

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

Bc. Inka Vrzáčková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Testy ekotoxicity nanočástic ZnO na roupicích *Enchytraeus
crypticus* prováděné v agarových médiích se zvýšenou
environmentální relevancí

Bc. Inka Vrzáčková

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Inka Vrzáčková**
Osobní číslo: **C16577**
Studijní program: **N2807 Chemické a procesní inženýrství**
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**
Název tématu: **Testy ekotoxicity nanočástic ZnO na roupicích *Enchytraeus crypticus* prováděné v agarových médiích se zvýšenou environmentální relevancí**
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na problematiku vztahu mezi environmentální relevancí a reprodukovatelností jednotlivých postupů testování ekotoxicity nanočástic na půdních organismech. Popište parametry experimentů, které zásadním způsobem ovlivňují každý z těchto faktorů, a diskutujte možnosti jejich optimalizace.
2. Vysvětlete, jaký význam mají jednotlivé složky půdního prostředí na výslednou ekotoxicitu vybraných typů nanočástic. Zaměřte se zejména na problematiku vztahu mezi danou půdní složkou a osudem nanočástice v půdě. Zjistěte, zda již byly definovány nějaké obecné zákonitosti popisující vliv složení půdy na ekotoxicitu nanočástic.
3. Na kroužkovci *Enchytraeus crypticus* proveďte test ekotoxicity nanočástic ZnO v agarovém médiu modifikovaném pomocí přídavku písku a rašeliny. Diskutujte, jak přídavek obou modelových složek půdy ovlivnil výsledky prováděných testů. Zhodnoťte přednosti a nevýhody tohoto postupu.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

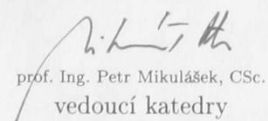
Datum zadání diplomové práce: **6. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 6. února 2018

Prohlášení autora

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena 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 3.5.2018

Inka Vrzáčková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Doc. Ing. Miloslavu Pouzarovi Ph.D. za velkou pomoc, připomínky a metodické vedení práce. Dále patří poděkování Ing. Kateřině Hrdé za odborné konzultace a mé rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Anotace

Teoretická část práce shrnuje poznatky o ekotoxikologických účincích nanočástic oxidu zinečnatého. Zabývá se jejich vlastnostmi, transformacemi a především jejich osudem v půdě. Experimentální část práce je věnována využití živných médií na bázi agaru se zvýšenou environmentální relevancí při testech ekotoxicity nanočástic. V této části práce jsou shrnuty výsledky testů ekotoxicity Zn^{2+} iontů a nanočástic ZnO na kroužkovci z čeledi roupicovitých (*Enchytraeus crypticus*) prováděných v agarovém živném médiu s přidavkem modelových půdních složek (písek, rašelina).

Klíčová slova

Testy ekotoxicity, nanočástice, zinek, roupice (*Enchytraeus crypticus*), agar, půda

Title

Ecotoxicity testing of ZnO nanoparticles on *Enchytraeus crypticus* in agar medium with increased environmental relevance.

Annotation

The theoretical part summarizes current knowledge regarding ecotoxicological effects of zinc oxide nanoparticles. In particular, it deals with the sources of these nanoparticles, and their fate, behavior and transformations in the environment. The experimental part is devoted to the use of agar-based nutrient media with increased environmental relevance in ecotoxicity tests. Results of Zn^{+2} and ZnO nanoparticles ecotoxicity tests performed using annelid *Enchytraeus crypticus* cultivated in agarose gel with the addition of model soil components (sand, peat) are summarized in this part of the thesis.

Keywords

ecotoxicity tests, nanoparticles, zinc, potworm (*Enchytraeus crypticus*), agar, soil

Obsah

Obsah	7
Seznam zkratk	9
Seznam obrázků	11
Seznam tabulek	13
Úvod	14
1 TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 <i>Nanočástice oxidu zinečnatého</i>	15
1.1.1 Mechanismus toxicity ZnO–NPs	16
1.2 <i>Ekotoxikologie půd</i>	19
1.2.1 Půdní biologické testy	20
1.2.2 Testování NPs v různých typech médií	21
1.3 <i>Vliv půdních složek na osud nanočástic v půdách</i>	25
1.3.1 Agregace a aglomerace	26
1.3.2 Vliv povrchové úpravy NPs na jejich stabilitu	27
1.3.3 Bioakumulace a biodostupnost NPs	28
1.3.4 Závislost chování NPs na půdních vlastnostech	29
1.3.5 Pohyb NPs v půdním prostředí	30
1.4 <i>Modelové organismy</i>	31
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
2.1 <i>Chov modelových organismů</i>	33
2.2 <i>Ekotoxikologické testy</i>	34
2.3 <i>Testy toxicity Zn²⁺ iontů</i>	35
2.4 <i>Testy toxicity ZnO-NPs</i>	36
2.4.1 Testy ZnO-NPs v upraveném agarovém médiu	36
2.4.2 Testy toxicity supernatantu ZnO-NPs	38

3	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
3.1	<i>Testy toxicity Zn²⁺ iontů v agaru s přidavkem písku</i>	<i>39</i>
3.1.1	Toxicita Zn ²⁺ iontů v agaru s přidavkem písku	39
3.1.2	Toxicita Zn ²⁺ iontů v agaru s přidavkem rašeliny	40
3.1.3	Toxicita Zn ²⁺ iontů v agaru s přidavkem obou komponent	42
3.2	<i>Testy toxicity ZnO-NPs v agaru s přidavkem písku</i>	<i>43</i>
3.2.1	Charakterizace ZnO-NPs v upraveném agaru s přidavkem písku	43
3.2.2	Toxicita ZnO-NPs v agaru s přidavkem písku.....	48
3.3	<i>Testy toxicity ZnO-NPs v agaru s přidavkem rašeliny</i>	<i>49</i>
3.3.1	Charakterizace ZnO-NPs v upraveném agaru s přidavkem rašeliny	49
3.3.2	Toxicita ZnO-NPs v agaru s přidavkem rašeliny.....	52
3.4	<i>Testy toxicity ZnO-NPs v agaru s přidavkem písku a rašeliny</i>	<i>53</i>
3.4.1	Charakterizace ZnO-NPs v agaru s přidavkem písku a rašeliny	53
3.4.2	Toxicita ZnO-NPs v agaru s přidavkem písku a rašeliny	56
3.5	<i>Testy toxicity supernatantu ZnO-NPs</i>	<i>57</i>
3.6	<i>Porovnání toxicity Zn²⁺ iontů a ZnO-NPs v jednotlivých typech upraveného agarového média.....</i>	<i>59</i>
4	ZÁVĚR	63
5	POUŽITÁ LITERATURA.....	64

Seznam zkratek

ENPs	Engineered Nanoparticles – Průmyslově vyráběné nanočástice
NPs	Nanoparticles – Nanočástice
ZnO–NPs	Zinc oxide nanoparticles – nanočástice oxidu zinečnatého
ČOV	Čistírna odpadních vod
NOM	Natural Organic Matter – Přírodní organické látky
IS	Ionic Strength – Iontová síla
SEM	Scanning Electron Microscopy – Rastrovací elektronová mikroskopie
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development – Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek – teorie stability heterogenních koloidně disperzních soustav
SEM	Scanning Electron Microscopy – Rastrovací elektronová mikroskopie
EDS/EDX	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy – Energiově disperzní rentgenfluorescenční spektrometrie
DLS	Dynamic Light Scattering – Dynamický rozptyl světla
LC ₅₀	Medium Lethal Concentration – Střední letální koncentrace – koncentrace dané látky, při které uhynie 50 % testovacích organismů
EC ₅₀	Effective Concentration – Účinná koncentrace, při které dochází ke změnám v chování organismů
IC ₅₀	Inhibition concentration – Inhibiční koncentrace, při které dochází ke změnám v chování organismů
NOEC	No Observed Effect Concentration – Koncentrace bez pozorovatelného škodlivého účinku
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration – Nejnižší koncentrace, při které je pozorován škodlivý účinek
TEM	Transmission Electron Microscopy – Transmisní elektronová mikroskopie

ICP-OES Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spektrometry – Optická emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu

Seznam obrázků

Obrázek 1	Rozpustnost nanočástic ZnO po 24 hodinové expozici ve vodné suspenzi [18].....	18
Obrázek 2	Závislost zeta potenciálu nanočástic TiO ₂ na pH [49]	27
Obrázek 3.	Chovná nádoba <i>Enchytraeus crypticus</i> , zdroj: vlastní.....	34
Obrázek 4	Příprava agaru s přidavkem rašeliny pro testy ekotoxicity ZnO–NPs, zdroj vlastní	37
Obrázek 5	Křivka dávka-účinek pro <i>E. crypticus</i> po 96 hodinové expozici Zn ²⁺ ionty v agaru s přidavkem písku.....	40
Obrázek 6	Křivka dávka-účinek pro <i>E. crypticus</i> po 96 hodinové expozici Zn ²⁺ iontů v agaru s přidavkem rašeliny	41
Obrázek 7	Křivka dávka-účinek pro <i>E. crypticus</i> po 96 hodinové expozici Zn ²⁺ ionty v agaru s přidavkem rašeliny i písku.....	43
Obrázek 8	Snímek SEM zobrazující tzv. „bouli“ agaru	44
Obrázek 9	Snímky agaru s pískem s koncentracemi nanočástic 50 a 1000 mg Zn/kg agaru pořízené SEM.....	44
Obrázek 10	Snímky SEM zobrazující zvětšené útvary částic při koncentraci 50 a 1000 mg Zn/kg agaru.....	45
Obrázek 11	Výstupy z EDX analýzy s příklady spekter analyzovaných útvarů: (1) plocha (50 mg/kg agaru), (2) plocha (1000 mg/kg agaru), (3) částice NPs (50 mg/kg agaru), (4) částice NPs (1000 mg/kg agaru).....	46
Obrázek 12	Snímky agaru s uhličitanem s koncentrací nanočástic 1000 mg Zn/kg agaru pořízení SEM a výstup z EDX analýzy této částice.....	47
Obrázek 13	Křivka dávka-účinek pro <i>E. crypticus</i> po 96 hodinové expozici ZnO–NPs v agaru s přidavkem písku.....	49
Obrázek 14	Snímky agaru s rašelinou s koncentracemi nanočástic 50 a 1000 mg Zn/kg agaru pořízené SEM.....	50
Obrázek 15	Snímky SEM zobrazující zvětšené útvary částic rašeliny a aglomerátů ZnO–NPs při koncentraci 50 a 1000 mg Zn/kg agaru	50
Obrázek 16	Výstupy z EDX analýzy s příklady spekter analyzovaných útvarů: (1) plocha (50 mg/kg agaru), (2) plocha (1000 mg/kg agaru), (3) částice rašeliny (50 mg/kg agaru), (4) částice NPs (1000 mg/kg agaru).....	51
Obrázek 17	Křivka dávka-účinek pro <i>E. crypticus</i> po 96 hodinové expozici ZnO–NPs v agaru s přidavkem rašeliny	53

Obrázek 18 Snímky agarů s pískem a rašelinou s koncentracemi nanočástic 50 a 1000 mg Zn/kg agarů pořízené SEM	54
Obrázek 19 Snímky SEM zobrazující zvětšené útvary částic při koncentraci 50 a 1000 mg Zn/kg agarů	54
Obrázek 20 Výstupy z EDX analýzy s příklady spekter analyzovaných útvarů: (1) plocha (50 mg/kg agarů), (2) plocha (1000 mg/kg agarů), (3) útvary agarů a rašeliny (50 mg/kg agarů), (4) částice NPs (1000 mg/kg agarů)	55
Obrázek 21 Křivka dávka–účinek pro <i>E. crypticus</i> po 96 hodinové expozici ZnO-NPs v agarů s přídavkem rašeliny a písku	57
Obrázek 22 TEM zobrazující nanočástice ZnO	60
Obrázek 23 Křivky dávka–účinek Zn^{2+} iontů v různých modifikacích agarového média	61
Obrázek 24 Křivky dávka–účinek ZnO-NPs v různých modifikacích agarového média	62

Seznam tabulek

Tabulka 1 Závislost rozpouštění nanočástic ZnO (1000 mg/L) na velikosti částic, při pH 7,517	
Tabulka 2 Vybrané příklady akutních a reprodukčních testů toxicity (26)	22
Tabulka 3 Korigovaná mortalita roupic (%) v jednotlivých koncentracích po 96 hodinové expozici ZnCl ₂ ve třech opakování s přidavkem písku.....	39
Tabulka 4 Korigovaná mortalita roupic (%) v jednotlivých koncentracích po 96 hodinové expozici ZnCl ₂ v agaru s 1% přidavkem rašeliny.....	41
Tabulka 5 Korigovaná mortalita roupic (%) v jednotlivých koncentracích po 96 hodinové expozici ZnCl ₂ v agaru s 1% přidavkem rašeliny i písku	42
Tabulka 6 Korigovaná mortalita roupic (%) v jednotlivých koncentracích po 96 hodinové expozici ZnO-NPs v agaru s 1% přidavkem písku	48
Tabulka 7 Korigovaná mortalita roupic (%) v jednotlivých koncentracích po 96 hodinové expozici ZnO-NPs v agaru s 1% přidavkem rašeliny	52
Tabulka 8 Korigovaná mortalita roupic (%) v jednotlivých koncentracích po 96 hodinové expozici ZnO-NPs v agaru s 1% přidavkem písku a rašeliny	56
Tabulka 9 Korigovaná mortalita (%) <i>E. crypticus</i> v jednotlivých modifikacích agaru při koncentraci 8,15 mg Zn/kg agaru	58
Tabulka 10 Srovnání korigovaných mortalit pro Zn ²⁺ a supernatant v upraveném agaru s přidavky půdních komponent.....	58
Tabulka 11 Vypočtené hodnoty LC ₅₀ pro <i>E. crypticus</i> v jednotlivých úpravách agaru při testech se Zn ²⁺ ionty a ZnO-NPs	59

Úvod

Cílem diplomové práce bylo zvýšit environmentální relevanci agarového kultivačního média pro testy ekotoxicity nanočástic na půdním kroužkovci *Enchytraeus crypticus*. Toho bylo možné dosáhnout za pomoci přísadků některé půdní komponenty do agaru, protože agar je čisté kultivační médium bez obsahu půdních složek. Jako přísadkové složky byly zvoleny písek a rašelina a při testech byla sledována změna výsledné toxicity vlivem přísadkové složky.

Teoretická část práce je zaměřena na nanočástice oxidu zinečnatého a jejich osud v životním prostředí. Popisuje, jakým způsobem se nanočástice dostávají do půdy a jaké parametry mohou ovlivnit jejich výslednou toxicitu v půdě. Pozornost je věnována především transformacím nanočástic v půdě. Práce se zabývá také testováním ekotoxicity v umělých standardizovaných půdách a srovnáním výsledků těchto testů s výsledky získanými při použití agarových kultivačních médií. Řešeny jsou vlastnosti jednotlivých komponent půd a jejich působení na testovací organismus v přítomnosti toxické látky. Malá část je věnována popisu a vlastnostem modelovaného organismu *Enchytraeus crypticus*, používaného při ekotoxikologických testech.

