připravené dle normy OECD 202
NMs	nanomateriály
NOM	přírodní organická matrice
NPs	nanočástice
NR	barvivo Nutral Red
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PBS	fosfátový pufr
PVP	polyvinylpyrrolidon
RTgutGC	buňky střevního epitelu pstruha duhového
SDS	dodecilsíran sodný
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TOC	celkový organický uhlík
UV-Vis	spektroskopie ve viditelné a ultrafialové částic spektra
WoS	web of science
XRD	Rentgenová strukturní analýza
ŽP	životní prostředí

## SOUHRN

Prezentovaná disertační práce se zabývá problematikou testování ekotoxicity nanomateriálů a definováním významných fyzikálně-chemických parametrů nanočástic a expozičních médií, které tyto testy ovlivňují. Práce je rozdělena do tří svébytných celků, které vzájemně propojuje typické chování nanomateriálů, které je pro ně a jejich osud v životním prostředí charakteristické.

Počáteční část práce je zaměřena na syntézu a charakterizaci základních fyzikálně-chemických parametrů stříbrných nanočástic (Ag NPs) a jejich osudu v kapalných expozičních médiích. K tomuto účelu byly využívány techniky dynamického rozptylu světla (DLS), spektroskopie ve viditelné a ultrafialové části spektra (UV-Vis), mikroskopie atomárních sil (AFM), elektronové mikroskopie (SEM), rentgenové difrakční analýzy (XRD), optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP - OES) a měření  $\zeta$ -potenciálu koloidních systémů. Na charakterizační část navazují testy ekotoxicity Ag NPs ve vodných prostředích. K tomuto účelu byly použity vodní organismy hrotnatka velká (*Daphnia magna*), dánío pruhované (*Danio rerio*) a kapr obecný (*Cyprinus carpio*). Na nich bylo provedeno testování toxicity Ag NPs dle stávajících norem OECD, tak i za pomoci testů, které z norem OECD vycházejí, ale byly modifikovány s respektem ke zjištěným faktům z části charakterizační. Jelikož se aglomerační chování jeví jako jeden z hlavních problémů při testování ekotoxicity nanomateriálů ve vodných prostředích, zamýšlené modifikace měly za úkol snížit míru a rychlost aglomerace a získání monotónních závislostí dávka - účinek.

Snaha potlačit aglomeraci nanočástic během terestrických testů vedla k využití agarového gelu jako kultivačního a expozičního média pro půdní organismy. Testování ekotoxicity bylo v tomto případě prováděno na roupici *Enchytraeus crypticus* a jako testovaný nanomateriál byly zvoleny nanočástice oxidu zinečnatého v práškové formě. Na nich byly ověřovány různé přístupy k provádění dispergace v expozičním médiu a na základě fyzikálně-chemické charakterizace vzorků bylo usuzováno na vztah mezi mírou aglomerace částic a jejich toxicitou pro pokusný organismus.

Vyjma aglomerace jsou dalším procesem ovlivňujícím toxicitu nanočástic změny chemického složení jejich povrchu, které nastávají v důsledku interakce těchto částic se složkami životního prostředí. Další část práce je tedy věnována laboratorní modifikaci povrchu Ag NPs relevantní změně nanočástic v životním prostředí, jejich charakterizaci po přípravě i v expozičních médiích a buněčným testům. Ty byly provedeny na buňkách střevního epitelu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a byly koncipovány nejen jako porovnávací testy cytotoxicity, ale zároveň byly provedeny i experimenty schopnosti obou druhů těchto částic prostupovat skrz buněčné membrány do cytosolu a následně interagovat s důležitými buněčnými organelami.

**Klíčová slova:** nanočástice, stříbro, oxid zinečnatý, aglomerace, ekotoxicita, *Danio rerio*, *Cyprinus carpio*, *Enchytraeus crypticus*, RTgutGC

## TITLE

Impact of physico-chemical properties of nanomaterials and exposure media on results of ecotoxicity tests.

## ANNOTATION

The presented dissertation focuses on defining physico-chemical parameters of nanoparticles and exposure media that significantly affect the outcomes of ecotoxicological tests on nanomaterials. The dissertation is structured into three independent units that are all interconnected by the properties and behavior of nanomaterials that play a key role in their environmental fate.

In the first unit, the synthesis and characterization of the basic physico-chemical parameters of silver nanoparticles (Ag NPs) and their behavior in liquid exposure media are discussed. The applied characterization techniques were dynamic light scattering (DLS), UltraViolet-Visible spectroscopy (UV-Vis), atomic force microscopy (AFM), electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES) and  $\zeta$ -potential measurements of colloidal systems. The second unit then deals with the ecotoxicity tests of Ag NPs in aquatic environment. Ecotoxicity was tested on three aquatic organisms *Daphnia magna*, zebrafish (*Danio rerio*) and common carp (*Cyprinus carpio*) using OECD test methods as well as their modifications, which accounted for the observations from the characterization experiments. Since agglomeration appears to play a crucial role in nanomaterial ecotoxicity testing in aquatic environment. The applied modifications aimed to reduce the agglomeration rate and to obtain monotonic dose-response curves.

The effort to suppress the nanoparticle agglomeration during terrestrial ecotoxicity tests led to the application of agar gel as an exposure medium for terrestrial organisms. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in powder form was tested on enchytraeids *Enchytraeus crypticus* and the influence of different dispersion techniques on the toxicity outcomes was

examined. The evaluation of the relationship between the agglomeration rate and the toxicity for the target organism was based on the physico-chemical characterization of the samples of nanomaterials dispersed in the agar gel.

Surface chemistry and the interactions with the components of the environment are another significant factor contributing to the complexity of nanomaterial ecotoxicity. Thus the third unit focuses on an environmentally relevant surface modification of Ag NPs and the characterization of the synthesized colloids as well as their dispersions in the exposure media for cytotoxicity tests. Comparative cytotoxicity experiments with native Ag NPs and their modified counterparts were conducted using intestinal epithelial cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Penetration tests were performed to study the capability of the nanoparticles of both types to cross the cell membrane and thus interact with essential cellular organelles in the cytosol.

**Key words:** nanoparticle, silver, zinc oxide, agglomeration, ecotoxicity, *Danio rerio*, *Cyprinus carpio*, *Enchytraeus crypticus*, RTgutGC

## CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem předložené disertační práce bylo definování významných fyzikálně-chemických parametrů nanočástic a expozičních médií, které zásadním způsobem ovlivňují výsledky testů ekotoxicity nanomateriálů, nalezení vhodných způsobů charakterizace těchto parametrů a navržení takových experimentálních postupů, které povedou k minimalizaci vlivu faktorů výrazně zhoršujících reprodukovatelnost či vypovídací schopnost testů ekotoxicity nanočástic. Hlavní cíl práce byl naplňován v rámci série několika dílčích kroků, jejichž podrobný popis je uveden níže.

### Dílčí cíl 1 – syntéza a charakterizace chování nanočástic

Prvním dílčím cílem bylo ověření použitelnosti testů ekotoxicity prováděných dle stávajících norem OECD, určených především pro hodnocení účinků chemikálií rozpustných ve vodě, pro účely testování toxicity nanočástic a úprava stávajících testů OECD pro aplikaci na nanomateriály. Dalším krokem pak bylo definování významných parametrů, které negativně ovlivňují vypovídací schopnost těchto testů. Pro potřeby našich experimentů bylo nejprve nutné nalézt takový typ nanočástic, o němž bylo již v době zahájení práce známo, že je výrazně toxický pro vodní organismy a že podléhá v životním prostředí změnám, které zásadním způsobem ovlivňují jeho interakci s živými organismy. Daný materiál měl být rovněž v dostatečném množství snadno a reprodukovatelně dostupný v našich podmínkách. Těmto kritériím nejlépe vyhovovaly nanočástice Ag (Ag NPs) syntetizované ve formě koloidu z diaminstříbrného komplexu  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  pomocí redukujících cukrů (glukóza). Syntéza uvedených částic byla prováděna na našem pracovišti. Jedním z významných úkolů v první fázi práce bylo též navržení efektivního způsobu charakterizace primárních koloidů a nalezení postupů umožňujících sledovat chování nanočástic v expozičním médiu. Pro určení velikosti částic byly používány metody dynamického rozptylu světla (DLS) a spektroskopie ve viditelné a ultrafialové části spektra (UV-Vis), velikost a tvar byly dále vyhodnocovány pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) a elektronové mikroskopie (SEM). Povrchový náboj spojený se stabilitou koloidních systémů byl zjišťován měřením  $\zeta$ -potenciálu, koncentrace



v koloidech pomocí emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP - OES) a krystalická struktura částic pomocí rentgenové difrakční analýzy (XRD). Jako modelové vodní organismy byly zvoleny hrotnatka velká (*Daphnia magna*) a dánío pruhované (*Danio rerio*). OECD testy (202, 203, 211, 212) využívající těchto organismů byly v době zahájení práce nedílnou součástí baterie pro testování ekotoxicity látek pro potřeby normy REACH a byly zavedeny a validovány na partnerském pracovišti CETA VÚOS a.s. (Centrum ekologie, toxikologie a analytiky, Výzkumný ústav organických syntéz, Pardubice). Každý z organismů reprezentuje jinou trofickou úroveň (dánío - konzumenti, dafnie - producenti) a pro každý z organismů je normou OECD a následně vnitřními předpisy CETA VUOS a.s., předepsán jiný typ živného média (dle SOP č. M/52/1 medium M203 pro dánío a dle SOP č. M/40/2 médium M4 pro dafnie). Volba těchto organismů nám tedy měla umožnit postihnout okolnosti testování ekotoxicity nanomateriálů za velmi rozdílných podmínek.

## **Dílčí cíle 2 – modifikace stávajících testů ekotoxicity**

### **2a) – testy s řízenou velikostí aglomerátů**

Druhým dílčím cílem práce bylo navrhnout a ověřit funkčnost modifikací, které by vedly k odstranění hlavních problémů zjištěných při použití klasických OECD metodik pro testování ekotoxicity nanomateriálů. Modifikovány nebyly pouze postupy používané v první části práce, ale i postupy další, u nichž se dal předpokládat ten samý typ negativně působících parametrů. Z pilotních experimentů jasně vyplynulo, že procesem, který nejvýznamněji ovlivňuje reprodukovatelnost a vypovídací schopnost testů na embryu a váčkovém plůdku ryb (OECD 212), je aglomerace nanočástic a následná sedimentace vzniklých aglomerátů. Rychlost a stupeň aglomerace byly pak velmi závislé na složení expozičních médií, zejména pak na jejich iontové síle. První testovanou modifikací tedy bylo snížení iontové síly expozičního média na maximální možnou míru, která ještě umožňovala zdravý vývoj embrya a váčkového plůdku. Tento postup měl umožnit zpomalení aglomerace na únosnou mez a získání monotónních křivek dávka - účinek. V průběhu pilotních experimentů bylo rovněž konstatováno, že aglomerace probíhá různě v koloidních roztocích o různé

koncentraci nanočástic. V důsledku toho však každá koncentrační úroveň koloidu představuje směs s různým poměrem volných a aglomerovaných nanočástic, přičemž u každé z těchto složek lze důvodně předpokládat jinou nominální toxicitu. Další modifikace metodiky OECD 212 tedy spočívala v řízení maximální velikosti aglomerátů prostřednictvím proměnné rychlosti výměny expozičních médií o různých koncentracích nanočástic v průběhu semi-statického testu. Tato modifikace nám měla umožnit (i) testování koloidních systémů, které se liší koncentrací nanočástic, ale neliší se zastoupením volných částic a aglomerátů a (ii) studium vlivu velikosti aglomerátů na výsledek testu toxicity. Experimenty v této fázi práce byly prováděny jednak na plůdku dáňia pruhovaného (*Danio rerio*) a později i na plůdku kapra obecného (*Cyprinus carpio*).

## **2b) – testy v půdních matricích**

Jelikož je v půdních matricích rovněž možné předpokládat výrazný vliv aglomerace nanočástic, v daném případě navíc doprovázený různými typy interakcí testovaného materiálu se složkami půdy, byly provedeny pokusy eliminovat aglomeraci i při testech terestrické ekotoxicity. Jelikož je charakterizace nanočástic rozptýlených v klasické půdní matrici v našich podmínkách těžko řešitelným úkolem, rozhodli jsme se ověřit možnost využití agarového gelu jako kultivačního a expozičního média pro půdní organismy. Předpokládali jsme, že využití agaru povede k potlačení vlivu aglomerace nanočástic a jejich interakce se složkami půdy na výsledky experimentů. V rámci práce bylo testováno několik způsobů vnášení nanočástic do agaru, s cílem nalézt postup vedoucí k co nejvyšší míře homogenní dispergace co nejméně aglomerovaných nanočástic. Další výhodou použití agaru měl být snadnější postup charakterizace expozičního média. Testy byly v tomto případě prováděny na roupici *Enchytraeus crypticus*. Jelikož se toxicita nanočástic při terestrických experimentech pohybuje řádově výše než při testování ve vodném prostředí, nebylo s využitím námi připravených koloidů možné zajistit koncentraci Ag NPs v gelu v míře, která by byla toxikologicky významná. Z toho důvodu byly zvoleny nanočástice oxidu zinečnatého (ZnO NPs), které jsou známy svoji ekotoxicitou, a je možné je do expozičního média dávkovat

v toxikologicky významné koncentraci. S roční produkcí okolo 9 milionů tun [Ebin et al., 2016] tvoří potencionálně významný polutant životního prostředí.

### **Dílčí cíl 3 – modifikace povrchu nanočástic a buněčné testy**

Kromě aglomerace výrazně ovlivňují toxicitu nanočástic i změny chemického složení jejich povrchu, které nastávají v důsledku interakce těchto částic se složkami životního prostředí. Dalším dílčím cílem práce tedy bylo sledování vlivu uvedených změn na interakci nanočástic s buněčnými kulturami. Nejčastější změnou, která probíhá v případě nanočástic Ag je sulfidace jejich povrchu. Tento proces jsme se rozhodli modelovat v laboratorních podmínkách. Povrch Ag NPs byl cílně modifikován a poté byl studován vliv této modifikace na schopnost částic přestupovat buněčné membrány a následně interagovat s důležitými buněčnými organelami. Pro toxikokinetické experimenty a testy cytotoxicity byly použity buňky střevního epitelu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), které patřili do standardní baterie testů ekotoxicity na pracovišti, kde byly testy realizovány (EAWAG, Švýcarsko).

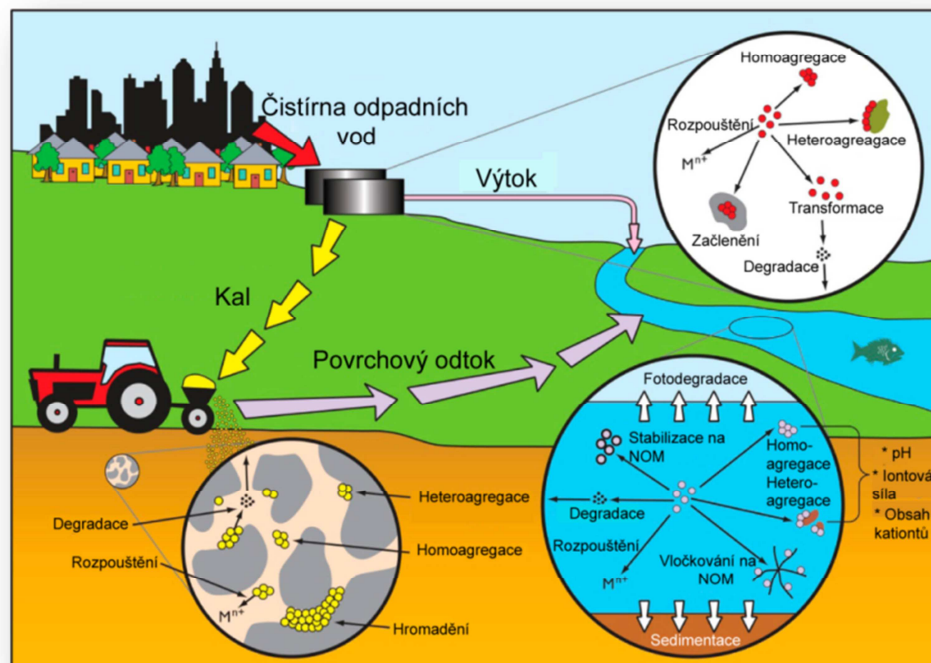
## ÚVOD

Nanotechnologie jsou považovány za jednu z klíčových oblastí technologického vývoje v 21. století a slibují v budoucnu udržitelnost včetně řady převratných inovací. Objekty v nanoměřítku, nanomateriály a nanočástice, se výrazně liší svými vlastnostmi od materiálů, jejichž velikost se pohybuje od hranice 100 nm výše a to zejména z důvodu velikosti jejich povrchu. Rostoucí trend na poli výzkumu nanotechnologií vedl k identifikaci celé řady technologicky využitelných parametrů, jako jsou unikátní magnetické, katalytické, optické, elektrické a mechanické vlastnosti, ve srovnání s materiály, jejichž velikost je nad „nano“ hranicí [Qin et al., 1999, Vasir et al., 2005, Webster et al., 2000, Farokhzad and Langer, 2009]. Nanomateriály jsou stále více využívány ke komerčním účelům jako plniva, katalyzátory, jako součást aktivních filtrů vody a v elektronice. Své uplatnění našly i v kosmetice a mikroelektronice [Nel et al., 2006]. Další široké aplikační okno nanomateriálů je v oblasti biomedicíny. Nanomateriály začínají být využívány pro cílený transport léčiv v organismu, jako biosenzory a kontrastní látky v radiologii [Vasir et al., 2005]. Tento široký, ale ne vyčerpávající výčet aplikačního potenciálu průmyslově vyráběných nanomateriálů ukazuje na vysokou pravděpodobnost přímé i nepřímé expozice člověka i životního prostředí. Nejedna toxikologická [Karmakar et al., 2014, Nel et al., 2013] a ekotoxikologická [Farre et al., 2009, Klaine et al., 2008] studie poukazuje na to, že právě ty vlastnosti nanomateriálů, kterých si tolik ceníme, mohou být též zodpovědné za jejich potencionální toxicitu. Velmi malá velikost nanočástic a poměrově k objemu extrémně velký povrch je činí velmi reaktivní. To může v důsledku vést k řadě velmi škodlivých interakcí s biologickými systémy a životním prostředím [Wang et al., 2014]. Vzhledem k tomu, že zamýšlená i nezamýšlená expozice nanomateriálům má v posledních letech výrazně rostoucí trend a ještě stále není k dispozici žádný jasný regulační pokyn na testování a hodnocení toxicity a ekotoxicity nanomateriálů, jeví se tento směr výzkumu jako více než relevantní, důležitý a potřebný [Selck et al., 2016].

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Parametry ovlivňující ekotoxicitu nanomateriálů

Nanotechnologie a využití nanomateriálů v téměř všech oblastech lidského působení má každoročně prudce stoupající tendenci. Odhady hovoří o tom, že v roce 2016 se prodá takové množství produktů obsahujících nanomateriály, které odpovídá částce 2,6 bilionu amerických dolarů [Li et al., 2016]. Úměrně ke zvyšování počtu dostupných produktů obsahujících nanomateriály, roste i potenciální riziko uvolňování těchto nanomateriálů z jejich matric. Osud a transformace uvolňujících se průmyslově vyráběných nanomateriálů v životním prostředí jsou znázorněny na **Obr. 1**. I když je užívání nanomateriálů bezesporu velice dobrou cestou k vylepšení mechanických či optických vlastností materiálů, v kterých jsou použity, stále zde zůstávají otázky ohledně potenciálních krátkodobých i dlouhodobých rizik průmyslově vyráběných nanomateriálů a ohledně jejich dopadu na životní prostředí a lidské zdraví.



Obrázek 1: Osud a transformace nanomateriálů v životním prostředí (Batley et al., 2012).

V toxikologických a ekotoxikologických kruzích panuje všeobecné povědomí o nízké míře jednoznačnosti údajů o nebezpečnosti průmyslově vyráběných nanomateriálů. V publikovaných ekotoxikologických studiích je možno nalézt data s nízkou mírou reprodukovatelnosti a konzistence. I když není možné tyto rozporů v datech připsat na vrub jednomu činiteli, nejpravděpodobnější příčinou rozporů v publikovaných datech je nedostatečná fyzikálně-chemická charakterizace nanomateriálů nejen před provedením ekotoxikologického experimentu, ale i během něho a po něm. K parametrům, které mohou způsobovat nízkou reprodukovatelnost a koherenci ekotoxikologických dat patří chyby v měření, změny v metodách experimentů, jako různé expoziční scénáře a délky expozice, různá kapalná média, ve kterých jsou nanomateriály testovány, či nízké detekční limity analytických technik.

Dnes je více než zřejmé, že průmyslově vyráběné nanomateriály mohou být bioakumulovány ve velkém množství suchozemských i vodních organismů. V době provádění prvních experimentů prezentovaných v předložené disertační práci bylo mnohem méně než dnes známo o problematice chování, transportu a osudu průmyslově vyráběných nanomateriálů v environmentálně relevantních podmínkách [Ramskov et al., 2015]. Většina experimentů popsaných do roku 2012 byla provedena na základě expozičních scénářů odpovídajících testům klasických chemikálií s využitím tradičních expozičních medií, jako jsou  $K^+$  medium, Medium 203 či Hoaglandův živný roztok [Batley et al., 2012]. Vysoké iontové síly těchto roztoků způsobují nestabilitu nanomateriálů a předurčují je k rychlé aglomeraci či agregaci. Vzhledem k tomuto faktu lze pochybovat o adekvátnosti provedených experimentů a vypovídací hodnotě dat prezentovaných do tohoto období. Dalším zásadním nedostatkem většiny dříve publikovaných studií bylo, že nezohledňovaly transformaci nanomateriálů během jejich uvolňování, akumulace a depozice v životním prostředí. V poslední době se však autoři snaží tento nedostatek napravit a již existují práce, kde je problematika environmentálních transformací nanomateriálů dle našich laboratorních zkušeností řešena uspokojivě [Louie et al., 2016].

Snaha odstranit vysokou míru nekonzistence ekotoxikologických dat a umožnit tak jejich efektivní využití v rámci tvorby norem na ochranu zdraví a životního prostředí, vedla

v roce 2012 k vytvoření „European Union–United States Communities of Research“ [Selck et al., 2016]. Cílem spolupráce vědeckých institucí zapojených v této iniciativě bylo vytvořit platformu pro sdílení postupů a metod umožňujících zaplnit mezery ve znalostech o zdravotních a environmentálních rizicích nanotechnologií. Ecotoxicology Community of Research se v letech 2012 až 2015 soustředila zejména na problematiku nanomateriálů ve vodním prostředí a doporučila zaměřit pozornost na následující okruhy klíčových otázek: i) charakterizace NMs a jejich detekce v environmentálních a biologických matricích, ii) transformace NMs v jednotlivých složkách ŽP a jejich dopad na biologickou dostupnost a toxicitu, iii) alternativní metody hodnocení expozice, iv) vliv expozičních scénářů na biologickou dostupnost a toxicitu, v) vývoj více biologicky relevantních biotestů, vi) příjem, distribuce a vylučování NMs [Selck et al., 2016]. Většina těchto klíčových otázek má svůj význam i v případě testů prováděných v jiném než ve vodním prostředí.

### **1.1.1 Nanočástice ve vodním prostředí**

K procesům, které významným způsobem ovlivňují osud nanočástic ve vodním prostředí řadíme zejména jejich agregaci a následnou sedimentaci, rozpouštění, adsorpci na přírodních koloidech a dalších pevných površích, vazbu na rozpuštěné organické látky přírodního původu (celkový organický uhlík – TOC) a stabilizaci prostřednictvím povrchově aktivních látek. Mezi další významné procesy patří biologická degradace nanomateriálů (aerobní a anaerobní), abiotická degradace (zejména hydrolýza a fotolýza), atd. Vodní prostředí obsahuje celou řadu přírodních nanočástic, jako jsou částice jílu, hydratované oxidy železa a manganu, rozpuštěné organické látky (huminové a fulvinové kyseliny) a vláknité koloidy (exopolymery), které jsou jako exsudáty vylučovány řasami a dalšími mikroorganismy (polysacharidy a proteiny). Tyto látky jsou souhrnně nazývány přírodní organické látky a označují se zkratkou NOM („natural organic matter“). Chování těchto přírodních nanomateriálů bylo v dřívějších dobách intenzivně studováno a získané poznatky tvoří základ pro porozumění osudu průmyslově vyráběných nanomateriálů ve vodním prostředí [Patil et al., 2016]. Přírodní koloidy podléhají agregaci, při níž vznikají částice o velikosti 100 –

1000 nm, což často vede k následné sedimentaci. Agregace je řízena povrchovým nábojem a velikostí částic, iontovou silou, pH a obsahem a mocností kationtů ve vodním prostředí. Obecně platí, že částice s téměř neutrálním povrchovým nábojem agregují nejrychleji. V případě přírodních koloidů i průmyslově vyráběných nanomateriálů často selhávají předpoklady vytvořené na základě DLVO (Děřjagin, Landau, Verwey a Overbeek teorie stability heterogenních koloidně disperzních soustav s vodným disperzním prostředím) a dalších podobných teorií, které popisují agregaci částic v koloidních systémech [Merk et al., 2014]. Příčinou může být polydisperzita systémů, tvar částic, který se může výrazně lišit od ideálního kulovitěho tvaru, hydrofobicita povrchů, atd. [Khan et al., 2015b].

Funkční předpověď chování nanomateriálů může být výrazně komplikována jejich povrchovou úpravou [Merk et al., 2014]. Cílem zmíněných povrchových úprav bývá zvýšení stability průmyslově vyráběných koloidů. Otázkou však zůstává, jak tato povrchová úprava ovlivní interakci průmyslových nanomateriálů s přírodními koloidy, a to zejména v případech, kdy dochází k její biodegradaci. Předpokládaná koncentrace průmyslově vyráběných nanomateriálů v přírodních vodách se obvykle pohybuje pod úrovní  $20 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Naproti tomu typická koncentrace přírodních koloidů bývá o několik řádů vyšší ( $1 - 20 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Důležitým procesem, který ovlivňuje osud nanočástic ve vodním prostředí, bude tedy heteroagregace (interakce mezi průmyslovými nanomateriály a složkami přírodních koloidů). Většina publikovaných studií je zaměřená na homoagregaci, tedy na proces vzájemné interakce průmyslově vyráběných nanomateriálů bez zahrnutí vlivu přírodních koloidů. Výjimečně publikované studie zabývající se problematikou heteroagregace nanočástic ve vodním prostředí jsou obvykle prováděny s využitím vysoké koncentrace nanomateriálů a nízké koncentrace složek přírodních koloidů. Důvodem výše popsaného uspořádání experimentu jsou pro tuto aplikaci vysoké hodnoty detekčních limitů analytických technik, které jsou využívány pro hodnocení distribuce velikostí částic v koloidech a pro studium kinetiky agregace. Jako ukázkou uvedeme např. heteroagregaci nanočástic  $\text{CeO}_2$  s přírodními koloidy v říčních vodách. Stabilita koloidů byla podstatně vyšší ve filtrované než v neupravené říční vodě [Quik et al., 2012].



Dalším významným parametrem ovlivňujícím osud průmyslově vyráběných nanočástic ve vodním prostředí je jejich interakce s rozpuštěnými organickými látkami. Bohužel většina publikací věnovaných tomuto tématu je zaměřena na problematiku vlivu huminových kyselin, méně pak na problematiku environmentálně více relevantních fulvinových kyselin a jejich solí. Interakci nanomateriálů s huminovými kyselinami výrazně ovlivňuje povrchový náboj částic, který je často silně závislý na hodnotě pH prostředí. Typickou ukázkou tohoto jevu jsou nanočástice  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  vykazující neutrální povrchový náboj při pH okolo 7,8. Pokles pH pod tuto hodnotu vede ke vzniku kladného povrchového náboje částic, který může být následně neutralizován reakcí s huminovými kyselinami. Také částice se záporným povrchovým nábojem mohou být stabilizovány prostřednictvím huminových kyselin. V daném případě hrají důležitou roli hydrofobní interakce [Baalousha, 2009]. Přestože z výsledků laboratorních testů teoreticky vyplývá schopnost huminových kyselin stabilizovat systémy průmyslově vyráběných nanomateriálů, při experimentech s reálnou přírodní vodou vede vysoká koncentrace huminových kyselin často naopak k destabilizaci systému [Town and van Leeuwen, 2016], případně vede k jednodušší komplexaci uvolněných iontů a aglomeraci nanočástic. Přítomnost huminových kyselin také usnadňuje sulfidizaci Ag NPs [Thalman et al., 2016].

Dalším parametrem, který může ovlivnit výsledky ekotoxikologických studií ve vztahu k huminovým kyselinám je fakt, že nanočástice pokryté jejich vrstvou jsou snadněji adsorbovány na povrchu částic přírodních koloidů [Bae et al., 2011]. V případě mořské vody je agregace či aglomerace průmyslově vyráběných nanomateriálů urychlována vysokou iontovou silou prostředí. Určitou míru stability vykazují pouze stericky stabilizované nanomateriály s vhodnou povrchovou úpravou. Ag NPs stabilizované PVP s negativním povrchovým nábojem vykazovaly stabilitu v roztocích modelové mořské vody až do koncentrace  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  NaCl. Nanočástice stabilizované citrátem podléhaly agregaci již při koncentraci  $0,03 \text{ mol.l}^{-1}$  NaCl. Přírodní mořská voda však obsahuje přibližně  $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$  NaCl (Huynh and Chen, 2011).

Dalším procesem, který mimo agregace a aglomerace ovlivňuje osud nanočástic ve vodním prostředí, je jejich rozpouštění. Na základě Gibbs - Thomsonova efektu

Lze usuzovat, že částice s menším průměrem a vyšším zakřivením povrchu (nanočástice) budou více rozpustné ve vodě, než částice vyšších průměrů a menšího zakřivení povrchu (mikročástice). Tato rozpustnost může v některých případech vést k přesycení roztoku a k procesu zvanému Ostwaldovo zrání, které může způsobit transformaci nanočástic v částice jiného tvaru, velikosti či krystalové struktury [May et al., 2016]. Většina kovových nanočástic má hydrofobní charakter a určitou, i když velmi nízkou, rozpustnost ve vodě. Kovové ionty uvolňované z povrchu těchto nanočástic se tedy mohou výraznou měrou podílet na jejich celkové toxicitě. Nanočástice zlata,  $\text{TiO}_2$  a  $\text{CeO}_2$  jsou ve vodě vysoce nerozpustné a nevolňují ionty téměř za žádných podmínek [Schmidt and Vogelsberger, 2009]. Avšak Ag NPs, nanočástice ZnO a Cu/CuO jsou ve vodních prostředích relativně rozpustné a v environmentálně relevantních podmínkách částečně ionty uvolňují [Liu and Hurt, 2010]. Transformace těchto rozpustných nanočástic je silně ovlivněna hodnotou pH, iontovou silou média, přítomností anorganických a organických sloučenin a dalších látek, které mohou být pro jednotlivé druhy nanomateriálů specifické. V případě Ag NPs hraje vyjma výše zmíněných parametrů velice důležitou roli koncentrace rozpuštěného kyslíku, chloridů a sulfidů [Lowry et al., 2012]. Pokud se Ag NPs vyskytnou v aerobním prostředí, které má relativně vysokou iontovou sílu a nízký obsah chloridů a sulfidů, dochází k tvorbě nanočástic AgCl a komplexních stříbrných thiolů [Levard et al., 2012]. Nejběžnějším způsobem, jakým se mohou nanomateriály dostávat do životního prostředí je jejich uvolňování z komerčně vyráběných materiálů v průběhu jejich životního cyklu a následná depozice uvolněných nanomateriálů v odpadních vodách, či čistírnách těchto odpadních vod. Impellitteri a kol. se ve své práci zabývali uvolňováním Ag NPs z oblečení, na které jsou tyto nanočástice deponovány kvůli jejich antibakteriálním a antimikotickým účinkům. Jako rozpouštědlo byla použita klasická kohoutková voda a jako bělidlo byl užit chlornan sodný. Z jejich práce plyne, že takovéto uspořádání experimentu má za následek přednostní formování AgCl už v samotném počátku přeměny Ag NPs [Impellitteri et al., 2009]. Pokud se budeme zabývat osudem a transformací Ag NPs v životním prostředí, je nezbytně nutné vystavit tyto částice působení podmínek, které jsou relevantní podmínkám v usazovacích nádržích čistíren odpadních vod. Jedná se o aerobní

prostředí s relativně nízkou konduktivitou a vysokým obsahem síry. Za takovýchto podmínek dochází k přednostnímu formování vrstvy  $\text{Ag}_2\text{S}$  okolo původní stříbrné nanočástice. Tento proces je environmentálně významný zejména z důvodu velice nízké rozpustnosti obalu  $\text{Ag}_2\text{S}$  ( $K_s = 5,92 \cdot 10^{-51}$ ), která zabrání dalšímu uvolňování stříbrného iontu z nanočástice. Jádra Ag NPs v podobě core-shell nanosystému  $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$  mohou být takto transportována vodními toky na velkou vzdálenost až do míst, kde bude možná jejich akumulace a to ať v sedimentu či ve vodních organismech.

Parametry ovlivňující chování nanomateriálů ve vodním prostředí je třeba zohlednit při přípravě koloidů pro testování ekotoxicity nanočástic v laboratorních podmínkách. Velké množství průmyslově vyráběných nanomateriálů vykazuje nízkou rozpustnost ve vodě, vysokou tendenci k aglomeraci a k rychlé sedimentaci [Selck et al., 2016]. Uvedené procesy i v laboratorních podmínkách velmi komplikují možnost přesného určení dávky nanomateriálů, jíž byl v průběhu experimentu vystaven pokusný organismus. V tekoucích vodách ovlivňuje stabilitu nanomateriálů např. turbulentní charakter proudění, přítomnost povrchově aktivních látek přírodního i antropogenního původu a vysoká koncentrace přírodních koloidů. Na míru, s jakou mají být tyto parametry zohledněny i při návrhu konkrétního laboratorního postupu testování ekotoxicity nanomateriálů, existují různé vzájemně protichůdné pohledy [Chekli et al., 2015]. V odpadních vodách se pak mohou na povrch nanočástic vázat látky, jejichž toxicita značně převyšuje vlastní toxicitu nanomateriálů. Také tento parametr je obtížné modelovat v laboratorních podmínkách. Celá řada raných prací zabývajících se ekotoxicitou nanomateriálů využívala pro stabilizaci experimentálních koloidů povrchově aktivní látky. Známa je např. práce [Fortner et al., 2005], v níž byl ke stabilizaci fullerenu  $\text{C}_{60}$  použit tetrahydrofuran (THF). Zjištěná toxicita takto stabilizovaných fullerenu popisovala spíše účinky kombinovaného systému  $\text{C}_{60}$  – THF než studovaných fullerenu jako takových. Experimenty prováděné za environmentálně relevantních podmínek by sice teoreticky měly mít vyšší vypovídací hodnotu, jejich provádění je však komplikováno zejména možnostmi dostupných laboratorních technik, jako interferencemi přírodních koloidů při analýze velikosti částic pomocí DLS, změnami charakteru vzorku při jeho přípravě pro mikroskopické techniky, vysoká hodnota pozadí při analýze za pomoci spektroskopie

ve viditelné a ultrafialové části spektra, případně sorpcí nanočástic na plastové nádoby, v nichž jsou ekotoxikologické experimenty prováděny [Malysheva et al., 2016].

### 1.1.2 Nanočástice v půdách

Osud nanomateriálů v půdních matricích je problematika cca 31 krát méně studovaná, než je tomu v případě nanomateriálů ve vodním prostředí (porovnání počtu publikované literatury, která souvisí s danými tématy pomocí aplikace Web of Science k červenci 2016), přitom půdní bezobratlí živočichové, jako jsou členovci, hlístice a kroužkovci, jsou velice významnou částí edafonu, který se podílí na mnoha důležitých půdních ekosystémových službách. Jejich funkce spočívá nejen v dekompozici a mineralizaci organické hmoty, která je naprosto nezbytná pro tvorbu humusu a půdy, ale zajišťují také koloběh živin, zlepšení půdních fyzikálních vlastností a jsou významnou součástí v mnoha suchozemských potravních sítích. Nejen z toho důvodu je vhodné se problematikou dopadu nanotechnologií na tyto živočichy zabývat hlouběji [Bouguerra et al., 2016].

Osud průmyslově vyráběných nanočástic v půdách byl dosud studován s podstatně menší intenzitou než jejich osud ve vodním prostředí. Klíčové fyzikálně - chemické parametry ovlivňující osud nanomateriálů v půdách jsou velmi podobné parametrům, které ovlivňují osud nanomateriálů ve vodách. Základním rozdílem mezi oběma prostředími je podíl pevné fáze, která v případě půd mnohem významněji ovlivňuje biologickou dostupnost deponovaných nanočástic. Dobře zpracovanou prací na toto téma je článek týmu profesora Yanga, který se zabývá testováním toxicity průmyslově vyráběných nanomateriálů na půdních organismech. Ve své práci z roku 2011 zkoumali toxicitu různě velkých a různě stabilizovaných Ag NPs. Pracovali se 7 nm Ag NPs, které byly stabilizovány citrátem, s 5 a 22 nm velkými Ag NPs, které byly stabilizovány arabskou gumou a 8 a 38 nm velkými Ag NPs stabilizovanými pomocí polyvinylpyrrolidonu. Experiment byl proveden v umělé půdě ve středně tvrdé vodě a v  $K^+$  médiu. Jako modelový organismus bylo vybráno Hád'átko obecné (*Caenorhabditis elegans*).  $EC_{50}$  v  $K^+$  médiu se pohybovala v rozmezí 0,9 až 50  $mg.l^{-1}$  Ag NPs.  $EC_{50}$  ve středně tvrdé vodě se pohybovala v rozmezí 0,09 až 11,7  $mg.l^{-1}$  Ag NPs. V této práci

nebyly popsány žádné významné rozdíly v toxicitě Ag NPs v závislosti na jejich velikosti. Autoři spekulují, že toxicita Ag NPs je přímo spojená s množstvím  $\text{Ag}^+$ , který byl uvolněn z AgNPs rozpouštěním v průběhu experimentu. K tomuto tvrzení však nedodali žádné signifikantní důkazy, jelikož množství rozpuštěného  $\text{Ag}^+$  nebylo žádným způsobem stanoveno [Yang et al., 2011]. Rozpustnost nanomateriálů v půdách bude významným způsobem ovlivněna schopností půdních částic vázat uvolněné kationty a anionty. Iontovýměnná kapacita půd a s ní spojená rozpustnost nanočástic je pak silně závislá na hodnotě pH. Agregace nanomateriálů v půdách bude urychlována vysokou iontovou silou pórové vody, vzniklé agregáty pak budou účinně zachytávány v půdních kapilárách [Yuzer et al., 2016]. Adsorpce na částicích půdy a mobilita nanočástic pak bude záviset na jejich povrchovém náboji, jelikož negativně nabitě povrchy částic půdních minerálů a organických složek půdy budou přitahovat zejména kladně nabitě nanočástice. Povrchový náboj průmyslově vyráběných nanočástic je spojen s typem a kvalitou povrchové úpravy, v dané souvislosti bude tedy významnou vlastností odolnost této úpravy vůči degradaci [Bradfield et al., 2016].

## 1.2 Způsoby charakterizace nanomateriálů

Koloidní materiály, definované jako heterogenní systém obsahující pevnou složku s alespoň jedním rozměrem v rozpětí 1 nm - 1  $\mu\text{m}$  [Everett, 1988], mohou být toxické samy o sobě, mohou ale také hrát důležitou roli při distribuci toxických látek v jednotlivých složkách životního prostředí a to bez ohledu na jejich původ. Tyto materiály mohou na svém rozměrném povrchu sorbovat velké množství stopových prvků či organických polutantů, jelikož s velikostí povrchu přímo úměrně souvisí množství potencionálně reaktivních funkčních skupin [William, 2006].

Optické charakterizační techniky je možno rozdělit na nespektrální a spektrální metody. U nespektrálních metod nedochází k výměně energie mezi elektromagnetickým zářením a studovanou látkou a měření je uskutečňováno sledováním změn vlastností záření, jako je rozptyl, otáčení roviny polarizovaného světla nebo změna jeho rychlosti. Mezi tyto

metody je možno zařadit polarimetrii, nefelometrii, turbidimetrii, refraktometrii nebo interferometrii, avšak ani jedna z vyjmenovaných metod není významněji používána při stanovování významných parametrů, které ovlivňují výsledky testů ekotoxicity nanomateriálů. Metody spektrální jsou naopak založeny na principu interakce elektromagnetického záření se vzorkem. Spektrum je poté závislost veličiny, která charakterizuje intenzitu měřeného záření (emitovaného nebo prošlého) na vlnové délce záření  $\lambda$ . Absorpční či emisní spektra poskytují důležité informace o energetických hladinách studovaných látek, jejich koncentraci a jiných vlastnostech jako velikosti částic.

V předložené disertační práci byly významné fyzikálně-chemické parametry nanočástic, jako je jejich velikost, tvar, krystalografická struktura, povrchový náboj či rychlost a míra aglomerace v expozičních médiích sledovány systémem několika charakterizačních technik a pouze kombinace jejich výsledků umožnila popsat soustavu pro nás dostatečných způsobem. Fyzikálně-chemické principy použitých technik budou stručně zmíněny v následujících kapitolách, přičemž zvláštní důraz bude kladen na DLS jako klíčové metody.