V experimentální části práce jsou shrnuty výsledky jednotlivých testů. Srovnány jsou výsledky testování zinečnatých kationtů a nanočástic oxidu zinečnatého. Dále jsou porovnány výsledky tří úprav agarového kultivačního média, které spočívají v přísadku rašeliny, písku a kombinací obou komponent.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Nanočástice oxidu zinečnatého

Nanotechnologie je v současné době jeden z nejrychleji se rozvíjejících technických oborů. Produkce průmyslově vyráběných nanočástic (ENPs) se stále zvyšuje a jejich úniku do životního prostředí není možné zcela zabránit. V důsledku toho je nutné řešit nejen toxicitu samotných nanočástic (NPs), ale také problematiku transformací, které NPs prodělávají při interakci s jednotlivými složkami životního prostředí. Mezi přeměny, které nanočástice v životním prostředí prodělávají můžeme zařadit například rozpouštění, nebo změny chemického složení povrchu částic vlivem adsorpce či reakce s kyslíkem. Všechny tyto transformace mají zásadní vliv na průběh interakcí nanočástic se živými organismy a v důsledku toho i na jejich případné ekotoxické účinky [1].

Nanotechnologií myslíme technický obor, jehož podstatou je manipulace s objekty o velikosti blízké se rozměrům jednotlivých atomů, čímž vznikají materiály s netradičními vlastnostmi. Za nanomateriály považujeme takové hmotné útvary, jejichž jeden, dva nebo tři rozměry spadají do oblasti 1–100 nm. Tyto útvary se mohou vyskytovat v podobě nanovláken, nanofilmů či nanočástic. Největší využití nacházejí v dnešní době právě nanočástice, které mají všechny tři rozměry menší než 100 nm. NPs můžeme dle jejich původu rozdělit na přírodní a antropogenní. Přírodní NPs vznikají při procesech, jako jsou lesní požáry, eroze, či vulkanická činnost. Antropogenní NPs vznikají lidskou činností při jejich cílené výrobě. Až miliony tun nanočástic jsou celosvětově ročně vyráběny cíleně pro komerční účely [2].

Řada průmyslově vyráběných nanočástic oxidů kovů je díky svým unikátním optickým a elektrickým vlastnostem a antimikrobiální aktivitě využívána v široké škále aplikací [3]. Nanoprášek ZnO je v současné době využíván například v produktech, jako jsou plasty, keramika, sklo, pigmenty či cement. Velká množství ZnO jsou spotřebována při výrobě kosmetických přípravků. Do opalovacích krémů, jsou ZnO-NPs přidávány, jelikož jsou schopny absorbovat UV záření [4]. V roce 2015 překročila celosvětová produkce ZnO-NPs milion tun a odhadovaný celosvětový roční objem výroby neustále roste [5]. S nárůstem objemu výroby nanočástic ZnO roste i potenciál jejich uvolňování do životního prostředí. Odhady koncentrací ZnO-NPs v jednotlivých složkách životního prostředí se v roce 2009 pohybovaly v rozmezí od 100 µg/L (ve vodě) až po několik mg/kg v půdě [6]. Ve studii Gottschalk a kol. (2009) jsou uvedeny modelované koncentrace nanočástic ZnO pohybující se kolem 10 ng/L v přírodních povrchových vodách a 430 ng/L v upravených odpadních

vodách [7]. Vzhledem k rozšiřujícím se aplikacím nanočástic ZnO se očekává, že jejich uvolňování do životního prostředí se bude neustále zvyšovat. Ekotoxicita těchto nanočástic je ovlivňována řadou vnějších faktorů, z toho důvodu jsou informace o konkrétních dopadech působení ZnO na jednotlivé organismy celkem omezené a daná problematika je stále předmětem studia [8].

Toxické působení nanočástic kovů a oxidů kovů může být vyvoláno nejméně třemi odlišnými mechanismy. Nanočástice mohou do média uvolňovat toxické ionty. Dále může dojít k interakci povrchu částic s expozičním médiem a tím k produkci volných radikálů či reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou poškozovat buněčné membrány. Třetím mechanismem může být přímá interakce internalizované částice či jejího povrchu s biologickým cílem, čímž dochází k narušení funkce buněčných organel. Brayner a kol. ve své studii uvádí, že nanočástice zinku mohou u gramnegativních bakterií zvýšit propustnost membrán, čímž dochází k akumulaci a internalizaci ZnO-NPs. Vzhledem k tomu, že se nanočástice ZnO ve vodách částečně rozpouští, musíme brát v úvahu jak toxicitu samotných NPs tak i z nich uvolněných iontů. Při posuzování toxického účinku nanočástic ZnO musíme počítat se všemi výše popsány mechanismy. Bylo prokázáno že uvolňování Zn^{2+} iontů z nanočástic ZnO významně přispívá k cytotoxicitě těchto nanočástic [9,10]. ZnO-NPs fungují jako fotokatalyzátory a podporují generování ROS. Nejvyšší fotokatalytické účinnosti bývá dosaženo, pokud na ZnO-NPs dopadá záření o energií odpovídající šířce zakázaného pásu – tedy 3,37 eV (vlnová délka 368 nm). Jedná se o proces, kdy NPs působí toxicky především na vyšší organismy [11]. Určení zda, a za jakých podmínek každý z těchto mechanismů přispívá toxicitě, je nezbytné pro posouzení potenciální nebezpečnosti a environmentálních rizik těchto nanočástic.

1.1.1 Mechanismus toxicity ZnO–NPs

Jak již bylo řečeno, existuje několik mechanismů toxického působení nanočástic. Jedním z nich je rozpouštění nanočástic ZnO, čímž dochází k uvolňování iontů Zn^{2+} . Ve více než polovině studií, zabývajících se studiem vlivu uvolněných iontů Zn^{2+} , je uvedeno, že tyto ionty částečně přispívají k toxicitě nanočástic ZnO. Přítomnost uvolněných iontů Zn^{2+} je pro posouzení toxicity samotných nanočástic důležitá, protože vykazují srovnatelnou, někdy i vyšší toxicitu než původní nerozpuštěná forma NPs. Rozpustnost těchto částic a vysoká

toxická uvolněných iontů Zn^{2+} vysvětluje, proč jsou ZnO-NPs považovány za velmi toxické ve srovnání s ostatními nanočásticemi oxidů kovů (například TiO_2 , SiO_2 , CuO , atd.) [12,13].

Ve vodních systémech jsou přítomny jak samotné nanočástice, tak i z nich uvolněné ionty Zn^{2+} . Při určování výsledné toxicity ve vodním prostředí tedy musíme brát v potaz i uvolněné ionty. Dosud bylo publikováno jen málo studií, v nichž byl vhodným způsobem odlišen ekotoxický účinek nerozpuštěných nanočástic ZnO a Zn^{2+} iontů, které se z nich ve vodním prostředí uvolňují. Ve studii Poynton a kol. z roku 2010 je uvedeno, že mechanismus působení ZnO-NPs se liší oproti mechanismu uvolněných iontů Zn^{2+} . Ve studii prováděné na *D. magna* byly při subletálních dávkách ZnO-NPs a $ZnSO_4$ pozorovány výrazné rozdíly v genové expresi několika genů. Zvýšená exprese genů pro multicystatin, ferritin a C1q protein byla typická pro účinek ZnO-NPs a příslušné proteiny tedy mohou sloužit jako vhodné biomarkery k odlišení účinku nanočástic a Zn^{2+} iontů [14].

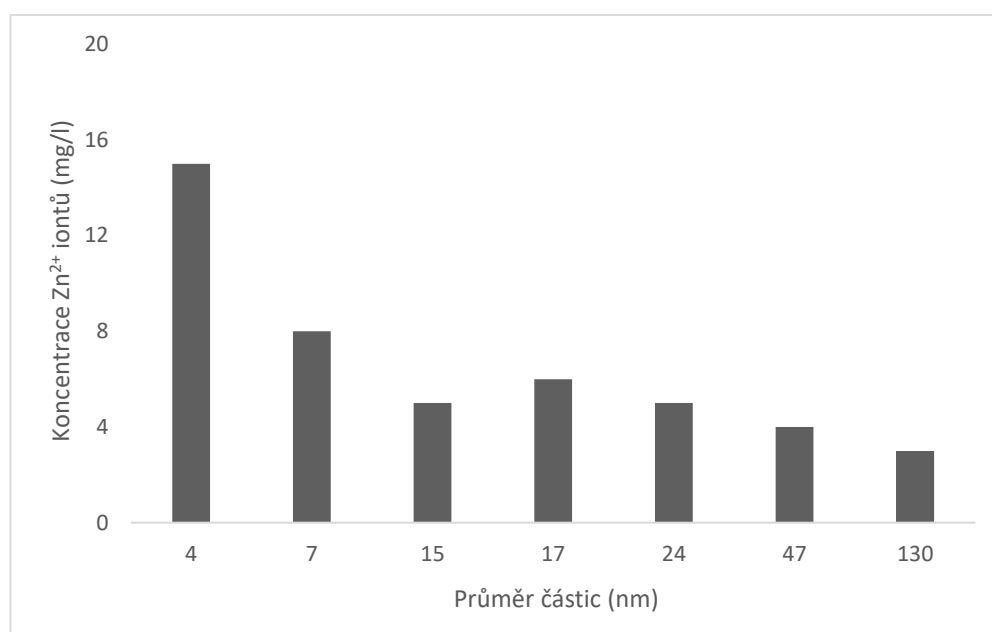
Rozpustnost částic je závislá především na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, jako je chemické složení, plocha povrchu či velikost částice. Dále jsou důležité environmentální parametry expozičního média, především teplota a rozpuštěné organické látky. Borm a kol. (2006) ve své práci dokazují, že míra rozpouštění nanočástic je řízena difúzním koeficientem molekuly rozpuštěné látky, objemem roztoku, plochou povrchu částice a difúzní tloušťkou vrstvy [15].

Reed a kol. ve své studii uvádí pro ZnO-NPs výrazné zvýšení rozpustnosti se zmenšující se velikostí nanočástic ZnO [16]. Vyšší míra rozpustnosti menších částic nastává v důsledku jejich vyšší specifické plochy. Srovnávání rozpustnosti ZnO-NPs bylo provedeno s částicemi, jejichž průměr se pohyboval v rozmezí od 4 nm do 250 nm. Experimenty byly prováděny s využitím koloidního roztoku ZnO-NPs o koncentraci ZnO 1 g/L a pH 7,5, po dobu 24 hodin [17]. Výsledky experimentu jsou uvedeny v Tab. 1.

Tabulka 1 Závislost rozpouštění nanočástic ZnO (1000 mg/L) na velikosti částic, při pH 7,5

Průměr částic (nm)	Zn^{2+} ionty (mg/L)
4 ± 1	57 ± 1
15 ± 4	22 ± 1
241 ± 11,5	10 ± 2

Mudunkotuwa a kol. rovněž připisují zvýšenou rychlost rozpouštění ZnO-NPs zvětšené ploše povrchu nanočástic. Při testu s řadou dobře charakterizovaných ZnO-NPs s průměrem v rozmezí 4-130 nm, bylo zjištěno, že menší částice vykazují zvýšenou rozpustnost, v porovnání s částicemi většími. A to i v případě aglomerace těchto částic, kdy v testovaném roztoku vznikaly agregáty s průměrem 1-3 μm . Na Obr. 1 je možné vidět rozpustnost ZnO-NPs (měřena koncentrace uvolněných iontů Zn^{2+}) po 24 hodinách, při koncentraci ZnO-NPs 500 mg/L a pH 7,5 [18].



Obrázek 1 Rozpustnost nanočástic ZnO po 24 hodinové expozici ve vodné suspenzi [18]

Jedním z nejvýznamnějších parametrů prostředí, který zásadním způsobem ovlivňuje rozpustnost NPs je pH. Miao a kol. (2010) pozorovali téměř 100–násobný nárůst celkové koncentrace Zn^{2+} při poklesu pH z hodnoty 9 na 7. Dalším významným parametrem je teplota. Při experimentu s koloidními roztoky o koncentraci ZnO-NPs 100 mg/L a 10 mg/L, byla při teplotě 37 °C zjištěna výrazně nižší rozpustnost částic než při teplotě 20 °C. Podobné výsledky byly zjištěny i při experimentech se ZnCl_2 . Tento poznatek není překvapující vzhledem k tomu, že entalpie rozpouštění ZnO je negativní. Můžeme tedy očekávat, že jakékoli zvýšení teploty bude mít za následek nižší rozpustnost částic.

Jaký vliv budou mít na rozpustnost ZnO-NPs přírodní organické látky (NOM) závisí především na jejich chemické struktuře. Organické látky mohou zvýšit rozpustnost tím,

že působí jako chelatační činidla pro Zn^{2+} , čímž dojde k uvolnění iontů z nanočástic ZnO. Díky NOM může být rozpouštění i omezeno, a to adsorpcí NOM na povrch NPs, čímž zablokují jejich interakci s molekulami vody. Například kyselina citronová způsobuje zvýšení rozpustnosti za pomoci karboxylových skupin. Z výše uvedených důvodů mohou organické látky, při interakci s NPs významně ovlivnit jejich toxicitu [16,19].

Mimo uvolňování iontů může být toxický účinek ZnO-NPs rovněž vyvolán i samotnými nerozpuštěnými nanočásticemi. Jedním z nejčastěji diskutovaných mechanismů tohoto typu je indukce tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS). Toxicita vyvolaná nanočásticemi prostřednictvím ROS byla pozorována např. u eukaryotických buněk, kde způsobovala poškození buněčných organel. Ke vzniku ROS může docházet interakcí nanočástice s enzymaticky katalyzovanými oxidačními procesy v buněčných organelách, nejčastěji v mitochondriích [20].

Toxicitu ZnO-NPs můžeme připsat také jejich fotokatalytické aktivitě. Nanočástice ZnO působí jako katalyzátor, a za předpokladu, že na částice dopadá záření o energii 3,37 eV (368 nm) je podporováno generování ROS, čímž je vyvolána fototoxicita. Důležité je poznamenat, že energie záření o vlnové délce 368 nm představuje přibližně 6 % energie slunečního světla dopadajícího na zemský povrch (v závislosti na atmosférických podmínkách). Lipovsky a kolektiv (2009) ve své studii uvádí výrazné zvýšení toxicity ZnO-NPs při vystavení částic přirozenému slunečnímu záření. Nicméně většina studií toxicity je prováděna za laboratorních podmínek, kde má UV záření zanedbatelný vliv [21,22].

1.2 Ekotoxikologie půd

Vývoj půdní ekotoxikologie začal s pozorováním vlivů pesticidů na půdní bezobratlé již v 60. letech 20. století. Ekotoxikologie zkoumá účinky chemických látek na organismy v životním prostředí s cílem chránit strukturu a fungování ekosystémů. Hlavním cílem půdní ekotoxikologie je vývoj metod, které umožňují charakterizovat vliv chemických látek na živé organismy v půdním prostředí [23]. Při hodnocení ekotoxikologických rizik je možné rozlišit dva přístupy. Jeden přístup má za cíl předpovědět možné účinky chemických látek, aby bylo možné regulovat jejich použití nebo zabránit jejich uvedení na trh. Druhým přístupem je posouzení skutečného ekologického rizika v případě znečištění prostředí. V obou případech je možné vyžítí ekotoxikologických testů, které mají za cíl vyhodnotit toxicitu. Ta je nejčastěji vyjádřena jako mortalita, nebo inhibice růstu či reprodukce testovacích

organismů. Toxicitu je možné vyjádřit pomocí parametrů LC_{10} a LC_{50} (10% a 50% mortalita exponovaných organismů), dále EC_{10} a EC_{50} (účinná koncentrace látky, která způsobuje snížení růstu, změnu chování, apod. u 10% a 50% testovaných organismů za definovaných podmínek) a také pomocí inhibiční koncentrace IC_{50} (při níž dochází k zamezení růstu organismů) [24].