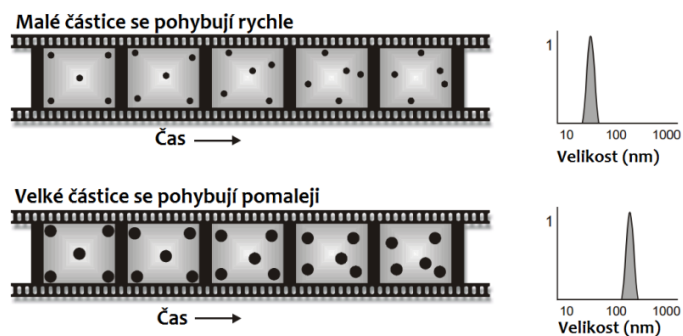
### **1.2.1 Dynamický rozptyl světla**

Dynamický rozptyl světla, Dynamic Light Scattering (DLS), je základní technikou charakterizace nanomateriálů v koloidním systému, neboť přináší informace o distribuci velikostí hydrodynamických průměrů částic, jejich pohyblivosti a koncentraci částic ve vzorku. Je založena na spontánní fluktuaci intenzity odráženého laserového záření, kdy koloidní částice indukují časově závislý pružný rozptyl intenzit záření. Tyto časově závislé fluktuace jsou snímány statickým detektorem a v případě, že částice dorazí do oblasti se zaostřeným laserovým paprskem, dojde k nárůstu signálu. Naopak, když tento prostor opustí, dochází k útlumu signálu. Statistická analýza těchto časově závislých fluktuací umožňuje odvodit difúzní koeficient částic. Časové kolísání v měřených intenzitách záření se následně použije k odvození autokorelační křivky. Za předpokladu, že stanovujeme velikost, pohyblivost či koncentraci, tato technika je schopna pracovat v blízkosti detekce jediné částice v objemu vzorku.

Typickým výstupem je střední difúzní koeficient [Finsy, 1994] pro jednotlivé částice a nebo hmotnostní průměr difúzních koeficientů [Powers et al., 2011]. Jedná-li se o měření DLS ve známém kapalném prostředí, lze výsledky přepočítat na hodnoty středního intenzitního kumulativního hydrodynamického průměru částic [Dash et al., 2012] a indexu polydisperzity (PDI).

Obdobnou technikou je fotonová korelační spektroskopie, která se využívá při studiu vlastností suspenzí, koloidních soustav nanomateriálů, biologických vzorků, proteinů a polymerů. Hlavní přednost této techniky je aplikovatelnost na různé druhy systémů částic, jednoduchost instrumentace a automatizovatelnosti, neinvazivnosti vůči studovanému vzorku. V případě analýzy citlivých látek (biologické, snadno aglomerující či třaskavé systémy) je navíc možno použít jinou vlnovou délku interagujícího laseru, čímž můžeme dopady záření na materiál ještě snížit.

Dalším možným rozšířením této techniky je sledování změny posunu vlnové délky laserového paprsku vlivem Dopplerova jevu na pevných částicích. Tato změna je úměrná velikosti částic disperzního systému (**Obr. 2**). Za pomoci měření difuzního koeficientu částic a s použitím naměřené autokorelační funkce je možno vypočíst distribuci velikosti částic [Pecora, 2013]. Další nespornou výhodou těchto technik je širší měřicí rozsah, který se teoreticky pohybuje od 1 nm po několik mikronů v závislosti na druhu měřeného materiálu, jeho indexu lomu a použitém rozpouštědle. Takto široký měřicí rozsah je pro jiné techniky obtížně dosažitelný. Částice o velikosti desítek nanometrů jsou příliš malé na měření pomocí optických mikroskopů, desítky mikronů zase příliš pro mikroskopy elektronové.



Obrázek 2: Znárodnění pohybu částic prostředím v závislosti na jejich velikosti. Teplota i viskozita kapalného média jsou v obou případech totožná [Malvern, 2013].

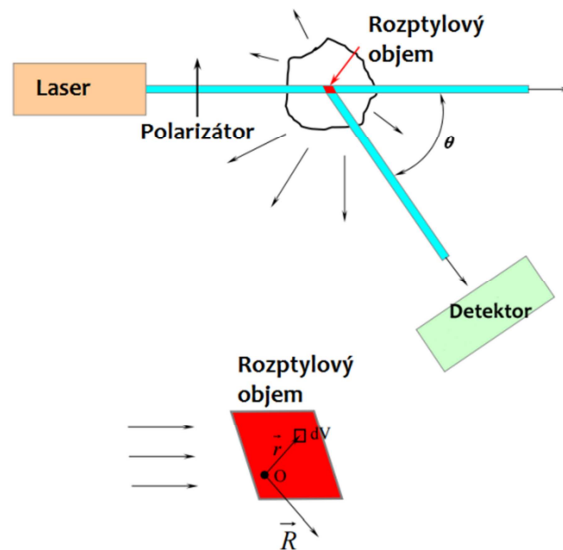
Typická sestava pro experimentální měření rozptylu světla se skládá ze zdroje laserového paprsku osvětlujícího vzorek a pohyblivého detektoru, kterým je zjišťován úhel rozptylu  $\theta$  na základě měření intenzit rozptýleného záření  $I(\theta, t)$ . Nejčastěji bývá dopadající paprsek polarizován vertikálně, detektor se pohybuje v rovině horizontální a hledá úhel rozptýleného paprsku s nejvyšší intenzitou rozptýleného záření. Oblast vzorku ozařovaná současně dopadajícím a odraženým paprskem je nazývána „scattering volume“, tedy rozptylový objem [Berne and Pecora, 2000]. Na Obr. 3 je typické uspořádání aparatury, ve které je elektrické pole  $E_i$  vyvolané polarizovanou elektromagnetickou vlnou definováno rovnicí 1.

$$E_i(r, t) = \hat{n}E_0e^{i(k_i \cdot r - \omega_i t)}$$

Rovnice 1

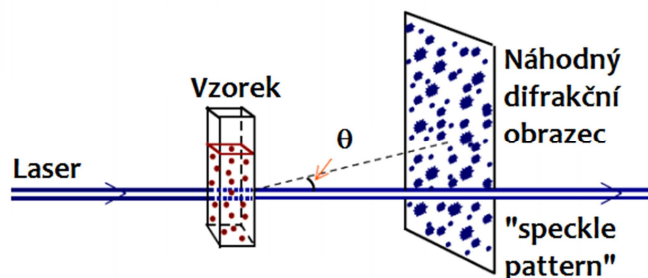
V této rovnici představuje  $\hat{n}$  polarizaci kolmou k rovině rozptylu o amplitudě  $E_0$ ,  $\omega_i$  je úhlová frekvence,  $k_i$  je vlnový vektor dopadajícího světelného paprsku definovaný jako  $k_i = \frac{2\pi n}{\lambda_i}$ , ve kterém je  $\lambda_i$  vlnová délka dopadajícího záření ve vakuu a  $n$  je index lomu rozptylujícího média.





Obrázek 3: Schéma typické sestavy pro měření DLS se znázorněným rozptylovým objemem. Úhel  $\theta$  je úhel rozptylu světelné vlny [Kozina, 2009].

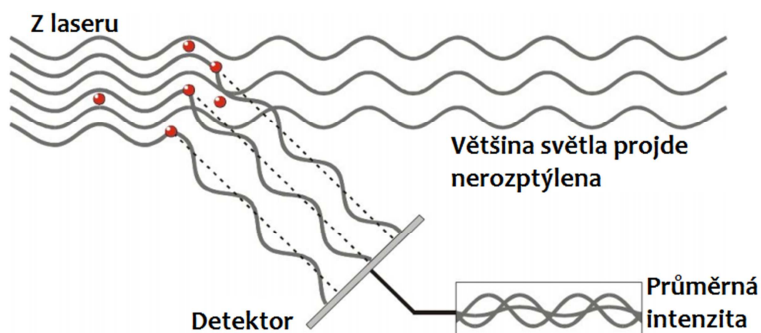
Rozptýlené pole má podobu náhodného difrakčního obrazce, který je nazýván „speckle pattern“. Ten sestává ze světlých a tmavých bodů, v závislosti na tom, zda dopadající vlna podlela konstruktivní, či destruktivní interferenci (Obr. 4).



Obrázek 4: Znázornění difrakčního obrazce tvořeného částicemi, jejichž pozice se v čase náhodně mění díky Brownovu pohybu. Intenzita rozptýleného záření v jednotce plochy detektoru tak náhodně fluktuuje od jednoho extrému k druhému [Kozina, 2009].

Jak znázorňuje Obr. 5, v dostatečně zředěných monodisperzních koloidních systémech, ve kterých lze předpokládat vzdálenost mezi jednotlivými částicemi natolik

velkou, že se částice vzájemně neovlivňují a jejich poloha je statisticky nezávislá, odpovídá každý z bodů difrakčního obrazce jedné složce Fourierovy hustotní fluktuační.



Obrázek 5: Rozptýlený světelný paprsek dopadající na detektor. Překresleno podle [Malvern, 2013].

Dobrá shoda mezi teorií a reálnými výsledky panuje při měření monodisperzních systémů s úzkou distribucí velikostí částic. Reálné systémy environmentálního prostředí jsou však od této teorie značně vzdáleny a v praxi je situace mnohem komplikovanější, jelikož reálné vzorky obsahují aglomeráty, které zvyšují polydisperzitu a tím vnášejí do procesu zjišťování reálné velikosti částic chybu úměrnou zvyšujícímu se rozdílu mezi primárními částicemi a aglomeráty. DLS tak může být s úspěchem použita při sledování velikosti částic laboratorně připravených vzorků, či sledování kinetiky tvorby aglomerátů, avšak použití této techniky při měření reálných vzorků životního prostředí je bez zařazení separačních a purifikačních kroků prakticky nemožné [Domingos et al., 2009].

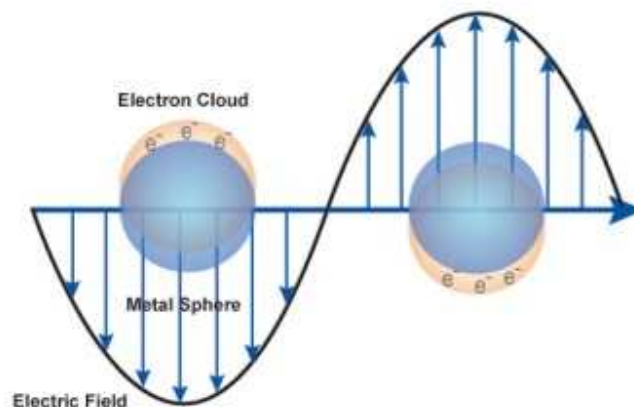
### 1.2.2 Spektroskopie ve viditelné a ultrafialové části spektra

Spektroskopie ve viditelné a ultrafialové části spektra, UltraViolet-Visible spectroscopy (UV-Vis), je klasická spektrofotometrická metoda, pomocí které je možné sledovat interakce elektromagnetického záření o vlnových délkách typicky v rozmezí 200 až 800 nm s měřeným vzorkem. Základem metody je měření míry pohlcení monochromatického světla, kterým je vzorek ozařován, při různých vlnových délkách. Pokles v intenzitě světelného toku je dán Lambert-Beerovým zákonem, což je matematické vyjádření závislosti absorpce

elektromagnetického záření prostředím, přes které záření prochází. Pokles zářivého toku je v případě chemikálií dán interakcí fotonů elektromagnetického záření s měřenou látkou a měřená spektra odpovídají přechodům elektronů mezi základním a excitovaným stavem molekul vzorku.

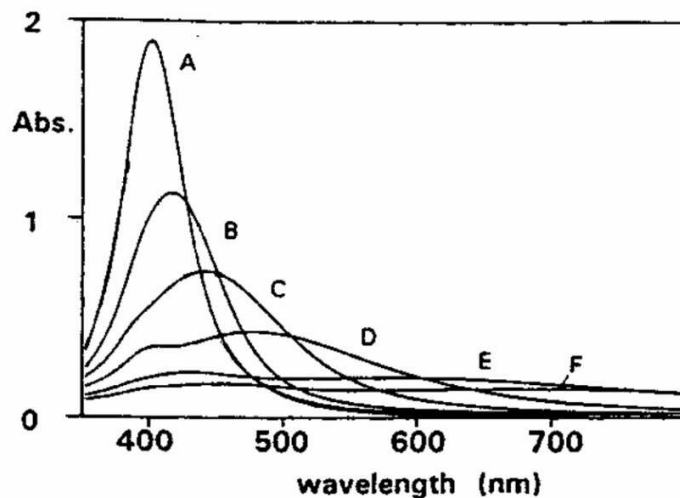
Situace při měření nanočástic pomocí UV-Vis je odlišná. Jelikož nejsou ozařovány jednotlivé, volně lokalizované molekuly, ale jedná se o absorpci elektromagnetického záření hmotou, elektrony si nejsou v rámci daného materiálu z hlediska polohy ani vazby rovnoceny. Díky vzájemným interakcím atomů dochází k překryvu obsazených i neobsazených elektronových orbitalů a tím vznikají kontinuální pásy energií. S narůstajícím počtem překryvů elektronových orbitalů dochází k tvorbě energetických pásů, které jsou rozděleny na pásy valenční, zakázané a vodivostní. Elektrony, které jsou lokalizovány v pásu valenčním, mohou při absorpci energie jednoho fotonu odpovídající minimálně velikosti energie pásu zakázaného přejít do pásu vodivostního. S klesajícím rozměrem materiálu dochází k zužování energetických pásů až k diskretním energetickým hladinám a naopak dochází k rozšiřování pásu zakázaného. V limitním případě by snižování velikosti částice vedlo až k jednotlivým atomům, či molekulám, jejichž elektronová struktura by byla dána diskretními elektronovými hladinami odpovídající řešení Schredingerovy rovnice [Schmid, 2005].

Měření velikosti kovových nanočástic pomocí UV-Vis je relativně jednoduchý způsob charakterizace jejich velikosti i když v případě nanočástic nejde o prostou absorpci elektromagnetického záření, ale v případě kovových nanočástic dochází ke koherentní oscilaci elektronů indukovanou interakcí s elektromagnetickým zářením. Tyto oscilace elektronů produkují na povrchu nanočástice šíření vln, které jsou často nazývány lokalizovaný povrchový plazmon. Jeho tvorbu vystihuje **Obr. 6**.



Obrázek 6: Rezonance povrchového plazmonu, kde volné elektrony v kovové nanočástice jsou poháněny do kmitání v důsledku silného spojení se specifické vlnové délce dopadajícího světla. Převzato ze [Sigma-Aldrich].

Vlnová délka záření s odpovídající energií fotonů, při které je elektromagnetické záření absorbováno za vzniku plazmonické rezonanční vlny je označována jako absorpční pás povrchového plazmonu a s rostoucí velikostí částice dochází k jeho posunu k vyšším vlnovým délkám („red shift“) a útlumu až po jeho úplné vymizení. Teoretické informace vycházející z rozšířené Mieho teorie založené na popisu elektrického pole indukovaného v částici dopadající světelnou vlnou a byly teoreticky potvrzeny prací [Schneider et al., 1994]. Na **grafu 1** je dobře patrný posun polohy absorpčního maxima a útlum plazmonické rezonanční vlny se vzrůstající velikostí stříbrných nanočástic. Tato složenina UV-Vis spekter dokumentuje polohu absorpčních pásů lokalizovaného povrchového plazmonu pro částice o velikosti 38 až 110 nm, kdežto pro částice o velikosti 162 nm a více dochází k úplnému vymizení a tento pás se již u částic nevyskytuje.



Graf 1: Hodnoty absorpčních pásů lokalizovaného povrchového plazmonu pro částice o velikosti 38 nm (A), 56 nm (B), 75 nm (C), 110 nm(D), 162 nm (E) až 173 nm (F). Převzato z [Schneider et al., 1994].

Z experimentálně zjištěné hodnoty polohy absorpčního maxima lze následně vypočítat poloměr nanočástic přítomných v měřeném vzorku mimo jiné pomocí Brusovy rovnice (**rovnice 2**).

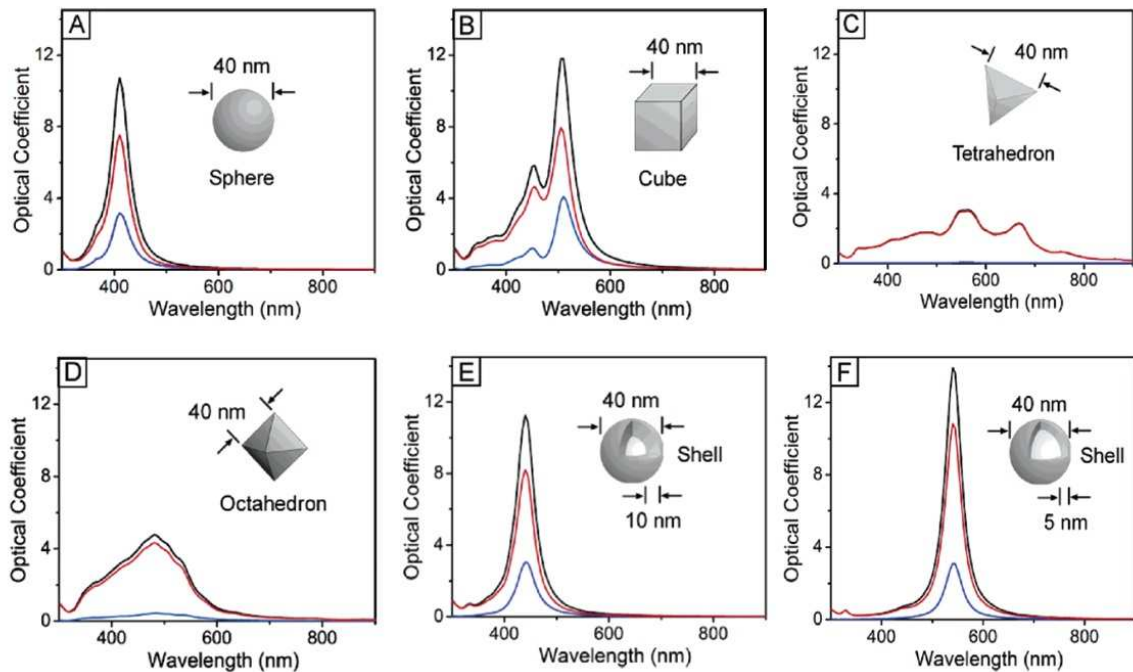
$$E = E_{bulk} + \frac{h^2}{8R^2} \left( \frac{1}{m_e} + \frac{1}{m_h} \right) - \frac{1,8e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon R}$$

Rovnice 2

Kde  $E$  vystupuje jako hodnota energie zakázaného pásu,  $E_{bulk}$  je energie zakázaného pásu materiálu mimo nanorozměry,  $h$  je Planckova konstanta,  $m_e = 0,19m_0$ ,  $m_h = 0,8m_0$  kde  $m_0$  je klidová hmotnost elektronu,  $e$  je elementární náboj,  $\epsilon_0$  je permitivita vakua,  $\epsilon$  je dielektrická konstanta a  $R$  je poloměr nanočástice. Dle této rovnice je možno určit velikost kulových částic dle energie fotonů  $E$ .

Situace se ovšem značně komplikuje, pokud pracujeme se systémy nanočástic, jejichž tvar se od ideální koule vzdaluje. Jak je patrné z **Obr. 7**, tvary absorpčních spekter

se pro různé tvary Ag NPs značně liší. Tím je limitováno použití UV-Vis pro potřeby zjišťování velikosti částic vzorků nanočástic o neznámém tvaru a je tedy nutné zařadit mikroskopickou techniku pro ověření tvaru nanočástic.



Obrázek 7: Rozličné tvary UV-Vis spekter Ag NPs charakterizující nanočástice s odlišným tvarem, ve kterém je extinkční spektrum vykresleno barvou černou, absorpční červenou a spektrum rozptylové barvou modrou. Izotropní (A) duté (E, F) koule vykazují spektra s jediným rezonančním píkem posunutým v závislosti na jejich velikosti a síle slupky, anizotropní krychle (B), tetraedr (C) a oktaedr (D) poskytují spektra s více rezonančními píky. Převzato [Wiley et al., 2006].

### 1.2.3 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil, Atomic Force Microscopy (AFM), je mikroskopická technika, která se používá k trojrozměrnému zobrazování povrchů. Je založená na silovém působení mezi mechanickým hrotem a povrchem vzorku. Prvně ji realizovali v roce 1986 Binnig, Quate a Gerber [Binnig et al., 1986] následováním skenovací tunelovací mikroskopie (STM) [Pashley et al., 1985]. Obraz povrchu se zde sestavuje postupně, bod po bodu tak, že se velmi ostrý hrot (křivost cca 5 – 20 nm) umístěný na nosníku (tzv. cantilever) pohybuje nad

vzorkem či je v přímém kontaktu s ním a je díky různým silám přitahován či odpuzován. Výchylka nosníku hrotu pak odpovídá součtu jednotlivých interakcí mezi hrotem a vzorkem.

Jedním ze základních prvků měření je dobrá volba hrotů pro měření AFM. Ostrost hrotu určuje rozlišovací schopnost měření a nosník hrotu musí mít kvůli rychlosti měření a jeho stabilitě vysokou rezonanční frekvenci a nízkou hmotnost. V současnosti se všechny hroty připravují pomocí litografických technologií a volba nosníku hrotu závisí především na způsobu jeho použití. Pro semi-kontaktní mód měření musí být nosník tvrdý a naopak pro měření v kontaktním módu musí být pružný, aby nedošlo k poškození vzorku. [Fang et al., 1997].

I když je možné pomocí AFM měřit „pouhou“ topologii povrchu, velikost a tvar částic, je možné zesílit jednotlivé síly a ty pak použít pro mapování zvolených vlastností typu adheze, tuhosti a jiné. Mezi nejdůležitější formy interakcí, jejichž součet určuje vychylku hrotu, patří Van der Waalovy síly, odpudivé síly krátkého dosahu, kapilární síly a elektrostatické síly.

#### **1.2.4 Elektronová mikroskopie**

Rastrovací elektronový mikroskop, Scanning Electron Microscope (SEM), je stejně jako transmisní elektronová mikroskopie (TEM) složité elektronické zařízení, které využívá k zobrazování vzorku v mikro a nano rozměru pohyblivého svazku elektronů. Hlavním rozdílem mezi oběma mikroskopy spočívá v tom, že TEM zobrazuje vnitřní struktury vzorku pomocí elektronů prošlých skrz vzorek, kdežto SEM bývá primárně používán k zobrazení povrchu vzorku a to za pomoci elektronů sekundárních anebo zpětně odražených. Název této mikroskopie je odvozen z toho, že se elektronový svazek pohybuje po vzorku řádek po řádku v rastru ve zvolené oblasti vzorku a výsledný obraz se vytváří postupným skenováním [Danilatos, 1991]. I když může TEM produkovat snímky se znatelně větším zvětšením a rozlišením, má SEM své nezastupitelné místo, jelikož jsou odražené a sekundární elektrony snímány detektory a tvoří na rozdíl od TEM trojrozměrný obraz s velkou hloubkou ostrosti, avšak je třeba mít na paměti, že s rostoucím zvětšením hloubka ostrosti vzniklého obrazu

SEM klesá [Oatley et al., 1966]. Zdroje elektronů jsou pro oba typy elektronových mikroskopu shodné a jsou jimi nejčastěji žhavené wolframové vlákno či autoemisní tryska ve Wehneltově válci. Průměr svazku elektronů je úměrný průměru katody a jeho hodnota je jedním ze základních parametrů ovlivňujících rozlišení mikroskopu. Wolframová katoda dovoluje rozlišení k hranici 10 nm, nejmodernější přístroje se Schottkyho autoemisní tryskou s tenčím proudem elektronů, poskytují rozlišení i 1 nm [Lee and Chow, 2012]. Rozsah zvětšení používaných v SEM se pohybuje v rozmezí od 5 až po 600 000 krát [Keddie et al., 1995].

### 1.2.5 Rentgenová strukturní analýza

Rentgenová strukturní analýza, X – Ray Diffraction (XRD), je běžnou laboratorní technikou, která umožňuje určit absolutní strukturu molekul, polohy atomů v krystalické mřížce, vazebné délky a úhly v krystalové mřížce a je možno jí využít k fázové identifikaci a kvantitativní strukturní analýze [Bragg, 1961]. Rentgenovo záření je elektromagnetické záření s vlnovou délkou pohybující se mezi  $10^{-11}$  a  $10^{-8}$  metru, přičemž záření o vlnové délce větší než 0,1 nm je nazýváno měkké, kratší než 0,1 nm tvrdé rentgenové záření. Jelikož je mezivazebná vzdálenost mezi atomy v krystalických strukturách řádově  $10^{-10}$  metru [Kaewamatawong et al.], je možné využít tohoto záření pro strukturní analýzy širokého pásma materiálů. Rentgenové paprsky pronikají hluboko do materiálu a poskytují informaci o objemové struktuře. Toto záření je produkováno buď rentgenovou trubicí nebo synchrotronní radiací. V tubusu, který se nejčastěji používá jako zdroj rentgenového záření v laboratořích, jsou paprsky generovány v případě, že fokusovaný paprsek elektronů akcelerovaných skrz vysokonapěťové pole bombarduje stacionární nebo rotující pevný terč. Když se elektrony srazí s atomy na terči a dojde k jejich zpomalení, emituje se spojitě spektrum rentgenova záření, též nazývané jako Bremsstrahlungova radiace. Když elektron z vyššího energetického orbitalu zaplní slupku, foton s energií charakteristickou pro terčový materiál je vypuzen. Běžné terče v tubusu jsou z Cu a Mo, které emitují záření o energiích 8 keV a 14 keV, což odpovídá vlnové délce 1,54 a 0,8 Å [Kalimuthu et al., 2008] (0,158 a 0,08 nm). Rentgenové paprsky primárně interagují s elektrony v atomech a některé fotony z paprsku jsou odkloněny od původního směru. Tyto difraktované paprsky jsou snímány, protože nesou



informaci o distribuci elektronů v materiálu. Difraktované vlny různých atomů mohou interferovat a výsledná intenzita je touto interakcí silně ovlivněna. Pokud se atomy periodicky opakují (např. v krystalu), difraktované vlny se budou skládat z ostrého interferenčního maxima dle symetrie atomů. Měření difrakčního vzoru tudíž dovoluje odhadnout distribuci atomů v materiálu, avšak touto metodou není možné zjistit velikost jednotlivých částic. Je však možno vypočítat velikost krystalinitů, což jsou zrna s periodicky se opakující strukturou, tvořící větší částici, aglomerát. Toto stanovení je založeno na analýze rozšíření difrakčních pásů pomocí Scherrerovy závislosti [Shankar et al., 2004].

### **1.2.6 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem**

Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES), je v současné době nejrozšířenější technikou stopové a ultra stopové multielementární analýzy, která umožňuje detekovat téměř všechny prvky periodické tabulky. Metoda je založena na sledování intenzity emise elektromagnetického záření atomů nebo iontů prvků v excitovaném stavu. Prakticky všechny vzorky, u nichž je stanovovaná koncentrace, je třeba před samotnou analýzou převést do roztoku. Ten je pomocí peristaltické pumpy transportován do zmlžovače, kde dojde k tvorbě aerosolu. Aerosol je dále unášen proudem argonu do mlžné komory, ve které dojde k odloučení větších kapek a následně pokračuje dále do plazmového hořáku, kde dojde k odpaření rozpouštědla a ionizaci vzorku. Elektronů jsou v plazmatu excitovány do vyšších energetických hladin a po návratu do základního stavu emitují přebytek energie jako nespojitě polychromatické záření. Po rozkladu emitovaného polychromatického záření pomocí monochromátoru je získáno čárové spektrum, v němž jsou jednotlivé spektrální čáry pro každý prvek charakteristické. Úměra mezi intenzitou signálu na konkrétní vlnové délce a koncentrací látky v analyzovaném vzorku je pak základ pro kvantitativní vyhodnocení obsahu prvku ve vzorku [Novaes et al., 2016].

ICP-OES má vynikající analytické vlastnosti, proto je rozšířena ve všech oborech vyžadujících spolehlivou elementární analýzu. Především se využívá v oblasti analýzy kontroly

životního prostředí a zjišťování obsahu prvků v geologických maticích, například zjišťování obsahu železa v jeho rudě nebo zlata v zlatonosné hornině. Velkou výhodou jsou široký dynamický rozsah, výborná reprodukovatelnost, vysoká linearita kalibrací, dobré detekční limity a velká citlivost. Ta se pohybuje od jednotek  $\mu\text{g.l}^{-1}$  až po stovky  $\text{mg.l}^{-1}$ . Omezení použití metody spočívá v komplikovanosti a překryvu některých emisních čar prvků a poměrně značném ovlivnění signálu maticí vzorku. Další nevýhodou této metody jsou značné náklady na provoz kvůli vysoké spotřebě argonu [Huang and Hieftje, 1989].

### 1.3 Modelové organismy

Pod pojmem modelové organismy je možno si představit takové organismy, jež jsou rozsáhle studovány kvůli pochopení určitých biologických jevů s očekáváním, že chování těchto organismů poskytne vhled do fungování organismů ostatních. Zpravidla se nejedná o hlavní zástupce daného živočišného druhu, rychlý vývoj s krátkým životním cyklem, malá velikost, snadná dostupnost a manipulovatelnost, nenáročné podmínky chovu, či nízké finanční nároky jsou často rozhodujícími faktory volby [Fields and Johnston, 2005]. Ta závisí především na kritériích vycházejících z účelu experimentu. V této disertační práci budou prezentovány výsledky testů ekotoxicity nanomateriálů provedené na čtyřech trofických úrovních. Na úrovni buněčné byly provedeny testy cytotoxicity a testy v uspořádání, které umožňuje predikovat množství nanočástic transponovaných skrz monovrstvu buněk střevního epitelu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) do vnitřního prostředí organismu či množství částic zachycených uvnitř cytosolu buňky. Ekotoxikologické testy akutní a reprodukční toxicity byly provedeny na hrotnatce velké (*Daphnia magna*), jakožto zástupci malých vodních korýšů a testy akutní, embryonální a vývojové toxicity nanočástic na daniu pruhovaném (*Danio rerio*) a kapru obecném (*Cyprinus carpio*), jakožto zástupců ryb. Jako modelový organismus pro terestrické testy ekotoxicity byla zvolena roupice *Enchytraeus crypticus*.

### 1.3.1 Buněčná kultura střevního epitelu pstruha duhového - RTgutGC

Pro výzkum ekotoxikologických účinků chemických látek i nanomateriálů ve vodním prostředí jsou jako modelové organismy hojně využívány různé druhy ryb. Existují dvě hlavní cesty příjmu NPs do těla těchto živočichů. Nanočástice se mohou do těla ryb dostávat buď přes gastrointestinální soustavu nebo přes žaberní epitel [Handy et al., 2011]. Odsud jsou pak distribuovány do dalších orgánů např. do mozku, jater či pohlavních žláz. Buněčné linie získávané ze tkání uvedených orgánů jsou pak použity jako biologické modely v řadě *in-vitro* studií [Spence et al., 2008, Obiakor et al., 2014, Monaghan et al., 2011, Yue et al., 2015].

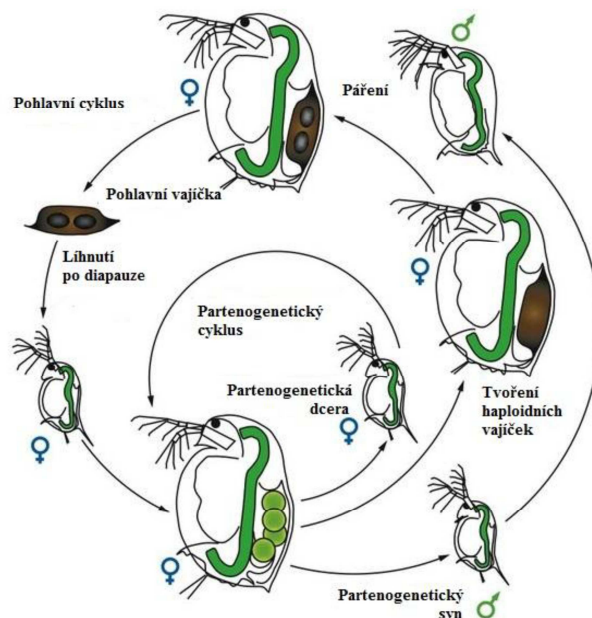
Buněčná linie RTgutGC byla úspěšně vyvinuta ze střeva mladé samice pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) roku 2011 ve spolupráci Univerzity Waterloo, Guelphské univerzity, Univerzity Wilfrida Lauriera (Waterloo, Ontario, Kanada), Helmholtzova centra pro výzkum životního prostředí (Lipsko, Německo) a Švýcarského federálního centra pro výzkum vodního prostředí Eawag (Dübendorf, Švýcarsko). RTgutGC byly úspěšně pěstovány v Leibovitzově médiu L15 bez obsahu glutaminu, které bylo doplněné 10 % fetálního bovinního séra (FBS). Buňky byly 100 krát pasážovány a úspěšně kryoprezervovány. Jako kryoprotektor proti narušení buněk byl použit dimethylsulfoxid bránící vzniku krystalů ledu v buňce. Životaschopnost buněk byla hodnocena pomocí testů buněčné toxicity využívající fluorescenčních barviv Alamar Blue (AB) pro zjišťování míry metabolické aktivity a acetoxymethylesteru karboxyfluoresceindiacetátu (CFDA-AM) pro zjišťování míry membránové integrity [Kawano et al., 2011].

Tato buněčná linie je zajímavá z toho důvodu, že střevo všech ryb je multifunkční orgán, který je zapojen nejen do vstřebávání živin, ale důležitou roli hraje i v iontové výměně a osmotické regulaci. Současná míra poznání tohoto orgánu se opírá o nesčetné *in vivo* i *ex vivo* studie, nicméně mechanismus translokace NMs skrz intestinální trakt do vnitřního prostředí ryb byl zatím popsán pouze v jediné publikaci [Geppert et al., 2016]. Ta se zabývala fluorescenčními polystyrenovými NPs. V rozsáhlé *in vivo* studii, zabývající se působením Ag NPs na vnitřní orgány kapra obecného (*Cyprinus Carpio*), bylo po expozici NPs zjištěno významné zvýšení obsahu stříbra v játrech a střevě, což naznačuje, že Ag NPs, nebo alespoň

uvolněné ionty stříbra mohou prostupovat skrz bariéru střevního epitelu, ať již prostou difuzí, či aktivním transportem [Lee et al., 2012].

### 1.3.2 Hrotnatka velká (*Daphnia magna*)

Hrotnatka je běžný zástupce sladkovodního planktonu z řádu perlooček, třídy lupenonožců a společně s vířníky a klanonožci tvoří nejvýznamnější skupinu planktonních živočichů. Spadá pod monofyletickou skupinu, která je tvořena asi 400 známými druhy v 80 rodech a 11 čeledích. V českých tocích nalezneme přibližně 90 druhů, z nichž jsou nejvíce zastoupeny právě hrotnatky. Tělo je tvořeno dvěma základními částmi - hlavovou a trupovou. Na hlavové části lze pozorovat tykadla, která jsou u samic kratší než u samců. Při teplotě 20 °C trvá životní cyklus hrotnatek okolo 8 týdnů. Pohlavní dospělosti dosahují po 6 až 8 dnech od narození. Vajíčka jsou umístěna dorzálně pod krunýřem a vývin neonat je přímý. Po třech dnech v mateční komoře dochází k porodu mladých neonat. Každá dospělá samice produkuje okolo 6 až 50 jedinců o velikosti 1 mm. Vývoj jedinců je ovlivněn intenzitou krmení a kvalitou vody. Životní cyklus hrotnatek je zobrazen na **Obr. 8** [Ebert, 2005].



Obrázek 8: Životní cyklus organismu *Daphnia magna* [Ebert, 2005].

Hrotnatky použité do testů byly chovány v laboratorních podmínkách při teplotě  $19 \pm 1$  °C s fotoperiodou 12 hodin, při intenzitě osvětlení 1250 až 1670 lux. Jelikož při chovu nebyla používána filtrace, k zajištění optimálních podmínek sloužila výměna chovného média M4 [OECD, 2012] jednou za týden tak, že byla v chovné nádobě ponechána polovina média starého a ta byla doplněna nově připraveným. Dospělé hrotnatky byly krmeny každý den. Nově narozené hrotnatky musí být každý den odstraňovány do samostatné chovné nádoby, jelikož při neoddělení mláďat dochází ke snížení plodnosti.

### 1.3.3 Dánio pruhované (*Danio rerio*)

*Danio rerio* je sladkovodní ryba původem z oblastí východní Indie, vyskytující se od Kalkaty až po Masulipatam. Jedná se o významný modelový organismus v genetice, molekulární biologii, biochemii, farmakologii, ekotoxikologii, fyziologii, neurobiologii a histologii, mimo jiné proto, že je znám kompletně celý jeho genom skládající se z 16596 nukleotidů [Broughton et al., 2001]. Patří do čeledi kaprovitých (*Cyprinidae*), řádu maloostní (*Cypriniformes*), třídy paprskoploutví (*Actinopterygii*) a kmene strunatci (*Chordata*). Tělo mají podlouhlé štíhlé, ze stran mírně zploštělé a samečci jsou štíhlejší než samičky. Základní zbarvení hřbetu je tmavé až olivově hnědé. Břišní oblast je zlatavá s nádechy táhnoucími se do stříbrné. Na bocích má dánio 7 až 9 jasně modrých až fialových pruhů, které se táhnou od hlavy až na konec ocasní ploutve. Hřbetní ploutev má tmavší odstín než zbytek celého těla a má zlaté lemování. Je však třeba mít na paměti, že existuje velké množství barevných variet. Z koutků tlamky vyrůstají dva páry vousků, jeden z párů je výrazně delší. V přírodě se dánia rozmnožují v období dešťů, kdy dochází k velké změně chemismu vody. V laboratorních podmínkách by se ryby měly třít celý rok. Mezi hlavní faktory ovlivňující průběh tření patří roční období, teplota vody, světelné podmínky, kvalita vody, množství a kvalita krmiva [Spence et al., 2008].

Veškerá dánia použitá pro testování pocházela z chovu oddělení CETA VÚOS a.s. Dospělé ryby pro chov pocházely od více dodavatelů. Po zakoupení byly nové ryby drženy 14 dní v karanténě, aby nedošlo k případné kontaminaci chovu. Ryby byly chovány v odstáté

a provzdušňované pitné kohoutkové vodě, v Médiu 203 (M203) [OECD, 1992] a v 75 % Médiu 203 (M203/75) připraveném z M203 ředěním demineralizovanou vodou. M203 je vodný roztok solí o koncentracích  $2 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ CaCl}_2$ ;  $0,5 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ MgSO}_4$ ;  $0,77 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaHCO}_3$  a  $0,075 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ KCl}$ . Krmení bylo uskutečňováno dvakrát denně živou potravou tvořenou hrotnatkami, nitěnkami, buchankami nebo komerčně dostupnou sušenou potravou. Ke tření bylo využíváno 10 litrové třecí akvárium s dvojitým dnem, které bylo odděleno sítkou. Důvodem je fakt, že dána se o jikry ani potěr nestarají, naopak, požírají je. Teplota vody by se při tření pohybovala v rozmezí  $25 - 27 \text{ }^\circ\text{C}$  a pH bylo udržováno v rozmezí hodnot  $6,5 - 8,5$ . Saturace vody kyslíkem nesmí klesnout pod hodnotu  $7,8 \text{ mg.l}^{-1}$ . K rozdělení oplozených jiker od neoplozených bylo využíváno optického mikroskopu, jelikož velikost jiker se pohybuje okolo  $0,7 \text{ mm}$ . Oplozené jikry jsou průsvitné, zatímco neoplozené jsou mléčně zakalené. Pro správný vývoj embryí je nutná teplota minimálně  $26 \text{ }^\circ\text{C}$ . Zvolíme-li inkubační teplotu vyšší, dosáhneme rychlejšího vývoje embrya. K nejrychlejšímu vývoji dochází při  $28,5^\circ\text{C}$ , poté již narůstá mortalita inkubovaných embryí. Po uplynutí 2 – 3 dní dochází k tzv. vykulení, kdy embryo přechází do fáze váčkového plůdku. Žloutkový váček poskytuje plůdku prvotní výživu. Tento orgán je absorbován a ztrácí se kolem 10. dne po oplodnění, kdy též dochází k ukončení testu vývojové toxicity. K rozplavání plůdku dochází 5. – 6. den po oplození.

### 1.3.4 Kapr obecný (*Cyprinus carpio*)

Kapr obecný (*Cyprinus carpio*) je sladkovodní paprskoploutvá ryba z čeledi kaprovití (*Cyprinidae*), řádu maloostní (*Cypriniformes*), patří do třídy paprskoploutví (*Actinopterygii*) a kmene strunatci (*Chordata*). Původní forma kapra zvaná sazan pochází ze střední Asie, z oblastí Černého, Azovského a Kaspického moře a už v prvním tisíciletí před naším letopočtem zdomácněl v Číně. Je první domestikovanou rybou v historii. Tato forma žije nyní jen vzácně ve veletocích východní Evropy (Dunaj, Volha, Don). Má protáhlé tělo celé pokryté šupinami, je subtilnější než šlechtěný kapr, v rychle proudících vodách je jeho tělo více protáhlé, nízké a jen zřídka kdy dosahuje váhy přes 3 kg [Balon, 2004]. Postupnou selekcí byl změněn jeho vzhled až k dnešním jedincům, jejichž hmotnost může ve vhodných podmínkách

přesáhnout váhu 30 kilogramů a délku 100 centimetrů. Zušlechtěné formě kapra obecného se hřbet za hlavou výrazně zvedá a je oproti tělu užší. Tlamma je výsuvná a po jejím obvodu jsou čtyři vousy. Kapr není dravá ryba, takže v tlamě nemá zuby ani jazyk, má požerák. Na požerákové kosti je pět stoličkových zubů, kterými drtí a dále upravuje potravu, která putuje přes hltan do jícnu a odtud do žaludkové části střeva. Živí se především bentosem a drobnými živočichy, které sbírá a vyhrabává ze dna, někdy i z hloubky větší než 20 cm. V našich podmínkách je přikrmován pšenicí a další pro něj nepůvodní potravou, na kterou si ale velmi rychle zvykl. Díky klášternímu hospodářství byl pro svou užitkovou hodnotu postupně rozšířen na většinu území kontinentu a pro jeho chov byly vybudovány rozsáhlé rybniční soustavy. V současnosti patří mezi nejvýznamnější druhy využívané v akvakultuře a vodním hospodářství [Vandeputte, 2003]. Z České republiky je ve velkém množství vyvážen do evropských zemí za účelem chovu, či přímé konzumace.