1.2.1 Půdní biologické testy

Testy toxicity, které slouží k poskytnutí informací o účincích látek na životní prostředí, jsou prováděny od druhé poloviny 20. století. V 80. letech byly uveřejněny konkrétní jednodruhové testy, určené k výzkumu toxicity látek ve vodním i půdním prostředí. Biosféra se skládá až z 5 miliónů organismů a není v žádném případě možné provést testy na všech jednotlivých druzích. Z tohoto důvodu jsou jednodruhové testy toxicity nevýhodné. Je tedy žádoucí používat vícedruhové testy s rostlinami, mikroorganismy a půdními bezobratlými, kteří mezi sebou interagují, čímž jsou společně vystaveny působení toxické látky. Pro správné zhodnocení ekotoxického účinku látky na konkrétní ekosystém je tedy nutné otestovat vhodného zástupce či využít celou baterii testů. V opačném případě se mohou stát výsledky irelevantními pro požadovanou složku životního prostředí.

Biologické testy jsou v ekotoxikologii základním nástrojem, pomocí něhož zjišťujeme odezvu živých struktur na expozici toxické látky. Jedná se o nástroj standardního hodnocení životního prostředí. Biologické testy jsou v podstatě umělé systémy, které sice neodráží skutečnou povahu procesů v reálném prostředí, ale mohou být považovány za kompromis mezi nároky na environmentální relevanci a praktickou proveditelnost, cenu a rychlost [25]. Biotesty mohou být prováděny v krátkém časovém intervalu, kdy se jedná o testy s akutní expozicí, označované jako akutní testy, nebo se jedná o dlouhodobé testy označované jako chronické. Půdní testy (terestriální) jsou využívány k testování ekotoxicity látek dispergovaných v pevných matricích (kontaminované půdy, sedimenty či kaly). Mezi organismy, které se pro terestriální testy využívají, můžeme zařadit např. žížaly (*Lumbricidae*), hlístice (*Nematoda*) či roupice (*Enchytraeidae*) [23]. Studium ekotoxicity nanomateriálů v reálných půdách je komplikováno mimo jiné složitostí půdní matrice a její časovou a prostorovou variabilitou.

Pro hodnocení ekotoxicity je vhodné používat standardizované metodiky umožňující mezilaboratorní porovnání naměřených dat. Proto se využívají zejména normované postupy ekologických biotestů doporučené mezinárodními organizacemi, jako je ISO (International

Organization for Standardization) či OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Hlavní výhodou těchto standardizovaných postupů jsou jasná pravidla pro získávání, dokumentaci a zpracování dat, což mimo jiné vede k vysokému stupni reprodukovatelnosti výstupů. Nevýhodou jsou příliš specifické odpovědi, a proto nemusí být takto získané výsledky vždy použitelné pro věrohodný popis účinků látek v reálných podmínkách.

1.2.2 Testování NPs v různých typech médií

Většina dostupných studií, které se zabývají ekotoxicitou NPs pro půdní organismy je realizována s využitím modelových půd jako expozičního média. Při využití těchto půd je velmi obtížné udržet konstantní expoziční koncentraci NPs v celém objemu, a to především kvůli schopnosti NPs tvořit aglomeráty a interagovat s půdními složkami. Veškeré komponenty obsažené v půdě mohou interagovat s nanočásticemi a ovlivnit tak jejich toxicitu. Z tohoto důvodu může být výhodné využít při testech jako expoziční médium agar. Jedná se o směs polysacharidů získanou z různých druhů řas čeledi *Rhodophyceae*. Jeho využití teoreticky může vést k potlačení obtížně monitorovatelných interakcí mezi půdními složkami a NPs. Agar jako expoziční médium zajišťuje nižší stupeň aglomerace NPs, časovou stabilitu určité míry aglomerace během celého experimentu, možnost charakterizace připraveného média a v důsledku těchto zkušeností i vyšší míru reprodukovatelnosti získaných dat. Na druhou stranu nepřítomnost půdních složek snižuje environmentální relevanci prováděných testů.

Tab. 2 shrnuje informace o vybraných standardních testech ekotoxicity (dle OECD), které se využívají k posouzení environmentálních rizik spojených s chemickými látkami. Zaměřuje se především na druhy testovacích organismů a hodnocení koncových bodů, které se při testování ekotoxicity využívají. Dále je důležité věnovat pozornost způsobu dávkování a expozici toxické látky. Veškeré tyto informace umožňují posoudit, zda je vybraný druh testu vhodný pro hodnocení toxicity nanočástic [26].

Tabulka 2 Vybrané příklady akutních a reprodukčních testů toxicity [26]

Test	druh organismu	druh média	způsob dávkování	doba trvání	koncový bod
akutní test	<i>Daphnia magna</i>	přírodní voda	vnášení do vody bez využití rozpouštědel	48 hodin	EC50
akutní test	<i>Eisenia foetida foetida</i> <i>Eisenia foetida andrei</i>	filtrační papír, umělá půda	Nejprve rozmícháno ve vodě a poté aplikace do půdy či na filtrační papír	14 dnů	LC50
reprodukční test	<i>Enchytraeus albidus</i> <i>Enchytraeus buchholzi</i> <i>Enchytraeus crypticus</i>	umělá půda	Nejprve rozmícháno ve vodě a poté v písku či aplikace vodné suspenze přímo do půdy	42 dnů	LCx, NOEC, LOEC
reprodukční test	<i>Eisenia foetida</i> <i>Eisenia andrei</i>	umělá půda	Nejprve rozmícháno ve vodě a poté v písku či aplikace vodné suspenze přímo do půdy	56 dnů	LCx

Ve všech uvedených testech se testovaná látka dávkuje do testovacího média, čímž je voda nebo půda. Někdy mohou být, v případě málo rozpustných látek, využita rozpouštědla. Mezi koncové body, které jsou v těchto testech měřeny, patří letální koncentrace (LC), účinná koncentrace (EC), inhibiční koncentrace (IC), hodnota dávky/koncentrace bez pozorovaného účinku (NOEC) či nejnižší dávka/koncentrace s pozorovaným nepříznivým účinkem (LOEC). Tran a kol. (2005) ve své studii navrhovali, že pokud jde o nanočástice je zapotřebí předběžných (rychlých) testů, ze kterých bude možné zjistit, zda se studované nanočástice liší od své makroskopické formy či nikoli [27].

Testy ekotoxicity mohou být však nespolehlivé, a to kvůli způsobu, jakým jsou částice dávkovány a poté udržovány v testovacím médiu. Spolehlivost výsledků je možné poskytnout pouze při perorálním dávkování, kdy jsme si jisti, že byl organismus vystaven určité dávce nanočástic. Při testování by organismy měly být vystaveny nanočásticím takovým způsobem, který je relevantní z hlediska životního prostředí a poskytuje výsledky použitelné pro posouzení předpokládaného rizika [28]. Způsob dávkování nanočástic přímo do expozičního média je také zdrojem nejistot souvisejících s chováním a osudem NPs, které závisí zejména na jejich aglomeračním potenciálu. Kvůli těmto zdrojům nejistot je zapotřebí studovat nejen toxicitu samotných nanočástic, ale také jejich interakce s prostředím, do kterého se dostávají. Každý typ nanočástic je konstruován pro konkrétní aplikaci, a proto se fyzikálně-chemické vlastnosti a reaktivita každého materiálu liší. Z toho důvodu je obtížné navrhovat obecné postupy zjišťování toxicity nanočástic. Existují však některé klíčové vlastnosti, které budou pro posouzení ekotoxikologických účinků NPs relevantní. Patří sem velikost částic, tvar, reaktivita povrchu, rozpustnost a způsob úpravy povrchu nanočástic. Podrobně budou tyto klíčové vlastnosti probrány v kapitole 1.3, která se bude věnovat transformacím ZnO-NPs a osudu, který prodělávají v jednotlivých složkách životního prostředí [29]. Níže jsou uvedeny publikace, ve kterých byl studován vliv použitého živného média a způsobu vnášení nanočástic na výsledky testů ekotoxicity pro půdní organismy.

Práce Hrdá a kol. (2016) je zaměřena na testování ekotoxicity ZnO-NPs na rouspici *Enchytraeus crypticus* a uvádí dva možné způsoby vnášení NPs do expozičního média (agaru). Testované NPs byly v práškové formě (Bochemie Group a.s.) s průměrnou velikostí 10 nm s rozsahem 5–50 nm. První způsob vnášení byl založen na kryogenním mletí suchého agaru s testovanými NPs a následné dispergaci ve vodě. Dále byla tato směs za neustálého míchání zahřáta na teplotu (85 ± 5) °C a po uplynutí 1 hodiny bylo médium za horka rozlito do Petriho misek. Druhý způsob spočíval v přípravě vodné disperze NPs, která byla následně po kapkách přidávána do míchaného agaru zahřátého na teplotu (85 ± 5) °C. Pro oba způsoby byla provedena charakterizace pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Při využití druhého postupu vnášení NPs do agaru docházelo k podstatně nižšímu výskytu aglomerátů s největší velikostí 1 μm (v prvním případě se jednalo o aglomeráty v rozmezí 1-10 μm). Na základě výsledků bylo závěrem autorů této práce tvrzení, že postupné přikapávání koloidního roztoku NPs je optimálnější způsob než kryogenní mletí agaru a NPs [30].

Bicho a kol (2015) prováděli reprodukční test na žížalách (*enchytraeid*) v umělé půdě s návrhem modifikace, která zahrnovala snížení obsahu organických látek ve standardní zkušební půdě OECD a to z 10% obsahu na 5 až 2%. Modifikace byla využita z toho důvodu, že umělá půda snižuje biologickou dostupnost NPs v důsledku sorpce organické hmoty na částice. Při testování bylo prokázáno, že půda s vyšším obsahem organické hmoty vykazuje vyšší hodnoty EC_x, tzn. nižší toxicitu [31]. Hund–Rinke a kol. (2016) prováděli obdobné testy na žížalici (*lumbriculus*) v prostředí voda–sedimenty. Modifikace spočívala ve snížení obsahu organické hmoty v sedimentu s využitím 2% rašeliny oproti původní 5%. Tato modifikace je v souladu s doporučením popsáním v OECD TG 315 (2008), kde je uvedeno využití 2% obsahu rašeliny, který odpovídá obsahu organických látek v mnoha přírodních sedimentech. Biologická dostupnost NPs je snížením obsahu organických látek zvýšena a zjištěné účinky je možné považovat za reálnější odraz dějů probíhajících v některých typech životního prostředí. V tomto modifikovaném prostředí žížalici v kontrolní skupině vykazovaly stejné chování a dobrou reprodukci jako před modifikací [32]. Autoři Handy a kol. (2012) navrhli modifikaci, která spočívala v aplikaci NPs přímo na každou testovací nádobu se sedimenty. Dle OECD 225 je doporučeno vnášení NPs do suché izolované písčité části, která se následně zapracuje do zbytku sedimentu. Přímá aplikace NPs do sedimentů vedla k realističtějšímu průběhu interakcí nanočástic se složkami sedimentů a následně i k realističtější odezvě organismů. Tato aplikace snižuje kolísání koncentrací NPs tím, že omezuje příležitost zachytávání NPs spolu s médiem ve skleněné nádobě, která se využívá k jeho přípravě [33].

Ve studii Canas et al. (2011) byla sledována akutní a reprodukční toxicita nanočástic ZnO a TiO₂ na půdním organismu *Eisenia foetida*. Akutní toxicita nanočástic ZnO, jejichž velikost se pohybovala v rozmezí 40–100 nm, byla testována na filtračním papíře a v písčitém expozičním médiu (4 g kravský hnůj, 20 g písku Ottawa, 4 mL destilované vody). Bylo testováno celkem 8 koncentrací v rozmezí 0–10 000 mg/L. Charakterizace nanočástic byla provedena pomocí dynamického rozptylu světla (DLS). Během této analýzy byla detekována agregace pro ZnO-NPs mezi 1 a 100 mg/L a velikost těchto agregátů se pohybovala v rozmezí 200–300 nm. Při akutním testu toxicity byla na filtračním papíře zaznamenána mortalita ve všech testovaných koncentracích. V písčitém expozičním médiu byla pro ZnO-NPs u koncentrací 1 a 100 mg/kg pozorována mortalita 10 %, pro nejvyšší koncentraci (10 000 mg/kg) byla pozorována mortalita 20 % [34].

1.3 Vliv půdních složek na osud nanočástic v půdách

Půda je definována jako komplexní heterogenní a dynamický systém organického materiálu, minerálů, vody, plynů a půdních organismů. Do půdy se mohou dostávat i chemické látky, které jsou průmyslově vyráběné a vnášené do životního prostředí účelově v důsledku celé řady antropogenních činností. Půda je tedy významným rezervoárem průmyslově vyráběných nanočástic a dalších polutantů. Znečišťující látky mohou snižovat hustotu půdních organismů a celkovou kvalitu půd [35].

Vzhledem k různorodosti nanotechnologických aplikací mohou NPs vstupovat do životního prostředí mnoha cestami. K náhlému úniku může dojít během průmyslové výroby či při přepravě materiálu [36]. Emise do ovzduší, vznikající například při spalování, způsobují ukládání NPs do půdy i vod. Mezi hlavní zdroje nanočástic v půdách patří i kaly z čistíren odpadních vod (ČOV), kde se kumulují nanočástice uvolňované ze spotřebních produktů. Z důvodu využívání stabilizovaného kalu v zemědělství se tyto NPs snadno dostávají přímo do půdy [37]. Přesné odhady produkce jednotlivých druhů nanočástic jsou v současné době obtížné, ale z hlediska využívání nanočástic TiO_2 a ZnO v široké škále produktů můžeme usuzovat, že se v největší míře dostávají do životního prostředí právě tyto NPs [38].

Průmyslově vyráběné NPs na bázi kovu mají řadu klíčových charakteristik, o kterých se předpokládá, že budou mít zásadní vliv na jejich ekotoxicitu, chování a osud v jednotlivých složkách životního prostředí. Mezi tyto charakteristiky můžeme zařadit zejména velikost a tvar, acidobazický charakter povrchu a rozpustnost kovů ve vodě. V životním prostředí tedy může docházet k transformacím jako je agregace, aglomerace, sorpce organických látek na povrch částic či uvolňování iontů vlivem rozpouštění. Ve srovnání s vodným prostředím představuje půda značně složitě médium. V kontextu ekotoxicity je klíčem pochopit, jakým způsobem jsou specifické organismy vystaveny NPs v různých fázích (půda, půdní voda) a jakými procesy může být expozice NPs v těchto fázích ovlivněna. Většina dosavadních prací, popisujících chování NPs, byla provedena ve vodných médiích. Výsledky těchto studií jsou sami o sobě přímo relevantní pro půdu, protože chování NPs v pórové vodě může mít značný význam pro jejich transport a biologickou dostupnost. Pro relativně jednoduché analýzy jako je stav aglomerace NPs ve vodném roztoku, je možné využít dynamický rozptyl světla. Dále je možné využití mikroskopických technik, mezi které můžeme zařadit transmisní elektronový mikroskop, skenovací elektronový mikroskop či mikroskopii atomárních sil [39]. Nicméně, popis osudu NPs v půdách musí vycházet nejen z analýzy jejich chování v půdní vodě, ale je třeba získat relevantní data i o jejich interakci s pevným podílem půdy.