Ve volné přírodě dochází ke tření ryb při teplotě vody 16 až 22 °C, zatímco v umělých vytíračkách se používá teplota vody 20 až 24 °C. Samec dospívá ve věku 2 až 3 let. V tomto věku je jeho hmotnost 1 až 2 kg a délka 25 až 30 cm. Samice dospívá ve věku 4 až 5 let. Hmotnost dospělých samic je 4 až 5 kg a délka 30 až 40 cm. Jedna samice dokáže vyprodukovat až milion jiker, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 1 – 1,5 mm. Procentuální podíl oplodněných jiker bývá kolem 80 % a procento vykulení se pohybuje v rozmezí 90 až 100 %. Velikost plůdků po vykulení je 4,8 až 5,0 mm [Billard et al., 1995]. Plůdek se po vykulení v přírodě přichytává na vodní rostliny, kde zůstává přichycen až 14 dní [Čihař, 2003]. Vytírání kapra je z pohledu jeho použití jako modelového organismu v ekotoxikologii spojeno s řadou problémů. Prvním z nich je sezónní rozmnožování a to pouze od dubna do června. Dalším problémem je přítomnost adhezivních jiker. Adheze jiker nastává v prvním okamžiku kontaktu s vodou. Tento problém se dá eliminovat za použití substancí, které odstraní povrchovou vrstvu z jiker. V rybí líhni Mokřiny, pobočka Rybářství Třeboň a.s., používají k eliminaci adheze jiker plnotučné mléko. U akvariálních ryb se jikry získávají spontánním třením ve vytíracích nádržích (viz. kapitola 1.3.3.), zatímco u kapra probíhá získávání jiker především za použití inseminace, pouze v menší míře se uplatňuje spontánní rozmnožování na umělých substrátech [Billard et al., 1995].

### 1.3.5 Roupice (*Enchytraeus crypticus*)

Roupicovití jsou čeled' červů (*Vermes*) patřící do kmene kroužkovců (*Annelid*), podkmene opaskovitých (*Clitellata*), třídy máloštětinatců (*Oligochaeta*) a čeledi roupicovití (*Enchytraeidae*). Obývají jak půdní, tak i limnické a mořské prostředí. V současné době je známo okolo 900 druhů, přičemž ve střední Evropě je možné se setkat asi se 300 druhy. Tělo půdních roupic je obvykle bezbarvé, složené z mnoha segmentů a opasku. Žijí převážně v úzkém kontaktu s půdní pórovou vodou, jejich pokožka je značně náchylná k vysychání. Roupice jsou saprofágové a živí se především rozpadajícím se organickým materiálem, mikroorganismy a houbami a tím v půdách významně přispívají k dekompozici [van Vliet et al., 1995]. Jedná se převážně o hermafrodity, avšak ani partenogeneze či fragmentace jim není cizí. Jejich velikost se pohybuje od 1 do 40 mm. Roupicovití jsou v ekotoxikologii používáni již od roku 1970. Mezi nejvyhledávanější představitelé rodu *Enchytraeus* patří *E. albidus*, *E. crypticus*, *E. luxorius*, *E. buchholzi*, *E. minutus*, *E. fragmentosus* a *E. bulbosus*. Tyto druhy lze snadno chovat za laboratorních podmínek a jsou schopné rychlé reprodukce, která je pro testy toxicity žádoucí [Parmelee et al., 1990]. Délka těla roupice *Enchytraeus crypticus* závisí na kultivačních podmínkách. Pohybuje se v rozmezí 3–12 mm a tělo dospělého jedince se skládá z 34 segmentů. Embryonální vývoj trvá při 21 °C 9 dní a mláďata dospívají během 8 dní. Jeden kokon může obsahovat až 35 vajíček. Délka životního cyklu je přibližně 85 dní [Holubářová, 2004]. *E. crypticus* je často volen při ekotoxikologických testech zejména kvůli své krátké generační době, snadné kultivaci a velkému počtu narozených mláďat. Chov může být uskutečněn jak v umělé půdě [Westheide and Graefe, 1992] tak i v agaru [Djurisic et al., 2012].



Obrázek 9: Chov *Enchytraeus crypticus* v CETA VÚOS a.s. (foto Kateřina Hrdá)



## 2 PRAKTICKÁ ČÁST

### 2.1 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - Plnění dílčích cílů 1

#### 2.1.1 Syntéza Ag NPs

Před samotným započítím ověřování použitelnosti standardních testů ekotoxicity prováděných dle stávajících norem OECD pro účely testování toxicity nanočástic bylo třeba připravit vhodné nanočástice a zjistit jaké je jejich chování v expozičních médiích. Volba padla na stříbrné nanočástice (Ag NPs) z důvodu jejich známé toxicity na vodní organismy. Nanočástice měly být připraveny redukcí roztoků dusičnanu stříbrného různými redukčními agens. Volba vhodného redukujícího činidla má zásadní vliv nejen na výslednou velikost a distribuci velikostí částic, ale i na stabilitu nanočástic v roztoku. Například stabilita koloidního roztoku Ag NPs, které jsou připraveny pomocí redukce maltózou v alkalickém prostředí je odhadována v řádu měsíců [Badawy et al., 2010].

Prvním redukčním činidlem, které bylo pro přípravu Ag NPs zvoleno, byla glukóza. Postup syntézy vycházel z modifikovaného Tollensova postupu [Tolaymat et al., 2010]. Reakční směs sestávala z 10 ml demineralizované vody a 10 ml 50 mmol.l<sup>-1</sup> roztoku hydroxidu sodného, do které byl nadávkován roztok vzniklý smísením 10 ml 5 mmol.l<sup>-1</sup> roztoku dusičnanu stříbrného v 25 mmol.l<sup>-1</sup> roztoku amoniaku. Takto připravená reakční směs byla zahřáta na teplotu 25°C a následně do ní bylo za intenzivního míchání na magnetické míchačce najednou vliáno 10 ml 50 mmol.l<sup>-1</sup> vodného roztoku glukózy. Reakční směs byla po 15 minutách přelita do tmavé zásobní lahve a vzniklý koloidní systém byl analyticky hodnocen.

Dalším redukčním agens, které bylo uplatněno při syntéze Ag NPs, je citrát sodný. Laboratorní postup syntézy vycházel z práce [Cai et al., 2010]. Reakční směs sestávala ze 40 ml demineralizované vody, 0,385 ml 24 mmol.l<sup>-1</sup> roztoku dusičnanu stříbrného a 3,5 ml 1% roztoku amoniaku. Do této, na magnetickém míchadle dobře míchané reakční směsi, byly nadávkovány 4 ml čerstvě připraveného 0,05 % roztoku citrátu sodného a směs

byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byla reakční směs naředěna 50 ml demineralizované vody a přelita do zásobní lahve.

Další cesta syntézy Ag NPs na mokré cestě vedla přes redukcí dusičnanu stříbrného borohydridem sodným v stabilizujícím prostředí polyvinylpyrrolidonu. Syntéza spočívala v nadávkování 5 ml 2 mmol.l<sup>-1</sup> roztoku AgNO<sub>3</sub> do 15 ml demineralizované vody a takto vzniklý roztok byl po kapkách dávkován do čerstvě připraveného 2 mmol.l<sup>-1</sup> roztoku NaBH<sub>4</sub>. Tato reakční směs byla umístěna v nádobě s ledovou lázní a na magnetickém míchadle intenzivně míchána. Po dokončení dávkování roztoku dusičnanu byl roztok ponechán ještě 10 minut reagovat, aby nebyl narušen krystalizační proces vznikajících jader nanočástic a poté byl koloidního roztoku Ag NPs nadávkován 0,2 % roztok PVP v množství 100 µl. Následně byla odstraněna ledová lázeň, směs byla za stálého míchání při laboratorní teplotě temperovat a po dosažení 20°C byla slita do zásobní lahve. Laboratorní postup syntézy vycházel z práce [Van Dong et al., 2012].

Pro ověření stability syntetizovaných nanočástic bylo třeba ověřit jejich chování v demineralizované vodě. Ta byla využívána pro přípravu vzorků o potřebné koncentraci tak, aby bylo možno Ag NPs analyzovat za pomoci nejrůznějších analytických technik. Dále bylo nutné zjistit aglomerační chování Ag NPs v kapalných médiích určených pro testování ekotoxicity Ag NPs. Pro tyto testy byly zvoleny Ag NPs připravené redukcí glukózou, jelikož převyšovaly jiné systémy hned v několika směrech. Koloidy připravené tímto způsobem obsahovaly částice, jejichž distribuce velikostí byla ze všech syntetizovaných nejužší, jejich koncentrace v primárním koloidním roztoku byla nejvyšší a neméně důležitým bodem pro potřeby využití v ekotoxikologii je fakt, že cukry jsou ze všech redukčních agens použitých pro syntézu redukovadla s minimální toxicitou pro vodní organismy a tak je předpoklad, že rezidua tohoto redukčního činidla absorbovaná na povrchu nanočástic budou jen minimálně ovlivňovat výsledky testů.

## 2.1.2 Charakterizace Ag NPs

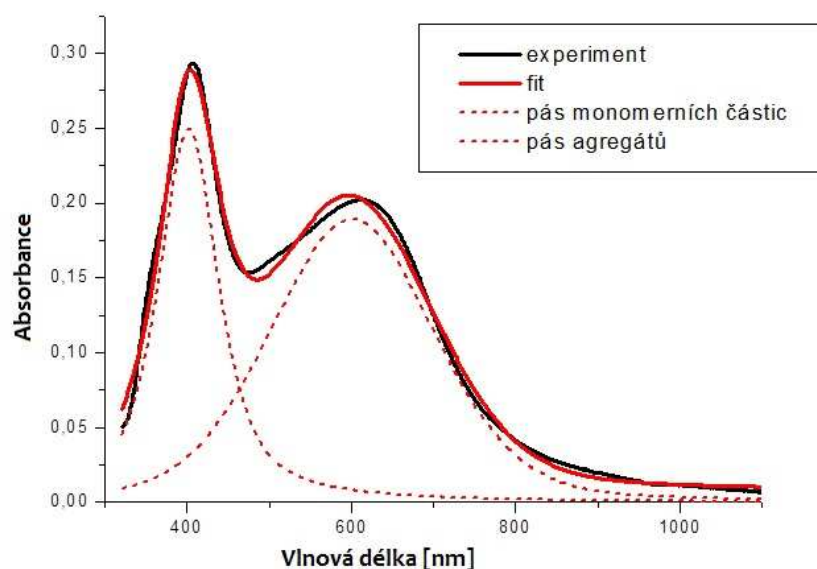
### 2.1.2.1 UV-Vis

UV-Vis je běžně dostupná laboratorní technika, která poskytuje pro nanočástice s povrchovou plazmonickou rezonancí rychlé a relativně levné výsledky s vysokou vypovídací hodnotou a minimálními nároky na laboratorní vybavení. Proto byla i v našem případě do charakterizace syntetizovaných Ag NPs zapojena právě tato technika. Měření byla prováděna v transmisním modu s kyvetou o délce optické dráhy 10 mm, na přístroji Perkin Elmer Lambda 12. Měření probíhalo s krokem 1 nm ve spektrální oblasti 190 – 1100 nm rychlostí 240 nm.min<sup>-1</sup>. Stabilita byla zjišťována nejen v primárním koloidu po samotné syntéze a následně po jeho naředění demineralizovanou vodou, ale i v různých kapalných médiích, která byla využívána pro testy ekotoxicity Ag NPs. Pro ověření stability v demineralizované vodě byla sledována časová závislost poklesu absorpance pásu o vlnové délce 417 nm po dobu 80 minut. Sledovaná koncentrační řada byla 10, 50, 100 a 250 μmol.l<sup>-1</sup> Ag NPs. Dále bylo prováděno hodnocení vlivu koncentrace NPs na aglomeraci v M203. UV-Vis spektra koloidních roztoků o koncentraci 50 μmol.l<sup>-1</sup> byla snímána od okamžiku vnesení primárního koloidu do kapalného média po dobu 80 min. Pomocí UV-Vis bylo také zjišťováno chování nanočástic při osvětlení systému různými vlnovými délkami. Cílem tohoto experimentu bylo posouzení vlivu slunečního záření na míru a rychlost aglomerace syntetizovaných AgNPs v kapalném médiu pro testování ekotoxicity dle OECD 203. K tomuto účelu bylo použito polychromatické světlo o plošné hustotě zářivého toku 1600 W.m<sup>-2</sup>, což přibližně odpovídá intenzitě slunečního záření dopadajícího na planetu za jasného letního dne. Dále byly využity 2 vlnové délky světla monochromatického (417 a 740 nm), což jsou vlnové délky odpovídající maximům absorpance primárních nanočástic a jejich aglomerátů. Aby bylo možno kvantitativně vyjádřit úbytek nanočástic a nárůst počtu aglomerátů ve sledovaném systému, je nutné provést dekonvoluci těchto spekter a odlišit tak pás nanočástic a pás aglomerátů. K tomuto algoritmickému procesu byl použit program Origin Pro 9, ve kterém byla zvolena funkce fitování Voigt. Ta je definována **rovnící 3**.

$$y = y_0 + A \frac{2 \ln 2}{\pi^{3/2}} \frac{W_L}{W_G^2} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{e^{-t^2}}{\left(\sqrt{\ln 2} \frac{W_L}{W_G}\right)^2 + \left(\sqrt{4 \ln 2} \frac{x-x_c}{W_G} - t\right)^2} dt$$

Rovnice 3

Jako nejvhodnější způsob dekonvoluce spektra byla separováním zvolena metoda na dva pásy, tedy pásu odpovídajícího jednotlivým částicím Ag NPs a pásu aglomerátů. Grafické znázornění celého dekonvolučního procesu je prezentováno na **grafu 2**.

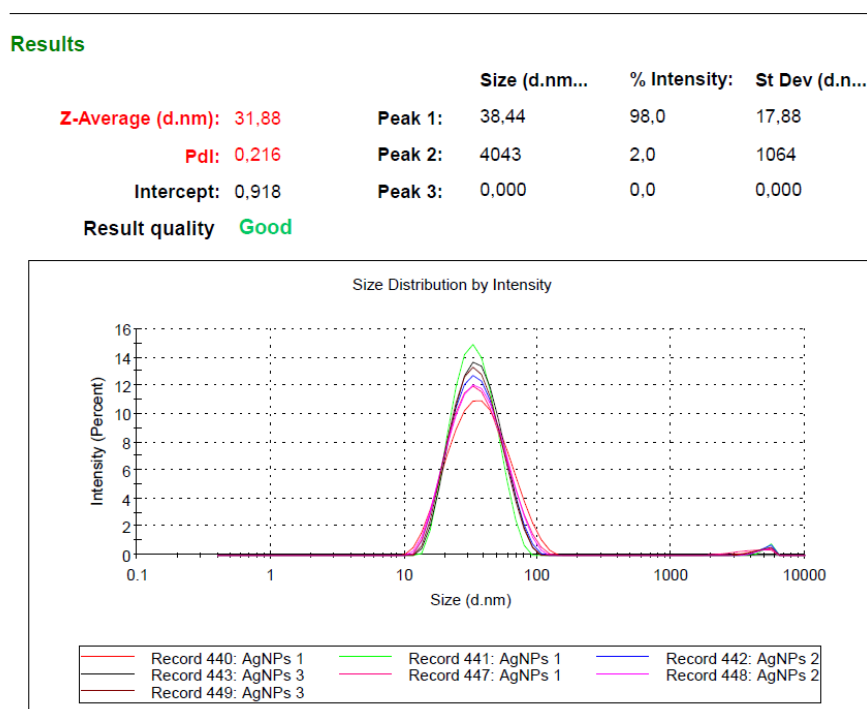


Graf 2: Ukázka dekonvoluce UV-Vis spektra pro koncentraci 50  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  Ag NPs v M203.

Z dat, která jsou zpracována dekonvolucí naměřených spekter je poté možno sestavit graf úbytku Ag NPs v porovnání s původní koncentrací. Z takto získaných dat je patrné, že na míru a rychlost aglomerace a s ní spojeného úbytku nanočástic v měřeném systému, má vliv celá řada faktorů, na jejichž váhu lze poté usuzovat.

### 2.1.2.2 DLS

Charakterizace hydrodynamických průměrů připravovaných koloidních roztoků Ag NPs byla uskutečňována za pomoci DLS na přístrojích ZetaPALS Potential Analyzer (Brookhaven Instruments, USA) a ZetaSizer Nano (Malvern, UK). Vzorky k měření stability koloidu v demineralizované vodě byly připravovány tak, že byla měřící kyveta naplněna do poloviny demineralizovanou vodou a do ní byl po kapkách dávkován měřený koloid tak, aby byla odezva signálu rozptylovaného laseru zhruba v polovině měřícího rozsahu přístroje. Signál dynamicky rozptýleného světla, z kterého je  $D_H$  kalkulován, je snímán po dobu 30 sekund při 10 replikacích a data jsou dále statisticky zpracována v programu MS Excel (střední hodnota, medián a směrodatná odchylka), pokud je měřeno na přístroji Brookhaven. V případě měření na přístroji Malvern je výstupem z měření již přístrojem vypracovaný protokol, jehož část je možné vidět na **Obr. 10**. Zde jsou výsledky z měření velikosti částic Ag NPs syntetizovaných redukcí glukózou.



Obrázek 10: Část protokolu z měření hydrodynamického průměru Ag NPs přístroje ZetaSizer Nano (Malvern, UK).

### 2.1.2.3 AFM

Pro určení reálné velikosti a zjištění tvaru syntetizovaných nanočástic bylo použito mikroskopických technik. Syntetizované Ag NPs byly zobrazeny pomocí AFM topologických snímků vzorků připravovaných metodou „spin coating“. Primární syntetizovaný koloid byl nakápnut při 15 x g na leptané podložní mikroskopické sklo, nebo na vysoce orientovaný pyrolytický grafit (HOPG, Highly oriented pyrolytic graphite). To je vrstevnatá forma syntetického grafitu s atomární rovností používaná jako substrát. Příprava vzorku k měření založená na metodě „spin-coating“ zaručuje nízkou míru aglomerace a agregace původních částic během přípravy vzorku a k rovnoměrné distribuci částic v ploše. Vzorky byly následně vakuově vysušeny. Mikroskopie atomárních sil byla uskutečňována na přístroji SolverProM (NT-MDT, Rusko) se sondou HA\_NC. Měření byla prováděna s rezonanční frekvencí hrotu 185 kHz a silou kmitu  $k = 4,6 \text{ N.m}^{-1}$  v semi-kontaktním modu, který byl nastaveným na 40 % volné oscilace.

### 2.1.2.4 SEM

Skenovací elektronová mikroskopie byla uskutečněna na přístroji JSM-7500F (JEOL, USA) s nízkým urychlovacím napětím 10 kV. Jako podložní materiál pro přípravu vzorků byl použit vysoce orientovaný pyrolytický grafit, na který byl metodou „spin coating“ při 90 x g nakápnut připravený koloidní roztok nanočástic. Vzorky byly následně vysušeny pomocí vakua a pozlaceny.

### 2.1.2.5 ICP-OES

Zjišťování koncentrace syntetizovaných koloidů Ag NPs bylo uskutečněno za pomoci optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem na spektrometru Optima 2000 DV (Perkin Elmer Inc., USA). Příprava vzorků spočívala v pouhém naředění koloidů demineralizovanou vodou v odměrných baňkách, které byly před použitím důkladně umyty. Vzorky byly dávkovány do koncentrického zmlžovače (Glass Expansion Pty Ltd, Austrálie) rychlostí  $3 \text{ ml.min}^{-1}$ , kde došlo k tvorbě prvotního aerosolu. Ten byl zbaven větších kapek v 70ml cyklonické mlžné komoře (Glass Expansion Pty Ltd, Austrálie) a zbylý podíl

aerosolu byl vnášen do argonového plazmatu. Spotřeba argonu je pro toto uspořádání 11 l.min<sup>-1</sup>. Zdrojem vysokofrekvenčního plazmatu je na tomto přístroji volně běžící robustní generátor o frekvenci 40,68 MHz s maximálním výkonem 1500 W. Spektrometr Optima 2000 DV je vybaven termicky stabilizovaným monochromátorem délky 0,75 m s krokem nastavení vlnových délek 0,0001 nm a mřížkou s 1800 vrypy.

#### **2.1.2.6 XRD**

Difrakční data z vysušených vzorků Ag NPs byly získány za pomoci D8-Advance difraktometru (Bruker AXS, Německo) s Bragg - Brentano  $\theta - \theta$  geometrií (40 kV, 40 mA) při pokojové teplotě. Měření bylo uskutečněno za použití Cu-K $\alpha$  záření se sekundárním grafitovým monochromátorem. Difrakční úhly byly měřeny od 37° do 39,5° ( $2\theta$ ) s krokem 0,02° a dobou 30 s na jeden krok.

### **2.1.3 Testy dle OECD – hrotnatka velká**

Modelový organismus *Daphnia magna* byl použit pro testování jak akutních, tak reprodukčních toxických účinků Ag NPs. Testování ekotoxicity na modelovém organismu *Daphnia magna* patří k základním testům pro testování jak akutních, tak reprodukčních toxických účinků chemikálií v oddělení CETA podniku VÚOS a.s. Z toho důvodu byl využit i pro potřeby testování akutních i reprodukčních toxických účinků nanočástic a ověření použitelnosti testů ekotoxicity prováděných dle stávajících norem OECD. Veškeré hrotnatky použité pro testování pocházely z chovu oddělení CETA VÚOS a.s. V obou typech testování ekotoxicity byly použity nestabilizované Ag NPs připravené redukcí stříbrné soli glukózou.

#### **2.1.3.1 Akutní toxicita**

Akutní toxicita Ag NPs byla testována v M203, které je pro tento test předepsáno v příslušném standardním operačním postupu SOP č. M/40/2 [VÚOS, 2012]. Projevem toxicity u tohoto druhu testu je inhibice pohybu hrotnatek. Nejprve byly provedeny předběžné zkoušky akutní toxicity dle směrnice OECD 202, při kterých byla koncentrační řada akutní

toxicity tvořena koloidy o koncentracích 125, 250 a 500  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Úplnou zkoušku akutní toxicity pak tvořila koncentrační řada 0, 15, 30, 60, 120 a 240  $\mu\text{g.l}^{-1}$  Ag NPs. Jako kontrolní skupina byly použity hrotnatky umístěné v M203 bez obsahu Ag NPs.

### 2.1.3.2 Reprodukční toxicita

Reprodukční toxicita Ag NPs byla testována v médiu M4, které je pro tento test předepsáno ve standardním operačním postupu SOP č. M/40/2. Složení tohoto živného a kultivačního roztoku, včetně příslušných koncentrací jeho složek, shrnuje **tabulka 1**. Test probíhal dle protokolu OECD 211. Na základě výsledků z testů akutní toxicity byla stanovena koncentrační řada pro předběžnou zkoušku 0, 10, 20 a 40  $\mu\text{g.l}^{-1}$  Ag NPs a v následném úplném testu reprodukční toxicity byla koncentrační řada ještě doplněna o koncentraci 80 a 160  $\mu\text{g.l}^{-1}$  Ag NPs. Jako kontrolní skupina byly použity hrotnatky umístěné v M4 bez obsahu Ag NPs. Jelikož se jedná o dlouhodobý test trvající 28 dní, hrotnatky byly krmeny každý pracovní den. Množství krmiva na jednu hrotnatku odpovídalo množství 0,5 mg C na den.

Tabulka 1: Kompozice média M4 a koncentrace jednotlivých složek

Chemikálie	Koncentrace [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]	Chemikálie	Koncentrace [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]
$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5	$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	0,0022
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,995	$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0,0006
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,85	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293,8
$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,36	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123,3
LiCl	0,31	KCl	0,58
RbCl	0,07	$\text{NaHCO}_3$	64,8
$\text{SrCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,15	$\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10
NaBr	0,016	$\text{NaNO}_3$	0,274
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	0,063	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,143
$\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,017	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,184
$\text{ZnCl}_2$	0,013	Thiamin·HCl	0,0075
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01	B12	0,001
KI	0,0033	Biotin	0,0008



#### **2.1.4 Testy dle OECD – dánío pruhované**

Jelikož patřily v oddělení CETA podniku VÚOS a.s. testy ekotoxicity na modelovém organismu *Danio rerio* mezi základní testy jak akutních, tak vývojových a embryonálních toxických účinků chemikálií, bylo přistoupeno k testování ekotoxicity NPs na tomto zástupci z říše ryb.

##### **2.1.4.1 Embryonální a vývojová toxicita AgNO<sub>3</sub>**

Před samotným počátkem testování toxicity nanočástic bylo provedeno pro srovnání testování vývojové a embryonální toxicity dusičnanu stříbrného, jakožto zástupci ve vodě rozpustné stříbrné soli. Testování toxicity stříbrného iontu bylo provedeno dle směrnice OECD 212, která předepisuje uskutečnění testu v M203. Koncentrace jednotlivých roztoků použitých v testu byla 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 a 5,0  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  AgNO<sub>3</sub> a test byl uskutečněn semistatickým způsobem. To znamená, že embrya a včákové plůdky byly exponovány 24 hodin experimentálnímu roztoku o příslušné koncentraci a po uplynutí této doby jim byl experimentální roztok vyměněn za nový, čerstvě připravený.

##### **2.1.4.2 Embryonální a vývojová toxicita Ag NPs**

Experimenty s Ag NPs, které měly odhalit slabá místa při testování ekotoxicity nanomateriálů pomocí běžných normovaných přístupů dle protokolů OECD byly provedeny ve stejném uspořádání, jako testy s AgNO<sub>3</sub>, dle směrnice OECD 212. Totožná byla kompozice experimentálního média M203 i semistatická výměna koloidních roztoků jednou za 24 hodin. Experimentální koloidy byly připraveny prostým smísením M203 a zásobního roztoku Ag NPs tak, aby byla vytvořena koncentrační řada 10, 25, 50, 100 a 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  Ag NPs.

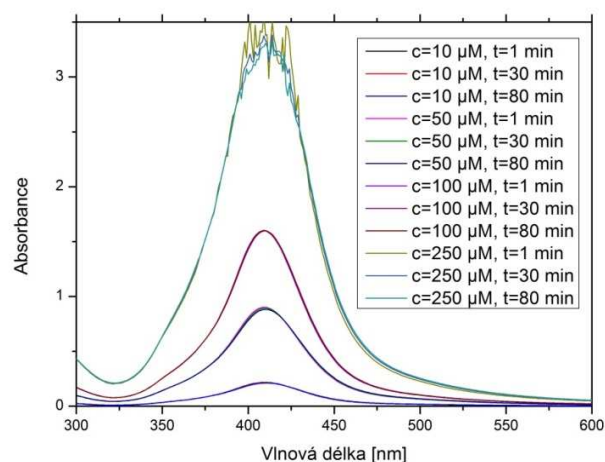
## 2.2 VÝSLEDKY A DISKUZE - Plnění dílčích cílů 1

### 2.2.1 Charakterizace Ag NPs

Syntetizované nanočástice byly charakterizovány jak v primárním koloidu, tak i po naředění demineralizovanou vodou. Velikost syntetizovaných Ag NPs byla závislá na použitém redukčním činidle a klesala v pořadí glukóza < NaBH<sub>4</sub>+PVP << citrát sodný.

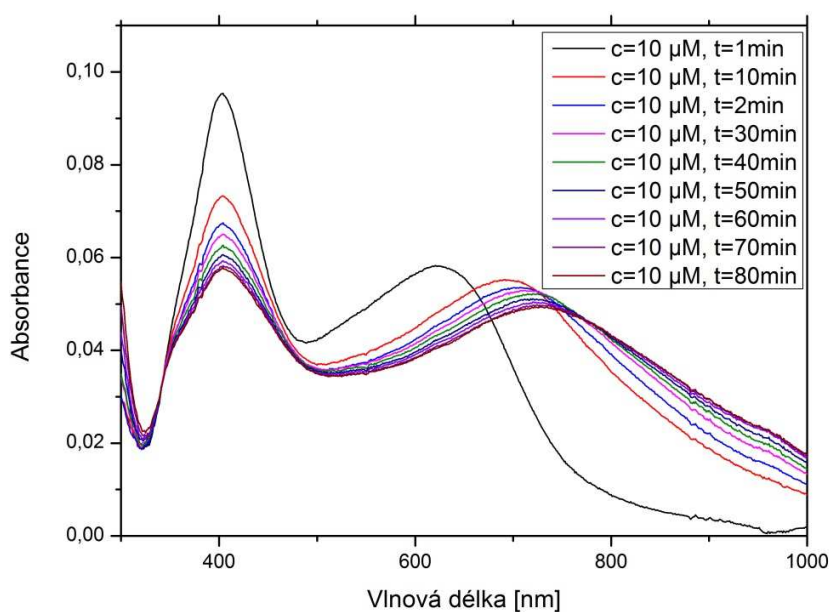
#### 2.2.1.1 UV-Vis

Pro ověření stability syntetizovaného systému nanočástic v demineralizované vodě byla sledována časová závislost poklesu absorpance píku při vlnové délce 417 nm po dobu 80 minut. Sledovaná koncentrační řada byla 10, 50, 100 a 250 μmol.l<sup>-1</sup> Ag NPs. Jak je patrné z **grafu 3**, po dobu experimentu nedošlo k jakémukoli poklesu absorpance v žádné z koncentračních hladin. To znamená, že připravený koloid je v demineralizované vodě stabilní. Jelikož koncentrace 250 μmol.l<sup>-1</sup> vykazovala hodnotu absorpance nad hodnotu 3, další experimenty týkající se chování Ag NPs v M203 sledované pomocí UV-Vis byly prováděny s koncentrací 50 μmol.l<sup>-1</sup>. Při této koncentraci se absorpance pohybuje do hodnoty 1 a odpovídá tak lineární části Lambert-Beerova zákona.



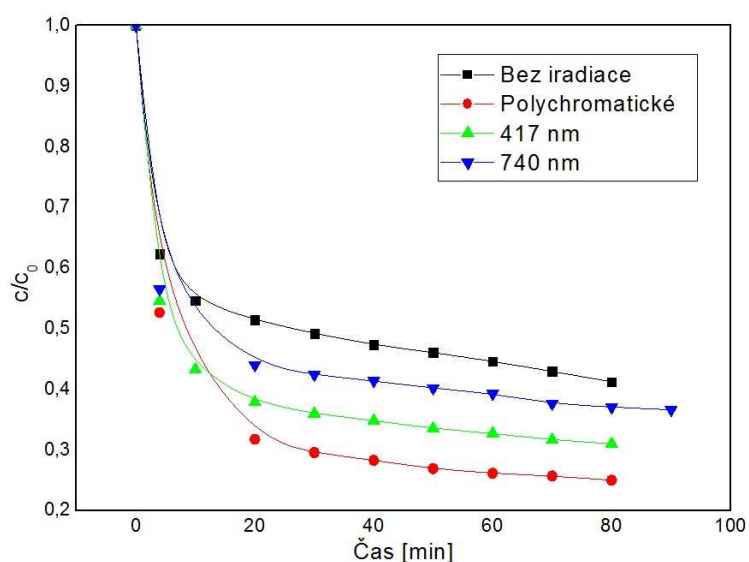
Graf 3: Chování syntetizovaných Ag NPs v demineralizované vodě v čase.

Pomocí UV-Vis bylo sledováno chování syntetizovaných Ag NPs v kapalném médiu, které je používáno pro testy akutní toxicity na rybách definované normou OECD 203. Z průběhu křivek absorpčních pásů (**graf 4**) je patrné, že s plynoucím časem dochází k poklesu absorpčního maxima okolo vlnové délky 417nm, které odpovídá plazmonické rezonanci částic o velikosti okolo 40 nm a posunu absorpčního maxima k hodnotám okolo 600 nm. Oba tyto jevy jsou způsobeny aglomeračním chováním nanočástic. Pokles absorpčního pásu na 417 nm odpovídá úbytku monomerních částic, které vytvořily aglomeráty. Posun druhého absorpčního maxima, které odpovídá aglomerátům, směrem k vyšším vlnovým délkám naznačuje růst aglomerátů. V případě dostatečně dlouhé doby měření dochází k úplnému vymizení absorpčního pásu monomerních částic a zformování jediného absorpčního pásu za hranicí 700 nm. Tato naměřená data jsou v dobré shodě s teorií koloidních soustav [Debye and Hückel, 1923], DLVO teorií [Derjaguin and Landau, 1993] i daty prezentovanými v následujících odstavcích.



Graf 4: Chování syntetizovaných Ag NPs v M203 v čase.

Pro posouzení vlivu elektromagnetického záření na míru a rychlost aglomerace syntetizovaných Ag NPs v M203 byl proveden experiment, ve kterém byla aparatura, v níž probíhala aglomerace, ozařována polychromatickým světlem o hustotě zářivého toku  $1600 \text{ W.m}^{-2}$ . Výsledky experimentů, kdy byl systém o koncentraci  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$  Ag NPs v M203 ozařován polychromatickým světlem a lasery o vlnových délkách 417 a 740 nm po dekonvoluci spekter, jsou znázorněny na **grafu 5**. Z něho plyne, že nejmarkantnější aglomerace probíhá za ozařování polychromatickým světlem, následovaná ozařováním světlem modrým, které odpovídá maximu absorpčního pásu monomerních částic a je následována ozařováním světlem o vlnové délce 740 nm, tedy světlem modrým. Za předpokladu, že do systému není dodána žádná energie ve formě záření, aglomerační chování nanočástic je v porovnání s ostatními nejnižší.

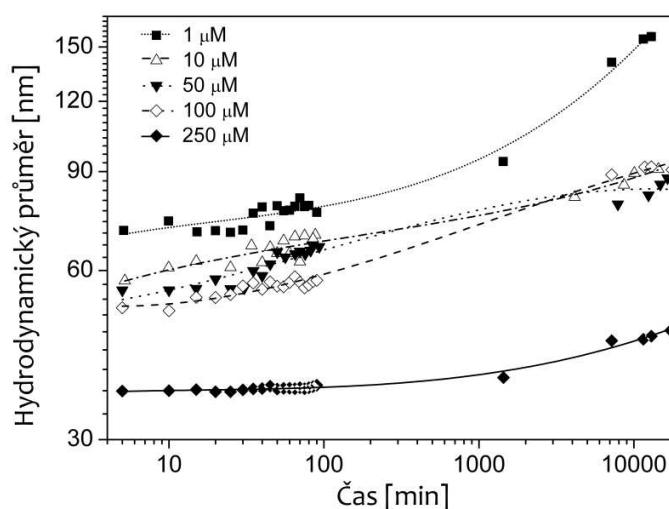


Graf 5: Porovnání rychlosti aglomerace Ag NPs při ozařování vzorku různými vlnovými délkami záření. Parametr  $c/c_0$  vyjadřuje úbytek koncentrace ve vztahu ke koncentraci počáteční.

### 2.2.1.2 DLS

Hodnoty hydrodynamických průměrů byly měřeny pomocí techniky dynamického rozptylu světla na přístrojích, jejichž laser operuje na vlnové délce 660 nm a jeho výkon je 35 mW. Pro experiment, který měl ověřit stabilitu koloidního systému Ag NPs

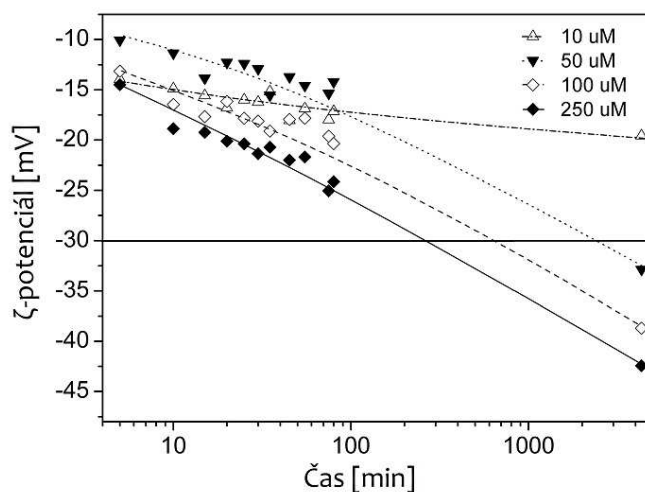
v demineralizované vodě a potvrdit výsledky získané pomocí UV-Vis byl zvolen koloid připravený redukcí pomocí glukózy. Naředěný koloidní systém vykazoval vysokou stabilitu i při měření změny hydrodynamického průměru částic, což je v dobré shodě s experimenty, které byly hodnoceny pomocí UV-Vis. Chování tohoto koloidního systému při ředění demineralizovanou vodou bylo ověřeno v koncentračním rozsahu 1 – 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Výsledná data z těchto DLS experimentů shrnuje **graf 6**. Hodnoty  $D_H$  se v iniciační fázi experimentu měnily od 40 nm pro koncentraci 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  až k hodnotě 70 nm pro koncentraci 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Tento nárůst  $D_H$  je způsoben elektrostatickými repulzemi v elektrické dvojvrstvě hydratovaných nanočástic. Další růst  $D_H$  v čase indikuje aglomerační chování Ag NPs a jak je patrné z **grafu 6**, nárůst  $D_H$  je tím větší, čím nižší je koncentrace Ag NPs v sledovaném systému. Pravděpodobným důvodem tohoto jevu jsou elektromagnetické repulze ve Sternově elektrické dvojvrstvě, která se díky snižující se iontové síle zvětšuje [Carneiro-da-Cunha et al., 2011].



Graf 6: Nárůst hydrodynamického průměru Ag NPs v čase v závislosti na koncentraci při ředění demineralizovanou vodou.

Tuto myšlenku podporuje i snížení měřené hodnoty  $\zeta$ -potenciálu z - 43 mV v původním systému, až k hodnotám - 10 až -15 mV, v závislosti na míře naředění. Systémy s absolutní

hodnotou  $\zeta$ -potenciálu větší než 30 jsou považovány za stabilní. Hodnota  $-30$  mV je v **grafu 7** znázorněna horizontální čarou. Námi pozorované systémy od koncentrace  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  výše dosáhly hodnoty  $-30$  mV v ustáleném stavu, avšak koloid o koncentraci  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  této hranice nedosáhl ani po extrapolování experimentálních hodnot k nekonečnu. O tomto systému není tedy možné přemýšlet jako o systému stabilním. Naředěné systémy nanočástic stříbra se postupem času stabilizovaly vznikem aglomerátů původních Ag NPs, jak je možno vypočítat z nárůstu hodnot  $D_H$  a poklesu hodnoty  $\zeta$ -potenciálu v čase. Změny nárůstu  $D_H$  jsou pomalé, mají nízkou rychlostní konstantu ( $k = 0,011 \text{ h}^{-1}$ ), avšak po dobu nutnou k provedení ekotoxikologického experimentu (13000 minut, 8 dní) jsou tyto změny evidentní. Během této doby došlo k zdvojnásobení hodnoty  $D_H$ , oproti hodnotě počáteční, měřené 5 minut od naředění roztoků.



**Graf 7:** Závislost změny  $\zeta$ -potenciálu koloidních systémů o různé koncentraci Ag, které vznikly naředěním primárního koloidu demineralizovanou vodou.

Pomocí dynamického rozptylu světla bylo následně zkoumáno i chování syntetizovaných nanočástic stříbra v kapalném médiu M203. Jedná se o vodný roztok solí o konduktivitě  $680 \mu\text{S.cm}^{-1}$ . Tvorba aglomerátů byla zjišťována pro koncentrační rozsah  $1 - 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$  Ag NPs v M203 a efekt míry zředění tohoto roztoku demineralizovanou vodou na rychlost a míru aglomerace byl testován pro rozsah konduktivit  $7 - 680 \mu\text{S.cm}^{-1}$ .

Z naměřených dat byly následně kalkulovány základní kinetické parametry, jako jsou řád reakce, rychlostní konstanta ( $k$ ) a hydrodynamický průměr aglomerátů v ustáleném stavu ( $D_H^{inf}$ ).

Prudký nárůst průměrné velikosti  $D_H$  během prvních 5 minut po přípravě koloidu v celém koncentračním rozmezí (1-250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  Ag NPs) poukazuje na opačné chování syntetizovaných Ag NPs v M203 a demineralizované vodě. Zatímco v demineralizované vodě došlo k největšímu nárůstu  $D_H$  v koloidním roztoku s nejnižší koncentrací Ag NPs ( $D_H_{1\mu\text{M}}^{5\text{min}} = 72 \text{ nm}$ ), v případě koloidního systému připraveného z M203 bylo dosaženo nejvyšších hodnot  $D_H$  v případě nejkonzentrovanejšího systému ( $D_H_{250\mu\text{M}}^{5\text{min}} = 170 \text{ nm}$ ) a i rychlost, míra aglomerace a konečná velikost aglomerátů se značně liší. V tomto případě se začaly vyskytovat aglomeráty velikosti 650 nm (80 min, 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  Ag NPs), které již nejsou schopny setrvat nadále v roztoku, jelikož síly potřebné k udržení částice ve vznosu jsou překonány silami gravitačními a tyto aglomeráty bylo následně možno vizuálně detekovat na dně měřící kyvety. Růst aglomerační rychlostní konstanty ( $k$ ) i konečný hydrodynamický průměr vzniknuvších aglomerátů v ustáleném stavu  $D_H^{inf}$  byl úměrný koncentraci Ag NPs v koloidním systému. Z důvodu potřeby kvantifikace tohoto jevu, byl nárůst  $D_H$  v čase fitován pomocí **rovnice 4**,

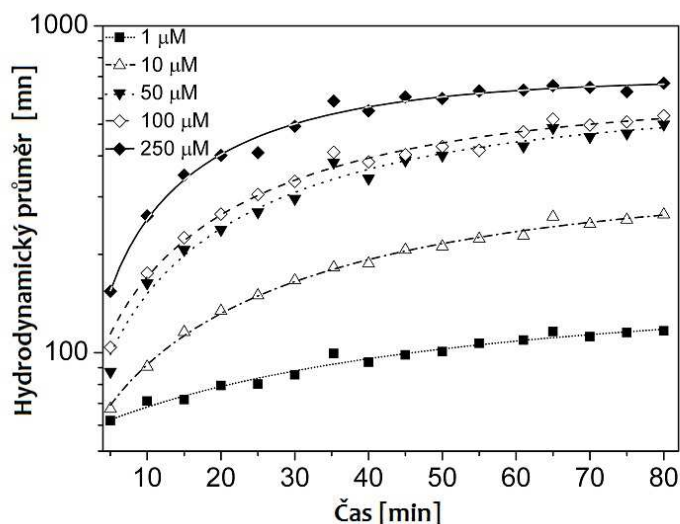
$$D_H^t = D_H^{inf} + (D_H^0 - D_H^{inf}) * e^{-k*t}$$

Rovnice 4

kde je  $k$  rychlostní konstanta,  $D_H^0$  je počáteční hydrodynamický průměr a  $D_H^{inf}$  je hydrodynamický průměr v ustáleném stavu. Experimentálně získaná data velice dobře korelují s daty modelovanými pomocí **rovnice 4**, jak je dobře patrné z **grafu 8** (body reprezentují naměřená data, křivky data fitovaná).