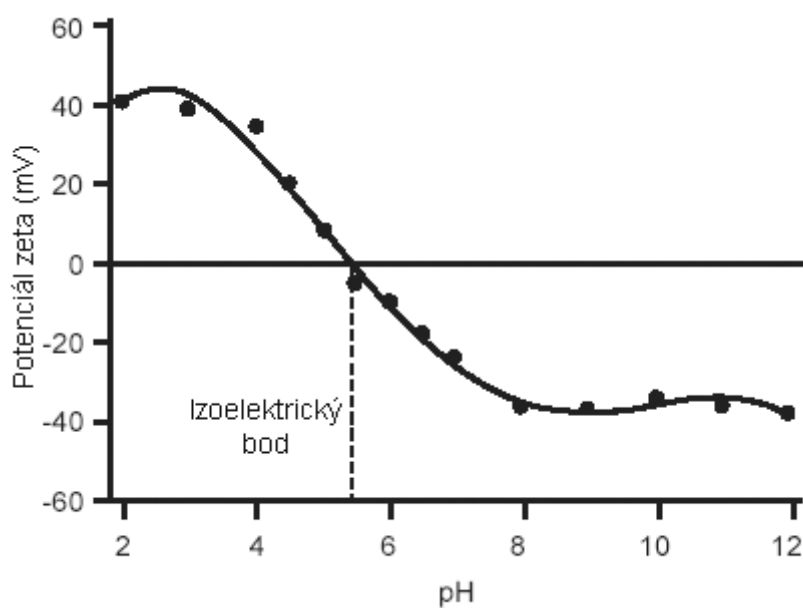
Stone a kolektiv (2010) ve své práci uvádí, že hlavní vlastnosti NPs, které by měly být vyhodnoceny během ekotoxikologických studií k popisu expozice jsou agregace, aglomerace, rozpouštění, velikost, plocha povrchu a náboj. Tyto vlastnosti jsou klíčové pro stabilitu NPs, pro jejich transport napříč složkami životního prostředí a také pro jejich biologickou dostupnost [40].

1.3.1 Agregace a aglomerace

Agregací myslíme vzájemné spojování primárních částic ve větší celky, tzv. agregáty, pomocí silné vazby, zatímco aglomerace je proces tvorby shluků částic, které jsou drženy pohromadě Van der Waalsovými silami [41]. Agregace a aglomerace bývá ovlivněna fyzikálními silami, jako je Brownův pohyb či gravitace. Dále na tyto procesy mají značný vliv i fyzikálně–chemické parametry NPs, jako velikost částic či vlastnosti povrchu [42]. Částice se neustále pohybují a sráží vlivem Brownova pohybu. Ve chvíli, kdy energie srážení či přitažlivosti přesáhne energii odpuzování nastává aglomerace [43]. K agregaci je nutný kontakt jader částic, předpokládáme tedy, že míra agregace je úměrná pravděpodobnosti srážky mezi dvěma částicemi [44]. Při těchto procesech dochází ke zvýšení vlivu gravitačních sil, čímž se zvyšuje možnost interakce těchto částic s povrchy půdních částic. Díky agregaci mohou vznikat částice s takovou velikostí, aby bylo možné jejich usazení na dně roztoku. Velikost vzniklých agregátů z NPs v roztoku závisí především na vlastnostech, jako je počáteční velikost částic a koncentrace. Například agregáty ZnO-NPs vznikaly v širokém rozmezí velikostí, což mělo za následek vznik částic s téměř 10-krát větším průměrem než primární NPs [45]. Nicméně, ne všechny NPs byly zabudovány do agregátů a jednotlivé NPs byly detekovány také v suspenzích [46]. Velikost agregátů se tedy může lišit v závislosti na typu NPs. Nanočástice TiO₂ vykazují rovnoměrnou distribuci částic a aglomeraci, zatímco nanočástice ZnO vykazují poměrně velkou distribuci velikosti částic a agregaci [47]. Tourinho a kol. (2012) zjistili, že rychlost agregace nanočástic oxidů kovů v půdních suspenzích pozitivně koreluje s iontovou silou, pH a zeta potenciálem. Naopak negativní korelace vykazuje s charakteristikami půdy, jako je obsah jílu a NOM. Agregace NPs se očekává, pokud se hodnota pH blíží izoelektrickému bodu a odpuzivé síly se zmenšují [48].

1.3.2 Vliv povrchové úpravy NPs na jejich stabilitu

Použité médium může ovlivnit elektrostatický povrchový náboj částic, což má značný vliv na agregaci/aglomeraci a stabilitu částic. U částic bez povrchové úpravy je jejich náboj výrazně ovlivněn zejména množstvím povrchových hydroxylových skupin. Tyto skupiny mohou zachytit a uvolnit protony a také mohou zachytit rozpuštěné chemické látky, jako jsou ionty kovů a organické ligandy. Polarita a velikost povrchového náboje je dána převážně povrchovou modifikací NPs a chemickým složením roztoku, zejména pak pH a koncentrací jednotlivých složek v disperzním prostředí. Při styku nabitého povrchu částice s roztokem elektrolytu vzniká útvar složený ze dvou opačně nabitých vrstev tzv. elektrická dvojvrstva. Nabitý povrch částice tvoří vnitřní vrstvu, k níž jsou adsorpčními silami přitahovány ionty s opačným nábojem, jejichž náboj neutralizuje náboj povrchu (vnitřní vrstvu). Uvnitř difúzní (vnější) vrstvy existuje teoretická hranice, kde ionty a částice tvoří stabilní jednotku. Na této hranici existuje potenciál, známý jako potenciál zeta. Velikost tohoto potenciálu vypovídá o stabilitě koloidního systému, který vzniká tehdy, jeli jedno ze tří skupenství (plynné, kapalné, pevné) jemně dispergované v jiném z nich. Zeta potenciál částic kovů či oxidů kovů s neupraveným povrchem závisí především na hodnotě pH. Čím vyšší bude hodnota pH tím zápornějších hodnot bude zeta potenciál nabývat. Po vynesení křivky závislosti zeta potenciálu na pH (Obr. 2.) je možné vidět bod, procházející nulovým potenciálem zeta. Jedná se o tzv. izoelektrický bod, kde je koloidní systém nejméně stabilní [49].



Obrázek 2 Závislost zeta potenciálu nanočástic TiO_2 na pH [49]

Ve chvíli, kdy se pH blíží izoelektrickému bodu, rychlost aglomerace se zvyšuje v důsledku snížení elektrostatických odpuzivých sil mezi částicemi. Suspenze homogenně nabitých částic bude stabilní, pokud bude absolutní hodnota zeta potenciálu vyšší než 30 mV. Jiang a kol. (2009) zjistili, že hydrodynamický průměr nanočástic TiO_2 kolísá s hodnotou pH roztoku, nejvíce v izoelektrickém bodě ($\text{pH} = 6$), [41].

Přítomnost povrchové úpravy na průmyslově vyráběných NPs může mít za následek výraznou změnu jejich vlastností, ve srovnání s neupravenými nanočásticemi. El Badawy a kol. (2010) měřili změny vlastností zlatých nanočástic s různě upraveným povrchem a bez upraveného povrchu. Za environmentálních podmínek v průběhu určitého časového intervalu, je stabilita povrchové úpravy částic důležitým parametrem, protože nám její sledování umožňuje posoudit životnost povrchově upravených ENPs [50].

Koloidní stabilitu je možné popsat pomocí teorie DLVO. Tato teorie byla r. 1940 vypracována ruskými autory Děrjaginem, Landauem, Verweym a Overbeekem. Teorie vychází ze závislosti energie vzájemného působení dvou elektricky nabitých částic na vzdálenosti jejich povrchů. Tito autoři považují stabilitu systému za funkci odpuzivých (elektrostatických) a přitažlivých (Van der Waalsových) sil. Teorie DLVO se obecně jeví jako nedostačující pro kvantitativní predikci chování koloidních systémů ve složité přírodní matrici. Avšak koncepční rámec, který je východiskem pro posuzování chování koloidních látek v jednotlivých složkách životního prostředí, může být užitečný při interpretaci trendů chování NPs pozorovaných v těchto environmentálních systémech [51-53]. Přírodní koloidy jsou definovány jako materiály, které vznikají přirozenými pochody, jako je zvětrávání, a které mají alespoň jeden rozměr v rozmezí 1 až 1000 nm [54]. NOM představují jednu z hlavních složek přírodních koloidů, přičemž jsou z 50–80 % tvořeny huminovými látkami. Povrchová úprava nanočástic za pomoci NOM ovlivňuje chování těchto částic a vede ke snížení aglomerace. Abychom pochopili osud NPs v půdním prostředí je nezbytné pochopit jejich vzájemné působení s NOM za různých fyzikálně–chemických podmínek, jako je změna pH, také typ a koncentrace NOM [55].

1.3.3 Bioakumulace a biodostupnost NPs

Existuje několik studií, které se zabývají hodnocením bioakumulace kovových NPs. Některé nanočástice na bázi kovu (např. TiO_2) mají tendenci v životním prostředí přetrvávat delší dobu. Hromadění NPs v půdě a vodách je způsobeno jejich nízkou rozpustností. NPs

se mohou částečně rozpouštět a tvořit i agregáty, čímž se stávají méně dostupnými pro organismy. Také samotné organismy mohou mít vliv na transformaci NPs, protože mohou ovlivňovat fyzikálně–chemické podmínky v půdách. Sloučeniny přítomné v půdě (např. aminokyseliny, cukry či mastné kyseliny) se adsorbují na povrch NPs, čímž mohou urychlit jejich rozpouštění. V případě nanočástic ZnO dochází k uvolňování Zn^{2+} iontů, které jsou organismy přijímány mnohem snadněji než samotné NPs. Nanočástice mohou uvnitř organismu interagovat s organickými molekulami (např. lipidy či sacharidy), čímž se stávají dostupnějšími pro trofický přenos potravním řetězcem [56]. Jednou z možných cest expozice NPs pro půdní organismy může být přímá dermální absorpce (přes kůži). Hlavní expoziční cestou je však požití samotných částic či kontaminované potravy. Nanočástice ZnO a TiO_2 byly akumulovány v tkáních žížal, přičemž bylo zjištěno, že ZnO-NPs vykazují větší akumulaci než TiO_2 -NPs. Vyšší míru akumulace ZnO-NPs autoři připisují jejich specifickým vlastnostem, které vedou k vyšší biologické dostupnosti. V případě ZnO-NPs byla pozorována indukce tvorby ROS vedoucí k poškození buněčných membrán. Výsledky této studie jednoznačně ukázaly, že při koncentraci 1 g/kg a 5 g/kg obou NPs (TiO_2 a ZnO), zejména ZnO-NPs, dochází u žížal k poškození DNA. Expoziční cesta bude specifická jak pro různé organismy, tak pro různé druhy NPs v závislosti na prostředí, ve kterém se vyskytují [57].

1.3.4 Závislost chování NPs na půdních vlastnostech

Pozorování chování NPs v půdních systémech je komplikováno přítomností pevné fáze. Půdní složky, jako jsou jílové minerály či huminové látky mají sami o sobě nabitý povrch, čímž mohou ovlivňovat interakce NPs s pevnou fází. Některé složky půdy mohou v pórové vodě vytvářet koloidy, které také mohou interagovat s NPs. Například huminové látky, které se dostávají do vodné fáze se mohou sorbovat na povrch NPs, čímž ovlivňují jejich stabilitu. Veškeré procesy, probíhající v půdě, jsou ovlivňovány převažujícími charakteristikami půdního prostředí, zejména hodnotou pH a iontovou silou půdní vody. Roku 2007 se Gimberty a kol. při studiu chování kovových NPs zaměřili spíše na půdní suspenze než na neporušené (konzistentní) půdy. Zkoumali např. distribuci velikosti nanočástic ZnO v suspenzích extrahovaných z půd (velikost dispergovaných částic menší než $1\mu m$). Bylo zjištěno, že dochází k rychlému vyrovnání koncentrace NPs mezi kapalnou a pevnou fází, a že frakce částic menších než $1\mu m$ vykazovaly v průběhu experimentu poměrně dobrou stabilitu [58].

Stabilita a sorpční chování kovových NPs v půdách je důležité pro jejich transport, osud i toxicitu.

Vzhledem k omezeným možnostem analýzy NPs v půdním prostředí uvádí většina studií charakterizaci NPs před jejich přidáním do půdy nebo dochází k charakterizaci v půdní vodě, která je poté používána k modelové kontaminaci půd. V těchto experimentech je většinou pozorována aglomerace či aglomerace studovaných nanočástic TiO_2 [59], ZnO-NPs [60] nebo Ag-NPs [61]. Manzo a kol. (2010) analyzovali půdu kontaminovanou ZnO-NPs metodou BET (Brunauer–Emmett–Teller) a zjistili, že částice nepodlehly agregaci. Autoři tento výsledek připisovali zavedení NPs do expozičního média suchou cestou, který spočíval v míchání nanoprášku ZnO se suchou půdou. Roztok extrahovaný ze vzorku půdy, která byla po zavedení NPs navlhčena, vykazoval větší částice, a při analýze pomocí DLS (dynamický rozptyl světla) bylo možné pozorovat bimodální vrchol v rozmezí 103 až 470 nm. Dostupné studie ekotoxicity NPs popisují využití různých metodik vnášení nanočástic do půdy, jako například smíchání nanoprášku přímo s půdou, přidání koloidního roztoku NPs v destilované vodě do půdy [62], nebo disperzi NPs v eluátu z půdní vody, která se poté mísí s půdou [63]. Pro lepší srovnatelnost výsledků je zapotřebí vypracovat standardní postupy vnášení NPs do půdy. Handy a kol. ve své studii doporučují využívat umělé půdy pro vyhodnocení expozice NPs. Toto doporučení je užitečné pro porovnání chování a toxicity různých typu NPs v konzistentním půdním médiu [48].

1.3.5 Pohyb NPs v půdním prostředí

Pohyb NPs v půdním prostředí je závislý na interakcích mezi částicemi a povrchem půdy. Tato interakce může být ovlivněna podmínkami prostředí a fyzikálně–chemickými vlastnostmi NPs. Obecně lze říci, že faktory ovlivňující stabilitu částic v daném prostředí mají také výrazný vliv na jejich pohyb. Sedimentace a difúze částic bývá způsobena gravitací a Brownovým pohybem částic. Vzhledem k tomu, že částice aglomerují, dochází ke vzrůstu gravitační síly a tím i k častější interakci NPs s povrchy půdních částic. Interakce kovových nanočástic s povrchem půdy závisí na jejich povrchovém náboji. Pokud mají částice i půda podobně nabitý povrch, budou se navzájem odpuzovat, čímž podpoří mobilitu NPs. Naopak v případech opačně nabitých povrchů může docházet k sorpci, čímž se mobilita částic snižuje. Ve studii Pennell a kol. (2008) byly pozorovány pozitivně nabitě Al_2O_3 -NPs (o velikosti 50, 80 a 120 nm), které prokázaly relativně nízkou mobilitu kvůli sorpci na negativně nabitě

povrchy půdních částic. Oproti tomu Al_2O_3 -NPs (50 nm) s naadsorbovaným fosforečnanem, který produkuje záporný náboj, vykazovaly sníženou sorpci na povrchy půdních částic a tím vyšší mobilitu [64].

Pohyblivost NPs v půdě se s rostoucí velikostí částic snižuje, protože větší částice mohou být zadržovány v půdních pórech. Vliv deformace pórů na zadržování částic závisí na podobných faktorech, které ovlivňují aglomeraci NPs (např. pH a iontová síla). Nižší mobilita částic nemusí být pouze důsledkem aglomerace částic ale i chemických podmínek, které podporují sorpci NPs na povrch půdy. Menší částice jsou mnohem pohyblivější a mohou tak pronikat hlouběji do podzemních vod. Na druhou stranu větší částice (aglomeráty) mají tendenci zdržovat se v horních vrstvách půdy, což může způsobovat ucpání pórů [65].

1.4 Modelové organismy

Jedná se o organismy, které se používají nejen pro poznání jich samotných, ale také pro systematické zkoumání a popis určitých biologických jevů, kdy se očekává, že pozorované chování modelového organismu poskytne pohled do fungování ostatních organismů. Aby byl organismus použitelný, musí splňovat určitá kritéria. Těchto kritérií existuje mnoho, patří mezi ně např. dobrá dostupnost, rychlý vývoj, krátký životní cyklus nebo vhodnost užití organismu pro daný test [66].

Enchytraeus cryptus

Pro testování ekotoxicity ZnO-NPs byl využit půdní kroužkovec *Enchytraeus cryptus* z čeledi roupicovití. Jedná se o malé, bělavé červy, kteří se obvykle reprodukují pohlavně. Živí se rozloženými rostlinnými zbytky a mikroorganismy. Většinou se vyskytují v půdách, kde plní důležité funkce ekosystému, mezi které patří zvýšení rozkladu organických látek nebo udržování struktury půdy (tvorba biopórů) [67]. Roupice mají v půdách omezenou schopnost pohybu, žijí v nejsvrchnějších vrstvách půdy (0–10 cm), kde je soustředována organická hmota. Díky tomu mohou být v těsném kontaktu se znečišťujícími látkami, které nepřetržitě vstupují do půdy. Tito máloštětinatci jsou citliví na potenciálně toxické látky přítomné v různých typech půd. Výhodou těchto organismů je snadná manipulace, chov a výrazně kratší životní cyklus než u ostatních druhů. Ačkoli bylo zaznamenáno jejich použití v laboratorních ekotoxikologických testech poprvé přibližně před 40 lety, roupice byly vybrány pro použití ve standardizovaných laboratorních testech teprve před 10 lety, jak je uvedeno ve směrnících ISO 16378 a OECD 220.

Roupice *Enchytraeus* je jediným rodem roupicovitých s druhy vybranými pro ekotoxikologické testy standardizované směrnicemi ISO a OECD (např. *E. albidu*, *E. crypticus*), protože tento rod je považován za typický indikační organismus environmentálního stresu a může být snadno chován v laboratorních podmínkách. *E. crypticus* má výhodu snadné kultivace v agaru a má vysokou reprodukční rychlost a krátký generační čas. Dospělí jedinci tohoto druhu dosahují velikosti mezi 3–12 mm a mají generační čas v agaru přibližně 18 dnů (za teploty 21 °C) [68].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem této práce bylo provést na roupici (*Enchytraeus crypticus*) testy ekotoxicity ZnO-NPs v upraveném agarovém kultivačním médiu. Úprava měla spočívat v přidavku modelových půdních komponent, které mohou mít vliv na biologickou dostupnost nanočástic. Agar byl zvolen z toho důvodu, že umožňuje snadné vnášení nanočástic do kultivačního média, potlačuje jejich aglomeraci a změny stupně aglomerace v průběhu experimentu, zajišťuje dostatečně homogenní rozptýlení nanočástic v médiu a jeho následnou charakterizaci. Přídavek jednotlivých půdních komponent do agaru měl zvýšit environmentální relevanci prováděných testů a umožnit sledování účinků jednotlivých půdních komponent na ekotoxicitu vybraných nanočástic. Před samotným testováním ZnO-NPs bylo nejprve nutné provést akutní test toxicity zinečnatých iontů. Cílem experimentů bylo posoudit možný vliv jednotlivých půdních složek na ekotoxicitu Zn^{2+} iontů ve srovnání se ZnO-NPs.

2.1 Chov modelových organismů

Chov *E. crypticus* byl realizován v plastových Petriho miskách s ventilací (90 x 14,2 mm), které byly naplněny agarem. Agar byl připravován z práškového agaru (Agar přírodní, Dr. Hoffmann), destilované vody a vodných roztoků solí (0,1M $NaHCO_3$; 0,01M KCl ; 0,2M $CaCl_2$; 0,1M $MgSO_4$). Po smíchání všech komponent se následně agar sterilizoval při teplotě cca 120 °C po dobu 30 minut za zvýšeného tlaku v tlakovém hrnci (Barazzoni 5 L, elektrický vařič jednoplotnový ETA 3109). Následně byl v digestoři rozlit do Petriho misek. Agar chladne a tuhne při laboratorní teplotě, dále byly do takto připraveného agaru převedeny roupice. Tyto misky s roupicemi byly uchovávány v termostatu (WTW TS 606 CZ/2) při teplotě 20–21°C. Krmení roupic probíhalo dvakrát do týdne jemně namletými ovesnými vločkami, které se jednou za 2 měsíce sterilizují v sušárně (Memmert UN55 SingleDISPLAY) při teplotě 160–180 °C po dobu 2–6 hodin. Do čerstvého agaru bylo nutné roupice přesazovat jednou až dvakrát za měsíc, dle stavu agaru. Na Obr. 3 je možné vidět snímek chovné nádoby s *E. crypticus* v agaru.



Obrázek 3. Chovná nádoba *Enchytraeus crypticus*, zdroj: vlastní

2.2 Ekotoxikologické testy

Ekotoxikologické testy i testovaná koncentrační řada (50, 100, 250, 500 a 1000 mg ZnO/kg agaru) vychází z diplomové práce Hrdá (2015). Pro testování byl využit bezvodý chlorid zinečnatý p. a. (PENTA s.r.o.) a nanočástice ve formě nanoprášku byly získány od společnosti Bochemie Group, a.s.

V rámci jednotlivých testů byly organismy vždy po dobu 96 hodin vystaveny působení ZnCl_2 a ZnO-NPs v upraveném agarovém médiu. Sledovaným výsledkem testu byla procentuálně vyjádřená korigovaná mortalita, což je mortalita vztažená na mortalitu v kontrolní skupině, její výpočet je uveden v kapitole 3.1.1. Hodnoty LC_{50} byly vypočteny za pomoci programu GraphPad Prism 7 metodou nelineární regrese. Jednotlivé testy byly prováděny v plastových Petriho miskách, které byly naplněny upraveným agarem, vždy ve třech opakováních na jednu koncentraci. K přípravě agarového média byl použit přírodní agar (Dr. Hoffmann)

a destilovaná voda. V průběhu testu byly Petriho misky ponechány v termostatu ve tmě a při teplotě $(21 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Po uplynutí 96 h byly spočítáni živí jedinci, kteří reagovali na mechanickou stimulaci či změnu prostředí (přenesením jedince z agarového média do vody). Zbylé roupice byly považovány za mrtvé.

Pro studium vlivu půdních komponent na ekotoxicitu byl zvolen 1% přídavek písku, 1% přídavek rašeliny, a nakonec kombinace obou půdních složek. Tyto koncentrace byly zvoleny na základě předchozích testů prováděných v rámci diplomové práce Dominiky Novákové (2017), která řešila přídavek kaolinu a huminových kyselin. Výsledky všech testů jsou uvedeny v kapitole 3.1.

2.3 Testy toxicity Zn^{2+} iontů

Před testováním účinků nanočástic byla nejdříve zjišťována toxicita zinečnatých iontů. K tomu byla použita ve vodě dobře rozpustná sůl ZnCl_2 (PENTA, s.r.o.). Nejprve byly testovány koncentrace 50, 100, 250, 500, 1000 mg Zn/kg agaru. Na základě výsledků předběžného testu bylo v dalším kroku zvoleno užší rozmezí koncentrací: 1, 10, 20, 30, 40 mg Zn/kg agaru a test byl proveden znovu. Do Erlenmeyerových baněk byl připraven 1,5% roztok agaru v destilované vodě a ZnCl_2 v množství potřebném k přípravě expozičního média o zvolené koncentraci Zn^{2+} . Následně bylo změřeno pH (pH metr VWR pH110) a pomocí pufru bylo upraveno na hodnotu ± 7 . Na úpravu pH byl využíván nejprve 0,1 M fosfátový pufr ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, LACHEMA a.s.), ale z důvodu nutnosti velkých přídavek tohoto pufru jsme přešli na úpravu pH pomocí NaOH a HCl. Jak bylo zjištěno při předběžných experimentech, vysoké přídávky pufru potřebné k úpravě pH zejména při vysokých koncentracích ZnCl_2 vedly ke zvýšené míře přežívání rousic v těchto půdách, a tedy ke zvratu křivky dávka-účinek. I využití NaOH způsobovalo problém, a to při testech, kdy byla do agaru přidávána rašelina. V tomto případě docházelo k příliš velké úmrtnosti v kontrolní skupině (až 60 %). Při přidavku 1% rašeliny do agaru, jsme tedy využívali k úpravě pH CaCO_3 , díky němuž jsme byli schopni připravit exponované médium s 1% přídávkem rašeliny, a to bez zvýšené mortality v kontrolní skupině. Takto připravené směsi byly na magnetických míchadlech (IKA–RH basic 2) zahřáty a udržovány při teplotě $(95 \pm 5) ^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut. Poté byl agar volně ponechán k vychladnutí na teplotu 30–40 $^\circ\text{C}$ (pro zamezení poklesu přidaných komponent na dno) a rozlito do jednotlivých testovacích nádob. Agarem byla zalita i víčka misek, z důvodu potlačení únikového chování

testovacích organismů. Pro usnadnění pohybu organismů byly do agaru vytvořeny vrypy. Následně byly do testu vybrány roupice s viditelným opaskem, a to vždy dvacet jedinců na jednu testovací nádobu. Tímto způsobem byly účinky Zn^{2+} iontů sledovány ve všech zvolených úpravách agarového média.

2.4 Testy toxicity ZnO-NPs

Nanočástice využívané v testech o čistotě min. 99,5 % byly získány od společnosti Bochemie Group a.s. ve formě nanoprášku. Průměr sférických částic byl výrobcem stanoven na 10 nm, s rozsahem 5–50 nm.

2.4.1 Testy ZnO-NPs v upraveném agarovém médiu

Při provádění testů toxicity ZnO-NPs spočíval postup v přípravě vodné disperze nanočástic a následném přidávání této disperze do horkého agaru. Postup přípravy expozičního média byl přejat z diplomové práce Kateřiny Hrdé z roku 2015 [69]. V této práci bylo zjištěno, že vnášení nanočástic v podobě vodné disperze vede k menší míře aglomerace.

Dle experimentálního zjištění je dosaženo nejlepší velikostní distribuce po 45 minutové sonifikaci koloidního roztoku nanočástic v přítomnosti dispergačního činidla pyrofosforečnanu sodného (0,02% $Na_2P_2O_7 \cdot 10H_2O$). Pro následné testy ZnO-NPs byla zvolena koncentrační řada 50, 100, 250, 500 a 1000 mg Zn/kg agaru. Koncentrační řada pro přípravu agaru s přídavkem písku byla volena na základě předchozí studie Dominiky Novákové (2017), kde byla hodnota LC_{50} v čistém agaru, bez přídavku půdních složek, vypočtena na 14 mg Zn/ kg agaru [70]. Výrazné ovlivnění toxicity v agaru s přídavkem písku oproti čistému agaru nebylo předpokládáno. Přesto zvolený rozsah koncentrační řady v případě testu toxicity s přídavkem 1% písku pokrýval oblast, ve které se pohybovala mortalita v rozmezí 0–100 %.

Příprava expozičního média byla rozdělena do dvou částí. Z celkového objemu destilované vody, byly 2/5 využity na přípravu disperze. K tomuto objemu vody byla převedena polovina navážky dispergačního činidla (0,02% $Na_2P_2O_7 \cdot 10H_2O$). Po jeho rozpuštění byla k objemu převedena i navážka ZnO-NPs a takto připravená disperze byla umístěna na 45 minut do ultrazvukové lázně (Bandelin Sonorex Digitec). Mezitím byl do Erlenmeyerových baněk převeden zbývající objem vody, navážka odpovídajícího množství agaru a druhá polovina dispergačního činidla. Na závěr byla přidána jedna či obě komponenty (1 % písku či rašeliny).

Koncentrace půdních komponent byla opět zvolena na základě testů uvedených v diplomové práci Dominiky Novákové. Dispergační činidlo bylo přidáno i do kontrolních testovacích skupin. Ve všech případech bylo upraveno pH na neutrální hodnotu. Agar byl umístěn na magnetická míchadla a za stálého míchání zahřát na $(95 \pm 5) ^\circ\text{C}$ (Obr. 4). Teplota byla udržována po dobu 15 minut a následovně byla zbývajících 15 minut do agaru po kapkách přidávána disperze ZnO-NPs. Agar byl rozlit do Petriho misek a po ztuhnutí bylo do každé testovací nádoby, včetně kontroly opět vneseno 20 jedinců. Po 96 hodinách byl test vyhodnocen. Koncovým bodem testu (endpointem) byla mortalita.



Obrázek 4 Příprava agaru s přidavkem rašeliny pro testy ekotoxicity ZnO–NPs, zdroj vlastní

K primární charakterizaci koloidů před jejich převedením do agaru byla použita metoda DLS (Brookhaven, ZetaPlus). Byly připraveny koloidy s koncentracemi odpovídajícími 50, 100, 250, 500, 1000 mg Zn/kg po převedení do agaru. Pomocí této metody byl zjištěn hydrodynamický průměr nanočástic. Hydrodynamický průměr NPs se pro danou koncentrační řadu pohyboval mezi hodnotami 226,7–310,9 nm.

Pro sekundární charakterizaci nanočástic v agaru byl využit skenovací/rastovací elektronový mikroskop (SEM), který je vybaven energiově disperzním rentgenofluorescenčním (EDX) mikroanalyzátozem. K analýze bylo připraveno celkem 6 vzorků o koncentracích 50 mg Zn/kg a 1000 mg Zn/kg ve všech třech variantách upraveného agarového média. Vzorky byly připraveny rozlitím agaru mezi sklíčka, dále byly vysušeny a pozlaceny

za účelem zvýšení vodivosti povrchu. Po dobu 6 hodin byly vzorky lyofilizovány za teploty ≤ -50 °C a voda z nich byla sublimována za tlaku ≤ 60 Pa. Poté probíhala analýza těchto vzorků za pomoci rastrovacího elektronového mikroskopu (JEOL JSM-5500LV), který je vybaven rentgenovým energiově disperzním (EDX) mikroanalyzátozem IXRF Systems (detektor GRESHAM Sirius 10). K ověření aglomerace a distribuce částic ve vzorcích byla vyšetřována jak plocha vzorku, tak i pozorované útvary různých velikostí.

2.4.2 Testy toxicity supernatantu ZnO-NPs

Za účelem odlišení toxicity ZnO-NPs a účinků z nich uvolněných Zn^{2+} iontů byl proveden test toxicity supernatantu. Supernatant byl získán odstředěním primárního koloidu ZnO-NPs, který se využívá pro přípravu média o koncentraci 1 000 mg Zn/kg agaru. Na přípravu supernatantu byly z celkového objemu (270 ml) destilované vody použity 2/5. Do tohoto objemu vody bylo převedeno dispergační činidlo (pyrofosforečnan sodný) a po rozpuštění i navážka ZnO-NPs. Nejdříve byla takto vzniklá disperze umístěna na 45 minut do ultrazvukové lázně. Poté následovala centrifugace po dobu 1 hodiny (EPPENDORF, Centrifuge 5804 R, teplota 21 °C, RPM 11000, akcelerace 5, brždění 2). Následně byla suspenze filtrována (Stříkačkové filtry Satorius Minisart, 0,1 μ m). Takto připravený supernatant byl dále přidáván do agaru stejným způsobem, jako disperze nanočástic popsána v kapitole 2.4.1. Test byl proveden ve třech opakování se všemi typy přidávaných komponent. Do kontrolní skupiny byly přidány obě půdní komponenty a pyrofosforečnan sodný.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Testy toxicity Zn²⁺ iontů v agaru s přidavkem písku

Testy toxicity Zn²⁺ iontů v čistém agaru již nebyly v mé práci prováděny. Vycházelo se z předchozích výsledků z práce Nováková (2017), kde byla hodnota LC₅₀ vypočtena pomocí programu GraphPad Prism 5 metodou nelineární regrese. Hodnota LC₅₀ v čistém agaru byla pro *E. crypticus* vypočtena na 14 mg Zn/kg agaru (12,5–15,8).