Velikost rychlostní konstanty aglomerace Ag NPs roste v rozsahu 0,89 – 2,5  $\text{h}^{-1}$  a velikost hydrodynamického průměru aglomerátů se pohybuje od 145 nm do 675 nm a to úměrně zvyšující se koncentraci stříbra v M203. Na základě těchto měření lze říci, že obsahuje-li koloidní systém vyšší koncentraci Ag NPs, aglomeráty jsou formovány rychleji,

což vede k jejich rychlejší sedimentaci a tím snižování jejich koncentrace v objemu koloidu. Naopak dochází k zvyšování obsahu Ag NPs na dně experimentální nádoby.

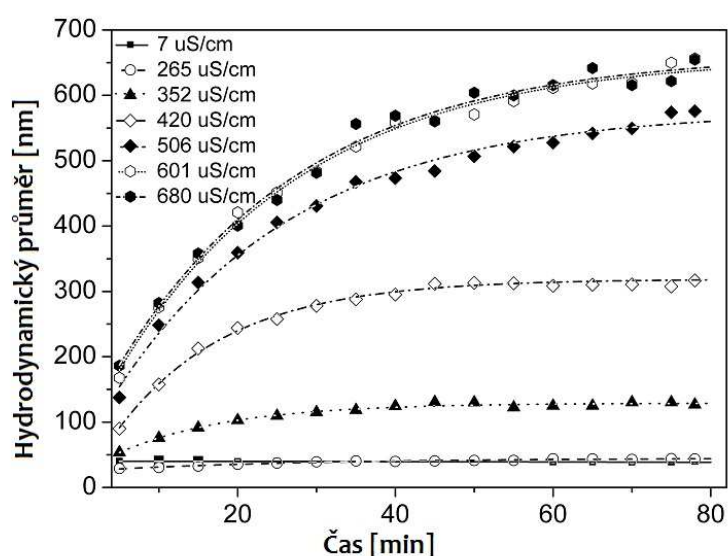


Graf 8: Časová závislost nárůstu hydrodynamického průměru Ag NPs v závislosti na koncentraci částic v M203.

Na základě pozorovaného rozdílného chování Ag NPs během ředění demineralizovanou vodou ( $7 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) a plně koncentrovaným M230 ( $680 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) bylo přistoupeno k testování rychlosti a míry aglomerace Ag NPs v médiích s různou iontovou silou. Ty byly připraveny mísením M203 a demineralizované vody tak, aby bylo dosaženo rovnoměrného pokrytí celé oblasti konduktivit ( $7 - 680 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Koncentrace Ag NPs byla ve všech případech  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Počáteční hydrodynamický průměr rostl během ředění těchto médií proporcčně ke zvyšující se konduktivitě médií. Závislosti růstu hydrodynamického průměru v čase nejsou monotónní a z **grafu 8** je patrné, že nárůst  $D_H$  se odehrává s jinými rychlostními konstantami pro každou iontovou sílu zvlášť. Kinetické parametry pro demineralizovanou vodu ( $7 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) byly vypočteny ze závislostí  $D_H$  zobrazených na **grafu 8** v experimentálním čase 13 000 minut, což odpovídá hydrodynamickému průměru v ustáleném stavu  $D_H^{\text{inf}}$ . Rychlostní konstanta aglomerace nemá monotónní trend, ale nejvyšších hodnot ( $k = 4,2 \text{ h}^{-1}$ ) bylo dosaženo pro média se střední iontovou silou, tedy konduktivitou 350 a  $420 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Nad tyto hodnoty konduktivit klesá rychlostní



konstanta  $k$  hodnotě  $k = 2,5 \text{ h}^{-1}$  pro média s konduktivitou vyšší než  $500 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , pro hodnoty konduktivit nižší než  $265 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  klesá rychlostní konstanta  $k$  hodnotě  $k = 2,6$ . Pro demineralizovanou vodu je aglomerační proces extrémně pomalý, což vyjadřuje rychlostní konstanta ve velikosti  $k = 0,011 \text{ h}^{-1}$ . Avšak hodnoty hydrodynamického průměru aglomerátů v ustáleném stavu nekorelují s rychlostními konstantami a s rostoucí konduktivitou rostou monotónně od 50 nm pro hodnoty nižší než  $265 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  až po 665 nm pro konduktivitu  $680 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

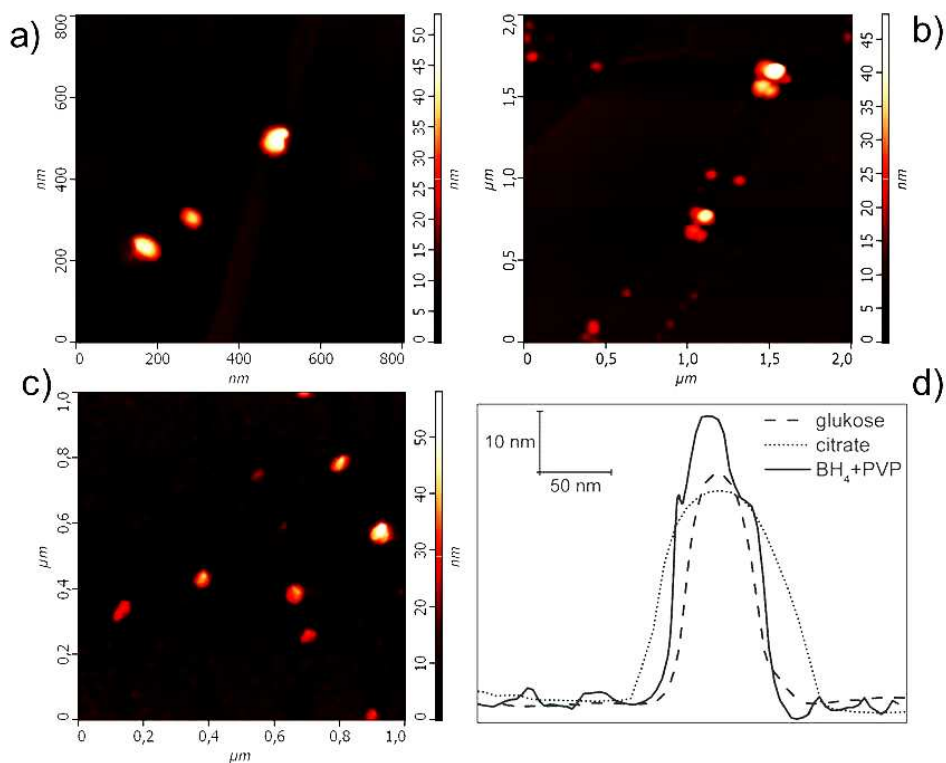


Graf 9: Časová závislost nárůstu hydrodynamického průměru částic testovaného koloidního systému Ag NPs v závislosti na konduktivitě kapalného média M203.

### 2.2.1.3 AFM

Vzorky získané z koloidů, které byly redukovány glukózou, citrátem a borohydridem byly vizualizovány pomocí AFM. Pomocí redukce glukózou byl získán systém s nízkou polydisperzitou, který obsahoval sférické nanočástice s průměrnou velikostí 35-50 nm, jak je patrné z **Obr. 11 A**. Redukce pomocí citrátu poskytla systém se signifikantně vyšší polydisperzitou a tvar vznikuvších nanočástic byl diskovitý až lentikulární, velikost částic se pohybovala v rozmezí 70 – 130 nm v průměru a 40 nm na výšku (**Obr. 11 B**). Redukční systém  $\text{NaBH}_4$ +PVP poskytl kulovité částice o velikosti 45 – 60 nm (**Obr. 11 C**) s vyšší drsností povrchu.

Tento rozdíl mezi hladkým kovovým povrchem a povrchem na kterém jsou absorbovány uhlovodíkové řetězce PVP, je dobře patrný z **Obr. 11 D**.



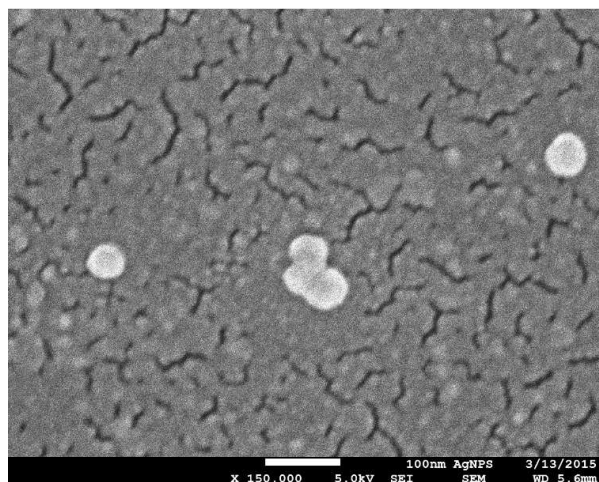
**Obrázek 11: Topologické obrazy Ag NPs získané pomocí AFM. Zobrazované Ag NPs byly připravovány redukcí a) glukózou, b) citrátem, c) borohydridem s PVP. Na obrázku d je zobrazeno porovnání topologie povrchu připravených nanočástic**

Výsledky měření velikosti hydrodynamického průměru částic v koloidu a výsledky měření AFM jsou v dobré shodě pro částice připravené redukcí pomocí citrátu sodného a částice redukované glukózou (**tabulka 2**), avšak velikosti částic, které jsou připravené redukcí  $\text{NaBH}_4$ +PVP se při měření pomocí DLS a AFM zřetelně liší (32 ku 53 nm). Tento rozdíl může být vysvětlen fyzikální podstatou měření. U AFM dochází k přímému kontaktu hrotu AFM sondy s povrchem vzorku a tím detekci obalu částic, jedná se tedy o čistě mechanickou interakci. Obal, který je v tomto případě tvořen organickým stabilizátorem PVP, interaguje s hrotem. Laser v přístroji pro měření DLS operuje při vlnové délce 660 nm, transparentní oblasti této vrstvy PVP. Tento polymer má zakázaný pás energií v UV oblasti,

při 253 nm [Chahal et al., 2011] a tak je pro přístroj DLS tato vrstva neměřitelná. Je tedy možno říci, že užití ani jedné metody není v tomto případě chybou a signifikantní rozdíl v naměřených hodnotách je způsoben tím, že pomocí DLS detekujeme v tomto „core-shell“ systému skrz transparentní slupku pouze jádro a pomocí AFM celou částici. Jedná se tedy o komplementární metody měření.

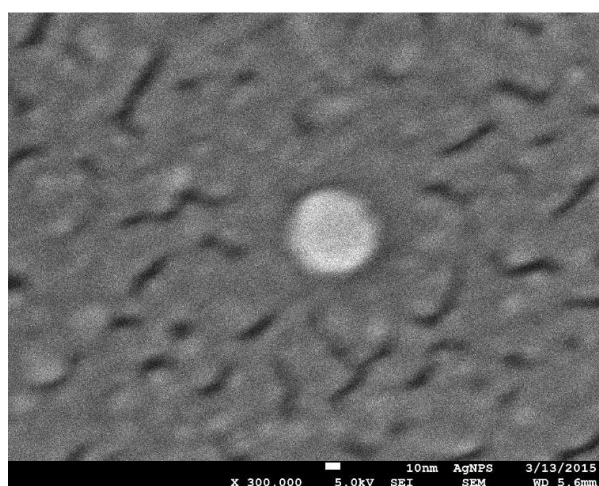
#### 2.2.1.4 SEM

Jako další metoda charakterizace syntetizovaných nanočástic stříbra byla použita skenovací elektronová mikroskopie. Důvodem k užití této mikroskopické techniky byla snaha dosáhnout reálného pohledu na nanočástice a ověření jejich velikosti a sféricity v porovnání s metodami nepřímými, jako je měření pomocí DLS i UV-Vis, či porovnání s jinými druhy mikroskopie, jakou je AFM. Jak je patrné z **Obr. 12 - 14**, syntetizované nanočástice jsou ve svém tvaru sférické, avšak o dokonalých koulích nemůže být řeč. Na povrchu částic jsou patrné nerovnosti a je možno pozorovat i aglomeráty částic. Tyto nerovnosti a defekty mohou do značné míry ovlivňovat výsledky měření pomocí nepřímých charakterizačních technik, jako je DLS, ve kterém dochází ke zvyšování stupně polydisperzity, či UV-Vis, kde dochází k posunu absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám („red shift“). Mikroskopické techniky jsou v tomto směru robustnější, avšak jejich nevýhodou je nízký počet částic ve vzorku, ze kterého je kalkulována finální velikost částic. Částice připravované redukcí citrátem sodným vykazovaly ve všech předešlých případech měření největší velikost částic, nejvyšší polydisperzitu i směrodatnou odchylku měření. To je v dobré shodě i s měřením pomocí elektronové mikroskopie. Diskovitost nanočástic není z principu měření možné ověřit.



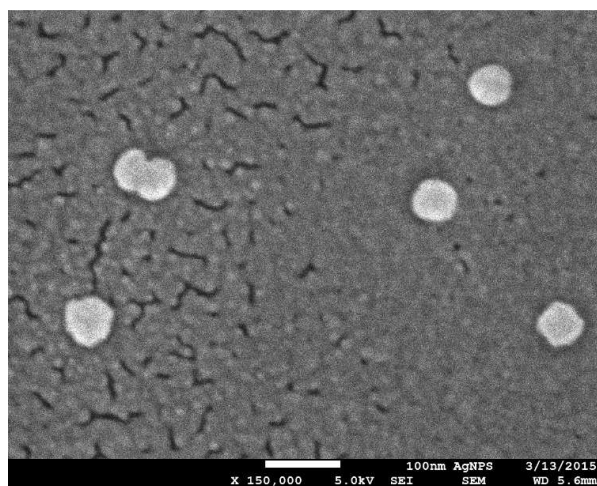
Obrázek 12: Snímek stříbrných nanočástic (Ag NPs) připravených redukcí citrátem z elektronového mikroskopu. Měřítka (100 nm) je zobrazeno v dolní části snímku.

SEM fotografie nanočástic připravených pomocí redukce aminostříbrného komplexu roztokem glukózy potvrzují nejmenší velikost částic ze všech použitých redukčních systémů. Na **Obr. 13** je záběr na jednu nanočástici, jejíž velikost je okolo 35 nm, což je spodní limit velikostí částic, které je SEM schopno zobrazit. Ze snímku je dobře patrná kulovitost částic vznikajících v tomto redukčním systému.



Obrázek 13: Snímek testovaných stříbrných nanočástic připravených redukcí roztokem glukózy pořízený pomocí elektronového mikroskopu. Měřítka (10 nm) je zobrazeno v dolní části snímku.

Na posledním prezentovaném snímku (**Obr. 14**) jsou zachyceny nanočástice stříbra připravené v redukčním systému  $\text{NaBH}_4$ + PVP. Velikost částic, patrná z této fotografie, je v dobré shodě s ostatními výsledky měření velikosti částic, avšak spíše se přiklání k velikosti zjištěné pomocí AFM a to znamená, že je detekován vnější obal, shell, tvořený vrstvou z PVP. Důvodem může být způsob přípravy vzorku. Povrch podložního sklíčka, na kterém je nanesen měřený vzorek, musí být pozlacen, aby byl dostatečně elektricky vodivý a bylo možné měření vůbec provést. Pozlácování je prováděno vakuovým napařováním za nízkých teplot, takže dekompozice vrstvy PVP v důsledku zvýšené teploty je nepravděpodobná.

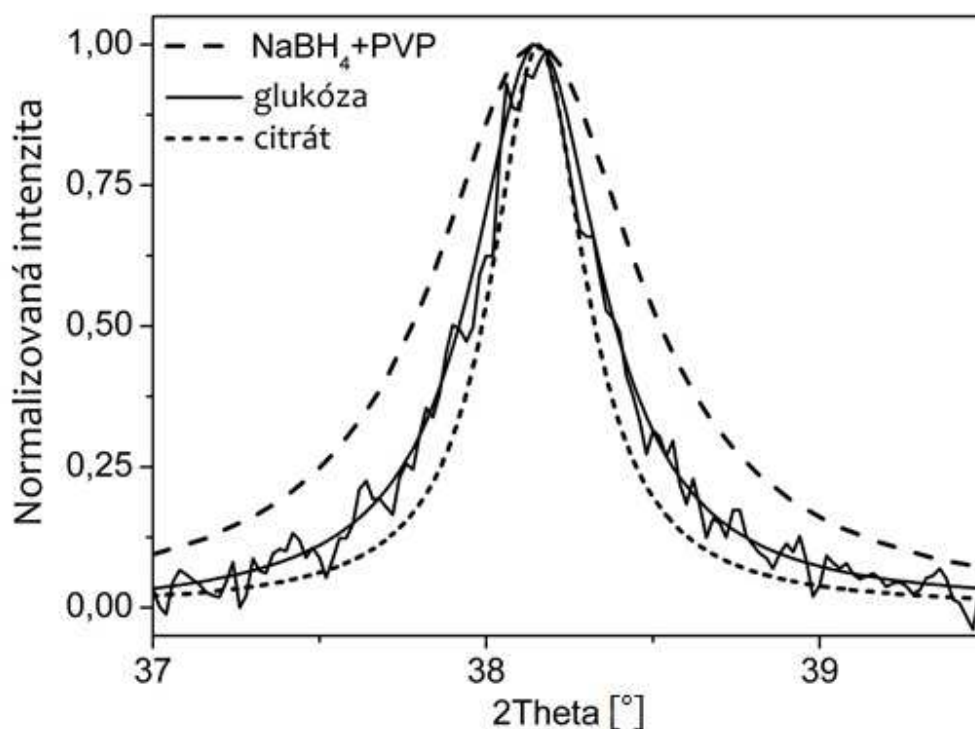


Obrázek 14: Snímek testovaných stříbrných nanočástic připravených redukcí borohydridem pořízený pomocí elektronového mikroskopu. Částice jsou stabilizovány pomocí polyvinylpyrrolidonu (PVP). Měřítka (100 nm) je zobrazeno v dolní části snímku.

### 2.2.1.5 XRD

Jak bylo zmíněno v předešlých kapitolách, koloid připravený redukcí  $\text{NaBH}_4$  a stabilizovaný PVP byl charakterizován jako „core-shell“ systém. Hypotéza o transparentnosti obalu z PVP byla ověřena pomocí měření velikosti krystalinitů technikou XRD. Jelikož je PVP slupka amorfního charakteru, není možné ji za pomoci měření XRD detekovat. Pomocí XRD byly měřeny nejintenzivnější  $K_\alpha$  difrakční čáry stříbra, které se dle **grafu 10** nacházejí pod úhlem  $38,2^\circ$ . Ag NPs krystalizovaly během vzniku nanočástic v kubické struktuře ve všech případech přípravy. Ag NPs připravené redukcí  $\text{NaBH}_4$  s povrchovou

stabilizaci PVP vykazovaly stejnou velikost jako nanočástice připravené reakcí pomocí glukózy. Z difraktogramu je patrné, že částice připravené redukcí pomocí citrátu jsou v porovnání s těmito dvěma redukčními systémy větší. Difrakční čáry byly z dat experimentálních získány fitováním za pomoci Lorentzovy funkce. Difrakční čáry potvrzují kubickou strukturu Ag NPs a rozdíly v pološířce pásů difraktogramu (FWHM) jsou důkazem rozdílných velikostí syntetizovaných nanočástic. Hodnoty FWHM (uvedené v závorkách) byly stanoveny v sestupném pořadí  $\text{NaBH}_4 + \text{PVP}$  (0,737) > glukóza (0,471) > citrát (0,359). Toto je nepřímým potvrzením pro hypotézu, že jsou nanočástice stříbra připravené redukcí  $\text{NaBH}_4 + \text{PVP}$  menší než Ag NPs připravené redukcí glukózy, i když oba mají podobnou velikost odvozenou z měření AFM.



Graf 10: Porovnání výřezů z rentgenových difraktogramů pořízených na  $\text{K}\alpha$  čarách stříbrných nanočástic připravených redukcí citrátem, glukózou a  $\text{NaBH}_4 + \text{PVP}$ .

Poté co byly definovány základní fyzikálně chemické parametry Ag NPs a bylo zjištěno jejich chování v expozičním médiu M203, bylo přistoupeno k testování ekotoxicity Ag NPs dle scénáře, který odpovídá postupům popsaným ve směrnících OECD [OECD, 2004, OECD, 2012, OECD, 1998]. Na základě těchto experimentů měly být nalezeny kritické parametry ovlivňující použitelnost postupů, které byly původně navrženy pro testování ve vodě rozpustných chemikálií, pro testování ekotoxicity nanočástic. Pozornost byla zaměřena zejména na ty parametry, které negativně ovlivňují vypovídací schopnost a reprodukovatelnost zmíněných testů. Jako modelové vodní organismy byly zvoleny hrotnatka velká (*Daphnia magna*) a dánío pruhované (*Danio rerio*).

## **2.2.2 Testy dle OECD – hrotnatka velká**

### **2.2.2.1 Akutní toxicita Ag NPs**

Akutní toxicita byla v prvotní fázi práce testována na hrotnatce velké. První známky imobilizace hrotnatek byly pozorovány při koncentraci  $100 \mu\text{g.l}^{-1}$  a to 48 hodin od počátku experimentu. U koncentrace  $250 \mu\text{g.l}^{-1}$  byla imobilizace druhý den již 100 %. Koncentrace  $500 \mu\text{g.l}^{-1}$  Ag NPs vykazovala totální imobilizaci již 6 hodin po nasazení experimentu. Imobilizace u jedinců umístěných v kontrole nebyla pozorována. Další test sestával z koncentrační řady 15, 30, 60, 120 a  $240 \mu\text{g.l}^{-1}$ , ve kterém byly pozorovány první známky imobilizace (10%) pro koncentraci  $15 \mu\text{g.l}^{-1}$  56 hodin po počátku experimentu. U koncentrace  $30 \mu\text{g.l}^{-1}$  byla pozorována 10% imobilizace po 48 hodinách a pro koncentraci  $60 \mu\text{g.l}^{-1}$  byla 100% imobilizace pozorována již za 48 hodin. U koncentrace  $120 \mu\text{g.l}^{-1}$  Ag NPs byla imobilizace 100% 24 hodin od nasazení testu. Jelikož se jednalo o předběžný test, který měl za úkol stanovení přibližné koncentrace, ve které budou prováděny testy reprodukční toxicity, nebyl vyhodnocen standardně. Na základě výsledků z testování akutní toxicity byla zvolena koncentrační řada pro následné testování reprodukční toxicity Ag NPs.



### 2.2.2.2 Reprodukční toxicita Ag NPs

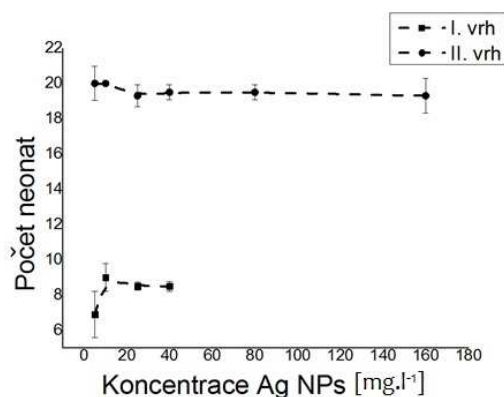
Hrotnatky umístěné v kontrolní skupině vykazovaly po celou dobu testu normální růst a nebyly u nich pozorovány žádné abnormality. Porod hrotnatek v předběžném testu započal 12. den od počátku testu a samice porodily v průměru 7,7 mláďat. Množství neonat na samici pro jednotlivé testované koncentrace shrnuje **tabulka 3**. Veškerá narozená neonata ve všech koncentracích a kontrole byla živá.

Tabulka 2: Souhrn výsledků testu reprodukční toxicity Ag NPs na hrotnatce velké.

Koncentrace Ag NPs [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	5	10	20	40	80	160
Průměrné množství neonat I. vrh	6,9	9	8,5	8,5	-	-
Průměrné množství neonat II. vrh	20,9	20	19,3	19,5	19,5	20,9

V druhém testu započal porod totožně jako v předešlém experimentu 12. den a samice porodily v průměru 20,3 mláďat. I v tomto případě byla veškerá narozená neonata ve všech koncentracích i kontrole živá a v plné síle. Ani jedna z provedených zkoušek reprodukční toxicity neumožňuje statistické zpracování dat (jak je patrné z **grafu 11**) ani výpočet hodnoty EC<sub>50</sub>, neboť nebylo zjištěno jakékoli významné snížení reprodukčních schopností hrotnatek, ba co víc, ani po 12 dnech experimentu nebylo pozorováno jiných toxických účinků Ag NPs ani v koncentracích vyšších, než v případě testů akutní toxicity Ag NPs, při kterém byla pozorována 100% imobilizace všech jedinců během 24 hodin ( $120 \mu\text{g.l}^{-1}$  Ag NPs).





Graf 11: Výsledek testu reprodukční toxicity Ag NPs na hrotnatce velké.

Příčinou pozorovaného jevu je s velkou pravděpodobností odlišná kompozice kapalného média v němž byl ekotoxikologický test proveden. Norma OECD 211 předepisuje pro testování reprodukční toxicity na modelovém organismu *Daphnia magna* médium M4, kdežto pro testy akutní toxicity předepisuje norma OECD 202 médium M203. M4 je živným roztokem obsahujícím krom vitamínů i kyselinu ethylendiamintetraoctovou (EDTA), která má schopnost nejen narušovat elektrickou dvojvrstvu Ag NPs a tím zvyšovat aglomerační rychlost a následnou sedimentaci aglomerátů mimo prostor ve kterém se hrotnatky pohybují, ale jako chelatační činidlo je schopná vytvářet komplexní sloučeniny s  $Ag^+$  ionty vytvořenými na povrchu částic, či uvolněnými z Ag NPs a tím snižovat jejich biodostupnost. To je experimentálně potvrzený důkaz teze, že k testování toxicity, či ekotoxicity nanomateriálů není možno přistupovat stejným způsobem jako k testování chemikálií, jelikož volba vhodného expozičního média má rozhodující vliv na jejich výsledky. Jako jistý druh opatření proti aglomeraci by mohlo být použito snížení iontové síly kapalného média až k hranici, která ještě neovlivní zdraví a vývoj jedinců umístěných do testu [Van Hoecke et al., 2011]. Jelikož se však jedná o dlouhodobý test, expoziční médium musí vyjma nezbytných rozpuštěných iontů obsahovat i vitamíny, stopové prvky a další podpůrné látky. Vynechání chelatačních činidel by jistě zvýšilo bio dostupnost uvolněných iontů a snížilo rychlost aglomerace částic, avšak k potvrzení této teorie by bylo nutné provést další série experimentů.

## 2.2.3 Testy dle OECD – dánío pruhované

### 2.2.3.1 Embryonální a vývojová toxicita AgNO<sub>3</sub>

Embrya umístěná v kontrolní skupině vykazovala po celou dobu testu normální růst a nebyly u nich pozorovány abnormality v chování ani v růstu. Test byl ukončen 7. den po oplození vajíčka, neboť již došlo ke vstřebání žloutkového váčku v kontrolní skupině. U koncentrace 25 μmol.l<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> nebyly pozorovány žádné významné abnormality ani v chování, ani růstu embryí i plůdků. U plůdků v koncentraci 50 μmol.l<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> byly pozorovány deformace ocasu. V koncentraci 100 μmol.l<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> byly pozorovány deformace ocasní ploutve v podobě zálomků a zdvojení. Dále byl v této koncentraci pozorován perikardiální edém. Při této koncentraci již nedošlo k vykulení embryí z chorionů a zmíněné deformace byly pozorovány u nevykulených embryí. Při koncentraci 250 μmol.l<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> došlo ke koagulaci veškerých embryí do 72 hodin po nasazení do testu a v případě koncentrace 500 μmol.l<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> došlo k úhynu všech embryí již 48 po nasazení do testu. Zpracování dat probíhalo pomocí programu Origin Pro 9 využitím Abbotovy rovnice (**rovnice 5**), ve které P vyjadřuje korigované procento přežití, C je procento přežití v kontrolní skupině a P' udává procento přežití při určité koncentraci. Pomocí této rovnice je tedy možné korigovat procento přežití v kontrolní skupině s procentem přeživších embryí, plůdků nebo celkového přežití sledovaných organismů při testované koncentraci xenobiotika, nebo nanočástic. Výsledky jsou shrnuty v **tabulce 4**. Hodnoty LC<sub>50</sub> byly vypočteny programem Toxicita a jsou uvedeny v **tabulce 5**.

$$P = 100 - \frac{C - P'}{C} * 100$$

Rovnice 5

Tabulka 3: Výsledky testování reprodukční a vývojové toxicity AgNO<sub>3</sub>

Koncentrace AgNO <sub>3</sub> [μmol.l <sup>-1</sup> ]	25	50	100	250	500
Korigované přežití embryí [%]	94,8	78,9	0	0	0
Korigované přežití plůdků [%]	99,3	104,3	0	0	0
Korigované přežití celkem [%]	94	82,4	0	0	0

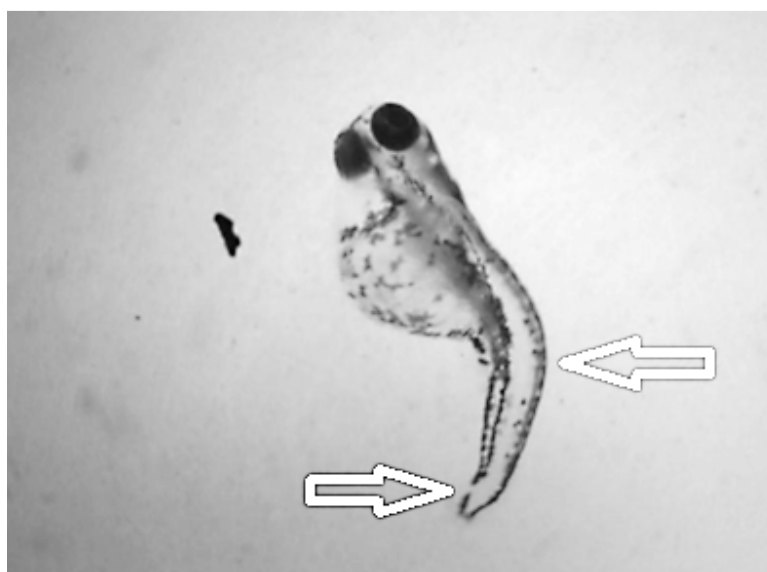
Tabulka 4: Hodnoty LC<sub>50</sub> získané z testování reprodukční a vývojové toxicity AgNO<sub>3</sub>

	LC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )
Embrya	66
Plůdky	65
Celkem	67

#### 2.2.3.1.1 Embryonální a vývojová toxicita Ag NPs

Při těchto ekotoxikologických testech se embrya i plůdky v kontrolních skupinách vyvíjely normálně, bez pozorovatelných deformací, abnormalit a vykazovaly po celou dobu testu normální rychlost růstu. Testy byly ukončeny standardně, tedy po vstřebání žloutkového vajíčka a při prvních pokusech plůdků o příjem potravy. Za 24 hodin po vystavení embryí účinkům Ag NPs byly pozorovány aglomeráty na povrchu chorionů a u dna Petriho misek, s rostoucí koncentrací bylo na chorionech a dnech misek pozorovatelných aglomerátů

více. U koncentrací 25, 50, 100 a 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  byl pozorován opožděný vývoj jedinců a též opožděné vykulení embryí z chorionu, u nejvyšší koncentrace k vykulení nedošlo vůbec. U koncentrací 25, 50 a 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  byly u plůdků pozorovány deformace ocasní ploutve a páteře a také četné edémy žloutkového váčku (**Obr. 15**). U koncentrace 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  došlo 5. den po nasazení do testu k úhynu všech plůdků. Od 4. dne po nasazení do testu byla pozorována snížená pohyblivost u všech testovaných koncentrací.

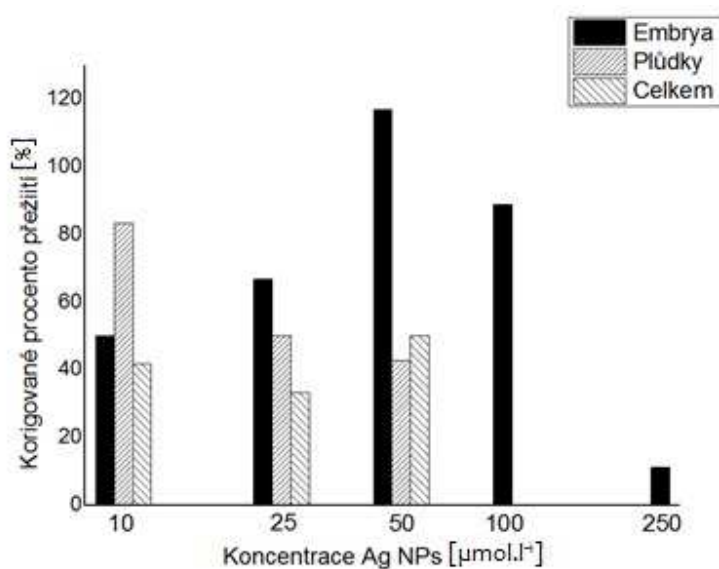


Obrázek 15: Deformace ocasní ploutve a edém páteře pozorovaný při testování toxicity Ag NPs

Data byla zpracována podle SOP [VÚOS, 2012]. Výsledky testování shrnuje **tabulka 6**. Prezentované hodnoty překračující 100 % znamenají, že počet přeživších jedinců byl vyšší než v kontrolní skupině.

Tabulka 5. Korigované procento přežití embryí, plůdků a celkového přežití dánía pruhovaného při semistatickém testování toxicity Ag NPs.

Koncentrace Ag NPs ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	10	25	50	100	250
Korigované přežití embryí (%)	50	66,7	116,9	88,9	11,1
Korigované přežití plůdků (%)	83,4	49,9	42,8	0	0
Korigované přežití celkem (%)	41,8	33,3	50	0	0



Graf 12: Závislost korigovaného procenta přežití embryí, plůdků a celkového přežití dánía pruhovaného v závislosti na koncentraci Ag NPs.

Z výsledků testu embryonální a vývojové toxicity Ag NPs provedených semistatickým způsobem plyne, že procentuální přežití embryí stoupá od koncentrace 10 do 50  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , kde je procento přežití nejvyšší ze všech testovaných koncentrací. Od koncentrace

100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  procentuální úmrtnost stoupá a je možné pozorovat deformace ocasní ploutve a edém páteře i žloutkového váčku. V koncentraci 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  plůdky nepřežívají vůbec. Zvrat trendu křivky dávka – účinek při koncentraci 50  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  poukazuje na možné zapojení dvou rozdílných mechanismů toxického účinku. Pravděpodobně se jedná o toxicitu Ag NPs a jejich aglomerátů. **Tabulka 6** se dá interpretovat tak, že nižší koncentrace Ag NPs působí toxicky více na již vykulené plůdky, naopak se zvyšující se koncentrací NPs stoupá procentuální přežití ještě nevykulených embryí. Důvodem by mohl být fakt, že v nižších koncentračních hladinách je míra a rychlost aglomerace menší, nedochází v nich tak markantnímu nárůstu velikosti vznikajících aglomerátů, aby překročily kritickou sedimentační velikost a sedimentovaly na dno experimentální nádoby a samozřejmě na chorion, který se na jejím dně nachází. Jelikož se jedná o test, při kterém není testovací médium mícháno, s rostoucím množstvím aglomerátů na dně vzrůstá i parciální koncentrace  $\text{Ag}^+$  iontu okolo chorionu. Vyšší toxicita pro vykulené plůdky v nízkých koncentracích Ag NPs může být vysvětlena na základě stejné myšlenky. Nanočástice v nízkých koncentracích nemají tak vysokou tendenci aglomerovat a zůstávají v expozičním roztoku přítomny jako primární, neaglomerované nanočástice, které nemají tendenci sedimentovat. Tím je zvýšena dostupnost NPs a také pravděpodobnost kontaktu s rozplavaným plůdkem, který se pohybuje po celém objemu testovaného koloidu, ve kterém setrvávají neaglomerované nanočástice. Avšak pro potvrzení teorie, že různá velikost nanočástic a jejich aglomerátů má různou toxicitu pro různá vývojová stádia ryb bylo nutné navrhnout experiment tak, aby byly embrya a plůdky vystaveny nanočásticím, případně jejich aglomerátům o přesně definované velikosti. Z toho důvodu bylo přistoupeno k modifikaci stávajícího semistatického testu tak, že byly experimentální koloidy pravidelně měněny za koloidy čerstvé vždy, když průměrná velikost aglomerátů rostoucích v experimentálním médiu narostla na předem definovanou mez. Detailní popis přístupu k problematice a výsledky tohoto přístupu k testování ekotoxických účinků Ag NPs na dáníu pruhovaném a následně na kapru obecném je možno dohledat v následujících kapitolách 2.4.2. a 2.4.3.

Tabulka 6. Hodnoty LC<sub>50</sub> získané při testování embryonální a vývojové toxicity semistatickým způsobem testování Ag NPs.

	LC <sub>50</sub> [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]
Embrya	102,2
Plůdky	44,3
Celkem	31,7

## 2.3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - Plnění dílčích cílů 2a

Náplní druhého dílčího cíle práce bylo eliminovat nedostatky spojené s využíváním klasických testů dle protokolů OECD pro potřeby testování ekotoxicity nanomateriálů zjištěné během plnění první části disertace. Jelikož prvotní experimenty naznačovaly, že hlavním procesem negativně ovlivňujícím možnosti využití klasických testů pro testování nanomateriálů a zhoršujícím míru reprodukovatelnosti ekotoxikologických testů na embryu a váčkovém plůdku ryb (OECD 212) může být aglomerace testovaných nanočástic, prvotním úkolem bylo tento proces eliminovat na nejnižší možnou míru. Jelikož je míra a rychlost aglomerace nanočástic spojena s narušením elektrostatických odpudivých sil mezi částicemi rozpuštěnými ionty, bylo snížení iontové síly expozičního média na minimální možnou míru, která ještě neovlivní zdravý vývoj embrya a váčkového plůdku, prvním námi vyzkoušeným přístupem.

### 2.3.1 Vliv snížení iontové síly expozičního média na přežití embryí

Jelikož je aglomerační chování nanomateriálů úzce spjata s koncentrací rozpuštěných solí v kapalném médiu, ve kterém jsou testy toxicity prováděny, je vhodné se pokusit zredukovat iontovou sílu těchto kapalných médií. Snížení iontové síly média mělo vést ke zpomalení rychlosti aglomerace Ag NPs a ke snížení rozdílů ve velikosti aglomerátů v koloidních roztocích o různé koncentraci nanočástic. Z toho důvodu bylo přistoupeno

k testování maximální možné míry naředění M203 demineralizovanou vodou tak, aby byl ještě zachován normální vývoj plůdku. Ke snížení iontové síly M203 byla použita demineralizovaná voda o konduktivitě menší než  $5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Pro posouzení vlivu ředění M203 na reprodukci a vývoj dání byly provedeny dva testy. Jeden předběžný a druhý úplný test. V prvním testu byla použita koncentrační řada tvořená zředěným M203 pomocí demineralizované vody s obsahem vody 50,0; 62,5 a 75,0 objemových %. Optimalizace složení média bude podrobně popsána v kapitole 2.4.1. Druhý test vycházel z výsledků testu předešlého a M203 bylo naředěno 60,0; 62,5; 65,0; 67,5; 70,0; 72,5 a 75,0 %. Testy probíhaly po dobu 5 dní a vyhodnocovány byly jako rozdíly v morfologii a rychlosti vývoje plůdků vzhledem ke kontrolní skupině.

Poté co byla nalezena nejnižší možná iontová síla expozičního média, bylo přistoupeno k návržení a ověření funkčnosti modifikací, které by vedly k odstranění hlavních problémů zjištěných při použití klasických OECD metodik pro testování ekotoxicity nanomateriálů. V důsledku toho, že každá koncentrační úroveň koloidu představuje směs s různým poměrem volných a aglomerovaných nanočástic, přičemž u každé z těchto složek lze důvodně předpokládat jinou nominální toxicitu, dalším krokem k modifikaci metodiky OECD 212 bylo experimentální ověření možnosti realizace testů, ve kterých bude využito řízení maximální velikosti aglomerátů prostřednictvím proměnné rychlosti výměny expozičních médií. Experimenty v této fázi práce byly prováděny jednak na plůdku dánia pruhovaného (*Danio rerio*), tak na plůdku kapra obecného (*Cyprinus carpio*).