3.1.1 Toxicita Zn²⁺ iontů v agaru s přidavkem písku

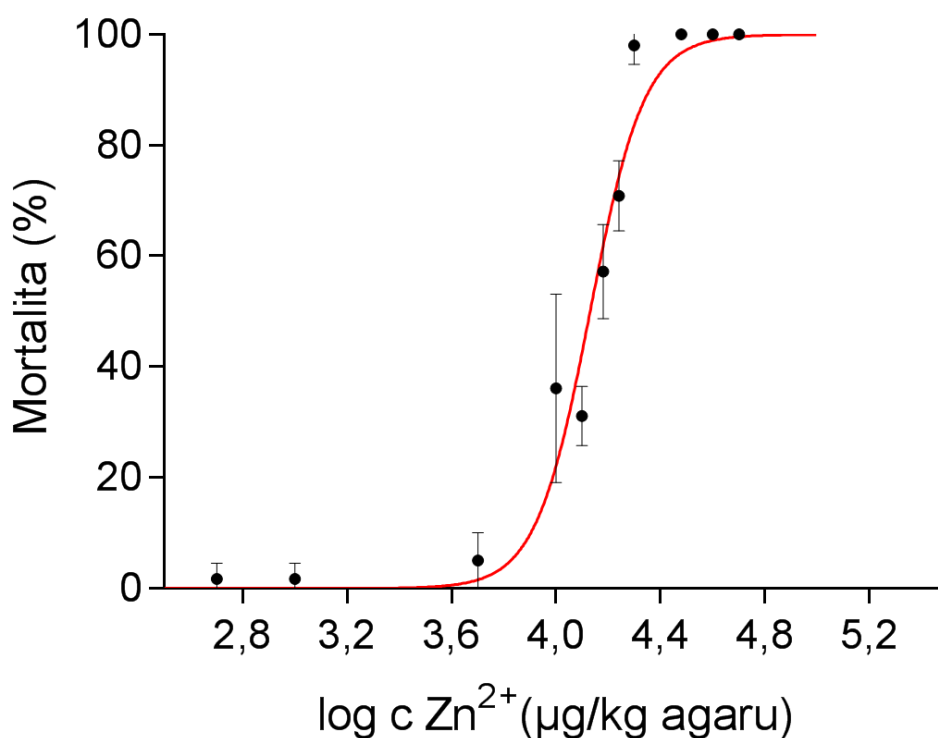
Výsledky testu toxicity pro *E. crypticus* jsou uvedeny v Tab. 3. Během testu byla pozorována zanedbatelná úmrtnost v kontrolní skupině, která nepřesáhla 10 %. Tabulka uvádí korigovanou mortalitu (%), která byla vypočítána dle rovnice:

$$\text{Korigovaná mortalita (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{počet živých jedinců v testované koncentraci}}{\text{počet živých jedinců v kontrolní skupině}} * 100 \right)$$

Tabulka 3 Korigovaná mortalita rouspic (%) v jednotlivých koncentracích po 96 hodinové expozici ZnCl₂ ve třech opakování s přidavkem písku

Opak.	Koncentrace Zn (mg/kg agaru)					
	1	10	12,5	15	17,5	20
1	0	24	25	55	65	95
2	0	30	35	50	70	100
3	5	29	33	67	78	100
Průměr	2	28	31	57	71	98
SD	3	4	5	9	6	3

S využitím získaných dat byla pomocí programu GraphPaD 7 (modul nelineární regrese) sestrojena křivka dávka-účinek popisující vliv Zn²⁺ iontů na mortalitu *E. crypticus*. Tato křivka je znázorněna na Obr.5 Vypočtená hodnota koeficientu determinace R² byla 0,9579. Hodnota LC₅₀ vypočtená tímto modulem byla 14 mg Zn/kg (12,9–15,1) upraveného kultivačního média – agaru, do kterého bylo přidáno 1 % písku.



Obrázek 5 Křivka dávka-účinek pro *E. crypticus* po 96 hodinové expozici Zn²⁺ ionty v agaru s přidavkem písku

Na základě výsledků testované koncentrační řady, je možné učinit závěr, že písek neměl žádný vliv na toxicitu Zn²⁺ iontů. Výsledek (14 mg Zn/ kg agaru) pro agar s přidavkem písku byl totožný s výsledkem testu toxicity pro čistý agar, který prováděla Dominika Nováková.

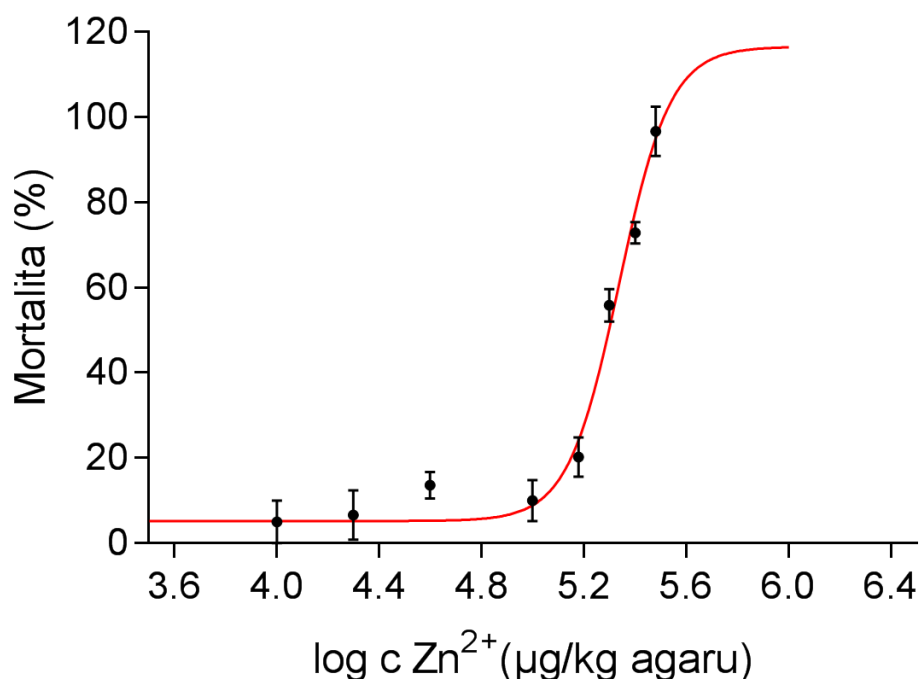
3.1.2 Toxicita Zn²⁺ iontů v agaru s přidavkem rašeliny

Výsledky testů toxicity Zn²⁺ iontů v upraveném agarovém médiu, jehož úprava spočívala v přidavku 1% rašeliny, jsou zobrazeny v Tab. 4. Úmrtnost v kontrolní skupině nepřesáhla 10 %.

Tabulka 4 Korigovaná mortalita roupic (%) v jednotlivých koncentracích po 96 hodinové expozici $ZnCl_2$ v agaru s 1% přídatkem rašeliny

Opak.	Koncentrace Zn (mg/kg agaru)					
	10	50	100	200	250	300
1	10	10	15	53	74	100
2	0	15	20	55	75	100
3	5	15	15	60	70	90
Průměr	5	13	17	56	73	97
SD	5	3	3	4	3	6

Aby bylo možné stanovit hodnotu LC_{50} , bylo zapotřebí rozšířit koncentrační řadu. Z výsledků uvedených v Tab. 4 je patrné, že přídatek 1% rašeliny do agarového média výrazně snížil toxicitu Zn^{2+} iontů pro *E. crypticus*. Na Obr. 6 je zobrazena křivka dávka-účinek popisující vliv Zn^{2+} iontů na mortalitu *E. crypticus* v agaru s přídatkem 1% rašeliny. Vypočtená hodnota koeficientu determinace R^2 byla 0,9717. Hodnota LC_{50} byla 217,8 mg Zn/kg agaru (192,3–331,6).



Obrázek 6 Křivka dávka-účinek pro *E. crypticus* po 96 hodinové expozici Zn^{2+} iontů v agaru s přídatkem rašeliny

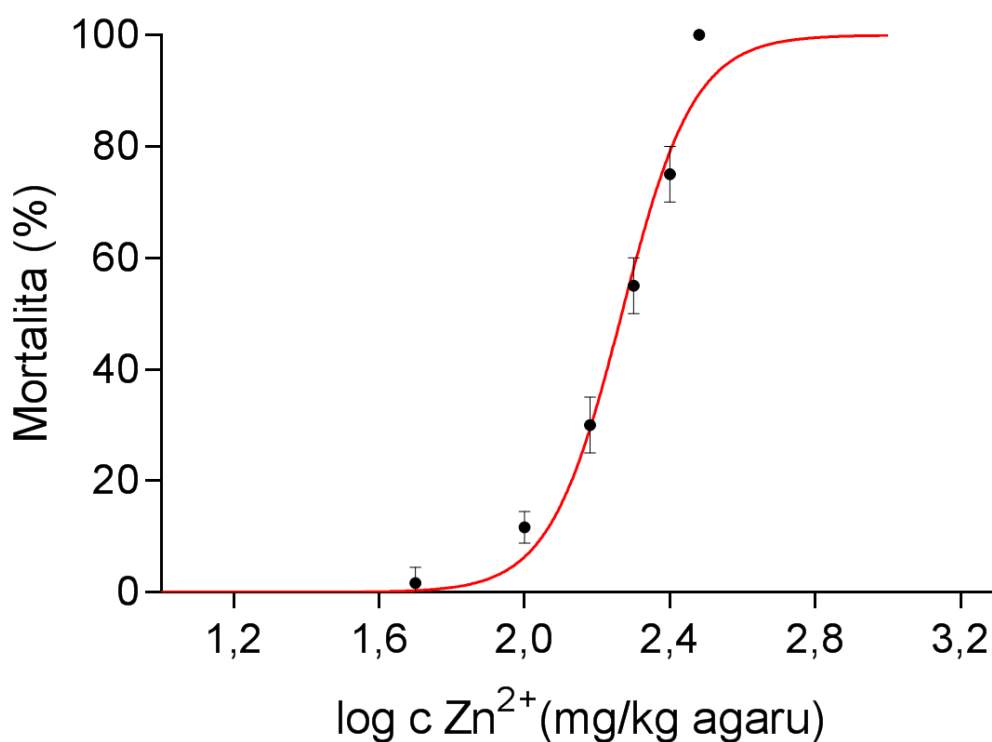
3.1.3 Toxicita Zn^{2+} iontů v agaru s přidavkem obou komponent

Výsledky testů toxicity Zn^{2+} iontů v agaru s přidavkem obou komponent jsou uvedeny v Tab. 5. Úmrtnost v kontrolní skupině byla opět zanedbatelná a nepřesáhla 10%.

Tabulka 5 Korigovaná mortalita rouspic (%) v jednotlivých koncentracích po 96 hodinové expozici $ZnCl_2$ v agaru s 1% přidavkem rašeliny i písku

Opak.	Koncentrace Zn (mg/kg agaru)					
	50	100	150	200	250	300
1	0	15	35	55	80	100
2	5	10	25	50	75	100
3	0	15	30	60	70	90
Průměr	2	13	30	55	75	98
SD	3	3	5	5	5	6

Stejně jako v případě přidavku rašeliny došlo i v těchto testech k výraznému snížení toxicity zinečnatých iontů. Na Obr. 7 je zobrazena křivka dávka-účinek popisující vliv Zn^{2+} iontů na mortalitu *E.crypticus* v agaru s přidavkem 1% písku i rašeliny. Vypočtená hodnota koeficientu determinace R^2 byla 0,9747. LC_{50} bylo 185 mg Zn/kg upraveného agaru (176,3–193,6).

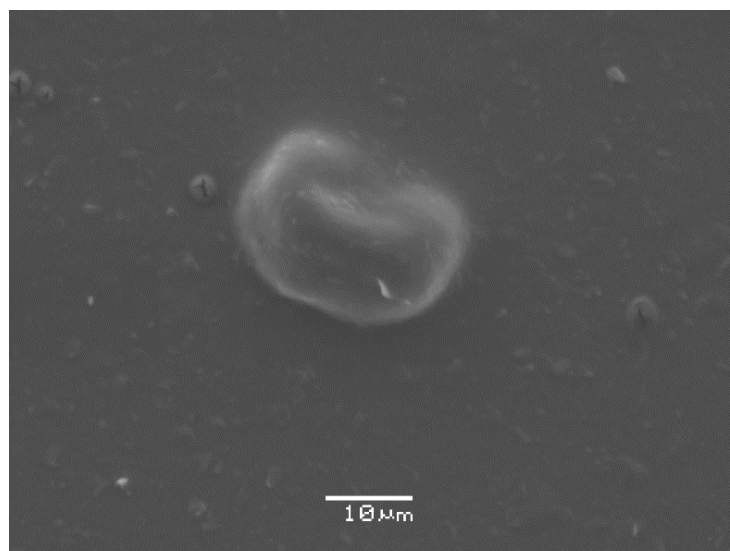


Obrázek 7 Křivka dávka-účinek pro *E. crypticus* po 96 hodinové expozici Zn²⁺ ionty v agaru s přidavkem rašeliny i písku

3.2 Testy toxicity ZnO-NPs v agaru s přidavkem písku

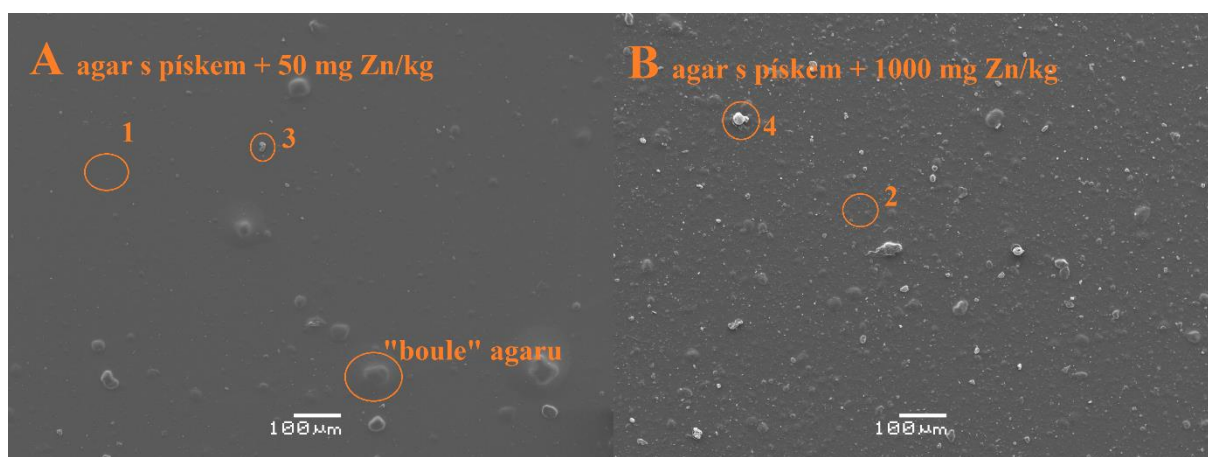
3.2.1 Charakterizace ZnO-NPs v upraveném agaru s přidavkem písku

Charakterizovány byly dvě koncentrace z každého prostředí, a to 50 mg Zn/kg agaru a 1000 mg Zn/kg agaru. Ve vzorku agaru s přidavkem písku bylo možné pozorovat tzv. „boule“ agaru, viz Obr. 8. Pomocí EDX bylo zjištěno, že tyto „boule“ agaru neobsahují téměř žádný zinek.

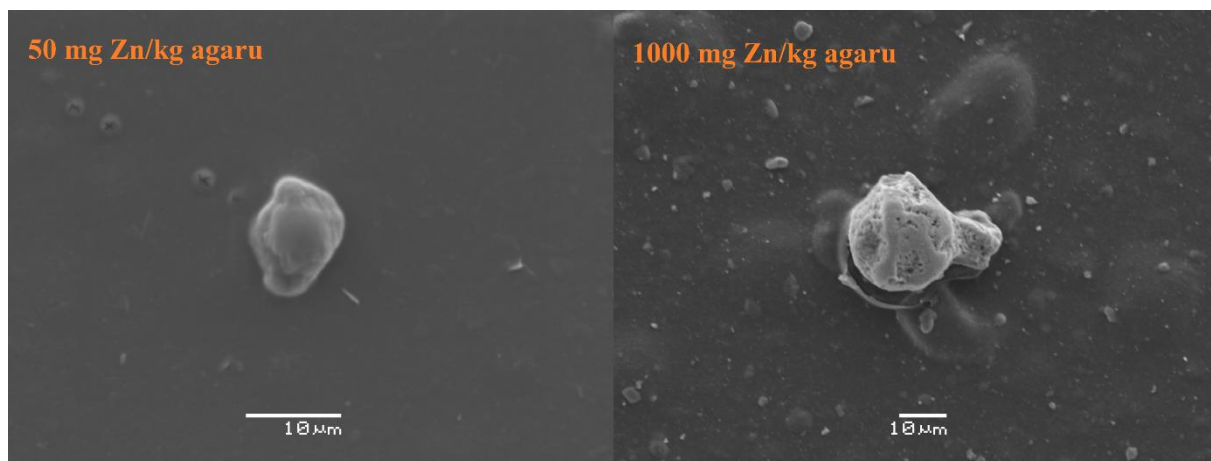


Obrázek 8 Snímek SEM zobrazující tzv. „bouli“ agaru

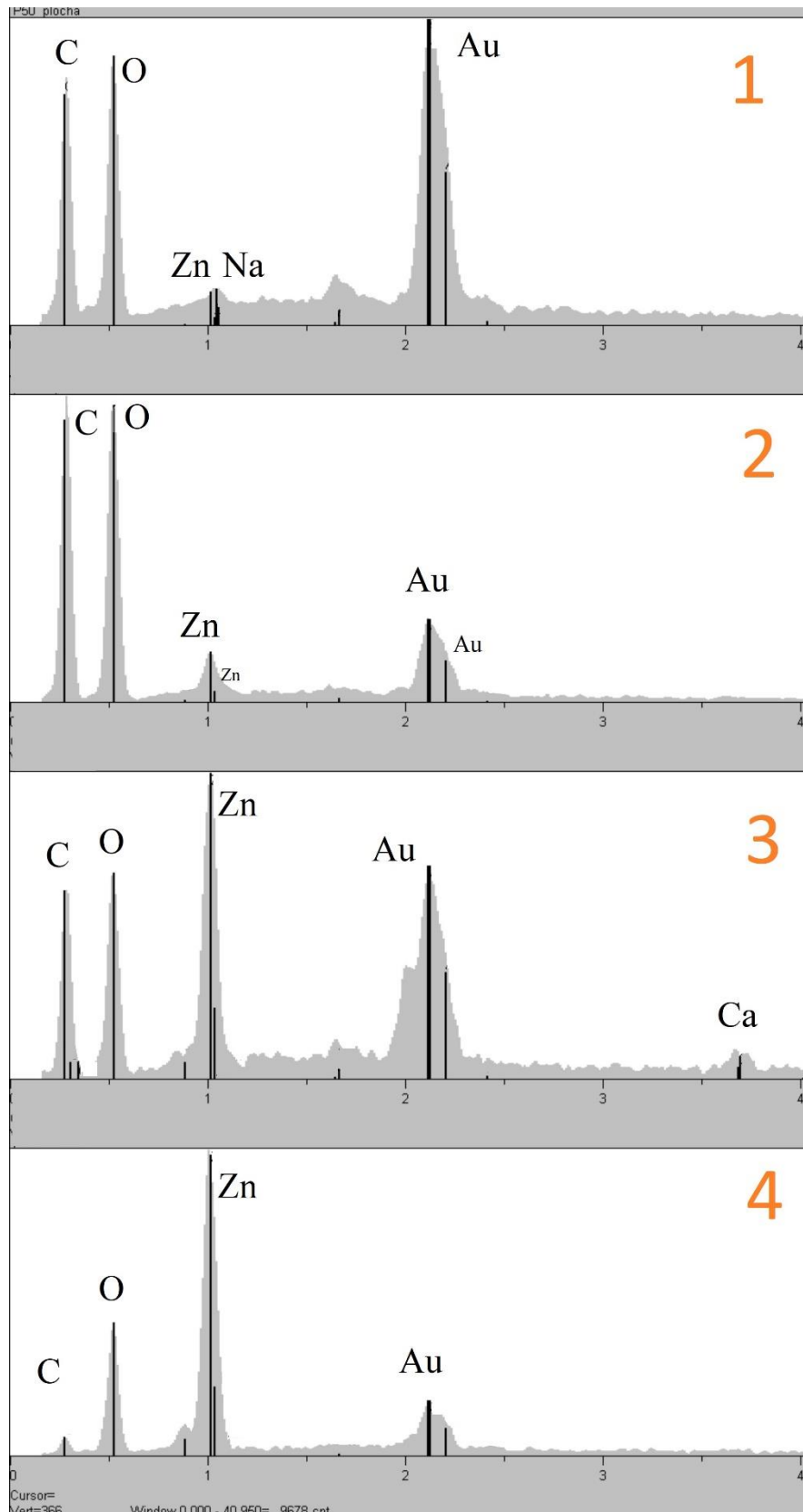
V případě agaru obsahujícího písek bylo u obou koncentrací možné pozorovat aglomeráty ZnO-NPs. Přítomnost Zn v útvarech označených čísly 3 a 4 na Obr. 9 potvrzuje intenzita čar zinku v rentgenofluorescenčních spektrech získaných metodou EDX – spektra 3 a 4 Obr. 11. Aglomeráty ZnO-NPs o velikosti v řádu 10 μm zobrazené pomocí SEM je možné vidět na Obr. 10. Také v bodech 1 a 2 na Obr. 9 bylo možné detekovat Zn. Poměr čar Zn, C a O ve spektrech 1 a 2 na Obr. 11 umožňuje formulovat závěr, že neaglomerované ZnO-NPs jsou rovnoměrně dispergovány v celém objemu agaru. V jednotlivých spektrech u všech modifikacích agaru je možné vidět čáry zlata, které bylo použito k pozlacení vzorků za účelem zvýšení vodivosti povrchu.



Obrázek 9 Snímky agaru s pískem s koncentracemi nanočástic 50 a 1000 mg Zn/kg agaru pořizené SEM

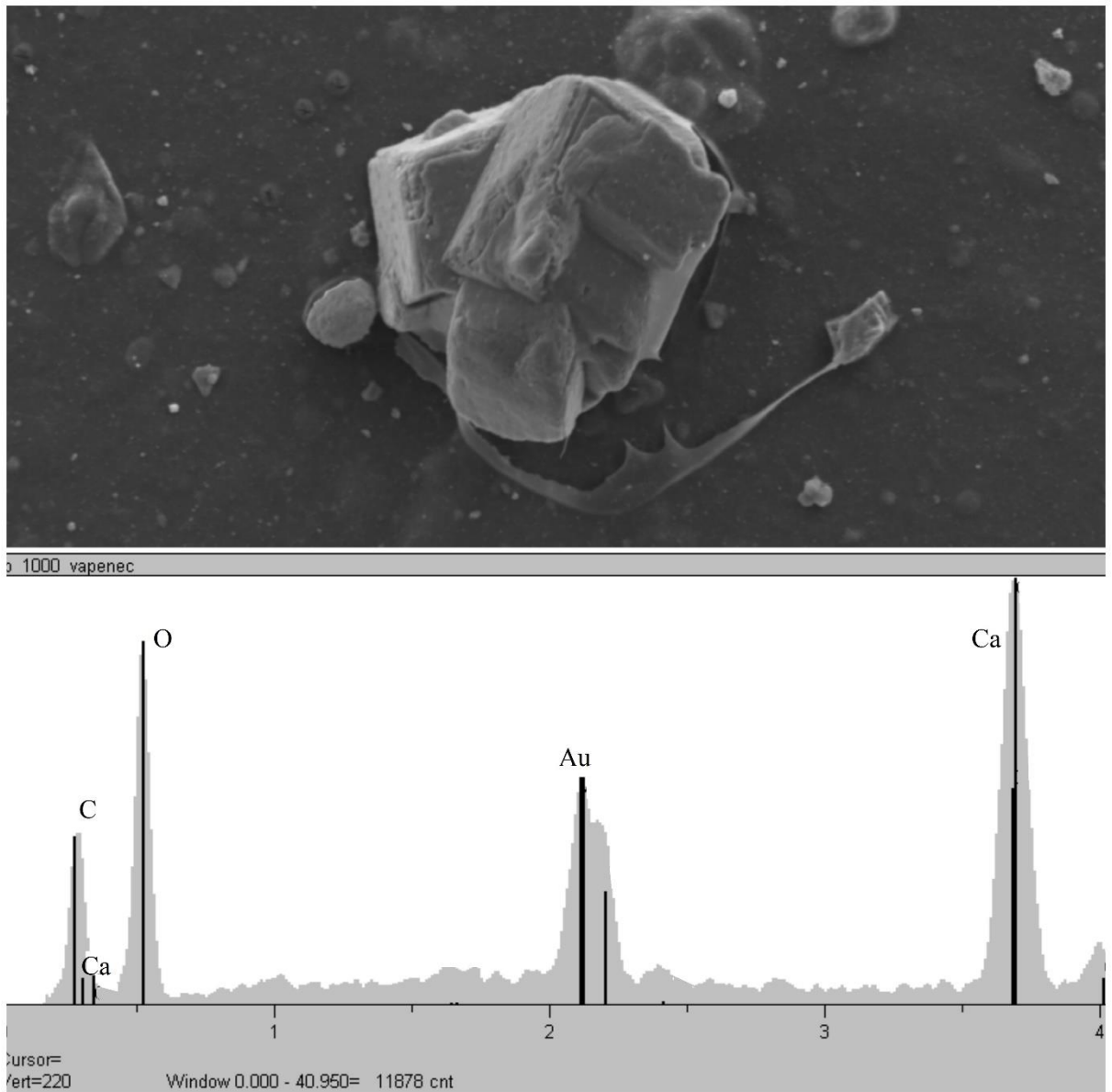


Obrázek 10 Snímky SEM zobrazující zvětšené útvary částic při koncentraci 50 a 1000 mg Zn/kg agaru



Obrázek 11 Výstupy z EDX analýzy s příklady spekter analyzovaných útvarů: (1) plocha (50 mg/kg agaru), (2) plocha (1000 mg/kg agaru), (3) částice NPs (50 mg/kg agaru), (4) částice NPs (1000 mg/kg agaru)

Na Obr. 12 můžeme vidět částici uhličitanu vápenatého, který byl při testech využit jako pufr. Jeho použití a případné obalení částic by mohlo mít za následek snížení biodostupnosti NPs. Ze spektra na obrázku můžeme vidět intenzitu čar vápníku v porovnání se zinkem, který nebyl v případě tohoto útvaru detekovatelný.



Obrázek 12 Snímky agaru s uhličitanem s koncentrací nanočástic 1000 mg Zn/kg agaru pořizení SEM a výstup z EDX analýzy této částice

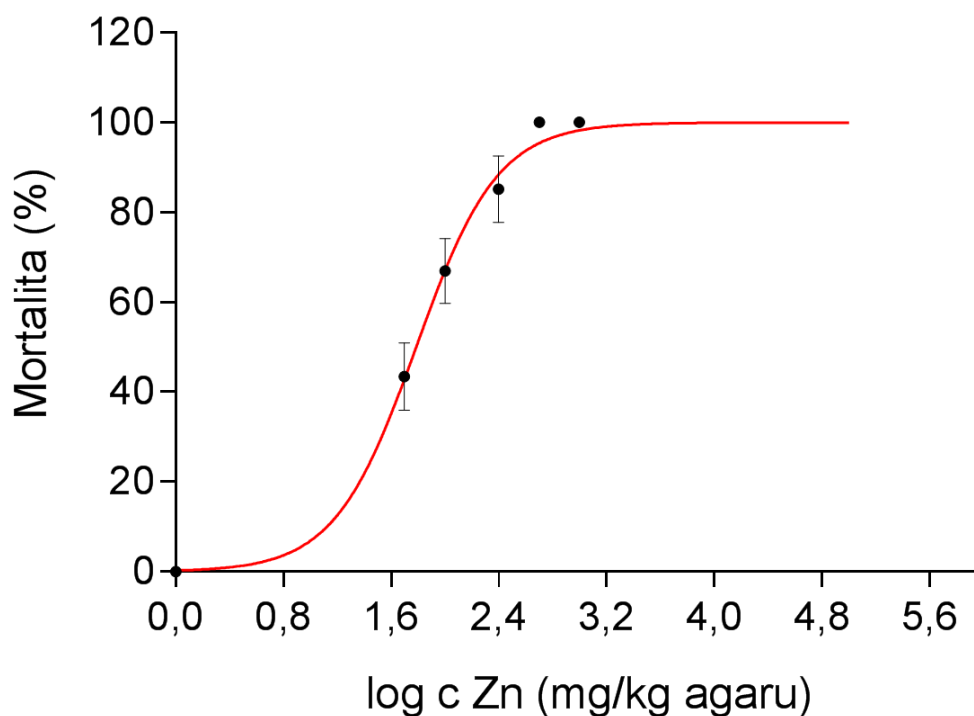
3.2.2 Toxicita ZnO-NPs v agaru s přidavkem písku

Výsledky testu toxicity ZnO-NPs pro *E. crypticus* v agaru s přidavkem písku jsou uvedeny v Tab. 6. Úmrtnost v kontrolní skupině byla zanedbatelná a nepřesáhla 10 %. Korigovaná mortalita byla ve všech případech vypočtena pomocí rovnice uvedené v kapitole 3.1.

Tabulka 6 Korigovaná mortalita roupic (%) v jednotlivých koncentracích po 96 hodinové expozici ZnO-NPs v agaru s 1% přidavkem písku

Opak.	Koncentrace Zn (mg/kg agaru)				
	50	100	250	500	1000
1	50	61	89	100	100
2	35	65	77	100	100
3	45	75	90	100	100
Průměr	43,4	66,9	85,1	100	100
SD	7,5	7,2	7,5	0	0

Hodnoty LC₅₀ byly ve všech případech vypočteny pomocí modulu nelineární regrese v programu GraphPad Prism 7. Na Obr. 13 je znázorněna křivka dávka-účinek pro *E. crypticus*. Hodnota koeficientu determinace R² byla 0,981. Hodnota LC₅₀ pro půdního kroužkovce *E. crypticus* byla v tomto případě 61,1 mg Zn/kg agaru (52,3–69,7).