### **2.3.2 Modifikace testu vývojové toxicity Ag NPs – dáanio pruhované**

Aglomerační chování nanočástic vede nejen ke změně podstaty nanomateriálů a vzniku aglomerátů, které již nemohou být považovány za nanočástice, vede též k sedimentaci a změnám v koncentracích v průběhu prováděného experimentu. V závislosti na koncentraci solí a koncentraci nanočástic dochází v průběhu testu k růstu aglomerátů a testy toxicity nanomateriálů tak volně přechází v testování toxicity aglomerátů původních nanočástic. Tento fakt drtivá většina autorů ekotoxikologických studií nanomateriálů v době



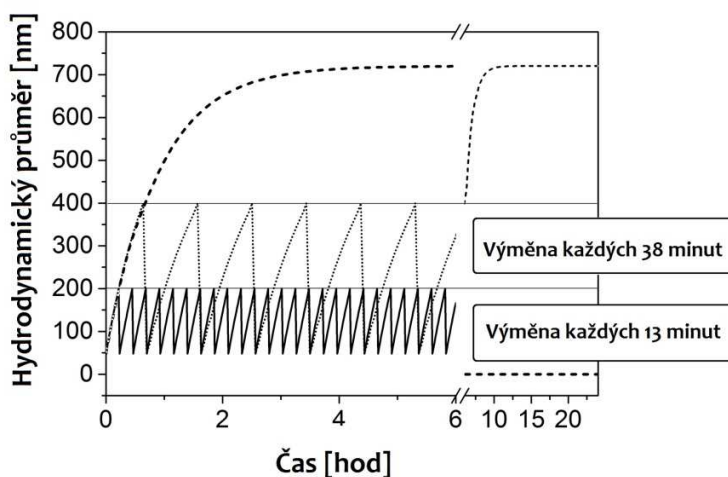
provádění experimentů, které budou v následujících odstavcích popsány, nebrala na zřetel. Výsledky byly většinou prezentovány jako toxicita nanočástic, i když šlo o jejich mikronové aglomeráty. Námí navržená modifikace spočívá v řízení maximální velikosti aglomerátů přítomných v testovacím médiu pomocí rozdílné frekvence výměny média pro různé koncentrace Ag NPs. Výpočet frekvence výměny média vychází z fyzikálně chemické charakterizace chování testovaných nanočástic v příslušném kapalném médiu, ve kterém bude daný experiment proveden. K tomuto účelu v našem případě posloužilo DLS měření růstu hydrodynamického průměru částic v čase v M203 ředěném na 75 % původní koncentrace demineralizovanou vodou (M203/75). Veškeré nanočástice ve všech koncentračních úrovních použité v testech vykazovaly téměř identický průběh aglomeračního chování s různou rychlostní konstantou a velikostí aglomerátů v ustáleném stavu. Rychlost a míra aglomerace byla pro jednotlivé koncentrační úrovně v souladu s namodelovanou **rovnicí 6**.

$$D_H^t = D_H^{inf} + (D_H^0 - D_H^{inf}) \times e^{-kt}$$

#### Rovnice 6

Parametr  $D_H^0$  značí hydrodynamický průměr částic neprodleně po přípravě testovacího roztoku nanočástic, tj. v testovaném koloidu neprodleně po smíchání primárního koloidu nanočástic a M203/75 tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace.  $D_H^{inf}$  je hydrodynamický průměr částic (aglomerátů) v ustáleném stavu a  $t$  je čas od počátku experimentu. Rychlostní konstanta  $k$  je silně závislá na počáteční koncentraci nanočástic a musí být pro každou koncentrační úroveň stanovena separátně. Člen  $D_H^t$  reprezentuje průměrný hydrodynamický průměr v čase  $t$ , je-li tento člen zvolen, rovnice může být použita pro výpočet času  $t$ , za který daný systém tuto hodnotu dosáhne. Jinými slovy – v případě, že je výměna testovaného koloidu provedena v čase  $t$ , velikost aglomerátů nepřesáhne stanovenou hodnotu  $D_H^t$ . Jelikož aglomerační chování Ag NPs v námi zvolených kapalných prostředích probíhá kinetikou prvního řádu, je možné velice dobře predikovat chování koloidu [Opsal et al., 2013]. Variabilní frekvence výměny média je pak cestou jak ovlivnit

velikost aglomerátů vyskytujících se v testovaném koloidu. Periodická výměna média během testu je graficky znázorněna na **Obr. 16**.



**Obrázek 16:** Grafické znázornění růstu hydrodynamického průměru aglomerátů Ag NPs v M203/75 k stanovené hraniční velikosti 200 a 400 nm při ekotoxikologickém experimentu s periodickou výměnou expozičního média.

V experimentech s řízenou velikostí částic bylo použito M203/75 a byly stanoveny maximální hodnoty velikosti aglomerátů  $D_H^t$  – 200 a 400 nm. Pro 200 nm aglomeráty byla použita koncentrace  $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , toto médium se měnilo každých 140 min, při koncentraci  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  se médium se měnilo každých 53 min a při koncentraci  $25 \mu\text{mol.l}^{-1}$  bylo expoziční médium měnilo každých 13 min. Pro aglomeráty s velikostí 400 nm byla použita nejvyšší koncentrace  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  – médium bylo měněno každých 300 min, pro koncentraci  $25 \mu\text{mol.l}^{-1}$  bylo expoziční médium měněno každých 76 min a koncentrace  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$  vyžadovala výměnu každých 38 min. Souhrn hodnot pro tento test udává **tabulka 8**. Pro zajištění optimální vypovídací hodnoty a objektivity experimentů bylo M203/75 v kontrole měněno po 13, 53 a 300 minutách. Výměny médií probíhaly po dobu 6 hodin a zbylých 18 hodin byla embrya v M203/75 bez obsahu Ag NPs. Pro každou koncentraci bylo použito 30 jiker rozdělených do 3 skupin, umístěných po 10 do 50 ml kádinek.

Tabulka 7: Doba výměny jednotlivých expozičních koloidů Ag NPs pro velikost aglomerátů 200 a 400 nm.

Velikost aglomerátů [nm]	Koncentrace Ag NPs [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]			
	5	10	25	50
200	140	53	13	-
400	-	300	76	38

### 2.3.3 Modifikace testu vývojové toxicity Ag NPs – kapr obecný

K testování ekotoxicity Ag NPs na tomto modelovém organismu bylo přistoupeno z důvodu opakovaných neúspěšných pokusů o získání zdravých životaschopných embryí z dána pruhovaného v množství, které by umožnilo jejich další použití. Pro potřeby testování ekotoxicity Ag NPs byla získána oplozená vajíčka kapra obecného z umělého výtěru chovu v rybí líhni Mokřiny (Rybářství Třeboň, a.s.). Oplozená vajíčka byla bezprostředně po umělém výtěru převezena do laboratoří oddělení CETA ve VÚOS a.s., kde byla opakovaně propláchnuta M203/75 a důkladně prohlédnuta za pomoci optického mikroskopu (XTL - 101, GX Optical, UK). Neoplozená, či nekrotická vajíčka, byla odstraněna a do testu byla nasazena pouze ta, jejichž vývoj byl normální. Jelikož byla z důvodu skromného přístrojového vybavení jediným možným toxikologickým endpointem zvolena mortalita, životaschopnost všech embryí i plůdků byla kontrolována minimálně jednou denně. Embrya byla považována za uhynulá, pokud u nich nebyl pozorován pohyb perikardu, nebo pokud vykulené plůdky nereagovaly na fyzickou stimulaci ocasní ploutve.

Testování vývojové toxicity na embryu a váčkovém plůdku kapra obecného v semistatickém uspořádání vycházelo z předešlých experimentů s dánií, z důvodu potřeby porovnatelnosti s výsledky z testování v uspořádání s řízenou velikostí částic byli jedinci umístěni na 6 hodin v testovaném koloidním roztoku Ag NPs a následně byli přeneseni na 18 hodin do M203/75 bez obsahu nanočástic. To odpovídá celkové expoziční době

36 ze 144 hodin v kontrastu se 144 expozičními hodinami při 24 hodinové periodické frekvenci výměny expozičního média dle OECD 212, tak jak to bylo provedeno v experimentech s dániem při testování toxicity AgNO<sub>3</sub>. Kontrolní skupinu tvořilo 50 jedinců umístěných v 50 ml M203/75. Testované skupiny obsahovaly 10 jedinců ve třech replikacích pro každou koncentraci a objem koloidního roztoku dávkovaného na každou experimentální skupinu byl 10 ml tak, aby každému jedinci náležel 1 cm<sup>3</sup> prostoru. Test započal 1 den po oplození vajíček a byl ukončen 5. den, kdy došlo u jedinců v kontrolní skupině ke vstřebání žloutkového vajíčku.

Na základě předběžných výsledků získaných z předešlých testů na organismu *Danio rerio* a jejich taxonomické podobnosti byla koncentrační řada na 5, 10, 25 a 50 µmol.l<sup>-1</sup> Ag NPs. Z důvodu vysoké časové náročnosti celého testu byly pro všechny koncentrace zvoleny dvě velikosti aglomerátů 200 a 400 nm. Jedincům, kteří byli vystaveni působení Ag NPs byl během 6 hodin měněn v různých frekvencích testovací koloid Ag NPs a následně byla embrya přenesena na zbylých 18 hodin z denního cyklu do M203/75 bez obsahu Ag NPs. Pro aglomeráty o velikosti 200 nm byly použity koncentrace 5 µmol.l<sup>-1</sup> s frekvencí výměny 140 minut, 10 µmol.l<sup>-1</sup> s frekvencí výměny 53 minut a 25 µmol.l<sup>-1</sup> s frekvencí výměny jednou za 13 minut. Pro aglomeráty 400 nm byly použity koncentrace 10 µmol.l<sup>-1</sup> s frekvencí výměny 300 minut, 25 µmol.l<sup>-1</sup> s frekvencí výměny média 76 minut a 50 µmol.l<sup>-1</sup> s frekvencí výměny média 38 minut.

## **2.4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST - Plnění dílčích cílů 2a**

### **2.4.1 Vliv snížení iontové síly expozičního média na přežití embryí**

Embrya umístěná v kontrolní skupině vykazovala po celou dobu testu normální růst a nebyly u nich pozorovány abnormality v chování ani v růstu. U experimentu, kdy byla embrya inkubována v demineralizované vodě, byl zjištěn rychlejší vývoj jedinců o 31,3 %, ale plůdky nebyly zcela vyvinuty, což odpovídá důsledkům malé iontové síly demineralizované vody. U vykulených plůdků byl pozorován edém perikardu a žloutkového vajíčku.

U 50 % M203 byl pozorován rychlejší vývoj o 14,3 % s porovnání s kontrolní skupinou a u vykultovaných plůdků byla též patrná depigmentace. U 62,5 % M203 byl pozorován rychlejší vývoj jedinců o 31,3 % a až u 75% naředění M203 nebyly pozorovány žádné abnormality ani v chování ani v morfologii jedinců. Zpracování dat bylo provedeno za pomoci Abbotovy rovnice v programu Origin Pro 9. Výsledky jsou shrnuty v **tabulce 9**.

**Tabulka 8: Korigované procento přežití embryí, plůdků a celkového přežití organismů v závislosti na míře naředění M203**

Koncentrace M203	[%]	0	50	62,5	75
Korigované přežití embryí	[%]	64,73	64,73	88,18	100
Korigované přežití plůdků	[%]	50	100	100	100
Korigované přežití celkem	[%]	23,46	64,73	88,18	100

Takto byla stanovena nejvyšší možná míra naředění média na 75% oproti koncentraci původní (M203/75).

#### **2.4.2 Modifikace testů vývojové toxicity Ag NPs – dánio pruhované**

Při experimentech s řízenou velikostí částic v M203/75 byla pozorována vysoká mortalita nejen ve skupinách testovaných, ale i ve skupinách kontrolních. To naznačovalo zhoršení zdravotního stavu celého chovu dánií, který se promítnul na zdravotním stavu odchovávaných testovacích generací. To mělo dopad nejen na výsledky testování vývojové toxicity pomocí modifikovaného semistatického testu s řízenou velikostí aglomerátů, ale ve výsledku způsobilo znemožnění dalšího provádění ekotoxikologických experimentů na tomto modelovém organismu na oddělení CETA ve VÚOS a.s. Jelikož přeživší embrya i plůdky

nacházející se v kontrole nevykazovaly fyziologické deformace a ani u nich nebylo pozorováno abnormální chování, bylo přistoupeno k testování i za těchto podmínek. Na chorionech embryí umístěných v koloidních roztocích s nízkou frekvencí výměny média byly před vykulením pozorovány aglomeráty Ag NPs na povrchu chorionů a od koncentrace  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a velikosti aglomerátů 400 nm byl pozorován i slabý zákal uvnitř chorionu, který nabýval na intenzitě se zvyšující se koncentrací Ag NPs. Ve skupinách vystavených koncentrací  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a velikosti aglomerátů 200 nm vykazovaly plůdky sníženou pohyblivost od 5. dne po nasazení do testu a plůdky setrvaly u dna testovacích nádob a byly u nich pozorovány výraznější a častější abnormality. U plůdků byly zjištěny deformace páteře a ocasu. V kontrastu s tím u totožné koncentrace, avšak velikosti aglomerátů 400 nm, byl výskyt pozorovaných abnormalit výrazně redukován. U koncentrací 10 a 25 byla sledována snížená pohyblivost plůdků až 5. a 6. den po nasazení do testu, v koncentracích vyšších docházelo k redukci mobility plůdků již 4. den. U koncentrací 10 a  $25 \mu\text{mol.l}^{-1}$  je procento přežití embryí vyšší u aglomerátů s velikostí 200 nm, než u aglomerátů s maximální velikostí 400. Pro plůdky jsou tedy koloidy obsahující aglomeráty o maximální velikosti 400 nm toxičtější než koloidy obsahující aglomeráty o maximální velikosti 200 nm. V koloidech o koncentraci  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$  došlo k úhynu všech plůdků. Zpracování dat proběhlo výpočtem za pomoci Abbotovy rovnice. Výsledky shrnuje **tabulka 10**.

Tabulka 9: Korigované procento přežití embryí, plůdků a celkového přežití dánía pruhovaného v závislosti na koncentraci Ag NPs při modifikovaném testu s řízenou velikostí částic.

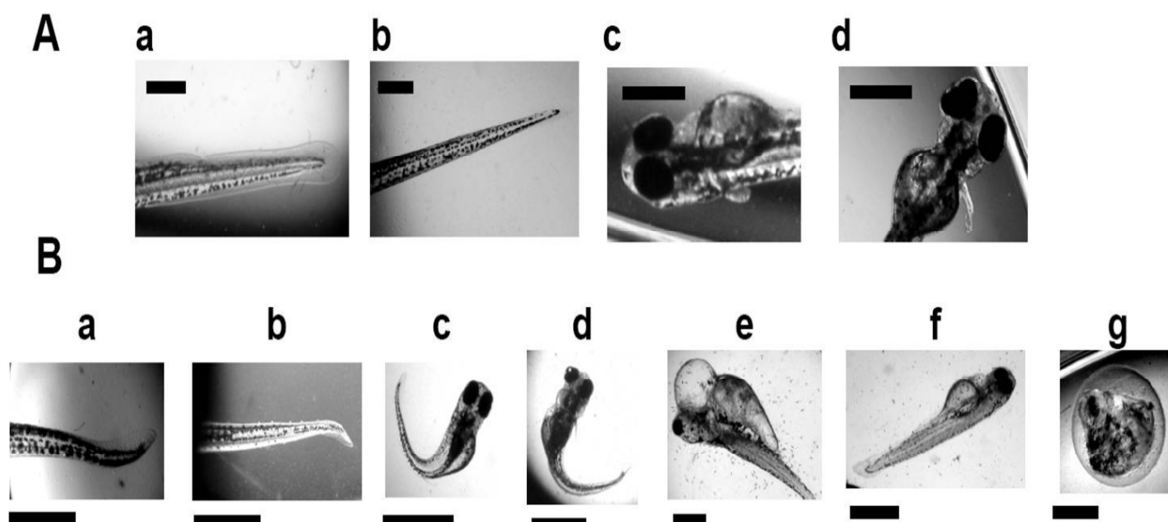
Velikost aglomerátů [nm]	Korigovaná mortalita embryí [%]			
	5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Ag NPs	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Ag NPs	25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Ag NPs	50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Ag NPs
200	93,3	100	96,7	x
400	x	86,7	90	96,7

Velikost aglomerátů [nm]	Korigovaná mortalita plůdků [%]			
	5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Ag NPs	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Ag NPs	25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Ag NPs	50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Ag NPs
200	48	10,7	21,4	x
400	x	0	26,8	0

Velikost aglomerátů [nm]	Korigovaná mortalita celkem [%]			
	5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Ag NPs	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Ag NPs	25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Ag NPs	50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Ag NPs
200	44,8	10,7	20,7	x
400	x	0	24,1	0

x – požadované hodnoty nebylo možno dosáhnout z důvodu příliš krátké, nebo příliš dlouhé doby periody výměny média.

Ve všech testovaných koncentracích u všech skupin maximálních velikostí aglomerátů se v testech s větší či menší intenzitou vyskytovali jedinci s deformacemi ocasní ploutve a páteře, edémy páteře a žloutkového váčku a malformacemi srdce. Všechny tyto chyby ve vývoji a růstu shrnuje **Obr. 17**.



Obrázek 17: Shrnutí nejběžnějších deformací plůdků dánia pruhovaného (*Danio rerio*) během testování reprodukční a vývojové toxicity nanočástic stříbra. A) reprezentativní jedinec, zobrazené měřítko odpovídá 500 µm. B) a, b) deformace ocasní ploutve; c, d) deformace páteře; e) edém žloutkového váčku a malformace srdce; f) srdeční malformace; g) jedinec bez hlavy a bez ocasu. Zobrazené měřítko je 250 µm (a, b), 1000 µm (c-f) a 500 µm (g). Převzato z [Browning et al., 2009].

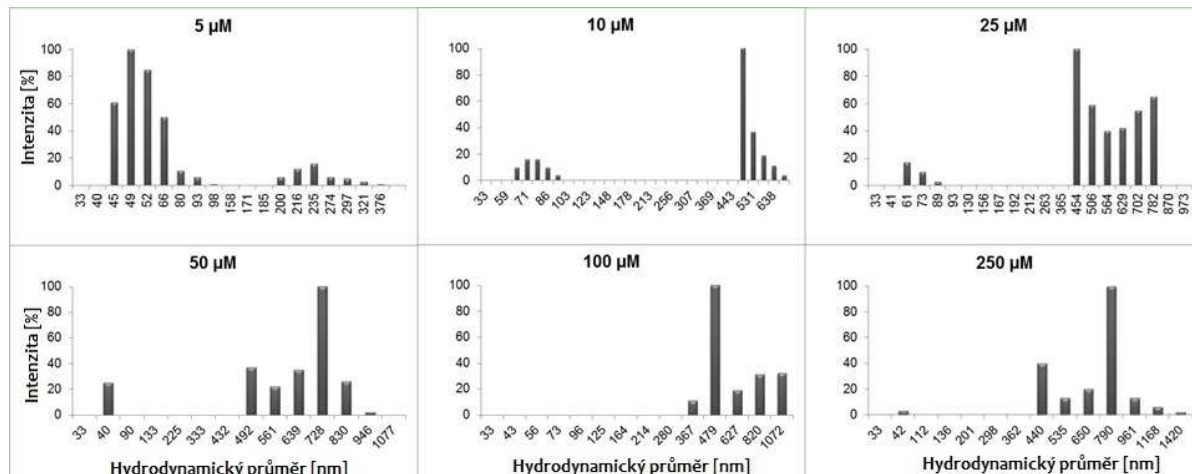
Pro objektivní závěry by bylo nutné provést další sady experimentů, což nebylo vzhledem ke zdravotnímu stavu chovu možné. I přes nové dodávky dospělých jedinců z chovů od různých dodavatelů se nepodařilo chov obnovit, jedinci se postupem času přestali vytírat, což vyústilo v úplné zrušení všech testů toxicity na modelovém organismu *Danio rerio* na oddělení CETA společnosti VÚOS a.s., kde bylo testování prováděno. Jelikož tímto krokem přišel VÚOS o jediný modelový organismus, na kterém bylo možné provést test embryonální a vývojové toxicity na embryu a váčkovém plůdku dle OECD 212 a jeho modifikaci s řízenou velikostí aglomerátu Ag NPs, bylo přistoupeno k opatření již oplozených jiker kapra obecného z rybí líhně Mokřiny. Testy na tomto modelovém organismu jsou zpracovány v kapitole následující.

### 2.4.3 Modifikace testu vývojové toxicity Ag NPs – kapr obecný

Během semistatického testování embryonální toxicity Ag NPs na kapru byla měřena velikost aglomerátů Ag NPs vzniknuvších po uplynutí expoziční doby připadající na jeden



testovací den (6 hodin) v M203/75 pomocí DLS. Výsledky měření jsou uvedeny na **Obr. 18**, který prezentuje histogramy velikostí aglomerátů všech testovaných koloidů. Je z něj patrné formování variabilně velikých aglomerátů, kde s lineárně vzrůstající koncentrací Ag NPs dochází k téměř logaritmickému nárůstu velikostí aglomerátů, rapidnímu vymizení primárních nanočástic s velikostí okolo 50 nm a viditelné zvýšení počtu částic přibližně okolo 400 nm. Histogramy na **Obr. 18** nemají jednotné měřítko a zvyšující se koncentrace Ag NPs vede nejen k vymizení primárních částic, ale dochází i k posunu hydrodynamických průměrů částic k větším velikostem. Výsledky tedy jasně demonstrují tvorbu aglomerátů, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti jsou podstatně odlišné od vlastností původního koloidu. Tyto výsledky by mohly být potvrzením hypotézy prezentované při předběžném testování koloidních roztoků Ag NPs na organismu *Danio rerio* a pozorované během testování s variabilní velikostí aglomerátů. Se vzrůstající koncentrací dochází k formování tak velkých aglomerátů, že nemohou setrvat ve vznosu a sedimentují na dno experimentální nádoby.



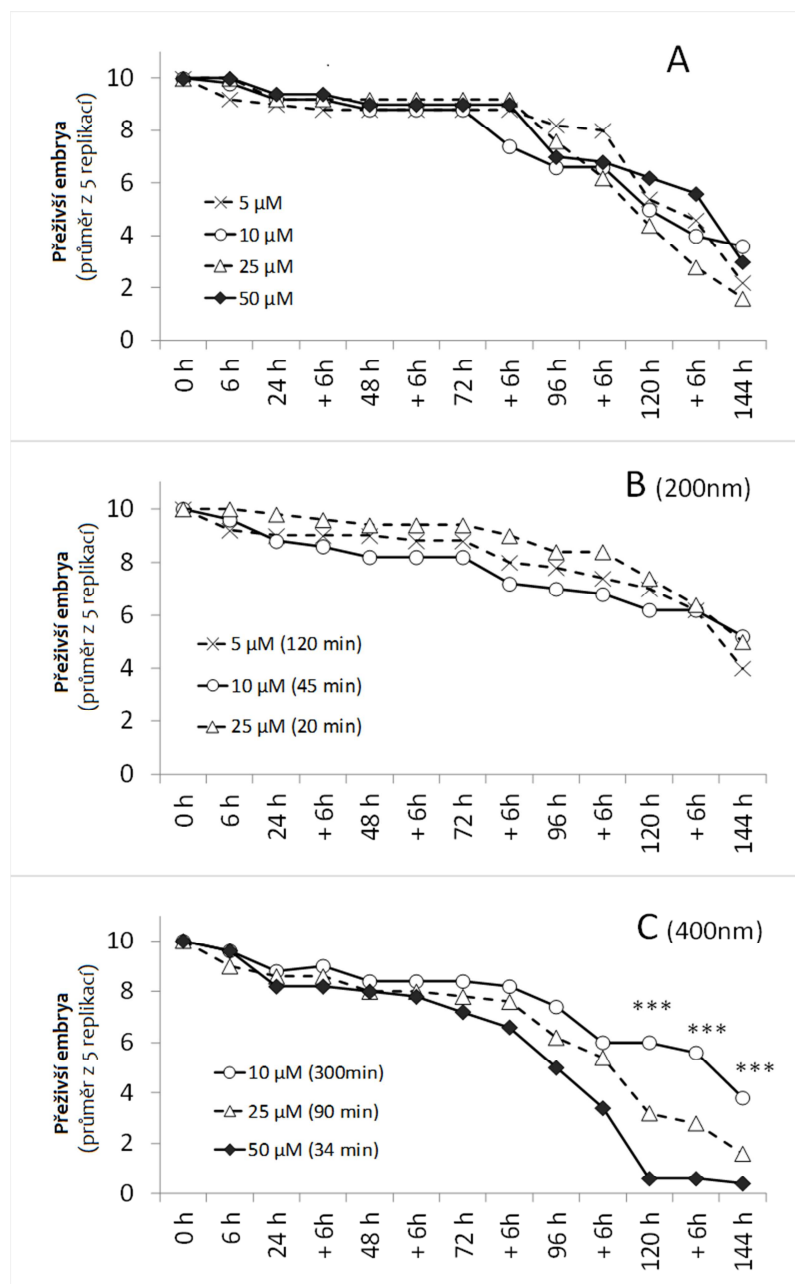
**Obrázek 18:** Histogramy distribucí hydrodynamických průměrů aglomerátů v M203/75 o různých koncentracích Ag NPs. Hodnoty v horních částech obrázků představují koncentraci Ag NPs.

Embrya umístěná v kontrolní skupině vykazovala po celou dobu testu normální růst a nebyly u nich pozorovány abnormality v chování ani v růstu. Mortalita u kontrolních skupin nepřesahovala sedmý den experimentu hodnotu 3 %, zvýšená frekvence výměny média

a s tím spojená častější manipulace s embryi neměla pozorovatelný vliv na vývoj, chování, růst ani mortalitu embryí. V tomto experimentu s 6 hodinovou expoziční dobou byla pozorována úmrtnost ve všech testovaných koncentracích Ag NPs po 144 hodinách (úhyn 60 až 90%). Z dat nevyplývají žádné významné statistické rozdíly (Mann-Whitneyho test,  $p > 0,05$ ) mezi jednotlivými koncentracemi a není zde možné pozorovat jakýkoli vztah mezi dávkou Ag NPs a posuzovanou toxikologickou odezvou, avšak je možné konstatovat, že od koncentrace Ag  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a výše byl pozorován pomalejší vývoj embryí. 3. den od oplození se v koloidu o koncentraci  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$  vykulo pouze 7 % jedinců, zatímco v koloidu o koncentraci  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  to bylo 27 % a v kontrolní skupině již 67 % embryí. Od této koncentrace začínaly být jikry na povrchu chorionu obaleny vrstvou aglomerátů a některé tyto aglomeráty byly pozorovány i uvnitř chorionu. U plůdků byly pozorovány deformace ocasu a páteře, edém srdce a neschopnost se vykult z chorionu. V několika případech došlo pouze k částečnému vykulení, kdy hlava plůdku zůstala v chorionu a tím došlo k úhynu jedince. Při kultivaci embryí v koloidním roztoku Ag NPs o koncentraci  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  provedené semistatickým způsobem (výměna média jednou za 24 hodin) byla 7. den experimentu výsledná mortalita 30 %. U takto kultivovaných embryí nebyly pozorovány deformace, ani žádné abnormality v pigmentaci či fenotypu, dříve pozorované při testech ekotoxicity Ag NPs prováděných na plůdku dávia pruhovaného. Test toxicity aglomerátů Ag NPs o velikosti 200 nm vykazoval obdobný průběh a výsledky mortality byly jen lehce nižší (3%) než výsledky testování semistatickým způsobem, bylo však možné pozorovat výrazné abnormality ve vývoji jedinců. Mezi nejčastějšími abnormalitami se vyskytovaly deformace páteře, záložky a absence ocasu, edém srdce či žloutkového váčku a krevní sraženiny v srdeční oblasti. V kontrastu s těmito daty jsou výsledky testování pro velikost aglomerátů 400 nm, kde je mezi jednotlivými body na křivce dávka - účinek možné nalézt statisticky významné rozdíly (Mann - Whitney,  $p < 0,05$ ). Nejvyšší testovaná koncentrace ( $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) vykazuje výslednou korigovanou mortalitu mezi 90 a 100 %. Výraznějších toxických účinků na embrya a plůdky kapra obecného bylo dosaženo vyššími koncentracemi 400 nm aglomerátů. Stejná koncentrace Ag NPs v semistatickém experimentu je významně méně toxická. Důvodem může být fakt, že při něm dochází k sedimentaci aglomerovaných částic

z experimentálního prostoru. Avšak v tomto případě může do výsledků zasáhnout fakt, že vysedimentované aglomeráty se usazují na chorionu nevykuleného embrya a tím může dojít k mechanickému narušení chorionu, blokadě přirozených biologických funkcí a parciálnímu zvýšení koncentrace  $\text{Ag}^+$  v těsném okolí embrya.

V práci [Chen et al., 2013] je prezentováno významné zvýšení bioakumulace železa v embryích a plůdcích medaky japonské, které jsou vystaveny působení aglomerátů oxidů železa a v práci [Zhu et al., 2012] jsou prezentovány testy toxicity nanočástic železa na dániu pruhovaném. V obou pracích byla potvrzena vyšší mortalita a výskyt malformací pro testy s aglomeráty nanočástic. Na důležitost pečlivého sledování aglomerace nanočástic v ekotoxikologických testech upozorňuje i prof. Melanie Auffan [Auffan et al., 2014]. Ve své práci z roku 2013, ve které byla sledována toxicita  $\text{CeO}_2$  na dafních uvádí opačný efekt, než je tomu v případě testování toxicity na rybím embryu. Uvádí, že skutečná doba expozice nanočásticím a jejich aglomerátům je během prováděného testu s dafniemi pouze 2 hodiny a po uplynutí této doby pak již nedochází k žádné významné expozici dafní nanočásticím, které sedimentují z experimentálního prostoru na dno [Auffan et al., 2013]. Aglomerace Ag NPs může mít i další spřažené ekotoxikologické dopady, jako jsou změny v biologické dostupnosti jiných kovů [Boran et al., 2016] a nebo změny podmínek během testů chronické toxicity [Bruneau et al., 2016]. Další možný negativní efekt aglomerace nanočástic je publikován v práci [Campos et al., 2013], ve které byl prokázán úbytek potravy z vodního sloupce, která sedimentovala spolu s nanočásticemi  $\text{TiO}_2$ . Ty samy o sobě žádnou toxicitu nevykazují, avšak úbytek potravy se ve výsledku projevil na snížení růstu a životaschopnosti hrotnatek. Koncentrační rozsah Ag NPs použitý v modifikovaném semistatickém testu s řízenou velikostí aglomerátů je v porovnání s koncentracemi environmentálně relevantními značně nadhodnocen, avšak cílem této studie nebylo samo testování akutní, vývojové, embryonální či reprodukční toxicity Ag NPs, ale vývoj metody umožňující testování ekotoxicity nanočástic a jejich aglomerátů přesně definované velikosti. To také reflektuje neshodu se stávajícími studiemi o toxicitě stříbra pro ryby, které prezentují mnohem vyšší efektivní koncentrace  $\text{EC}_{50}$  a to  $50 \mu\text{g.l}^{-1}$  pro medaku japonskou [Kashiwada et al., 2012] a  $500 \mu\text{g.l}^{-1}$  pro dániu pruhovanou [Bar-Ilan et al., 2009].



Graf 13: Shrnutí výsledků testování embryonální a vývojové toxicity Ag NPs. (A) testování provedené semistatickým způsobem, (B) velikost aglomerátů 200 nm, (C) velikost aglomerátů 400 nm. Chybové úsečky nejsou zobrazeny z důvodu přehlednosti. \*\*\* - Statisticky významné rozdíly mezi všemi třemi koncentracemi 10 vs. 25 vs. 50 umol.l<sup>-1</sup> (Mann-Whitney test, p <0,05).

Závěrem této subkapitoly plnění dílčích cílů 2a, která byla zaměřena na akvatické prostředí a aglomerační chování nanočástic v něm, je dobré konstatovat, že byl vyvinut a otestován nový metodický postup testování ekotoxicity Ag NPs a jejich aglomerátů na

rybím embryu a váčkovém plůdku za pomoci modifikace stávajících běžných testů způsobem, který je založen na předběžné fyzikálně-chemické charakterizaci chování testovaného nanomateriálu v expozičním médiu. Tento experimentální design byl úspěšně publikován v časopise *Environmental Science and Pollution Research* [Opsal et al., 2015]. Avšak pravděpodobnost uvedení výše popsaného metodického postupu do praxe pro rutinní testování ekotoxicity nanomateriálů na vodní organismy je velice nízká. Důvodem je značná náročnost na lidské zdroje a fakt, že při vyšších koncentracích nanomateriálů v expozičním médiu je potřeba měnit koloid za čerstvý tak rychle, že se to prakticky nedá stihnout. Jistou modifikací, která by umožnila realizaci navrhovaného přístupu je automatizace přípravy a výměny experimentálního koloidu, nebo přímé dávkování primárního koloidu do průtočného systému, v kterém by byl pokusný organismus umístěn.

## **2.5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - Plnění dílčích cílů 2b**

Jak bylo podrobněji popsáno v kapitole „1.1.2. Nanočástice v půdách“, tendence k aglomeračnímu chování je v půdách ještě větší než je tomu ve vodném médiu určeném pro testování ekotoxicity. Důvodem k tomu je fakt, že aglomeraci neovlivňují pouze ionty rozpuštěné ve vodě, ale i interakce nanočástic s částicemi půdy. Výzkum dále komplikuje charakterizace nanočástic v půdní matrici, která je těžko řešitelný úkolem. Rozhodli jsme se proto ověřit možnost využití agarového gelu jako kultivačního a expozičního média pro půdní organismy. Důvodem k tomuto počínání byla snaha o potlačení aglomerace nanočástic, které ovlivňují vypovídací hodnotu při testování ekotoxicity nanomateriálů. Dalším důvodem je snaha o fyzikálně chemickou charakterizaci dispergovaných nanočástic v matrici, která může být případnou alternativou k matricím běžně používaným. Jelikož se toxicita nanočástic při terestrických experimentech pohybuje řádově výše než při testování ve vodném prostředí, nebylo s využitím námi připravených koloidů možné zajistit koncentraci Ag NPs v agarovém gelu v míře, která by byla toxikologicky významná. Z toho důvodu byly zvoleny nanočástice oxidu zinečnatého (ZnO NPs), které jsou známy svoji ekotoxicitou, je možné je do expozičního média dávkovat v toxikologicky významné koncentraci a s roční

produkcí okolo 9 milionů tun [Ebin et al., 2016] tvoří potencionálně významný polutant životního prostředí.

Experimentální design ekotoxikologických testů, testovaná koncentrační řada nanočástic (50, 100, 200, 500 a 1000 mg Zn.kg<sup>-1</sup>), kultivační médium (agar) i složení rekonstituované vody vychází z práce [Li et al., 2011]. V ní byla testována ekotoxicita ZnO NPs na kroužkovci žížale hnojní (*Eisenia fetida*). Rozdíl oproti této práci tkví ve zvolených postupech dispergace práškových ZnO NPs v agarovém gelu. Jelikož v citované publikaci zvolili postup sonikace třepané suspenze ZnO NPs v agaru, jehož deklarovaná primární velikost byla 30±5 nm, setkáme se v publikaci se snímky z TEM zobrazující aglomeráty ZnO NPs velikosti desítek mikrometrů. Snaha o testování toxicity nanočástic, ne jejich aglomerátů, nás vedla k pokusům o dokonalejší dispergaci a deagregaci práškových ZnO NPs v agarovém gelu a ověření velikosti aglomerátů pomocí dostupných charakterizačních metod. Bez přístupu k TEM je charakterizace nanočástic v agarovém gelu složitým úkolem. V připravených vzorcích byla tedy ověřována možnost využití jiných mikroskopických technik.

První metodou charakterizace ZnO NPs v agaru byla mikroskopie atomárních sil (AFM). Ta byla uskutečněna na přístroji Solver Pro M (NT-MDT; Rusko) pomocí sondy HA\_NC (typická rezonanční frekvence 185 kHz,  $k = 4,6 \text{ N m}^{-1}$ ). Měření bylo uskutečněno v semikontaktním modu nastaveným na 40 % volné oscilace. Nicméně, vzhledem k povaze analyzovaného vzorku, kde jsou nanočástice uchyceny v měkkém agaru, se nepodařilo pomocí této techniky získat o vzorku jakékoli informace. S větším úspěchem byl aplikován skenovací elektronový mikroskop JEOL JSM-5500LV (JEOL, Japonsko) s rentgenovým energiově-disperzním detektorem GRESHAM Sirius 10 (IXRF Systems, Texas). Vlastní měření probíhalo za nízkého urychlovacího napětí 10 kV a připravené vzorky měly koncentraci ZnO NPs 50 a 1000 mg Zn.kg<sup>-1</sup> agaru. Příprava vzorků před analýzou spočívala v rozlítí horkého agaru s nanočásticemi mezi přípravek sestavený z podložních mikroskopických sklíček, vysušení vzorku a následném pozlacení. Při sušení vzorků za prostého vakua docházelo k aglomeraci nanočástic, a proto byly vzorky lyofilizovány při teplotě nižší než -115 °C. Voda byla sublimována při tlaku nižším než 60 Pa po dobu 6 hodin. Míra rozpouštění ZnO NPs v rekonstituované vodě byla zjišťována pomocí ICP-OES na spektrometru

Optima 2000 DV (Perkin Elmer Inc., USA). Příprava vzorků spočívala v centrifugaci připravených koloidních roztoků 10 minut a 96 hodin po jejich přípravě na laboratorní centrifuze LMC-4200R (Biosan, Lotyšsko), při 11000 x g po dobu 30 minut. Supernatant byl z kyvet odebrán a dávkován do odměrných baněk, kde byl naředěn 2M HNO<sub>3</sub> na požadovaný objem a dávkován do koncentrického zmlžovače rychlostí 3 ml.min<sup>-1</sup>.

Jelikož testy na roupicích nepatřily do standardního protokolu testů prováděných na oddělení CETA podniku VÚOS a.s., kde byly realizovány, byl chov byl opatřen z Centra pro výzkum toxických látek v prostředí (RECETOX, Masarykova univerzita Brno). Testy ekotoxicity byly realizovány v 50 ml plastových miskách naplněných agarem. Ten byl připraven z agarózy (Bacto-Agar, BD, USA), destilované vody a z vodných roztoků solí (0,1 mol.l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>; 0,01 mol.l<sup>-1</sup> KCl; 0,2 mol.l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 0,1 mol.l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>). Agar byl po rozlití do misek sterilizován v autoklávu při 120°C po dobu 30 minut a po zchlazení na laboratorní teplotu byly připravené plotny očkovány roupicemi. Experimentální vzorky byly umístěny do termoboxů a (WTW TS 606 CZ/4 – Var) a inkubovány při teplotě 20 °C.

### **2.5.1 Nanočástice a modelový organismus**

Testované nanočástice byly získány od společnosti Bochemie Group a.s. ve formě prášku o deklarované čistotě 99,5 %. Průměr sférických nanočástic byl výrobcem deklarován na 10 nm s rozsahem 5–50 nm a nanočástice měly mít dle specifikace šesterečnou krystalickou strukturu, která odpovídá zinkitu. Jejich toxicita, respektive toxicita aglomerátů těchto nanočástic, byla testována na roupiči *Enchytraeus crypticus*. Pro potřeby testování ekotoxicity ZnO NPs byly zvoleny dva rozdílné způsoby vnášení nanočástic do agaru s cílem nalézt postup vedoucí k co nejvyšší homogenitě disperze s co nejmenším zastoupením aglomerovaných nanočástic ZnO.

## 2.5.2 Příprava expozičních gelů

První způsob vnášení práškových nanočástic spočíval v jejich kryogenním mletí společně s agarem a následné přípravě gelu z takto připravené směsi ZnO NPs a agaru. Kryogenní mletí bylo uskutečněno v mlýnu SPEX SamplePrep 6970EFM Freezer/Mill (New Jersey, USA). Do mlecích nádob bylo naváženo odpovídající množství suchého agaru a ZnO NPs. Poměr agaru a práškových nanočástic byl volen tak, aby se koncentrace ZnO NPs v připravovaném agaru pohyboval v rozsahu 50, 100, 200, 500 a 1000 mg.kg<sup>-1</sup>. Každá z testovaných koncentrací byla mleta separátně. Doba předchlazení byla 10 min, délka mlecího cyklu 1 min, chlazení mezi cykly 1 min, počet cyklů 10 a frekvence impaktoru 12 Hz. Namletá směs byla poté převedena do Erlenmeyerových baněk, následně bylo přidáno odpovídající množství rekonstituované vody, agar byl za stálého míchání zahřát na 85 ± 5 °C a při této teplotě udržován jednu hodinu. Následně byl horký agar rozlit do jednotlivých testovacích nádob, ve kterých byly provedeny testy ekotoxicity.

Dalším způsobem vnášení ZnO NPs do agaru byla prostá sonikace těchto částic v rekonstituované vodě, ze které bude gel připravován. Průběh dispergace nanočástic byl sledován pomocí DLS na přístroji ZetaSizer (Malvern, USA). Jelikož ani způsob prosté dispergace neposkytl uspokojivé výsledky, bylo přistoupeno k použití povrchově aktivní látky, která by zaručila lepší solvataci a dispergaci ZnO NPs. Nejprve bylo vybíráno vhodné dispergační činidlo, které by mělo nejnižší toxikologickou odezvu. Z toho důvodu byly vynechány organické tenzidy se značnou toxicitou a pro potřeby dispergace byly použity hexametafosforečnan sodný (Na<sub>6</sub>P<sub>6</sub>O<sub>18</sub>) a dekahydrát pyrofosforečnanu sodného (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O) v koncentraci 0,02 a 0,04 hm. %.

V rámci prováděných experimentů bylo uskutečňováno zobrazování nanočástic pomocí SEM na přístroji JEOL JSM-7500F s energiově disperzním rentgenovým (EDX) mikroanalyzátozem IXRF Systems (detektor GRESHAM Sirius 10). Jako podložní materiál pro přípravu vzorků byl použit vysoce orientovaný pyrolytický grafit, na který byl metodou „spin coating“ při 90 x g nakápnut připravený koloidní roztok nanočástic. Vzorky byly následně



vysušeny pomocí vakua. Aby byla zajištěna vodivost, následně byly vzorky pozlaceny. Z toho důvodu byl při všech EDX analýzách zaznamenán intenzivní pás zlata.

Pro potřeby srovnání experimentálně zjištěných hodnot ekotoxicity pro nanočástice ZnO s toxicitou rozpuštěného  $Zn^{2+}$ , byla připravena řada experimentálních agarů s totožnou koncentrační  $Zn^{2+}$  jako byla koncentrace Zn v následně použité koncentrační řadě ZnO NPs, tedy 50, 100, 200, 500 a 1000 mg  $Zn \cdot kg^{-1}$  agaru. Jako ve vodě rozpustná sůl byl použit  $ZnCl_2$  (Penta, ČR), který byl rozpuštěn v rekonstituované vodě, ze které byl agar připraven.

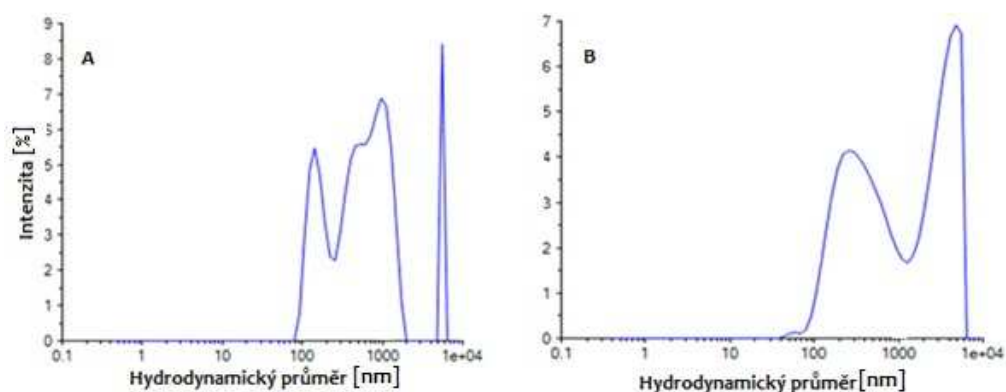
Experimentální vzorky připravované sonikací ZnO NPs byly připraveny tak, že z celkového objemu rekonstituované vody potřebné na přípravu agaru byly  $\frac{2}{5}$  použity na přípravu disperze. Do tohoto objemu vody byla převedena navážka dispergačního činidla ( $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ ) a po jeho rozpuštění i odpovídající množství ZnO NPs. Disperze byla ultrazvukována v lázni Bandelin (Sonorex, Německo). Do Erlenmeyerových baněk bylo naváženo odpovídající množství agaru, dispergačního činidla a následně zbývající množství destilované vody. Pyrofosforečnan byl přidán i do kontrolní skupiny, aby byla zajištěna objektivita výsledků, v obou případech se jeho množství rovná 0,02 % hm. Agar byl za energického míchání zahřát k  $85 \pm 5$  °C a po 45 minutách od dosažení této teploty byla do takto vzniklého koloidu během 15 minut přikapána disperze ZnO NPs. Při testování ekotoxicity byly rouspice vystaveny působení ZnO NPs v koncentračním rozsahu 50, 100, 200, 500 a 1000 mg  $Zn \cdot kg^{-1}$  agaru po dobu 96 hodin a byly použity Petriho misky naplněné 50 ml testovacího agaru. Sledovaným toxikologickým endpointem byla korigovaná mortalita, tedy procentuální úmrtnost těchto kroužkovců ve srovnání s kontrolní skupinou. Každý experiment byl proveden ve třech replikách. Testovací nádoby byly během testu umístěny v termoboxu při teplotě 20 °C ve tmě. Po 96 hodinách byl zjištěn počet živých rouspic a jedinci, kteří nereagovali na mechanickou stimulaci, byli považováni za mrtvé.

## 2.6 VÝSLEDKOVÁ ČÁST - Plnění dílčích cílů 2b

### 2.6.1 Charakterizace nanočástic

#### 2.6.1.1 DLS analýza vodných disperzí ZnO NPs

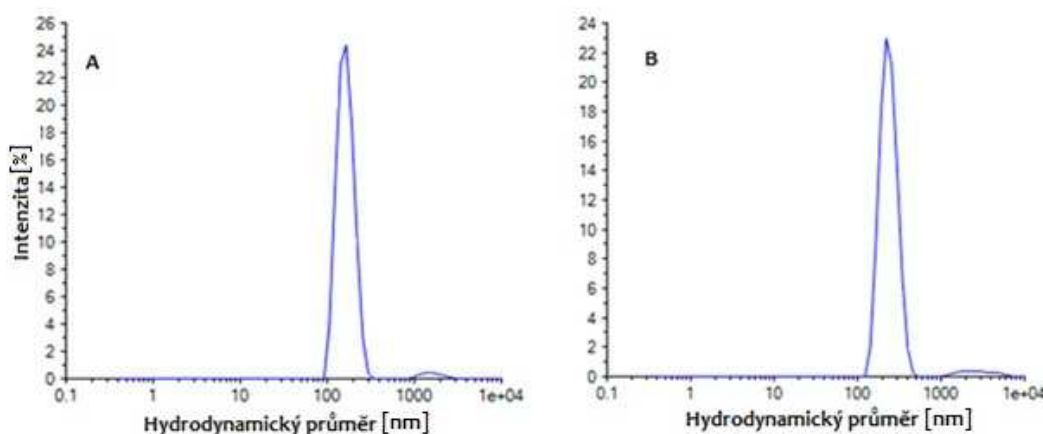
Jelikož byl experiment primárně zaměřen na přípravu expozičního média do ekotoxikologického experimentu, bylo nejprve přistoupeno k testování možnosti dispergace ZnO NPs pouhou ultrazvukací míchaného koloidu bez přísad jakýchkoliv dispergačních činidel, či smáčedel, která by mohla ovlivnit výsledky testů toxicity. Vodné disperze ZnO NPs o koncentracích 50 a 1000 mg Zn.l<sup>-1</sup> byly umístěny na dvě hodiny do ultrazvukové lázně a vzorky pro analýzu distribuce velikosti částic byly odebírány v 15 minutovém intervalu. Bylo zjištěno, že delší doba sonikace vede ke zmenšení velikosti aglomerátů do doby 45 minut. Po uplynutí této doby nebylo již pozorováno výrazné klesání D<sub>H</sub> aglomerátů ZnO. Jak je patrné z **Obr. 19 A**, hydrodynamický průměr majoritní frakce (38,3 %) u disperze s nejnižší testovanou koncentrací (50 mg.l<sup>-1</sup>) po 45 minutové sonikaci sahal k mikronové velikosti, u koncentrace 1000 mg.l<sup>-1</sup> to bylo 3,5 μm.



Obrázek 19: Znárodnění distribuce velikostí částic vodné disperze ZnO NPs o koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup> (A) a 1000 mg.l<sup>-1</sup> (B) Zn po 45 minutové sonikaci.

Dále byly analyzovány koloidy s přísadkou dispergantů. Pyrofosforečnan poskytoval oproti hexametafosforečnanu lepší výsledky. V jeho 0,02% roztoku byly zjištěny nejnižší

hodnoty hydrodynamického průměru částic po 45 minutové sonikaci (164,6 nm pro koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup> a 239,8 nm pro 1000 mg.l<sup>-1</sup>, viz **Obr. 20**). Na základě výše uvedených výsledků byl pro přípravu disperze expozičního média použit Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O jako 0,02% roztok a disperze byla za míchání ultrazvukována 45 minut.



Obrázek 20: Znáornění distribuce velikostí částic vodné disperze ZnO NPs o koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup> (A) a 1000 mg.l<sup>-1</sup> (B) Zn po 45 minutové sonikaci v přítomnosti dispergačního činidla (0,02% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O).

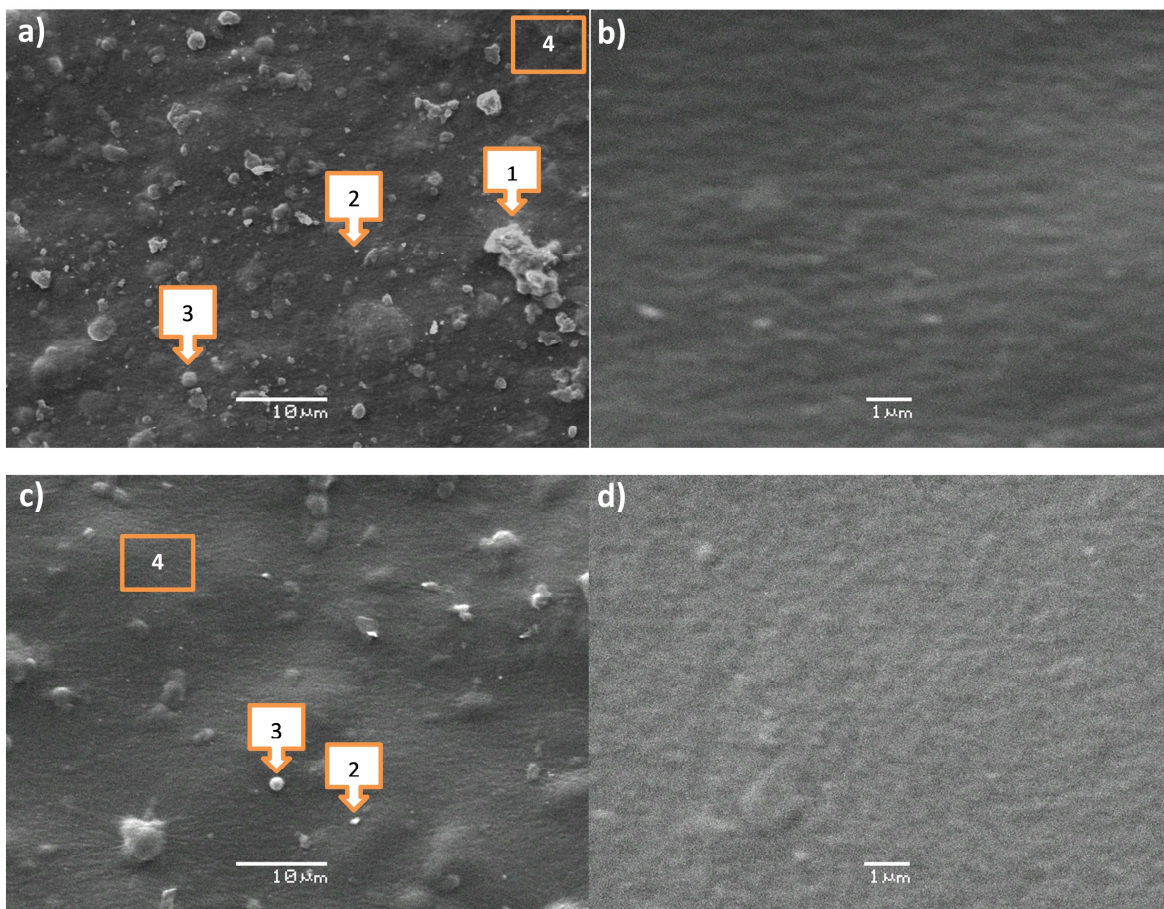
### 2.6.1.2 SEM analýza agarových gelů s přidavkem ZnO NPs

Pro účely charakterizace nanočástic v připravených vzorcích agaru bylo ověřováno využití mikroskopických technik. K charakterizaci nanočástic v připraveném agaru použita skenovací elektronová mikroskopie a s využitím této techniky již bylo možno vzorky popsat a vzájemně porovnat. Na snímcích bylo zjištěno, že použití pyrofosforečnanu jako dispergátoru bylo účelné a vedlo ke zmenšení velikosti aglomerátů. SEM snímky ze vzorků, které byly připraveny pomocí kryogenního mletí práškových nanočástic s agarem o koncentracích 1000 a 50 mg Zn na kilogram agaru jsou zobrazeny na **Obr. 21 A, B**. Vzorky které byly připraveny z vodné suspenze dispergovaných ZnO NPs reprezentují vzorky o totožných koncentracích, tedy o koncentracích 1000 a 50 mg Zn na kilogram agaru a jsou zobrazeny na **Obr. 21 C a D**. Ve vzorku agaru s koncentrací nanočástic 1000 mg Zn.kg<sup>-1</sup> připravené kryogenním mletím byly zaznamenány aglomeráty o velikosti

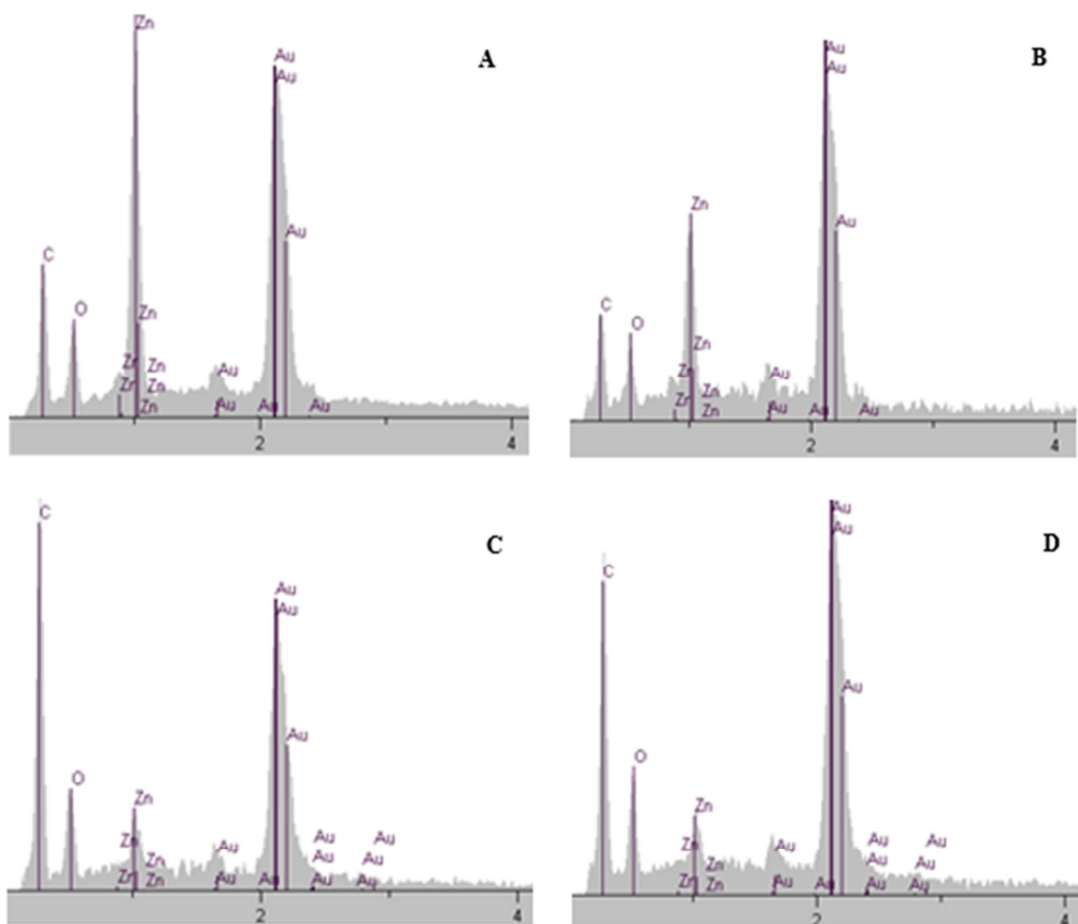
1 – 10  $\mu\text{m}$ , ve vzorku s koncentrací nanočástic 50 mg  $\text{Zn.kg}^{-1}$  agaru nebyly aglomeráty pozorovány až do úrovně rozlišovací schopnosti přístroje (100 nm). Jak je patrné ze SEM snímků vzorků (C a D) připravených z dispergovaných koloidů, vzorky neobsahují částice označené 1 tedy aglomeráty velikostí okolo 10  $\mu\text{m}$ . To značí vyšší míru dispergace ZnO NPs za pomoci pyrofosforečnanu v porovnání s kryogenním mletím. Stejně jako v předešlém případě, ve vzorku s koncentrací nanočástic 50 mg  $\text{Zn.kg}^{-1}$  agaru nebyly aglomeráty pozorovány až do úrovně rozlišovací schopnosti přístroje (100 nm).

### **2.6.1.3 ED XRF analýza agarových gelů s přidavkem ZnO NPs**

Z důvodu ujištění se o skutečnosti, že pozorované aglomeráty jsou nanočástice ZnO, byla provedena analýza spekter energiově disperzní rentgenové fluorescence (ED XRF), čímž bylo zkoumáno chemického složení jednotlivých objektů a ověřována přítomnost zinku v útvarech na povrchu vzorku. Na SEM snímku je možné od sebe rozlišit čtyři typy objektů s různými poměry intenzit čar zinku k uhlíku (Zn/C). I když se od sebe objekty označené 1 a 2 významně liší ve velikosti, poměr intenzity Zn/C je přibližně 3 pro oba. To znamená, že tyto objekty obsahují vysoké koncentrace Zn a proto můžou být popsány jako velký a malý aglomerát ZnO NPs. Poměr intenzity Zn/C pro objekty označené 3 a 4 bylo kolem 1/3, což naznačuje možné rozpouštění ZnO NPs do agarové matrice, případně dokonalou dispergaci práškových nanočástic až pod rozlišovací možnosti techniky. Objekty označené 3 jsou s největší pravděpodobností bubliny, které mají odlišnou intenzitu signálu od hladkého povrchu agaru, který je označen 4. To je přímým důsledkem rozdílné topologie povrchu, který byl modifikován při přípravě vzorku, při odtrhávání vzorku z podložního skla na kterém byl připravován. Nejsou tedy důsledkem změn v chemickém složení.



Obrázek 21: Snímky agarového gelu s obsahem ZnO NPs pořízené za pomoci SEM. Útvary označené 1 odpovídají aglomerátům o velikosti 10 μm, 2 jsou aglomeráty pod 1 μm. Objekt 3 byl detekován jako bublina, 4 je hladký povrch agaru.

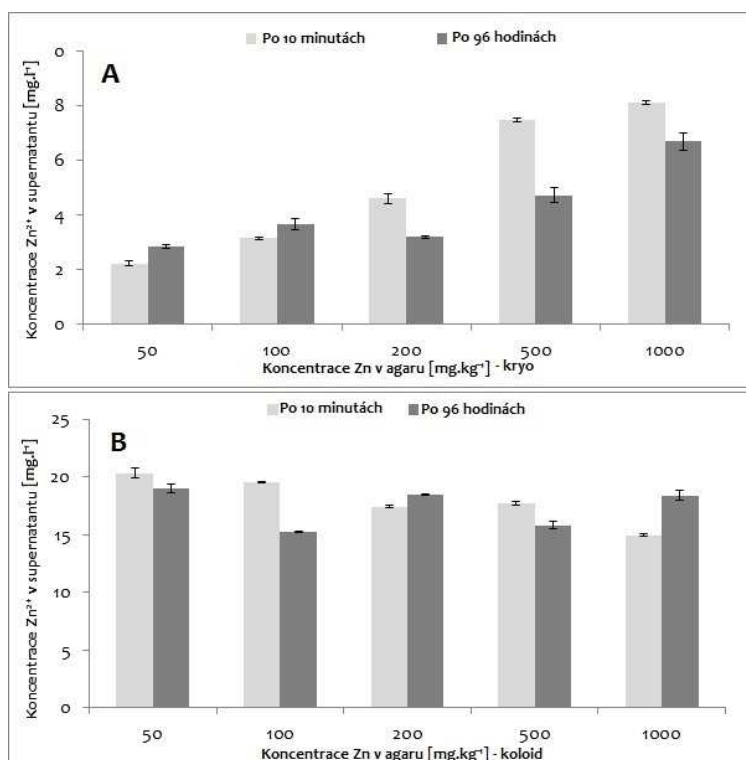


Obrázek 22: Výstup z ED XRF analýzy vzorků agarů s NPs. (A) velký aglomerát označený 1, (B) malý aglomerát označený 2, (C) bublina v agarovém gelu označená na fotografiích 3 a (D) je plocha volná plocha agarů bez aglomerátů a bublin

#### 2.6.1.4 ICP-OES analýza kapalné frakce získané z agarových gelů s přidavkem ZnO NPs

Aby byl kvantifikován příspěvek  $Zn^{2+}$  uvolněného z nanočástic k celkové toxicitě ZnO NPs, před samotným testováním toxicity nanočástic, bylo přistoupeno k zjištění množství rozpuštěného kationtu v expozičním médiu 10 minut po jeho přípravě a také 96 hodin poté v obou typech experimentálního uspořádání. Závislost míry uvolněného iontu na koncentraci NPs je graficky zpracována v **grafu 14**. Koncentrace  $Zn^{2+}$  se ve vzorcích připravovaných kryogenním mletím 10 minut po přípravě pohybovala mezi 2,2 a 8,1  $mg.l^{-1}$  a po 96 hodinách mezi 2,9 a 6,8  $mg.l^{-1}$ . V tomto případě se koncentrace uvolněného  $Zn^{2+}$  zvyšuje s rostoucí koncentrací ZnO NPs. Tento trend není pozorován u vzorků připravovaných za pomoci

dispergačního činidla ani 10 min po přípravě vzorků, kdy se hodnoty pohybovaly mezi 17,7 a 20,3 mg.l<sup>-1</sup>, ani po 96 hodinách, kdy byly v rozmezí 15,3 až 19,2 mg.l<sup>-1</sup>. V tomto případě výsledky nekorelují se zvyšující se koncentrací ZnO NPs v koloidech (50 - 1000 mg.l<sup>-1</sup>) a potvrzují tezi, že rozpouštění nanočástic je funkcí jejich velikosti [Franklin et al., 2007]. Z **grafu 14** plyne, že z částic, které byly lépe dispergovány, bylo uvolněné větší množství Zn<sup>2+</sup>. Největší množství bylo uvolněno v koncentraci nejnižší, kde bylo dosaženo dle DLS nejvyšší míry dispergace a nejmenšího průměru distribuce velikostí částic. Dá se tedy říci, že aglomerace nanočástic snižuje míru rozpouštění, což je v souladu s pozorováními publikovanými v práci [Li et al., 2011]. Jak je uvedeno v následující kapitole, koncentrace uvolněného Zn<sup>2+</sup> pohybuje hluboce pod námi zjištěnou hodnotou EC<sub>50</sub> (37,2 mg Zn<sup>2+</sup>.kg<sup>-1</sup> agaru) a tak je možné přispěvek Zn<sup>2+</sup> k celkové toxicitě ZnO NPs zcela zanedbat.



**Graf 14:** Míra rozpouštění ZnO NPs během testování ekotoxicity u vzorků připravených kryogenním mletím (A) a za pomoci dispergace ultrazvukem s použitím pyrofosforečnanu (B) měřeno po 10 minutách od přípravy a po 96 hodinách. Koncentrace je měřena v supernatantu vzniklém centrifugací koloidů. Úsečky představují standardní odchylku od střední hodnoty.



## 2.6.2 Test toxicity Zn<sup>2+</sup>

Po kvantifikaci míry uvolňování Zn<sup>2+</sup> z ZnO NPs bylo dalším krokem provedení testů ekotoxicity Zn<sup>2+</sup>. K testování toxicity zinečnatého kationtu bylo přistoupeno z důvodu absence relevantních informací o toxicitě, či ekotoxicitě ZnO pro kroužkovce obecně. Rozdíly v publikovaných toxicitách jsou řádové. Nejnižší publikovaná hodnota LC<sub>50</sub> pro roupici bělavou (*Enchytraeus albidus*) je 72,6 mg Zn na kilogram suché půdy [Novais et al., 2012] až po hodnotu 1598 mg Zn na kilogram suché půdy v práci [Spurgeon et al., 1997]. I když patří *Enchytraeus crypticus* v toxikologii k běžně využívaným modelovým organismům [Roelofs et al., 2016], je v dostupné odborné literatuře poměrně obtížné nalézt dostatek relevantních informací o toxických účincích zinečnatého kationtu pro *E. crypticus*. Například v práci [Posthuma et al., 1997] byly akutní a chronické účinky Zn<sup>2+</sup> testovány v umělé půdě. Hodnota LC<sub>50</sub> byla vypočtena na 336 mg Zn<sup>2+</sup>.kg<sup>-1</sup> suché půdy a hodnota EC<sub>50</sub> 118 mg Zn<sup>2+</sup>.kg<sup>-1</sup> suché půdy. V práci [Lock and Janssen, 2003] byla testována toxicita Zn<sup>2+</sup> na vodní roupice *E. variegatus* a v této práci prezentovaná hodnota LC<sub>50</sub> činila 2,984 mg.l<sup>-1</sup> expozičního média. Publikované hodnoty EC<sub>50</sub> pro *E. crypticus* získané při testování v umělé půdě a námi zjištěné hodnoty z testů v agaru se liší řádově, jak je patrné z **tabulky 11**, která shrnuje dostupné publikované údaje testování toxicit Zn<sup>2+</sup> na půdních organismech.

Tabulka 10: Shrnutí dostupných dat testování toxických účinků Zn<sup>2+</sup> na půdní organismy.

Modelový organismus	LC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	Autoři
<i>Eisenia fetida</i>	1340	705	[Lock and Janssen, 2003]
<i>Eisenia fetida</i>	662	-	[Castro-Ferreira et al., 2012]
<i>Eisenia fetida</i>	1598	234	[Spurgeon et al., 1997]
<i>Folsomia candida</i>	-	391	[Lock and Janssen, 2003]
<i>Folsomia candida</i>	-	487	[Smit and Van Gestel, 1998]
<i>Folsomia candida</i>	-	900	[Sandifer and Hopkin, 1997]
<i>Enchytraeus albidus</i>	72,6	35	[Novais et al., 2011]
<i>Enchytraeus albidus</i>	603	271	[Lock and Janssen, 2003]



Při prvotních experimentech byla po 96 hodinách expozice pozorována jistá mortalita v kontrolní skupině, která však nepřevyšovala hodnotu 20 %. Jelikož byla tato mortalita pozorována pouze v případě testování toxicity zinečnatého kationtu a v dalších testech ne, tato zvýšená mortalita v kontrolní skupině může být připisována nejen nedostatečně dlouhé aklimatizační době před započítáním testování, ale i počáteční neodborné manipulaci s jedinci. Data, která byla při testování toxicit získána, byla zpracována pomocí fitování metodou nelineární regrese a k výpočtu hodnot EC<sub>50</sub> byl použit Boltzmannův model (**rovnice 7**).

$$y = y_{min} + \frac{(y_{max} - y_{min})}{1 + e^{\frac{P_1 - x}{P_2}}}$$

Rovnice 7

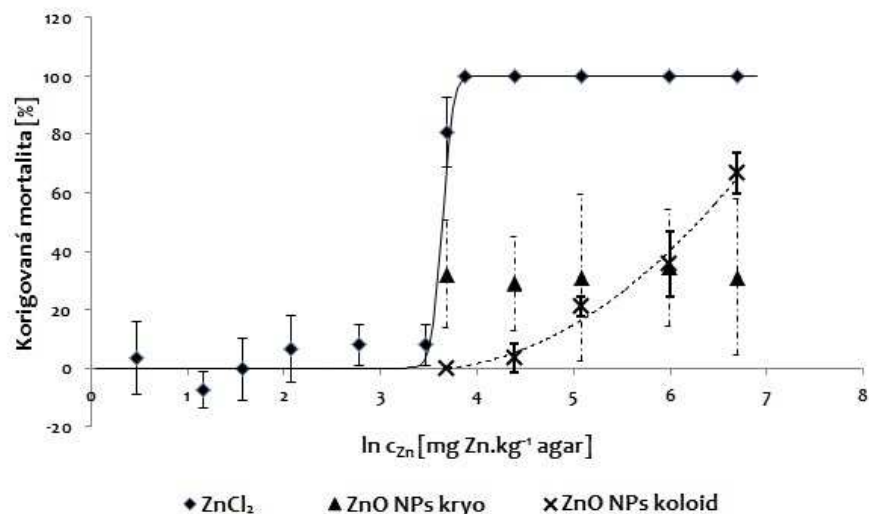
Parametr  $y$  představuje korigovanou mortalitu,  $x$  je logaritmem koncentrace  $Zn^{2+}$ ,  $P_1$  je inflexní bod křivky dávka - účinek (EC<sub>50</sub>) a parametr  $P_2$  je směrnici dané křivky. V případě testování toxicity zinečnatého kationtu uvolněného z jeho chloridu byl pozorován sigmoidní průběh křivky (**graf 15**) a hodnota EC<sub>50</sub> byla vypočtena na 37,2 mg  $Zn^{2+}$ .kg<sup>-1</sup> agaru. Tato námi zjištěná a publikovaná hodnota [Hrda et al., 2016] a hodnoty publikované se liší řádově. Použitím agaru, jako expozičního média namísto půdy, mohlo dojít k vyloučení interakcí  $Zn^{2+}$  se složkami půdy a tím i zvýšení jeho biologické dostupnosti.

### 2.6.3 Testy toxicity ZnO NPs

Zjištěné hodnoty mortality při testu ZnO NPs v agaru připraveném pomocí kryogenního mletí se pohybují v rozmezí 29–34 % a ani v nejvyšší testované koncentraci (1000 mg Zn.kg<sup>-1</sup> agaru) nebyla pozorována 100 % mortalita jedinců, z toho důvodu nebylo možné zkonstruovat křivku dávka-účinek, ze které by bylo možné určit hodnotu EC<sub>50</sub>. Hodnoty jsou charakteristické vysokým rozptylem a střední hodnoty úmrtnosti nevykazují žádný, na celkové koncentraci ZnO NPs závislý trend. Vysoký rozptyl hodnot úmrtností může být způsoben kombinovaným efektem heterogenního rozložení toxické formy zinku a únikového chování organismů. Roupice, podobně jako jiné půdní organismy, se vyznačují

schopností tzv. únikového chování, čehož je v půdních ekotoxikologických testech hojně využíváno při testování toxicity chemikálií. Nicméně, během testů se jedinci nacházeli v jednotlivých opakováních na různých místech bez jakékoli pravidelnosti, nahodile na víčkách testovacích nádob, na stěnách a pouze ve velmi malé míře zavrtané v agaru či na jeho povrchu bez ohledu na testovanou koncentraci ZnO NPs. Výsledky získané při testování toxicity nanočástic na vzorcích připravených z dispergovaných koloidů se zásadně lišily od výsledků z předchozího experimentu. Zatímco u prvního postupu bylo pozorováno nepředvídatelné únikové chování, během těchto experimentů se roupice nacházely ve většině případů zavrtané v agaru, případně na jeho povrchu. Jak je patrné z **grafu 15**, úmrtnost roupic se v jednotlivých opakováních liší jen velmi málo, což může být výsledkem výrazně lepšího rozptýlení nanočástic v agarovém gelu. Postup předdispergace nanočástic do expozičního média vedl k užší distribuci velikosti částic s podstatně nižší průměrnou velikostí částic a tato skutečnost se odráží v monotónně rostoucí křivce dávka – účinek, která se pohybovala od 0 do 66,7%, avšak ani při tomto designu experimentů nebyla pozorována 100% úmrtnost v žádné z testovaných koncentrací a tak je i v tomto případě nemožné vypočítat hodnotu EC<sub>50</sub>. Trendové chování křivky dávka – účinek může být výsledkem příjmu lépe dispergovaných částic požitím, které ve své práci popisuje [Li et al., 2011].

Z uvedeného **grafu 15** je patrné, že toxicita oxidu zinečnatého vneseného do média ve formě nanočástic je podstatně nižší, než je toxicita zinečnatého kationtu. Vzhledem k výsledkům předchozích experimentů je tedy možné předpokládat, že v našich experimentech byla pozorována toxicita vyvolaná zejména dispergovanými nanočásticemi ZnO, případně Zn<sup>2+</sup> ionty uvolněnými převážně z povrchu těchto neaglomerovaných nanočástic do jejich nejbližšího okolí, nikoli však do agarové matrice, což bylo ověřeno experimenty rozpouštění nanočástic.



Graf 15: Logaritmičké vyjádření korigované mortality roupičky *E. crypticus* po 96 hodinové expozici v agaru. ZnO NPs Kryo popisuje experiment, ve kterém byly nanočástice do agaru dispergovány pomocí kryogenního mletí. ZnO NPs koloid označuje experiment, při němž byly nanočástice dispergovány do agaru ve formě koloidního roztoku.

Závěrem kapitoly je možné konstatovat, že při krátkodobých testech toxicity nanočástic na půdních a sedimentárních organismech lze agar jako expozičního média s úspěchem využít, avšak naše práce [Hrda et al., 2016] a publikace [Li et al., 2011] jsou zatím jedinými dostupnými zdroji informací o testování toxicity nanočástic v agaru. Způsob vnášení nanočástic do agarového gelu má zásadní vliv na konečnou velikost aglomerátů i distribuci velikostí částic v připravovaných gelech. Při přípravě gelů za pomoci kryogenního mletí částic s práškovým agarem bylo ve výsledném gelu obsaženo množství velkých aglomerátů ZnO NPs a nepředvídatelné únikové chování během testů i vysoký rozptyl hodnot úmrtnosti naznačuje, že tento postup nevede k žádané disperzi nanočástic v agaru a z takto koncipovaného experimentu není možno odhadnout, natož statisticky vyhodnotit toxicitu nanočástic. V kontrastu s tím postup, který způsobil dokonalejší dispergaci nanočástic a snížení průměrné velikosti aglomerátů poskytl relevantnější výsledky. I když ani v tomto případě nebylo možné vypočítat hodnotu EC<sub>50</sub>, bylo již možno pozorovat vztah mezi dávkou ZnO NPs a mortalitou jedinců. Ze získaných výsledků je možné konstatovat, že toxicita ZnO NPs je v porovnání s toxicitou Zn<sup>2+</sup> nižší. Ke stejnému výsledku došla i studie provedená na

chvostoskoku *Folsomia candida* provedená v umělé půdě [Kool et al., 2011], či studie na žížale hnojní v přirozené půdě [García-Goméz et al., 2014]. Velice pravděpodobnou příčinou tohoto jevu je interakce nanočástic a jejich aglomerátů se složkami matrice, v níž je ekotoxikologický experiment prováděn.

## 2.7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - Plnění dílčích cílů 3

Dalším z parametrů, které vyjma aglomerace či rozpouštění nanočástic významně ovlivňují jejich toxicitu, je změna jejich chemického složení v průběhu jejich cesty ekosystémem. Interakce nanočástic se složkami životního prostředí často vede k adsorpci látek na jejich povrchu, změně jejich povrchové kompozice nebo náboje [Meesters et al., 2016]. V případě Ag NPs je ve vodném prostředí s nízkým obsahem chloridů nejčastějším způsobem transformace vznik vrstvy  $\text{Ag}_2\text{S}$  okolo nanočástic a vznik core-shell nanosystému  $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$  NPs [Levard et al., 2011]. Tento proces jsme se rozhodli modelovat v laboratorních podmínkách tak, že byly částice Ag NPs připravené redukcí glukózou sulfidizovány, následně charakterizovány a bylo ověřeno jejich chování v destilované vodě, živných a expozičních médiích. Jelikož se jedná o částice, s nimiž byly uskutečněny testy jejich toxicity na hrotnatce, dáníu a kaprovi, způsob přípravy Ag NPs i využívaná charakterizační technika je shodná a to i pro environmentálně relevantně pozměněné částice  $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$  NPs. Abychom zjistili, zda je nějaký rozdíl v toxicitě původních a modifikovaných nanočástic, byly provedeny nejen porovnávací testy cytotoxicity, ale v rámci plnění cíle 3 byly provedeny i testy ke zjištění schopnosti připravených nanočástic prostupovat skrz buněčné membrány, zachytávat se v buněčném cytosolu a následně interagovat s důležitými buněčnými organelami. Všechny tyto studie byly provedeny na buněčné kultuře střevního epitelu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), které patřili do standardní baterie testů ekotoxicity na pracovišti, kde byly testy realizovány (EAWAG, Švýcarsko).

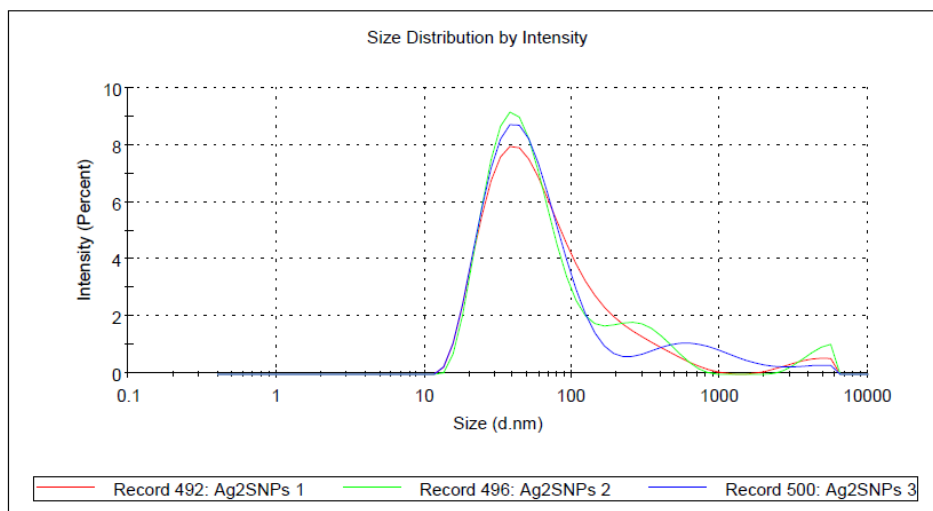
### 2.7.1 Syntéza Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs

Core – shell systém Ag@Ag<sub>2</sub>S byl syntetizován jako soustava, kde Ag komponenta vystupuje jako jádro, které je uzavřeno ve slupce z Ag<sub>2</sub>S. Stříbrné nanočástice, ze kterých byla syntéza uskutečněna, byly připraveny postupem na mokré cestě. Jednalo se o částice redukováné glukózou. Tento postup produkoval ze všech použitých syntézních cest koloid s nejužší distribucí velikostí částic a zároveň se jednalo o redukční činidlo s nejmenšími toxikologickými dopady ze všech testovaných. Následná sulfidace probíhala modifikovaným postupem, který vycházel z práce [Levard et al., 2012]. Modifikace spočívala v použití jiného stabilizačního agens nanočástic během sulfidace, jelikož v Levardově práci použitý polyvinylpyrrolidon (PVP) nevykazoval při syntéze dostatečnou schopnost udržet agregátní stabilitu zpracovávaného stříbrného koloidu a Ag NPs během sulfidizace aglomerovaly v mikronové shluky. Jako nejvhodnější stabilizační agens pro syntézu Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs byl zvolen dodecylsírán sodný (SDS), který zabezpečil srovnatelné výsledky hydrodynamických průměrů částic s obdobnou polydisperzitou a rozložením velikostí aglomerátů při třech po sobě jdoucích replikách syntézy (**Obr. 23**). Nevýhodou užití SDS jako stabilizačního činidla je nutnost jeho odstranění, čehož bylo dosaženo opakovanou centrifugací a promytím stabilizovaných nanočástic demineralizovanou vodou.

## Results

	Size (d.nm...)	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 48,35	<b>Peak 1:</b> 89,12	96,9	107,4
<b>Pdl:</b> 0,367	<b>Peak 2:</b> 3964	3,1	1095
<b>Intercept:</b> 0,854	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

Result quality **Good**



Obrázek 23: Výsledky z měření hydrodynamického průměru tří syntetizovaných šarží Ag@ Ag<sub>2</sub>S NPs. Z nich je patrné, že syntéza nanočástic je reprodukovatelná.

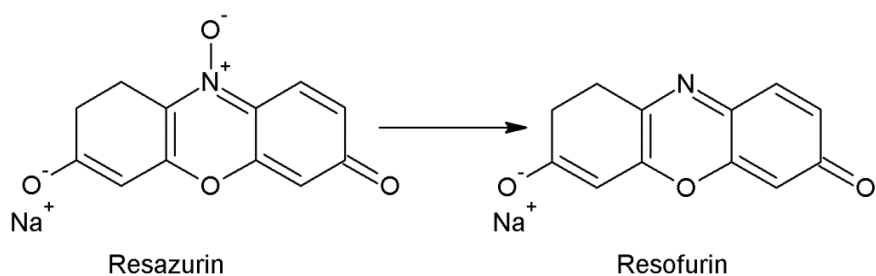
Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs byly připraveny sulfidací připravených Ag NPs pomocí vodného roztoku sulfidu sodného. Nejprve byl připraven roztok 1 mol.l<sup>-1</sup> Ag NPs, který obsahoval 0,1 mol.l<sup>-1</sup> dusičnanu sodného a 0,001 mol.l<sup>-1</sup> SDS. NaNO<sub>3</sub> vystupuje při této reakci jako elektrolyt, který umožňuje přenos elektronů během prvního kroku sulfidace, kterým je oxidace vzdušným kyslíkem rozpuštěným ve vodě. Do takto připraveného koloidního roztoku Ag NPs byl za stálého míchání na magnetickém míchadle po kapkách přikapáno 10 ml 0,1 mol.l<sup>-1</sup> roztoku sulfidu sodného a reakční směs byla ponechána míchat po dobu 24 hodin. Po sulfidizaci byly nanočástice promyty demineralizovanou vodou a finálně zakoncentrovány pomocí centrifugace, čímž byly odstraněny všechny nezreagované chemikálie.

## 2.7.2 Testy toxicity

### 2.7.2.1.1 Cytotoxicita

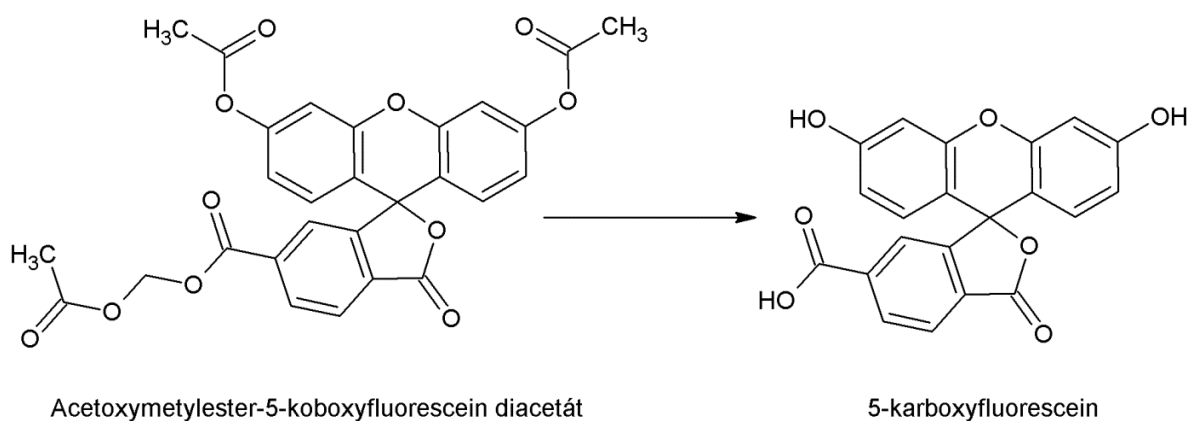
Pro experimenty, jejichž cílem bylo studovat cytotoxicitu a mechanismus přestupu NPs přes střevní stěnu ryb, byly jako modelový organismus použity buňky střevního epitelu pstruha duhového (RTgutGC), jež byly součástí baterie ekotoxikologických testů ve výzkumném ústavu Eawag (Švýcarsko), kde byly testy uskutečněny. Kultura byla kultivována v 75 cm<sup>2</sup> kultivačních nádobách (TPP, Švýcarsko) v kompletním Lebowitzově médiu L-15/FBS při teplotě 19°C a normální atmosféře. Médium L-15/FBS bylo měněno každý týden. Buňky, které dosáhly konfluence, byly trypsinizovány a rekultivovány v poměru 1:3 [Geppert et al., 2016].

Testy buněčné toxicity nanočástic byly provedeny v 24 jamkových mikrotitračních destičkách pro tkáňové kultury. Do každé jedné jamky bylo vyseto 150000 buněk RTgutGC v 1 ml média L-15/FBS a takto byly buňky ponechány v inkubátoru 48 hodin. Jelikož byly buňky získány desintegrací, je třeba je nechat přilnout k podkladu a teprve poté je možné provést testy cytotoxicity. RTgutGC jsou adherentní buňky a mají tendenci se přilnout na dno misky v jedné vrstvě a vytvořit tak buněčnou monovrstvu. Po uplynutí 48 hodin, kdy došlo k přichycení buněk ke dnu jamky a vytvoření monovrstvy buněčného epitelu, bylo možno na buňky dávkovat koloidní roztoky nanočástic v koncentrační řadě a z výsledků vypočítat hodnoty EC<sub>50</sub> pro jednotlivé organely v buňce. Testy cytotoxicity byly vyhodnocovány spektrofotometricky. Tato metoda je založena na interakci fluorescentních barviv s příslušnými buněčnými organelami. Barvivo AlamarBlue (AB) bylo použito pro stanovení míry poklesu buněčné aktivity. Jedná se o komerčně dostupný roztok barviva resazurinu [O'Brien et al., 2000]. Resazurin vniká skrz buněčnou membránu do cytosolu ve své nefluorescentní formě a zde je, díky mitochondriální aktivitě, konvertován mikrozosomálními, či cytoplazmatickými oxidoreduktázami, na fluorescentní produkt resofurin (**Obr. 24**).



Obrázek 24: Přeměna nefluorescentního resazurinu na fluorescentní resofurin, který je konvertován mikrozomálními, či cytoplazmatickými oxidoreduktázami v buňce.

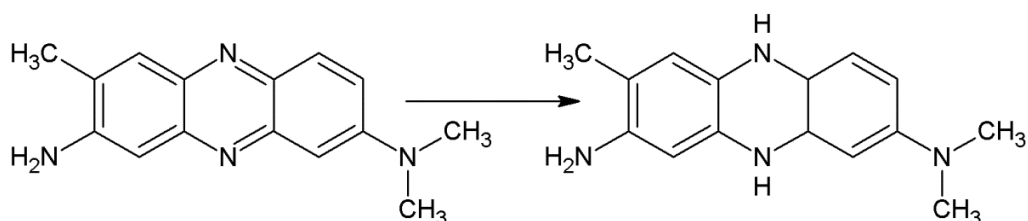
Acetoxymethylester-5-karboxyfluorescein diacetátu (CFDA-AM) je fluorescentní barvivo, které bylo využito pro měření integrity buněčné membrány. Po kontaktu s buňkou velice rychle difunduje skrz membránu do cytosolu, kde je konvertován pomocí nespécifických esteráz plazmatické membrány na 5-karboxyfluorescein (**Obr. 25**). Z neporušených buněk tento produkt redukce difunduje jen velmi obtížně a proto pokles fluorescence CFDA-AM indikuje porušení integrity plazmatické membrány (Schirmer, 1998 #314).



Obrázek 25: Konverze acetoxymethylester-5-karboxyfluorescein diacetátu na 5-karboxyfluorescein pomocí buněčných esteráz plazmatické membrány.



NeutralRed (NR) je barvivo stejné třídy jako methylenová modř a v buněčné toxikologii je hojně využíváno ke stanovení míry porušení integrity lysozomální membrány. Jelikož v porovnání s ostatními použitými barvivy difunduje do buňky pomalu, je nutné prodloužit dobu expozice buněk až na 2 hodiny. Toto barvivo se akumuluje v lysozomech, jejichž silně kyselé pH způsobí protonaci dusíků fenazinového cyklu v polohách 5 a 10 (**Obr. 26**). Tím zruší aromaticitu celého systému. Poškození lysozomů tedy přímo ovlivňuje pokles fluorescence NR [Borenfreund and Puerner, 1985].



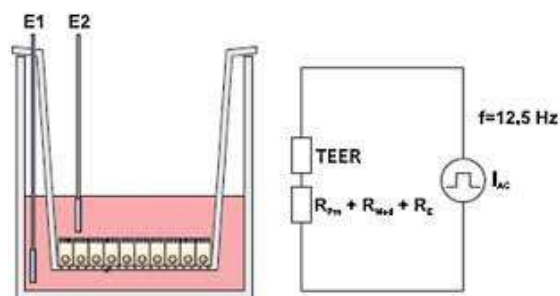
Obrázek 26: Protonace barviva NeutralRed a vznik nefluorescentního produktu

Protokol pro testy cytotoxicity vycházel z prací [Schirmer et al., 1997, Schirmer et al., 1998] a byl modifikován tak, aby bylo možno jej použít pro koloidní roztoky nanočástic. Testy cytotoxicity nanočástic byly provedeny v 24 jamkových mikrotitračních destičkách pro tkáňové kultury. Do každé jedné jamky bylo vyseto 150000 buněk RTgutGC v 1 ml média L-15/FBS a takto byly buňky ponechány v inkubátoru 48 hodin. Před započítáním expozice buněk nanočásticím bylo kultivační médium L-15/FBS odstraněno a buňky byly dvakrát omyty 1 ml expozičního média L-15/ex. Následně byly buňky inkubovány po dobu 24 hodin v 1 ml média L-15/ex, které obsahovalo příslušnou koncentraci Ag NPs a nebo Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs. Po uplynutí inkubační doby byly buňky dvakrát opláchnuty L-15/ex a takto připravený materiál byl podroben baterii testů cytotoxicity. Za toxikologické endpointy byla zvolena metabolická aktivita buněk, integrita jejich buněčné membrány a integrita lysozomální membrány, což jsou v současnosti hojně využívané markery toxicity nanočástic [Yue et al., 2015]. Testy cytotoxicity byly vyhodnocovány fotometricky a výsledek je vyjádřen jako procento buněčné vitality v porovnání s kontrolní skupinou. Monovrstva buněk byla dvakrát opláchnuta 1 ml PBS a následně inkubována 30 minut s 400  $\mu$ L roztoku PBS obsahujícím 5% AB

a  $4 \mu\text{mol.l}^{-1}$  CFDA-AM. Po uplynutí doby inkubace byla měřena fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$  pro AB;  $\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 541 \text{ nm}$  pro CFDA-AM). Buňky byly opláchnuty 1 ml PBS a následně inkubovány 1 hodinu v 400  $\mu\text{l}$  roztoku PBS obsahujícího 1% NR. Finální koncentrace NR v roztoku byla  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . Po inkubaci byly buňky opláchnuty 1 ml PBS a po dobu 10 minut třepány v extrakčním činidle pro NR (50% ethanol, 49%  $\text{H}_2\text{O}$ , 1% kyselina octová). Fluorescence byla měřena při vlnových délkách  $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$  a  $\lambda_{\text{em}} = 645 \text{ nm}$ . Veškeré testy cytotoxicity jsou vyhodnoceny jako procenta životaschopnosti v porovnání s kontrolní skupinou, kterou tvořily buňky inkubované dle totožného scénáře bez přídavků nanočástic.

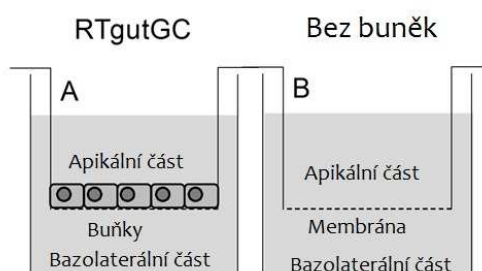
#### 2.7.2.1.2 Akumulace a prostup

Výzkum transepiteliálního transportu a záchytu NPs uvnitř cytosolu buňky byl proveden v jiném experimentálním uspořádání, než tomu bylo v případě testování cytotoxicity. Buněčná kultura RTgutGC může být s úspěchem pěstována nejen na dně mikrotitračních jamek, ale buňky mohou být úspěšně pěstovány v monovrstvě na semipermeabilních membránách, které jim slouží jako mechanická podpora. Tímto experimentálním uspořádáním je umožněna *in vivo* studie nejen hromadění nanočástic na povrchu a uvnitř buněk, ale díky tomuto uspořádání je možné simulovat prostup nanočástic (nebo kovových iontů) skrz střevní bariéru do vnitřního prostředí organismu. Bazolaterální (spodní) část mikroaparatury byla naplněna 1 ml média L-15/FBS a před započítím testů byly buňky ponechány růst alespoň 3 týdny v inkubátoru při teplotě  $19^\circ\text{C}$ , dokud nebylo dosaženo konfluence. Integrita buněčného epitelu byla sledována pomocí měření transepiteliálního elektrického odporu (TEER), mezi elektrodami E1 a E2 (**Obr. 27**), pomocí volt-ohm metru EVOM v kombinaci s Endohm-6 měřící celou (World Precision Instruments, Berlín, Německo). TEER buněk RTgutGC byl vypočten jako rozdíl hodnot měření mikroaparatur s buněčnou kulturou a bez ní.



Obrázek 27: Schématické znázornění aparatury pro měření transepiteliálního elektrického odporu buněk.

Pro testy absorpce a prostupu nanočástic skrz epitel byly buňky po dosažení konfluence v kultivačních nádobách trypsinizovány, spočítány a vysety v hustotě 62500 buněk.cm<sup>-2</sup> v 300 µl média L-15/FBS na mikroporézní přepážku apikální části mikroaparatury, která je znázorněna na **Obr. 28 A**. Bazolaterální část této mikroaparatury byla naplněna 1 ml L-15/FBS a buňky byly v tomto uspořádání ponechány růst po dobu alespoň 3 týdnů, do té doby, než bylo dosaženo dokonalé konfluence frity. Kapalně médium bylo měněno v obou částech mikroaparatury jednou za týden, což je dostatečná frekvence výměny k zajištění optimálního růstu buněk a zachování jejich dostatečné metabolické aktivity. Jako kontrola byl použit stejný experimentální setup (**Obr. 28 B**) jako v případě buněčné kultivace, avšak na frity apikální části mikroaparatury nebyly RTgutGC vysázeny. Apikální část obsahovala 300 µl L-15/FBS a bazolaterální 1 ml L-15/FBS.



Obrázek 28: Nákres mikroaparatury určené pro výzkum záchytu a transportu nanočástic skrz buněčný epitel do vnitřního prostředí organismu. A – část experimentální, B – část kontrolní

Před započítím testu transepiteliálního transportu a záchytu NPs buňkou byla odstraněna média, v kterých byly buňky kultivovány a z apikální i bazolaterální části byly dvakrát omyty 300  $\mu\text{L}$  média L-15/ex. Následně byly buňky inkubovány po dobu 24 hodin v 300  $\mu\text{L}$  L-15/ex o obsahu 1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  NPs. Experiment byl proveden při 19 ° C a při 4 ° C pro kontrolu energetické závislosti akumulace nebo transportu částic a zodpovězení otázky, zda se jedná o transport aktivní či pasivní. Toto experimentální uspořádání vychází z práce [Geppert et al., 2016]. Kromě samotného experimentu s buňkami byl proveden i experiment s prázdnými membránami bez buněk, aby byla provedena kontrola schopnosti nanočástic aglomerovat na povrchu membrán anebo díky koncentračnímu gradientu procházet skrze ně prostou difuzí do bazolaterální části mikroaparatury.

Všechny buněčné testy byly provedeny na alespoň třech různých pasážích buněk RTgutGC. Analýza významnosti rozdílů byla provedena pomocí t-testu z dvou souborů dat, případně metodou ANOVA následována Dunnettovým *post-hoc* testem z tří souborů dat. Hodnoty  $p > 0,05$  byly považovány za významné.

## 2.8 VÝSLEDKOVÁ ČÁST - Plnění dílčích cílů 3

### 2.8.1 Charakterizace Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs

#### 2.8.1.1 DLS

Částice byly po syntéze podrobeny testování stability po naředění demineralizovanou vodou na koncentraci 1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Velikost hydrodynamického průměru vznikajících aglomerátů a  $\zeta$ -potenciál systému byl zaznamenán 1 hodinu po naředění na požadovanou koncentraci a následně po 24 hodinách. Hodinu po naředění demineralizovanou vodou na koncentraci 1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  vykazoval koloid Ag NPs hydrodynamický průměr  $39 \pm 2$  nm a tato hodnota se signifikantně nezměnila ani po 24 hodinách. V kontrastu s tím, hydrodynamický průměr částic koloidu Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs narostl z  $80 \pm 16$  nm během 24 hodinové inkubace za stejných

podmínek k  $481 \pm 302$  nm.  $\zeta$ -potenciál byl negativní pro oba dva typy koloidů, Ag NPs vykazovaly vyšší agregátní stabilitu jak na začátku experimentu, tak po uplynutí 24 hodinové inkubace. Výsledné hodnoty měření včetně směrodatných odchylek shrnuje **tabulka 12**.

**Tabulka 11: Výsledky měření hydrodynamického průměru a  $\zeta$ -potenciálu Ag a Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs**

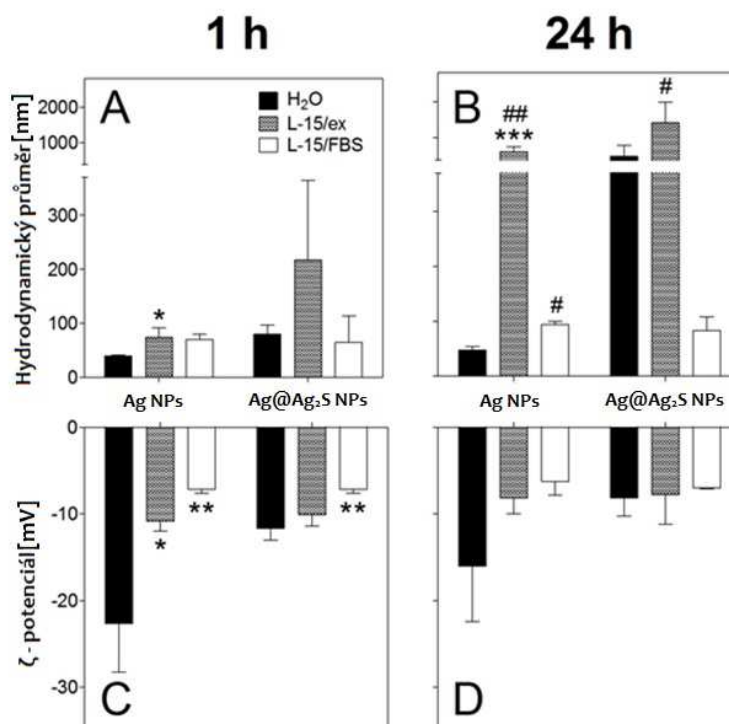
Počáteční hodnoty			Po 24 hodinách inkubace		
D <sub>H</sub>	nm	SD	D <sub>H</sub>	nm	SD
Ag NPs	39,38	1,76	Ag NPs	47,60	6,68
Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs	80,00	16,35	Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs	481,33	301,81

$\zeta$ -potenciál	mV	SD	$\zeta$ -potenciál	mV	SD
Ag NPs	-22,60	5,63	Ag NPs	-16,00	6,42
Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs	-11,67	1,35	Ag@Ag <sub>2</sub> S NPs	-8,15	2,13

Před samotným započítáním testů cytotoxicity a akumulace částic v buněčném epitelu bylo přistoupeno k testování agregátní stability připraveného koloidu Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs po naředění médiem expozičním (L-15/ex) i médiem kultivačním (L-15/FBS). Koncentrace částic v koloidu byla  $1 \text{ mg.l}^{-1}$ , což odpovídá koncentraci použité při testování transportu a akumulace nanočástic v buněčném epitelu. Velikost hydrodynamického průměru vznikajících aglomerátů a  $\zeta$ -potenciál systému byl zaznamenán 1 hodinu po naředění na požadovanou koncentraci a následně po 24 hodinách, což byla reálná expoziční doba buněk. Na rozdíl od experimentů v demineralizované vodě, nárůst hydrodynamického průměru vznikajících aglomerátů byl v L-15/ex pro oba typy částic signifikantně významný, když jeho velikost vzrostla na  $603 \pm 138$  nm pro Ag NPs a na  $1410 \pm 573$  nm pro Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs. V kompletním médiu L-15/FBS, které obsahuje aminokyseliny, jež mohou nanočástice stabilizovat, nebyl pozorován signifikantní nárůst velikostí ani pro Ag NPs ( $70 \pm 10$  nm), ani pro Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs ( $65 \pm 48$  nm).  $\zeta$ -potenciál byl pro oba typy částic negativní ve všech

případech, i když v médiích L-5/ex i L-15/FBS je patrný v porovnání s demineralizovanou vodou signifikantní úbytek jeho hodnoty. Grafické zpracování výsledků agregátní stability prezentuje **graf 16**.

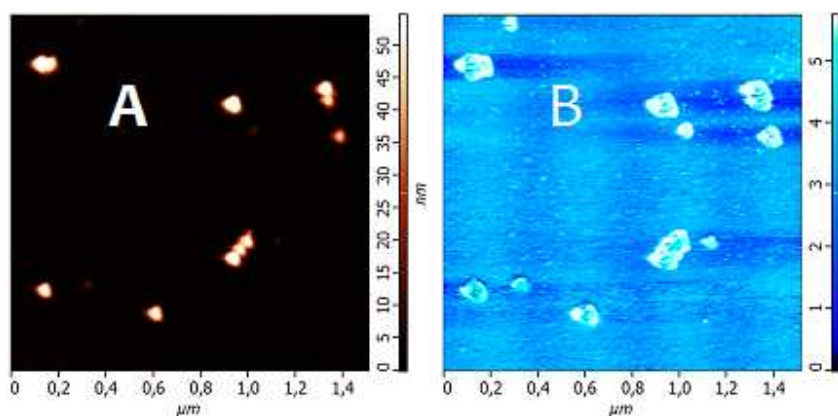


Graf 16: Výsledky měření velikosti hydrodynamického průměru a  $\zeta$ -potenciálu nanočástic v různých médiích pro testy buněčné toxicity po 1 a 24 hodinách. \* označují signifikantní rozdíly ve významnosti mezi průměry ve vodě a biologickými médii, hashtagy označují signifikantní rozdíly významnosti mezi 1 a 24 h inkubace; \*, # p < 0,05; \*\* ## p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

### 2.8.1.2 AFM

Topografie Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs byla studována pomocí AFM při stejném módu jako Ag NPs, tedy při rezonanční frekvenci hrotu 185 kHz, silou  $k = 4.6 \text{ N.m}^{-1}$ . Ze snímků nanočástic (**Obr. 29 A**) je patrné, že částice mají i po sulfidaci sférický tvar, jsou dobře dispergovány na substrátu a nenacházejí se mezi nimi nanomůstky Ag<sub>2</sub>S, jak bylo publikováno [Levard et al., 2011] pro částice stabilizované pomocí PVP. Měřené Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs byly 45-55 nm vysoké s průměrem pohybujícím se od 55 do 65 nm. Na **Obr. 29 B** je zobrazen topografický sken téže oblasti proveden v dynamickém nekontaktním režimu snímání,

kdy raménko mikroskopu osciluje působením harmonické síly při maximální výchylce cca 5 Å, tj. 0,5 nm, nad vzorkem a je snímán fázový posuv kmitání způsobený atomárními silami. Tato technika je dle principu měření nazývána Dynamic Force Microscopy (DFM), tedy mikroskopie dynamických sil [García and Pérez, 2002]. V tomto dynamickém módu je možno detekovat nejen velikost a tvar nanočástic, ale jelikož je metoda založena na detekci lokálních mechanických vlastností, jako je hustota a adheze hrotu mikroskopu k měřenému vzorku, je možné pozorovat, že všechny Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs vykazují totožné mechanické chování a podobné fázové posuny vůči substrátu. To je přinejmenším nepřímý důkaz homogenity a integrity obalu Ag<sub>2</sub>S s jádrem.

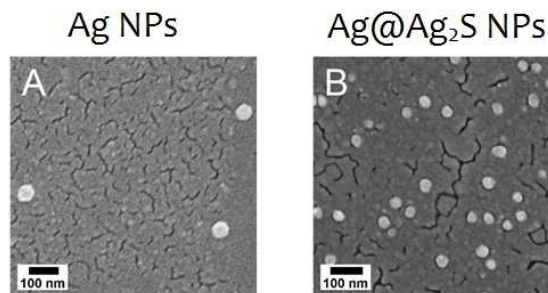


Obrázek 29: AFM topografický sken (A) testovaných Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs a sken fázového posunu (B) téže zobrazované oblasti.

### 2.8.1.3 SEM

Další mikroskopickou technikou, která byla zapojena do analýz vzorků Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs byla SEM. Srovnání fotografií těchto částic s Ag NPs, ze kterých byly syntetizovány (Obr. 30 A a B) poukazuje na žádné pozorovatelné změny kruhovitosti částic, jejich rozpouštění, tvorbu nanomůstek mezi jednotlivými částicemi, případné aglomerační, či agregátní chování. SEM fotografie primárního koloidu Ag NPs i následný sulfidovaný systém Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs vykazují stejnou velikost částic před i po sulfidaci s průměrem částic pohybujícím se okolo 50 nm v obou případech. Ze snímků je také možné vizuálně detekovat,

že se zde nenacházejí žádné nesulfidované částice, avšak tloušťka  $\text{Ag}_2\text{S}$  vrstvy není pomocí SEM detekovatelná. Pro tento účel byla použita rentgenová krystalografická analýza (XRD).

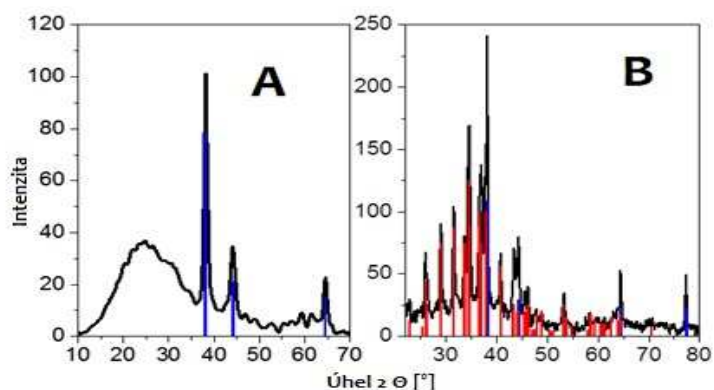


Obrázek 30: SEM snímky syntetizovaných Ag NPs a z nich sulfidovaných  $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$  NPs

#### 2.8.1.4 XRD

Analýza rentgenového difrakčního obrazce Ag NPs poukazuje na kubickou krystalografickou strukturu (**Obr. 31 A**), což je ve shodě s publikovanými krystalografickými daty (Sun, 2002 #45). Při analýze difrakčního obrazce  $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$  NPs (**Obr. 31 B**) jsou dobře patrné dvě krystalografické fáze, jedna kubická (modré linie), která odpovídá stříbru a pak je možno vidět monoklinickou krystalografickou soustavu sulfidu stříbrného (červené čáry). I to odpovídá popisu uvedenému v práci [Levard et al., 2011]. XRD interferogram byl podroben analýze pomocí Scherrerovy elementární konstruktivní teorie lineární aproximace [Langford and Wilson, 1978] založené na kalkulaci šířky pásu náležející příslušné interferenci rentgenova záření. Průměrná velikost krystalitů byla vypočtena na 30,7 nm pro Ag jádro a 18 nm pro obal tvořený  $\text{Ag}_2\text{S}$ . Tyto výsledky (celkový průměr  $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$  NPs odpovídá 66 nm pro nesolvatované nanočástice) jsou v dobré shodě s výsledky měření velikosti průměrů nanočástic pomocí AFM (55-65 nm pro několik vybraných NPs).

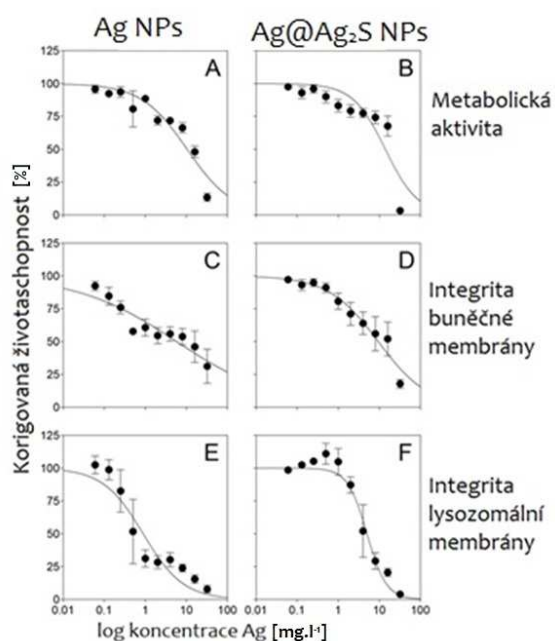




Obrázek 31: Rentgenový difraktogram Ag a Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs.

## 2.8.2 Testy cytotoxicity

K testování cytotoxicity Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs v porovnání s toxicitou Ag NPs bylo přistoupeno metodou analýzy koncentrační závislosti dávky nanočástic na životaschopnosti buněčné kultury RTgutGC sledované pomocí míry enzymatické odpovědi tří buněčných struktur. Jak je patrné z **grafů 17**, tyto analýzy vykazují pro oba typy částic sigmoidální odezvu ve vztahu dávka – účinek a je patrné, že mezi toxicitou obou druhů nanočástic není významný rozdíl.



Graf 17: Porovnání různých metabolických odpovědí při testování cytotoxicity Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs.

Za použití 4 parametrické nelineární regrese byly vypočteny hodnoty EC<sub>50</sub>, které vycházejí pro Ag NPs 10,4 mg.l<sup>-1</sup> pro metabolickou aktivitu, 5,8 mg.l<sup>-1</sup> pro membránovou integritu a EC<sub>50</sub> pro lysozomální integritu byla vypočtena na 0,89 mg.l<sup>-1</sup>. Hodnoty EC<sub>50</sub> pro Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs vycházejí ve výsledku o něco vyšší a to 14,0; 9,4 a 5 mg.l<sup>-1</sup> pro metabolickou aktivitu, membránovou a lysozomální integritu. Jak je patrné z 95% intervalu spolehlivosti prezentovaného v **tabulce 13**, mezi hodnotami EC<sub>50</sub> pro Ag NPs a Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs není signifikantního rozdílu pro metabolickou aktivitu a membránovou integritu, avšak je možné pozorovat statisticky významný rozdíl mezi hodnotami EC<sub>50</sub> vypočtenými pro integritu lysozomální membrány. Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs vykazují znatelně vyšší hodnotu EC<sub>50</sub>, a proto jsou z toxikologického úhlu pohledu v tomto parametru méně toxické.

Tabulka 12: Hodnoty EC<sub>50</sub> (mg.l<sup>-1</sup>) testovaných Ag a Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs vypočtené pro expozici RTgutGC po 24 hodinové inkubaci.

	Metabolická aktivita	Integrita buněčné membrány	Integrita lysozomální membrány
<b>Ag NPs</b>	10,4 (7,3 – 14,8)	5,8 (2,9 – 11,5)	0,89 (0,55 – 1,4)
<b>Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs</b>	14,0 (9,7 – 20,2)	9,4 (6,2 – 14,2)	5,0 (3,9 – 6,4)

Při aplikaci na buněčnou kulturu RTgutGC ve vyšších koncentracích vykazovaly oba typy nanočástic podobný toxický efekt. Toxicita Ag NPs byla prokázána na různých typech buněk, včetně rybích buněčných linií [Farkas et al., 2011, Farkas et al., 2010, Yue et al., 2015]. Tato pozorovaná toxicita bývá většinou připisována Ag<sup>+</sup> iontu uvolněnému z nanočástic jejich rozpouštěním během experimentů [Kim et al., 2013]. Nutno podotknout, Enrique Navarro vypracoval rozsáhlou studii pokrývající několik trofických úrovní, ve které poukazuje na přímý toxický efekt Ag NPs [Navarro et al., 2008a, Navarro et al., 2008b, Navarro et al., 2015]. Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs jsou považovány za méně toxické než Ag NPs, což bývá odůvodněno mnohem

nižším potenciálem k rozpouštění povrchové vrstvy Ag<sub>2</sub>S [Levard et al., 2011]. Naše výsledky z testování cytotoxicity obou částic nevykazují, s výjimkou integrity lysozomální membrány buněk, signifikantní rozdíl mezi částicemi a z výsledků testování cytotoxicity plyne, že oba druhy v testech použitých částic mají velmi podobné toxické účinky na buňky RTgutGC. Nicméně, skutečnost, že integrita lysozomální membrány je významně méně ovlivněna Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs než Ag NPs, ukazuje na rozdíl těchto dvou typů částic vzhledem k buněčné odpovědi. Lysozomální membrány jsou v našich testech cytotoxicity nejcitlivější organelou v obou případech testování toxicity nanočástic. To poukazuje na fakt, že jsou lysozomy ovlivněny nejvíce, jak je rovněž uvedeno pro Ag NPs testované na žaberních buňkách pstruha duhového [Yue et al., 2015]. Důvodem obdobné celkové toxicity obou částic by mohl být fakt, že pocházejí ze stejné šarže syntézy, kde jediný rozdíl byl následný sulfidační krok v případě Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs. To je rozdíl od prací, ve kterých byly použity zcela odlišné Ag a Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs [Levard et al., 2011, Levard et al., 2013, Levard et al., 2012]. Odhlédneme-li od toxicity nanočástic na jednotlivé buněčné organely a budeme se zabývat toxicitou celkovou vyjádřenou jako EC<sub>50</sub>, hodnoty pro Ag NPs se pohybují od méně než 1 mg.l<sup>-1</sup> do 10 mg.l<sup>-1</sup>, zatímco hodnoty EC<sub>50</sub> pro Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs se nacházejí v rozmezí od 5 do 14 mg.l<sup>-1</sup>. Dle klasifikace uvedené v práci s názvem „Od ekotoxikologie k nanoekotoxikologii“ [Kahru and Dubourguier, 2010], lze uvést, že Ag NPs mohou být považovány za toxické / velmi toxické, zatímco Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs spadají do kategorie škodlivé / toxické. Pomocí testu cytotoxicity bylo ověřeno, že žádná z experimentálních podmínek dalších testů (teplota, koncentrace nanočástic) nemá vliv na životaschopnost buněk a tím na výsledky provedených experimentů.

### 2.8.3 Akumulace a prostup

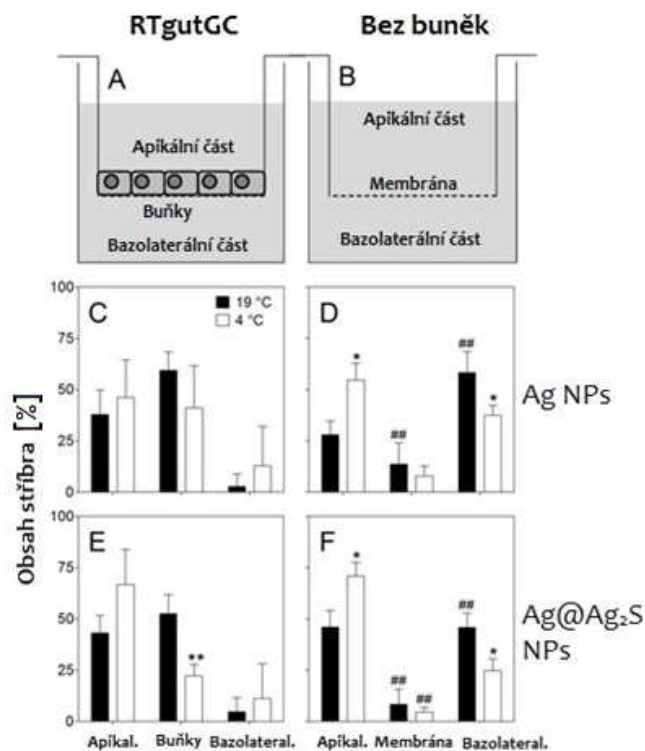
Z výsledků měření TEER (**tabulka 14**) plyne, že se hodnoty TEER se po inkubaci pohybovaly v rozmezí  $32 \pm 1 \Omega \times \text{cm}^2$  v kontrolní skupině a  $29 \pm 2 \Omega \times \text{cm}^2$  pro buňky inkubované s 1 mg.l<sup>-1</sup> NPs. Žádný signifikantní rozdíl mezi uvedenými hodnotami značí dobrou

konfluenci monovrstvy buněk, která nebyla žádným způsobem ovlivněna interakcí s nanočásticemi.

Tabulka 13: Výsledky měření epiteliální bariérové integrity RTgutGC

	TEER ( $\Omega \times \text{cm}^2$ )			
	Před inkubací		Po inkubaci	
	19 °C	4 °C	19 °C	4 °C
<b>Kontrola</b>	29,5 ± 2,9	31,1 ± 4,1	32,1 ± 1	30,6 ± 2,7
<b>Ag NPs</b>	28,1 ± 3	28,9 ± 3,3	29,3 ± 3,7	31,2 ± 4,6
<b>Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs</b>	30 ± 2,4	29,1 ± 2,7	29,1 ± 2,2	29,9 ± 1,3

Při experimentech s Ag NPs při 19 °C zbývalo po 24 hodinách inkubace v roztoku o koncentraci 1 mg.l<sup>-1</sup> částic v apikální části mikroaparatury 38 ± 12 % stříbra, 59 ± 9 % bylo akumulováno v buňkách a pouze 3 ± 6 % stříbra byly translokovány do bazolaterální části. Při snížení inkubační teploty na 4 °C nedošlo v případě Ag NPs k signifikantním změnám v rozložení stříbra v jednotlivých kompartmentech mikroaparatury (**Obr. 32 C**). V kontrastu s tím, při experimentech s Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs se efekt snížení teploty projevil. Při teplotě 4 °C bylo v buňkách detekováno pouze 22 ± 6 % stříbra. Tato hodnota je signifikantně nižší než při 19 °C, kde byla hodnota akumulace Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs 52 ± 9 %, nicméně, množství stříbra translokovaného do bazolaterálního prostoru je také velmi nízké (**Obr. 32 E**)



Obrázek 32: Porovnání obsahu stříbra v jednotlivých kompartmentech mikroaparatury.

Dle předpokladů je významný rozdíl v distribuci stříbra v jednotlivých kompartmentech, pokud byl experiment proveden s membránami, na kterých nebyly inkubovány buňky. Zde stoupá míra podílu stříbra v bazolaterální části aparatury na  $58 \pm 10 \%$  pro Ag NPs při  $19 \text{ }^\circ\text{C}$  (Obr. 32 D, F). Při testování s buňkami bylo dále pozorováno významné snížení difúze stříbra z Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs do bazolaterálního prostoru při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  ve srovnání s  $19 \text{ }^\circ\text{C}$ . To je doprovázeno zvýšeným obsahem zbývajícího stříbra v apikálním prostoru při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tento efekt se však při testech s Ag NPs neprojevil. To naznačuje, že akumulace stříbra v buněčném epitelu z Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs probíhá mechanismem aktivního transportu, pravděpodobně za pomoci endocytózy, jak bylo dříve popsáno pro Ag NPs na různých typech buněčných kultur z různých živočichů [Khan et al., 2015a, Kim et al., 2009, Kim and Choi, 2012, Wang et al., 2012, Maurer et al., 2016, Durán et al., 2015]. V kontrastu s tímto zjištěním množství akumulace stříbra z Ag NPs se zdá být nezávislá na inkubační teplotě.

To by mohlo být výsledkem toho, že podstatná část aglomerátů Ag NPs absorbuje na buněčné membráně RTgutGC buněk, setrvává extracelulární a není aktivně transportována do cytosolu, tak jak to bylo popsáno na nanočásticích oxidu železa při testování prostupu a akumulace nanočástic na epitelu lidských mozkových buněk [Mark et al., 2011]. Ve srovnání s kontrolou provedenou bez buněk, translokace stříbra na modelu střevní bariéry pstruha duhového je velmi nízká pro oba typy zkoumaných nanočástic. Z toho lze usuzovat, že buňky střevního epitelu pstruha duhového tvoří účinnou bariéru bránící transportu nanočástic do bazolaterálního prostoru mikroaparatury, respektive vnitřního prostoru ryby. I když bylo v bazolaterálním prostoru naměřeno malé množství stříbra, výsledky jsou v dobré shodě s očekáváním plynoucím z nezměněných hodnot měření TEER před a po provedených experimentech a jsou také ve shodě s daty publikovanými při experimentech s fluorescenčními částicemi polystyrenu [Geppert et al., 2016]. Nicméně z výsledků experimentů není možno odpovědět na to, zda je přítomnost stříbra v bazolaterální části důsledkem prostupu neporušených Ag nebo Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs, či se jedná o transport rozpuštěného stříbrného kationtu.

Závěrem kapitoly lze konstatovat, že byla vyvinuta nová metoda srovnávací analýzy cytotoxicity Ag a Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs na bariérovém modelu střevního epitelu pstruha duhového. Oba typy nanočástic vykazují obdobný průběh křivky dávka – účinek na různých organelových úrovních, Ag@Ag<sub>2</sub>S NPs se zdají být méně toxické, pokud jde o jejich vliv na lyzozomální systém buněk. Inkubace buněk s oběma typy nanočástic vykazuje vysokou míru buněčné akumulace stříbra, která je pravděpodobně sdruženým výsledkem akumulace aglomerátů na povrchu buněčné membrány a aktivního vychytávání nanočástic a stříbrných iontů buňkami pomocí endocytózy. Během inkubace je stříbro translokováno do bazolaterálního prostoru jen ve velmi omezeném množství, což podtrhuje bariérovou funkci RTgutGC buněk, které brání transportu toxických látek na stranu krve *in vivo*.

### 3 ZÁVĚR

Prezentovaná disertační práce je zaměřena na problematiku testování ekotoxicity nanomateriálů a definování významných fyzikálně-chemických parametrů nanočástic a expozičních médií, které tyto testy ovlivňují. Náš způsob řešení tohoto aktuálního a nadmíru komplexního problému spočíval v nalezení vhodných způsobů charakterizace fyzikálně-chemických vlastností nanomateriálů a jejich chování v expozičních médiích a navržení experimentálních postupů, které povedou k minimalizaci vlivu faktorů zhoršujících reprodukovatelnost či vypovídací schopnost testů ekotoxicity nanočástic. Pilotní experimenty popsané v této práci byly prováděny s využitím klasických OECD metodik, které jsou koncipovány k testování chemikálií rozpustných ve vodě s tím rozdílem, že pro ně byl použit koloid stříbrných nanočástic (Ag NPs). K charakterizaci fyzikálně-chemických parametrů ovlivňující chování a osud Ag NPs v expozičních médiích byly používány metody dynamického rozptylu světla (DLS) a spektroskopie ve viditelné a ultrafialové části spektra (UV-Vis). Velikost a tvar částic byly vyhodnocovány pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) a elektronové mikroskopie (SEM). Povrchový náboj koloidních systémů byl zjišťován měřením  $\zeta$ -potenciálu, koncentrace v koloidech pomocí emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP - OES). Krystalická struktura částic byla určována pomocí rentgenové difrakční analýzy (XRD). Jelikož se jako nejpravděpodobnější důvod vysoké nekonzistentnosti výsledků ekotoxikologických testů nanočástic v kapalných médiích jeví jejich aglomerační chování a snížení iontové síly vede ke zpomalení aglomerace nanočástic, byla ověřována možnost snížení iontové síly expozičního média. Maximální možná míra naředění je však limitována tím, že nesmí být ovlivněn zdravý vývoj embryí, plůdků a jedinců. K těmto testům byly použity vodní organismy hrotnatka velká (*Daphnia magna*), dánío pruhované (*Danio rerio*) a kapr obecný (*Cyprinus carpio*). Tímto byla stanovena maximální možná míra naředění na 75% koncentrace původního média M203.

Na základě poznatků o rychlosti a míře aglomerace Ag NPs při různých iontových silách expozičního média a různé koncentraci Ag NPs v něm, bylo možno modifikovat stávající klasické testy prováděné dle norem OECD na testy, při kterých byly embrya a plůdky

vystaveny působení aglomerátů o maximální velikosti 200 a 400 nm při shodných koncentracích Ag NPs. Experiment byl konstruován jako test s variabilní frekvencí výměny expozičního média. Z výsledků vyplývá, že aglomeráty s větší velikostí (400 nm) jsou pro plůdky i embrya obou testovaných ryb toxičtější. Důvodem k tomu by mohl být fakt, že aglomeráty o větší velikosti snadněji sedimentují na dno experimentálních nádob, kde parciálně zvyšují koncentrací  $Ag^+$ . Jelikož se v tomto prostoru embryo vyskytuje po celou dobu svého vývoje, může tak být ovlivněno aglomeráty a z nich uvolněným  $Ag^+$  více, než je tomu v případě experimentů v menší velikosti aglomerátů. Nicméně, ve všech testovaných koncentracích u obou skupin maximálních velikostí aglomerátů se v testech s větší či menší intenzitou vyskytovaly jedinci s deformacemi ocasní ploutve a páteře, edémy páteře a žloutkového váčku a malformacemi srdce. To by mohlo naznačovat jistou toxicitu Ag NPs nezávislou na jejich koncentraci v expozičním médiu či životním prostředí. Avšak pro potvrzení, či vyvrácení těchto teorií, by bylo potřeba dalších testů v různém experimentálním uspořádání, ve kterých by byla zapojena přinejmenším automatizace výměny koloidů, lépe průtočný systém s peristaltickým dávkováním nanočástic.

Při testování ekotoxicity nanočástic na půdních organismech byla aglomerace nanočástic potlačena použitím agaru jako expozičního média. Testovány byly účinky ZnO NPs a ekotoxikologický experiment byl proveden na roupici *Enchytraeus crypticus*. Bylo při něm ověřováno, zda má výsledná velikost aglomerátů dispergovaných v agaru vztah s jejich toxicitou a jaká je toxicita ZnO NPs v porovnání s toxicitou  $Zn^{2+}$ . Z výsledků experimentů je patrná řádově vyšší toxicita zinečnatého kationtu v porovnání s toxicitou nanočástic ZnO. Míra dispergace hraje v toxicitě také svou roli. Při experimentech, kdy byly práškové nanočástice v agaru dispergovány hůře nebylo možno pozorovat jakýkoli trend křivky dávka-účinek. Za předpokladu, že byly nanočástice dispergovány lépe, v agaru se nenacházely aglomeráty větší než 1  $\mu m$ , vztah mezi koncentrací ZnO NPs a mortalitou začíná již nabývat trendového chování, ale jelikož ani maximální testovaná koncentrace ZnO NPs nezpůsobila v experimentálních skupinách 100% mortalitu, nelze s jistotou tvrdit, že částice s menší velikostí vyvolávají vyšší mortalitu. Avšak díky těmto experimentům lze konstatovat, že při krátkodobých testech toxicity nanočástic na půdních a sedimentárních organismech lze



agaru jako expozičního média s úspěchem využít, avšak naše práce [Hrda et al., 2016] a publikace [Li et al., 2011] jsou zatím jedinými dostupnými zdroji informací o testování toxicity nanočástic na půdních organismech chovaných v agaru. Naše práce jako první přichází s hodnocením důležitých fyzikálně-chemických vlastností nanomateriálů v agaru ve vztahu k jejich toxicitě na půdní organismy a přichází s možným efektivním způsobem dispergace práškových nanočástic tak, aby byla v co nejvyšší možné míře testována toxicita nanočástic, ne jejich několika mikronových aglomerátů a zároveň nebyla ovlivněna objektivnost a vypovídací hodnota testování.

Dalším z významných parametrů, který vyjma aglomerace významně ovlivňuje toxicitu nanočástic, je změna jejich chemického složení, k níž dochází při interakci nanočástic s jednotlivými složkami životního prostředí. V případě Ag NPs je ve vodném prostředí s nízkým obsahem chloridů nejčastějším způsobem transformace vznik vrstvy  $\text{Ag}_2\text{S}$  okolo nanočástic a vznik core-shell nanosystému  $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$  NPs [Levard et al., 2011b]. Tento proces jsme se rozhodli modelovat a se syntetizovanými částicemi provést srovnávací testy rozdílů v toxicitě před a po environmentálně relevantní transformaci. Testování bylo provedeno na buněčné kultuře RTgutGC střevního epitelu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a pro srovnání toxicity původních Ag NPs a modifikovaných  $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$  NPs, byly provedeny nejen testy cytotoxicity, ale i testy ke zjištění schopnosti připravených nanočástic prostupovat skrz buněčné membrány, zachytávat se v buněčném cytosolu a následně interagovat s důležitými buněčnými organelami. Celková cytotoxicita obou typů částic hodnocená jako míra viability nevykazovala statisticky významné rozdíly. Rozdíl byl zjištěn pouze v případě testu, pomocí něhož byl posuzován vliv nanočástic na integritu lysozomální membrány buněk. Bylo zjištěno, že integrita lysozomální membrány je významně méně ovlivněna  $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$  NPs než Ag NPs. Výsledky testování míry akumulace nanočástic v buněčném epitelu RTgutGC a testů prostupu nanočástic skrz něj při různých inkubačních teplotách naznačují, že akumulace stříbra z  $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$  NPs probíhá mechanismem aktivního transportu, pravděpodobně za pomoci endocytózy. Tento efekt se při testech s Ag NPs neprojevil. To by mohlo být důsledkem toho, že se podstatná část aglomerátů Ag NPs absorbuje na buněčné membráně RTgutGC buněk a zde setrvává jako extracelulární podíl aglomerátů a není aktivně

transportována do cytosolu. Tento fakt je v rozporu s teorií snadnějšího uvolňování  $\text{Ag}^+$  z Ag NPs a jeho následného jednoduššího prostupu skrz buněčnou membránu [Mark et al., 2011]. Mohl by však být vysvětlen koagulací  $\text{Ag}^+$  s proteiny buněčné membrány, které díky ztrátě své funkčnosti neumožní aktivní transport. Tak jako tak, translokace stříbra na modelu střevní bariéry pstruha duhového skrz epitel je velmi nízká pro oba typy zkoumaných nanočástic. Z těchto výsledků lze usuzovat na fakt, že buňky střevního epitelu pstruha duhového tvoří účinnou bariéru bránící transportu nanočástic ze střeva do krve.

Experimenty shrnuté v této práci jasně prokázaly, že stávající OECD metodiky určené pro testování ekotoxicity ve vodě rozpustných chemikálií nelze bez modifikací použít k testování ekotoxicity nanočástic. Chování nanočástic v koloidních systémech má tak zásadní vliv na výsledky testů, že musí být při tvorbě metodik pro hodnocení ekotoxicity nanomateriálů významným způsobem zohledněno. Podstatnou součástí každého testovacího protokolu musí být zevrubná fyzikálně chemická charakterizace nanomateriálů a jejich disperzí v expozičních médiích. Testy musí být modifikovány s ohledem na typ posuzované nanočástice a na typ prostředí, v němž dochází ke kontaktu s živými organismy. Velmi podstatná je též otázka environmentální relevance posuzovaných koncentračních úrovní a složení expozičních médií. Protokoly pro testy ekotoxicity nanomateriálů budou patrně obsahovat méně univerzálně aplikovatelných kroků, než je tomu u testů jiných polutantů. Tato konstatování jsou plně v souladu se závěry European Union–United States Communities of Research publikovanými v práci [Selck et al., 2016].

## 4 SEZNAM LITERATURY

1. AUFFAN, M., BERTIN, D., CHAURAND, P., PAILLES, C., DOMINICI, C., ROSE, J., BOTTERO, J.-Y. & THIERY, A. 2013. Role of molting on the biodistribution of CeO<sub>2</sub> nanoparticles within *Daphnia pulex*. *Water Research*, 47, 3921-3930.
2. AUFFAN, M., MATSON, C. W., ROSE, J., ARNOLD, M., PROUX, O., FAYARD, B., LIU, W., CHAURAND, P., WIESNER, M. R., BOTTERO, J.-Y. & DI GIULIO, R. T. 2014. Salinity-dependent silver nanoparticle uptake and transformation by Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) embryos. *Nanotoxicology*, 8, 167-176.
3. BAALOUSHA, M. 2009. Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Sci. Total Environ.*, 407, 2093-2101.
4. BADAWY, A. M. E., LUXTON, T. P., SILVA, R. G., SCHECKEL, K. G., SUIDAN, M. T. & TOLAYMAT, T. M. 2010. Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. *Environmental Science and Technology*, 44, 1260-1266.
5. BAE, E., PARK, H. J., YOON, J., KIM, Y., CHOI, K. & YI, J. 2011. Bacterial uptake of silver nanoparticles in the presence of humic acid and AgNO<sub>3</sub>. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28, 267-271.
6. BALON, E. K. 2004. About the oldest domesticates among fishes. *Journal of Fish Biology*, 65, 1-27.
7. BAR-ILAN, O., ALBRECHT, R. M., FAKO, V. E. & FURGESON, D. Y. 2009. Toxicity Assessments of Multisized Gold and Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. *Small*, 5, 1897-1910.
8. BATLEY, G. E., KIRBY, J. K. & MCLAUGHLIN, M. J. 2012. Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments. *Accounts of Chemical Research*, 46, 854-862.
9. BERNE, B. J. & PECORA, R. 2000. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, Dover Publications.
10. BILLARD, R., COSSON, J., PERCHEC, G. & LINHART, O. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129, 95-112.
11. BINNIG, G., QUATE, C. F. & GERBER, C. 1986. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56, 930-933.
12. BORAN, H., BOYLE, D., ALTINOK, I., PATSIYOU, D. & HENRY, T. B. 2016. Aqueous Hg<sub>2</sub><sup>+</sup> associates with TiO<sub>2</sub> nanoparticles according to particle size, changes particle agglomeration, and becomes less bioavailable to zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 174, 242-246.
13. BORENFREUND, E. & PUERNER, J. A. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24, 119-124.
14. BOUGUERRA, S., GAVINA, A., KSIBI, M., DA GRAÇA RASTEIRO, M., ROCHA-SANTOS, T. & PEREIRA, R. 2016. Ecotoxicity of titanium silicon oxide (TiSiO<sub>4</sub>) nanomaterial for terrestrial plants and soil invertebrate species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 129, 291-301.
15. BRADFIELD, S. J., KUMAR, P., WHITE, J. C. & EBBS, S. D. 2016. Zinc, copper, or cerium accumulation from metal oxide nanoparticles or ions in sweet potato: Yield effects and projected dietary intake from consumption. *Plant Physiology and Biochemistry*, In Press.
16. BRAGG, L. 1961. The Rutherford Memorial Lecture, 1960. The Development of X-ray Analysis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 262, 145-158.
17. BROUGHTON, R. E., MILAM, J. E. & ROE, B. A. 2001. The Complete Sequence of the Zebrafish (*Danio rerio*) Mitochondrial Genome and Evolutionary Patterns in Vertebrate Mitochondrial DNA. *Genome Research*, 11, 1958-1967.

18. BRUNEAU, A., TURCOTTE, P., PILOTE, M., GAGNÉ, F. & GAGNON, C. 2016. Fate of silver nanoparticles in wastewater and immunotoxic effects on rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 174, 70-81.
19. CAI, W., FAN, Y., JIANG, Z. & YAO, J. 2010. A highly sensitive and selective resonance scattering spectral assay for potassium ion based on aptamer and nanosilver aggregation reactions. *Talanta*, 81, 1810-1815.
20. CAMPOS, B., RIVETTI, C., ROSENKRANZ, P., NAVAS, J. M. & BARATA, C. 2013. Effects of nanoparticles of TiO<sub>2</sub> on food depletion and life-history responses of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 130–131, 174-183.
21. CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., CERQUEIRA, M. A., SOUZA, B. W. S., TEIXEIRA, J. A. & VICENTE, A. A. 2011. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. *Carbohydrate Polymers*, 85, 522-528.
22. CASTRO-FERREIRA, M. P., ROELOFS, D., VAN GESTEL, C. A. M., VERWEIJ, R. A., SOARES, A. M. V. M. & AMORIM, M. J. B. 2012. *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. *Chemosphere*, 87, 1222-1227.
23. ČIHAŘ, J. 2003. *Naše ryby: Kapesní průvodce*, Praha, Ottovo nakladatelství.
24. DANILATOS, G. D. 1991. Review and outline of environmental SEM at present. *Journal of Microscopy*, 162, 391-402.
25. DASH, A., SINGH, A. P., CHAUDHARY, B. R., SINGH, S. K. & DASH, D. 2012. Effect of Silver Nanoparticles on Growth of Eukaryotic Green Algae. *Nano-Micro Letters*, 4, 158-165.
26. DEBYE, P. & HÜCKEL, E. 1923. ON THE THEORY OF ELECTROLYTES. I. FREEZING POINT DEPRESSION AND RELATED PHENOMENA. *Physikalische Zeitschrift*, 24, 185-206.
27. DERJAGUIN, B. & LANDAU, L. 1993. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Progress in Surface Science*, 43, 30-59.
28. DJURISIC, A. B., CHEN, X., LEUNG, Y. H. & MAN CHING NG, A. 2012. ZnO nanostructures: growth, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 6526-6535.
29. DOMINGOS, R. F., BAALOUSHA, M. A., JU-NAM, Y., REID, M. M., TUFENKJI, N., LEAD, J. R., LEPPARD, G. G. & WILKINSON, K. J. 2009. Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Science & Technology*, 43, 7277-7284.
30. DURÁN, N., SILVEIRA, C. P., DURÁN, M. & MARTINEZ, D. S. T. 2015. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *Journal of Nanobiotechnology*, 13, 55.
31. EBERT, D. 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
32. EBIN, B., PETRANIKOVA, M., STEENARI, B.-M. & EKBERG, C. 2016. Production of zinc and manganese oxide particles by pyrolysis of alkaline and Zn–C battery waste. *Waste Management*, 51, 157-167.
33. EVERETT, L. 1988. On metrical constituent structure in Piraha. *Natural Language and Linguistic Theory*, 6, 207-246.
34. FANG, S. J., HAPLEPETE, S., CHEN, W., HELMS, C. R. & EDWARDS, H. 1997. Analyzing atomic force microscopy images using spectral methods. *Journal of Applied Physics*, 82, 5891-5898.
35. FARKAS, J., CHRISTIAN, P., GALLEGU-URREA, J. A., ROOS, N., HASSELLÖV, M., TOLLEFSEN, K. E. & THOMAS, K. V. 2011. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. *Aquatic Toxicology*, 101, 117-125.

36. FARKAS, J., CHRISTIAN, P., URREA, J. A. G., ROOS, N., HASSELLÖV, M., TOLLEFSEN, K. E. & THOMAS, K. V. 2010. Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 96, 44-52.
37. FAROKHZAD, O. C. & LANGER, R. 2009. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*, 3, 16-20.
38. FARRE, M., GAJDA-SCHRANTZ, K., KANTIANI, L. & BARCELO, D. 2009. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 81-95.
39. FIELDS, S. & JOHNSTON, M. 2005. Whither Model Organism Research? *Science*, 307, 1885-1886.
40. FINSY, R. 1994. Particle sizing by quasi-elastic light scattering. *Advances in Colloid and Interface Science*, 52, 79-143.
41. FORTNER, J. D., LYON, D. Y., SAYES, C. M., BOYD, A. M., FALKNER, J. C., HOTZE, E. M., ALEMANY, L. B., TAO, Y. J., GUO, W., AUSMAN, K. D., COLVIN, V. L. & HUGHES, J. B. 2005. C-60 in water: Nanocrystal formation and microbial response. *Environmental Science & Technology*, 39, 4307-4316.
42. FRANKLIN, N. M., ROGERS, N. J., APTE, S. C., BATLEY, G. E., GADD, G. E. & CASEY, P. S. 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 41, 8484-90.
43. GARCÍA-GOMÉZ, C., BABIN, M. & OBRADOR, A. 2014. Toxicity of ZnO nanoparticles, ZnO bulk, and ZnCl<sub>2</sub> on earthworms in a spiked natural soil and toxicological effects of leachates on aquatic organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67, 465-473.
44. GARCÍA, R. & PÉREZ, R. 2002. Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Reports*, 47, 197-301.
45. GEPPERT, M., SIGG, L. & SCHIRMER, K. 2016. A novel two-compartment barrier model for investigating nanoparticle transport in fish intestinal epithelial cells. *Environmental Science: Nano*, 3, 388-395.
46. HANDY, R. D., AL-BAIRUTY, G., AL-JUBORY, A., RAMSDEN, C. S., BOYLE, D., SHAW, B. J. & HENRY, T. B. 2011. Effects of manufactured nanomaterials on fishes: a target organ and body systems physiology approach. *Journal of Fish Biology*, 79, 821-853.
47. HOLUBÁŘOVÁ, B. 2004. *Testování ekotoxikologického vlivu POPs na půdní roupice (Enchytraeidae, Oligochaeta)*. Bakalářská práce, Masarykova univerzita.
48. HRDA, K., OPRŠAL, J., KNOTEK, P., POUZAR, M. & VLCEK, M. 2016. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to the annelid *Enchytraeus crypticus* in agar-based exposure media. *Chemical Papers*, In Press.
49. HUANG, M. & HIEFTJE, G. M. 1989. Simultaneous measurement of spatially resolved electron temperatures, electron number densities and gas temperatures by laser light scattering from the ICP. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 44, 739-749.
50. CHAHAL, R. P., MAHENDIA, S., TOMAR, A. K. & KUMAR, S. 2011. Effect of ultraviolet irradiation on the optical and structural characteristics of in-situ prepared PVP-Ag nanocomposites. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 6, 299-306.
51. CHEKLI, L., ROY, M., TIJING, L. D., DONNER, E., LOMBI, E. & SHON, H. K. 2015. Agglomeration behaviour of titanium dioxide nanoparticles in river waters: A multi-method approach combining light scattering and field-flow fractionation techniques. *Journal of Environmental Management*, 159, 135-142.
52. CHEN, P.-J., WU, W.-L. & WU, K. C.-W. 2013. The zerovalent iron nanoparticle causes higher developmental toxicity than its oxidation products in early life stages of medaka fish. *Water Research*, 47, 3899-3909.

53. IMPELLITTERI, C. A., TOLAYMAT, T. M. & SCHECKEL, K. G. 2009. The Speciation of Silver Nanoparticles in Antimicrobial Fabric Before and After Exposure to a Hypochlorite/Detergent Solution All rights reserved. No part of this periodical may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. *Journal of Environmental Quality*, 38, 1528-1530.
54. KAEWAMATAWONG, T., BINTVIHOK, A. P. W. B. A., UDCHACHON, B. T. S. K. S., MANEEWATTANAPINYO, P. & EKGASIT, C. T. S. 2012. Toxicity Test of Nanosilver Particles on Zebrafish (*Danio rerio*) Embryonic Development. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 42, 305-310.
55. KAHRU, A. & DUBOURGUIER, H.-C. 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 269, 105-119.
56. KALIMUTHU, K., SURESH BABU, R., VENKATARAMAN, D., BILAL, M. & GURUNATHAN, S. 2008. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65, 150-153.
57. KARMAKAR, A., ZHANG, Q. L. & ZHANG, Y. B. 2014. Neurotoxicity of nanoscale materials. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 147-160.
58. KASHIWADA, S., ARIZA, M. E., KAWAGUCHI, T., NAKAGAME, Y., JAYASINGHE, B. S., GÄRTNER, K., NAKAMURA, H., KAGAMI, Y., SABO-ATTWOOD, T., FERGUSON, P. L. & CHANDLER, G. T. 2012. Silver Nanocolloids Disrupt Medaka Embryogenesis through Vital Gene Expressions. *Environmental Science & Technology*, 46, 6278-6287.
59. KAWANO, A., HAIDUK, C., SCHIRMER, K., HANNER, R., LEE, L. E. J., DIXON, B. & BOLLS, N. C. 2011. Development of a rainbow trout intestinal epithelial cell line and its response to lipopolysaccharide. *Aquaculture Nutrition*, 17, e241-e252.
60. KEDDIE, J. L., MEREDITH, P., JONES, R. A. L. & DONALD, A. M. 1995. Kinetics of Film Formation in Acrylic Latices Studied with Multiple-Angle-of-Incidence Ellipsometry and Environmental SEM. *Macromolecules*, 28, 2673-2682.
61. KHAN, F. R., MISRA, S. K., BURY, N. R., SMITH, B. D., RAINBOW, P. S., LUOMA, S. N. & VALSAMI-JONES, E. 2015a. Inhibition of potential uptake pathways for silver nanoparticles in the estuarine snail *Peringia ulvae*. *Nanotoxicology*, 9, 493-501.
62. KHAN, F. R., PAUL, K. B., DYBOWSKA, A. D., VALSAMI-JONES, E., LEAD, J. R., STONE, V. & FERNANDES, T. F. 2015b. Accumulation Dynamics and Acute Toxicity of Silver Nanoparticles to *Daphnia magna* and *Lumbriculus variegatus*: Implications for Metal Modeling Approaches. *Environmental Science & Technology*, 49, 4389-4397.
63. KIM, J. Y., KIM, K.-T., LEE, B. G., LIM, B. J. & KIM, S. D. 2013. Developmental toxicity of Japanese medaka embryos by silver nanoparticles and released ions in the presence of humic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 57-63.
64. KIM, S. & CHOI, I.-H. 2012. Phagocytosis and Endocytosis of Silver Nanoparticles Induce Interleukin-8 Production in Human Macrophages. *Yonsei Medical Journal*, 53, 654-657.
65. KIM, S., CHOI, J. E., CHOI, J., CHUNG, K.-H., PARK, K., YI, J. & RYU, D.-Y. 2009. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro*, 23, 1076-1084.
66. KLAINE, S. J., ALVAREZ, P. J. J., BATLEY, G. E., FERNANDES, T. F., HANDY, R. D., LYON, D. Y., MAHENDRA, S., MCLAUGHLIN, M. J. & LEAD, J. R. 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1825-1851.

67. KOOL, P. L., ORTIZ, M. D. & VAN GESTEL, C. A. M. 2011. Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl<sub>2</sub> to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Pollution*, 159, 2713-2719.
68. LANGFORD, J. I. & WILSON, A. J. C. 1978. Scherrer after sixty years: A survey and some new results in the determination of crystallite size. *Journal of Applied Crystallography*, 11, 102-113.
69. LEE, B., DUONG, C. N., CHO, J., LEE, J., KIM, K., SEO, Y., KIM, P., CHOI, K. & YOON, J. 2012. Toxicity of Citrate-Capped Silver Nanoparticles in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 262670.
70. LEE, J. T. Y. & CHOW, K. L. 2012. SEM sample preparation for cells on 3D scaffolds by freeze-drying and HMDS. *Scanning*, 34, 12-25.
71. LEVARD, C., HOTZE, E. M., LOWRY, G. V. & BROWN, G. E. 2012. Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environmental Science & Technology*, 46, 6900-6914.
72. LEVARD, C., MITRA, S., YANG, T., JEW, A. D., BADIREDDY, A. R., LOWRY, G. V. & BROWN, G. E. 2013. Effect of Chloride on the Dissolution Rate of Silver Nanoparticles and Toxicity to *E. coli*. *Environmental Science & Technology*, 47, 5738-5745.
73. LEVARD, C., REINSCH, B. C., MICHEL, F. M., OUMAHI, C., LOWRY, G. V. & BROWN, G. E. 2011. Sulfidation Processes of PVP-Coated Silver Nanoparticles in Aqueous Solution: Impact on Dissolution Rate. *Environmental Science & Technology*, 45, 5260-5266.
74. LI, L.-Z., ZHOU, D.-M., PEIJENBURG, W. J. G. M., VAN GESTEL, C. A. M., JIN, S.-Y., WANG, Y.-J. & WANG, P. 2011. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. *Environment International*, 37, 1098-1104.
75. LI, S., PEITZ, M. & ZHAO, X. 2016. Information disclosure and consumer awareness. *Journal of Economic Behavior & Organization*, 128, 209-230.
76. LIU, J. & HURT, R. H. 2010. Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environmental Science & Technology*, 44, 2169-2175.
77. LOCK, K. & JANSSEN, C. R. 2003. Comparative toxicity of a zinc salt, zinc powder and zinc oxide to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Chemosphere*, 53, 851-6.
78. LOUIE, S. M., TILTON, R. D. & LOWRY, G. V. 2016. Critical review: impacts of macromolecular coatings on critical physicochemical processes controlling environmental fate of nanomaterials. *Environmental Science: Nano*, 3, 283-310.
79. LOWRY, G. V., GREGORY, K. B., APTE, S. C. & LEAD, J. R. 2012. Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environmental Science & Technology*, 46, 6893-6899.
80. MALYSHEVA, A., IVASK, A., HAGER, C., BRUNETTI, G., MARZOUK, E. R., LOMBI, E. & VOELCKER, N. H. 2016. Sorption of silver nanoparticles to laboratory plastic during (eco)toxicological testing. *Nanotoxicology*, 10, 385-390.
81. MARK, G., MICHAELA, C. H., KARSTEN, T., SYLVIA, N., INGO, G., KUROSCH, R. & RALF, D. 2011. Uptake of dimercaptosuccinate-coated magnetic iron oxide nanoparticles by cultured brain astrocytes. *Nanotechnology*, 22, 145101.
82. MAURER, L. L., YANG, X., SCHINDLER, A. J., TAGGART, R. K., JIANG, C., HSU-KIM, H., SHERWOOD, D. R. & MEYER, J. N. 2016. Intracellular trafficking pathways in silver nanoparticle uptake and toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Nanotoxicology*, 10, 831-835.
83. MAY, P. B., SUTER, J. D., MAY, P. S. & BERRY, M. T. 2016. The Dynamics of Nanoparticle Growth and Phase Change During Synthesis of  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120, 9482-9489.

84. MEESTERS, J. A. J., QUIK, J. T. K., KOELMANS, A. A., HENDRIKS, A. J. & VAN DE MEENT, D. 2016. Multimedia environmental fate and speciation of engineered nanoparticles: a probabilistic modeling approach. *Environmental Science: Nano*.
85. MERK, V., REHBOCK, C., BECKER, F., HAGEMANN, U., NIENHAUS, H. & BARCIKOWSKI, S. 2014. In Situ Non-DLVO Stabilization of Surfactant-Free, Plasmonic Gold Nanoparticles: Effect of Hofmeister's Anions. *Langmuir*, 30, 4213-4222.
86. MONAGHAN, S. R., RUMNEY, R., VO, N. K., BOLS, N. & LEE, L. J. 2011. In vitro growth of microsporidia *Anncaliia algerae* in cell lines from warm water fish. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 47, 104-113.
87. NAVARRO, E., BAUN, A., BEHRA, R., HARTMANN, N., FILSER, J., MIAO, A.-J., QUIGG, A., SANTSCHI, P. & SIGG, L. 2008a. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17, 372-386.
88. NAVARRO, E., PICCAPIETRA, F., WAGNER, B., MARCONI, F., KAEGI, R., ODZAK, N., SIGG, L. & BEHRA, R. 2008b. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, 42, 8959-8964.
89. NAVARRO, E., WAGNER, B., ODZAK, N., SIGG, L. & BEHRA, R. 2015. Effects of Differently Coated Silver Nanoparticles on the Photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, 49, 8041-8047.
90. NEL, A., XIA, T., MÄDLER, L. & LI, N. 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, 311, 622-627.
91. NEL, A., XIA, T., MENG, H., WANG, X., LIN, S. J., JI, Z. X. & ZHANG, H. Y. 2013. Nanomaterial Toxicity Testing in the 21st Century: Use of a Predictive Toxicological Approach and High-Throughput Screening. *Accounts of Chemical Research*, 46, 607-621.
92. NOVAES, C. G., BEZERRA, M. A., DA SILVA, E. G. P., SANTOS, A. M. P. D., ROMÃO, I. L. D. S. & SANTOS NETO, J. H. 2016. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). *Microchemical Journal*, 128, 331-346.
93. NOVAIS, S. C., ARRAIS, J., LOPES, P., VANDENBROUCK, T., DE COEN, W., ROELOFS, D., SOARES, A. M. V. M. & AMORIM, M. J. B. 2012. *Enchytraeus albidus* Microarray: Enrichment, Design, Annotation and Database (EnchyBASE). *PLoS ONE*, 7, e34266.
94. NOVAIS, S. C., GOMES, S. I. L., GRAVATO, C., GUILHERMINO, L., DE COEN, W., SOARES, A. M. V. M. & AMORIM, M. J. B. 2011. Reproduction and biochemical responses in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) to zinc or cadmium exposures. *Environmental Pollution*, 159, 1836-1843.
95. O'BRIEN, J., WILSON, I., ORTON, T. & POGNAN, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267, 5421-6.
96. OATLEY, C. W., NIXON, W. C. & PEASE, R. F. W. 1966. Scanning Electron Microscopy. In: MARTON, L. (ed.) *Advances in Electronics and Electron Physics*. Academic Press.
97. OBIAKOR, M. O., OKONKWO, J. C. & EZEONYEJIAKU, C. D. 2014. Genotoxicity of freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 775-776, 20-30.
98. OECD 1992. *Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test*, OECD Publishing.
99. OECD 1998. *Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages*, OECD Publishing.
100. OECD 2004. *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*, OECD Publishing.
101. OECD 2012. *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*, OECD Publishing.



102. OPRISAL, J., BLAHA, L., POUZAR, M., KNOTEK, P., VLCEK, M. & HRDA, K. 2015. Assessment of silver nanoparticle toxicity for common carp (*Cyprinus carpio*) fish embryos using a novel method controlling the agglomeration in the aquatic media. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 19124-19132.
103. OPRISAL, J., BURES, Z., VLCEK, M., KNOTEK, P., POUZAR, M. & BENES, L. 2013. A Study of Silver Nanoparticles Behavior in Liquid Media for Ecotoxicity Tests. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 5, 589-592.
104. PARMELEE, R. W., BEARE, M. H., CHENG, W., HENDRIX, P. F., RIDER, S. J., CROSSLEY, D. A., JR. & COLEMAN, D. C. 1990. Earthworms and enchytraeids in conventional and no-tillage agroecosystems: A biocide approach to assess their role in organic matter breakdown. *Biology and Fertility of Soils*, 10, 1-10.
105. PASHLEY, M. D., PETHICA, J. B. & COOMBS, J. 1985. Scanning tunnelling microscope studies. *Surface Science*, 152, 27-32.
106. PATIL, S. S., SHEDBALKAR, U. U., TRUSKEWYCZ, A., CHOPADE, B. A. & BALL, A. S. 2016. Nanoparticles for environmental clean-up: A review of potential risks and emerging solutions. *Environmental Technology & Innovation*, 5, 10-21.
107. PECORA, R. 2013. *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*, Springer US.
108. POSTHUMA, L., BAERSELMAN, R., VAN VEEN, R. P. M. & DIRVEN-VAN BREEMEN, E. M. 1997. Single and Joint Toxic Effects of Copper and Zinc on Reproduction of *Enchytraeus crypticus* in Relation to Sorption of Metals in Soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38, 108-121.
109. POWERS, C. M., LEVIN, E. D., SEIDLER, F. J. & SLOTKIN, T. A. 2011. Silver exposure in developing zebrafish produces persistent synaptic and behavioral changes. *Neurotoxicology and Teratology*, 33, 329-332.
110. QIN, X. Y., KIM, J. G. & LEE, J. S. 1999. Synthesis and magnetic properties of nanostructured  $\gamma$ -Ni-Fe alloys. *Nanostructured Materials*, 11, 259-270.
111. QUIK, J. T. K., STUART, M. C., WOUTERSE, M., PEIJNENBURG, W., HENDRIKS, A. J. & VAN DE MEENT, D. 2012. Natural colloids are the dominant factor in the sedimentation of nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 1019-1022.
112. RAMSKOV, T., THIT, A., CROTEAU, M.-N. & SELCK, H. 2015. Biodynamics of copper oxide nanoparticles and copper ions in an oligochaete – Part I: Relative importance of water and sediment as exposure routes. *Aquatic Toxicology*, 164, 81-91.
113. ROELOFS, D., BICHO, R. C., DE BOER, T. E., CASTRO-FERREIRA, M. P., MONTAGNE-WAJER, K., VAN GESTEL, C. A. M., SOARES, A. M. V. M., VAN STRAALLEN, N. M. & AMORIM, M. J. B. 2016. Mechanisms of phenanthrene toxicity in the soil invertebrate, *Enchytraeus crypticus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, In Press.
114. SANDIFER, R. D. & HOPKIN, S. P. 1997. Effects of Temperature on the Relative Toxicities of Cd, Cu, Pb, and Zn to *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37, 125-130.
115. SELCK, H., HANDY, R. D., FERNANDES, T. F., KLAINÉ, S. J. & PETERSEN, E. J. 2016. Nanomaterials in the aquatic environment: A European Union–United States perspective on the status of ecotoxicity testing, research priorities, and challenges ahead. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35, 1055-1067.
116. SHANKAR, S. S., RAI, A., AHMAD, A. & SASTRY, M. 2004. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, 496-502.

117. SCHIRMER, K., CHAN, A. G. J., GREENBERG, B. M., DIXON, D. G. & BOLS, N. C. 1997. Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology in Vitro*, 11, 107-119.
118. SCHIRMER, K., CHAN, A. G. J., GREENBERG, B. M., DIXON, D. G. & BOLS, N. C. 1998. Ability of 16 priority PAHs to be photocytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology*, 127, 143-155.
119. SCHMID, G. 2005. General Introduction. *Nanoparticles*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
120. SCHMIDT, J. & VOGELSBERGER, W. 2009. Aqueous Long-Term Solubility of Titania Nanoparticles and Titanium(IV) Hydrolysis in a Sodium Chloride System Studied by Adsorptive Stripping Voltammetry. *Journal of Solution Chemistry*, 38, 1267-1282.
121. SCHNEIDER, S., HALBIG, P., GRAU, H. & NICKEL, U. 1994. Reproducible preparation of silver sols with uniform particle size for application in surface-enhanced Raman spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 60, 605-610.
122. SMIT, C. E. & VAN GESTEL, C. A. M. 1998. Effects of soil type, prepercolation, and ageing on bioaccumulation and toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 1132-1141.
123. SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C. & SMITH, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83, 13-34.
124. SPURGEON, D. J., TOMLIN, M. A. & HOPKIN, S. P. 1997. Influence of Temperature on the Toxicity of Zinc to the Earthworm *Eisenia Fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 283-290.
125. THALMANN, B., VOEGELIN, A., MORGENROTH, E. & KAEGI, R. 2016. Effect of humic acid on the kinetics of silver nanoparticle sulfidation. *Environmental Science: Nano*, 3, 203-212.
126. TOLAYMAT, T. M., EL BADAWY, A. M., GENAIDY, A., SCHECKEL, K. G., LUXTON, T. P. & SUIDAN, M. 2010. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of The Total Environment*, 408, 999-1006.
127. TOWN, R. M. & VAN LEEUWEN, H. P. 2016. Metal ion-humic acid nanoparticle interactions: role of both complexation and condensation mechanisms. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 27, 18024-18032.
128. VAN DONG, P., HA, C. H., BINH, L. T. & KASBOHM, J. 2012. Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. *International Nano Letters*, 2, 1-9.
129. VAN HOECKE, K., DE SCHAMPHELAERE, K. A. C., VAN DER MEEREN, P., SMAGGHE, G. & JANSSEN, C. R. 2011. Aggregation and ecotoxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles in synthetic and natural waters with variable pH, organic matter concentration and ionic strength. *Environmental Pollution*, 159, 970-976.
130. VAN VLIET, P. C. J., BEARE, M. H. & COLEMAN, D. C. 1995. Population dynamics and functional roles of Enchytraeidae (Oligochaeta) in hardwood forest and agricultural ecosystems. *Plant and Soil*, 170, 199-207.
131. VANDEPUTTE, M. 2003. Selective breeding of quantitative traits in the common carp (*Cyprinus carpio*): a review. *Aquatic Living Resources*, 16, 399-407.
132. VASIR, J. K., REDDY, M. K. & LABHASETWAR, V. D. 2005. Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges. *Current Nanoscience*, 1, 47-64.
133. VÚOS 2012. SOP č. M/40/2.
134. WANG, H., WU, L. & REINHARD, B. M. 2012. Scavenger Receptor Mediated Endocytosis of Silver Nanoparticles into J774A.1 Macrophages is Heterogeneous. *ACS nano*, 6, 7122-7132.

135. WANG, X. Z., YANG, Y., LI, R. F., MCGUINNES, C., ADAMSON, J., MEGSON, I. L. & DONALDSON, K. 2014. Principal component and causal analysis of structural and acute in vitro toxicity data for nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8, 465-476.
136. WEBSTER, T. J., ERGUN, C., DOREMUS, R. H., SIEGEL, R. W. & BIZIOS, R. 2000. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*, 21, 1803-1810.
137. WESTHEIDE, W. & GRAEFE, U. 1992. Two new terrestrial Enchytraeus species (Oligochaeta, Annelida). *Journal of Natural History*, 26, 479-488.
138. WILLIAM, M. 2006. *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments*, Springer Science & Business Media.
139. YANG, X., GONDIKAS, A. P., MARINAKOS, S. M., AUFFAN, M., LIU, J., HSU-KIM, H. & MEYER, J. N. 2011. Mechanism of Silver Nanoparticle Toxicity Is Dependent on Dissolved Silver and Surface Coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science & Technology*, 46, 1119-1127.
140. YUE, Y., BEHRA, R., SIGG, L., FERNÁNDEZ FREIRE, P., PILLAI, S. & SCHIRMER, K. 2015. Toxicity of silver nanoparticles to a fish gill cell line: Role of medium composition. *Nanotoxicology*, 9, 54-63.
141. YUZER, B., GUIDA, M., CINER, F., AKTAN, B., AYDIN, M. I., MERIC, S. & SELCUK, H. 2016. A multifaceted aggregation and toxicity assessment study of sol-gel-based TiO<sub>2</sub> nanoparticles during textile wastewater treatment. *Desalination and Water Treatment*, 57, 4966-4973.
142. ZHU, X., TIAN, S. & CAI, Z. 2012. Toxicity Assessment of Iron Oxide Nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) Early Life Stages. *PLoS ONE*, 7, e46286.

## **PŘÍLOHY**

### **Publikace v mezinárodních odborných časopisech abstrahovaných na WoS:**

HRDA, K., **OPRSAL, J. \***, KNOTEK, P., POUZAR, M. & VLCEK, M. 2016. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to the annelid *Enchytraeus crypticus* in agar-based exposure media. *Chemical Papers*. [IF 2015 = 1.326] Přijato k publikování 17. března 2016

NOVOTNY, L., **OPRSAL, J. \***, PETRANKOVA, R., KABUTEY, A., POUZAR, M. & LANGASEK, P. 2016. Characterization of the Kinetics of Silver Nanoparticles Agglomeration and their Toxicity on Fish Embryos. *Analytical Letters*, 49, 152-160. [IF 2015 = 1.088] (CIT – 0)

**OPRSAL, J.**, BLAHA, L., POUZAR, M., KNOTEK, P., VLCEK, M. & HRDA, K. 2015. Assessment of silver nanoparticle toxicity for common carp (*Cyprinus carpio*) fish embryos using a novel method controlling the agglomeration in the aquatic media. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 19124-19132. [IF 2015 = 2.760] (CIT – 0)

WEIDLICH, T., **OPRSAL, J.**, KREJCOVA, A. & JASUREK, B. 2015. Effect of glucose on lowering Al-Ni alloy consumption in dehalogenation of halogenoanilines. *Monatshefte Fur Chemie*, 146, 613-620. [IF 2015 = 1.131] (CIT – 0)

KULHANEK, J., BURES, F., **OPRSAL, J.**, KUZNIK, W., MIKYSEK, T. & RUZICKA, A. 2013. 1,4-Phenylene and 2,5-Thienylene pi-Linkers in Charge-Transfer Chromophores. *Asian Journal of Organic Chemistry*, 2, 422-431. [IF 2015 = 3.275] (CIT – 13)

### **Publikace v odborných časopisech a ostatní příspěvky abstrahované na WoS:**

**OPRSAL, J.**, KNOTEK, P., POUZAR, M., PALARCIK, J. & NOVOTNY, L. 2013. Impact of the Silver Nanoparticles Agglomeration on the Results of Ecotoxicity Tests on Aquatic organisms. *Chemické Listy*, 107, 386-392. [IF 2015 = 0.272] (CIT – 7)

**OPRSAL, J.**, PETRANKOVA, R., NOVOTNY, L. & POUZAR, M. 2013. Impact of the Silver Nanoparticles on *Carpio* Embryos, evaluation of their gradual agglomeration. *Moderní Elektrochemické Metody*, 132-134.

**OPRSAL, J.,** POUZAR, M., KNOTEK, P., SLOUF, M., PAVLOVOVA, E. & LTD, T. 2012. A STUDY OF SILVER NANOPARTICLE BEHAVIOR IN LIQUID MEDIA FOR ECOTOXICITY TESTS. Nanocon 2012, 4th International Conference. ISBN 978-80-87294-32-1, 665-668.

**Publikace v recenzovaných mezinárodních odborných časopisech:**

**OPRSAL, J.,** BURES, Z., VLCEK, M., KNOTEK, P., POUZAR, M. & BENES, L. 2013. A Study of Silver Nanoparticles Behavior in Liquid Media for Ecotoxicity Tests. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 5, 589-592.

**Příspěvky ve sbornících na mezinárodních vědeckých konferencích:**

**Oprsal, J.,** Pouzar, M., Blaha, L., Knotek, P., Plodikova, P.; Size of agglomerates like a major contribution to silver nanoparticles aquatic toxicity; SETAC 2015, Barcelona, Spain, book of abstracts ISSN 2309-8031, p. 213.

**Opršal, J.,** Knotek, P., Roupcová, M., Pouzar, M., Bureš, Z.; Modification of the Classic Aquatic OECD Tests for Testing of Metallic Nanomaterials; Nanocon 2013, Brno, book of abstracts ISBN 978-80-87294-44-4, p. 56.

**Opršal, J.,** Pouzar, M., Knotek, P.; Physico-chemical characterization of silver nanomaterials for purposes of ecotoxicity testing; Nanoparticles and nanomaterials 2012, Lodž, Polsko, book of abstracts ISBN 978-953-51-0714-9, p. 39.

### **Seznam příložených publikací týkajících se tématu disertační práce:**

Publikace zabývající se fyzikálně-chemickou charakterizací nanomateriálů v expozičních médiích využívaných pro testování ekotoxicity:

OPRSAL, J., BURES, Z., VLCEK, M., KNOTEK, P., POUZAR, M. & BENES, L. 2013. A Study of Silver Nanoparticles Behavior in Liquid Media for Ecotoxicity Tests. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 5, 589-592.

NOVOTNY, L., OPRSAL, J., PETRANKOVA, R., KABUTEY, A., POUZAR, M. & LANGASEK, P. 2016. Characterization of the Kinetics of Silver Nanoparticles Agglomeration and their Toxicity on Fish Embryos. *Analytical Letters*, 49, 152-160.

Publikace zabývající se vlivem fyzikálně-chemických vlastností nanomateriálů a jejich chování v expozičních médiích na výsledky testování ekotoxicity na vodních organismech:

OPRSAL, J., KNOTEK, P., POUZAR, M., PALARCIK, J. & NOVOTNY, L. 2013. Impact of the Silver Nanoparticles Agglomeration on the Results of Ecotoxicity Tests on Aquatic organisms. *Chemicke Listy*, 107, 386-392.

OPRSAL, J., BLAHA, L., POUZAR, M., KNOTEK, P., VLCEK, M. & HRDA, K. 2015. Assessment of silver nanoparticle toxicity for common carp (*Cyprinus carpio*) fish embryos using a novel method controlling the agglomeration in the aquatic media. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 19124-19132.

Publikace zabývající se vlivem fyzikálně-chemických vlastností nanomateriálů a jejich chování v expozičních médiích na výsledky testování ekotoxicity na půdních organismech:

HRDA, K., OPRSAL, J., KNOTEK, P., POUZAR, M. & VLCEK, M. 2016. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to the annelid *Enchytraeus crypticus* in agar-based exposure media. *Chemical Papers*.