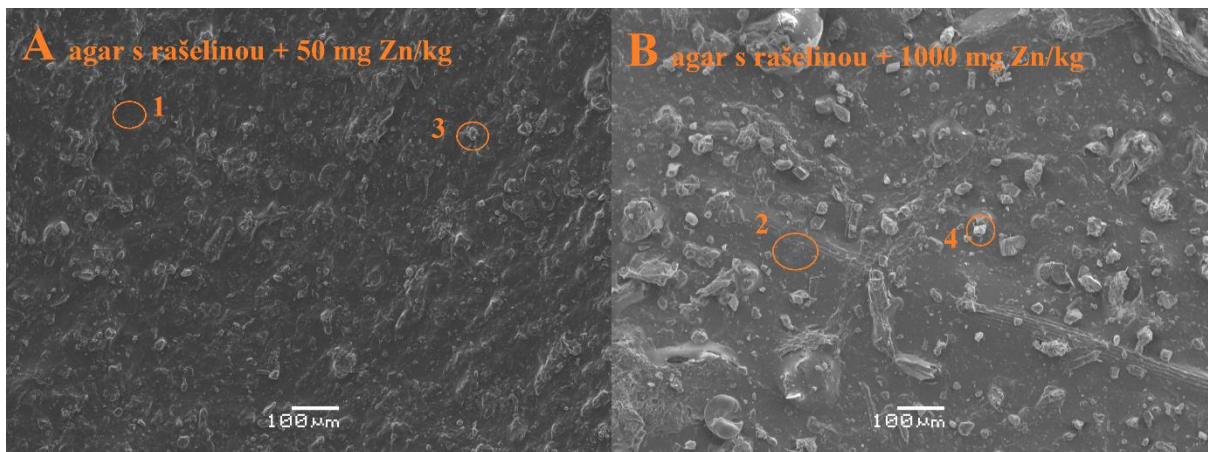


Obrázek 13 Křivka dávka-účinek pro *E. crypticus* po 96 hodinové expozici ZnO-NPs v agaru s přidavkem písku

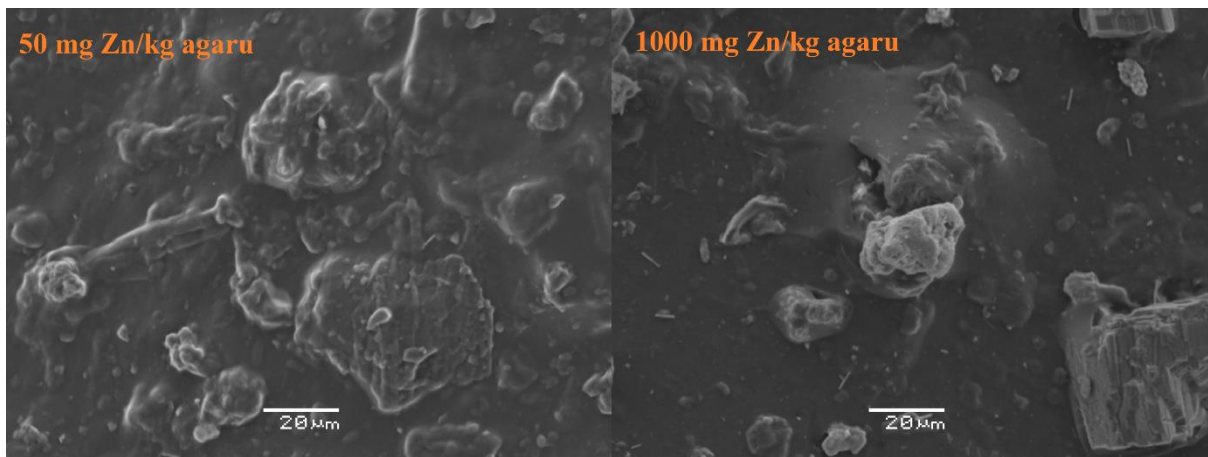
3.3 Testy toxicity ZnO-NPs v agaru s přidavkem rašeliny

3.3.1 Charakterizace ZnO-NPs v upraveném agaru s přidavkem rašeliny

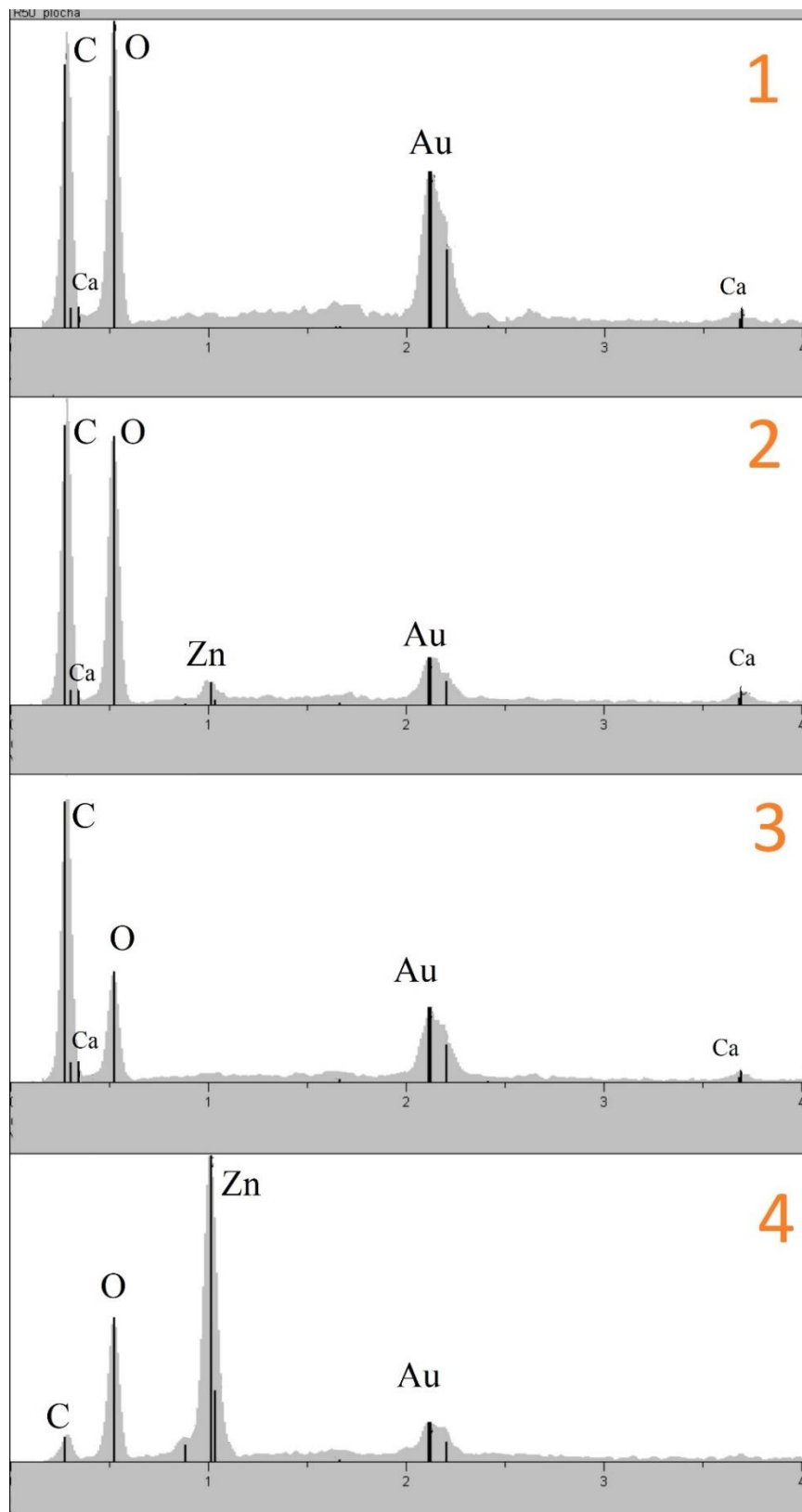
V agaru s přidavkem 1% rašeliny bylo možné pozorovat strukturu rašeliny a různě velké útvary aglomerátů ZnO-NPs. Přítomnost Zn v útvarech označených čísly 3 a 4 na Obr. 14 potvrzuje intenzita čar zinku v rentgenofluorescenčních spektrech 3 a 4 na Obr. 16. Aglomeráty ZnO-NPs o velikosti v řádu 20 μm zobrazované pomocí SEM je možné vidět na Obr.15. V bodech 1 a 2 na Obr. 14 nebyl detekován téměř žádný zinek. Poměr čar Zn, C a O ve spektru 2 na Obr. 16 umožňuje formulovat závěr, že neaglomerované ZnO-NPs jsou rovnoměrně dispergovány v celém objemu agaru. Ve většině případů se však jednalo pouze o útvary rašeliny nebo o částice vápence, který byl použit k úpravě pH.



Obrázek 14 Snímky agaru s rašelinou s koncentracemi nanočástic 50 a 1000 mg Zn/kg agaru pořizené SEM



Obrázek 15 Snímky SEM zobrazující zvětšené útvary částic rašeliny a aglomerátů ZnO-NPs při koncentraci 50 a 1000 mg Zn/kg agaru



Obrázek 16 Výstupy z EDX analýzy s příklady spekter analyzovaných útvarů: (1) plocha (50 mg/kg agaru), (2) plocha (1000 mg/kg agaru), (3) částice rašeliny (50 mg/kg agaru), (4) částice NPs (1000 mg/kg agaru)

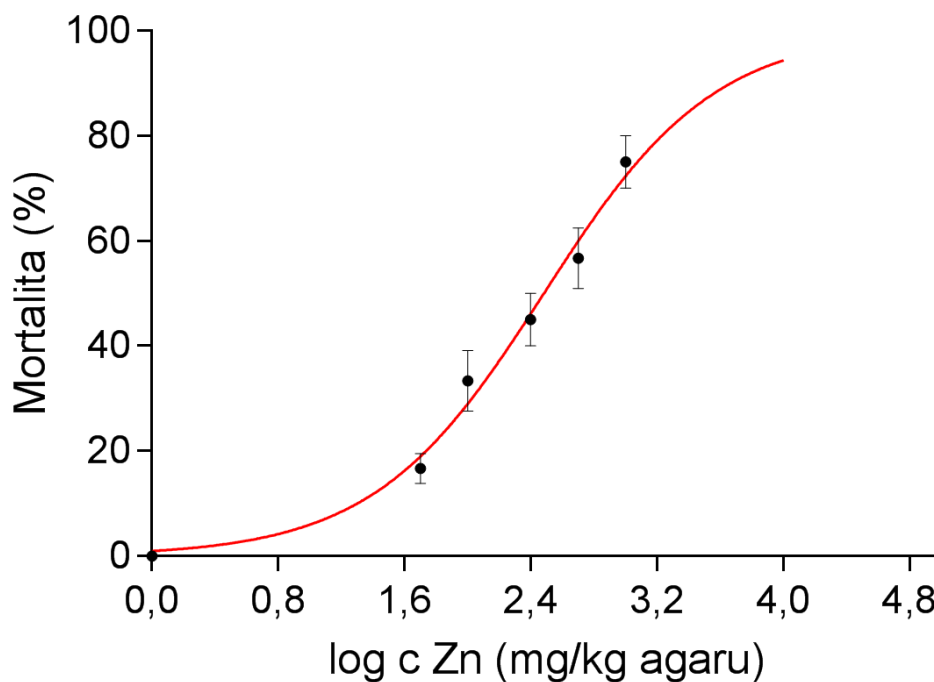
3.3.2 Toxicita ZnO-NPs v agaru s přidavkem rašeliny

Výsledky testu toxicity pro *E. crypticus* v upraveném agaru s přidavkem rašeliny jsou zobrazeny v Tab. 7. Úmrtnost v kontrolní skupině byla v tomto případě nulová a v žádné testované koncentraci nebyla pozorována 100% mortalita.

Tabulka 7 Korigovaná mortalita roupic (%) v jednotlivých koncentracích po 96 hodinové expozici ZnO-NPs v agaru s 1% přidavkem rašeliny

Opak.	Koncentrace Zn (mg/kg agaru)				
	50	100	250	500	1000
1	15	30	50	60	70
2	15	40	45	50	75
3	20	30	40	60	80
Průměr	17	33	45	57	75
SD	5	6	5	6	5

Na Obr. 17 je zobrazena křivka dávka-účinek zobrazující vliv ZnO-NPs na mortalitu testovacího organismu. Hodnota koeficientu determinace R^2 byla 0,9661. Hodnota LC_{50} v agaru s přidavkem rašeliny byla 304 mg Zn/kg agaru (260–357).

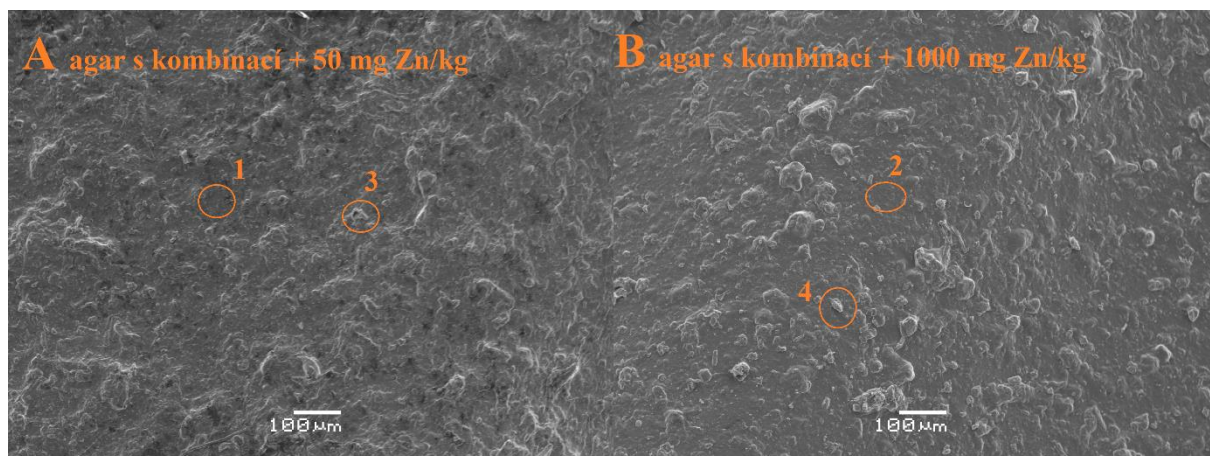


Obrázek 17 Křivka dávka-účinek pro *E. crypticus* po 96 hodinové expozici ZnO-NPs v agaru s přidavkem rašeliny

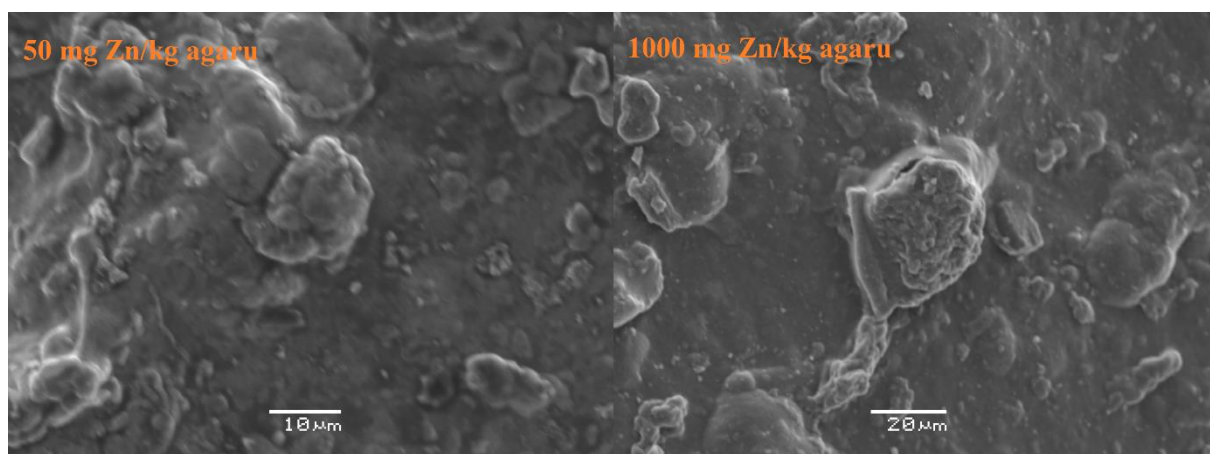
3.4 Testy toxicity ZnO-NPs v agaru s přidavkem písku a rašeliny

3.4.1 Charakterizace ZnO-NPs v agaru s přidavkem písku a rašeliny

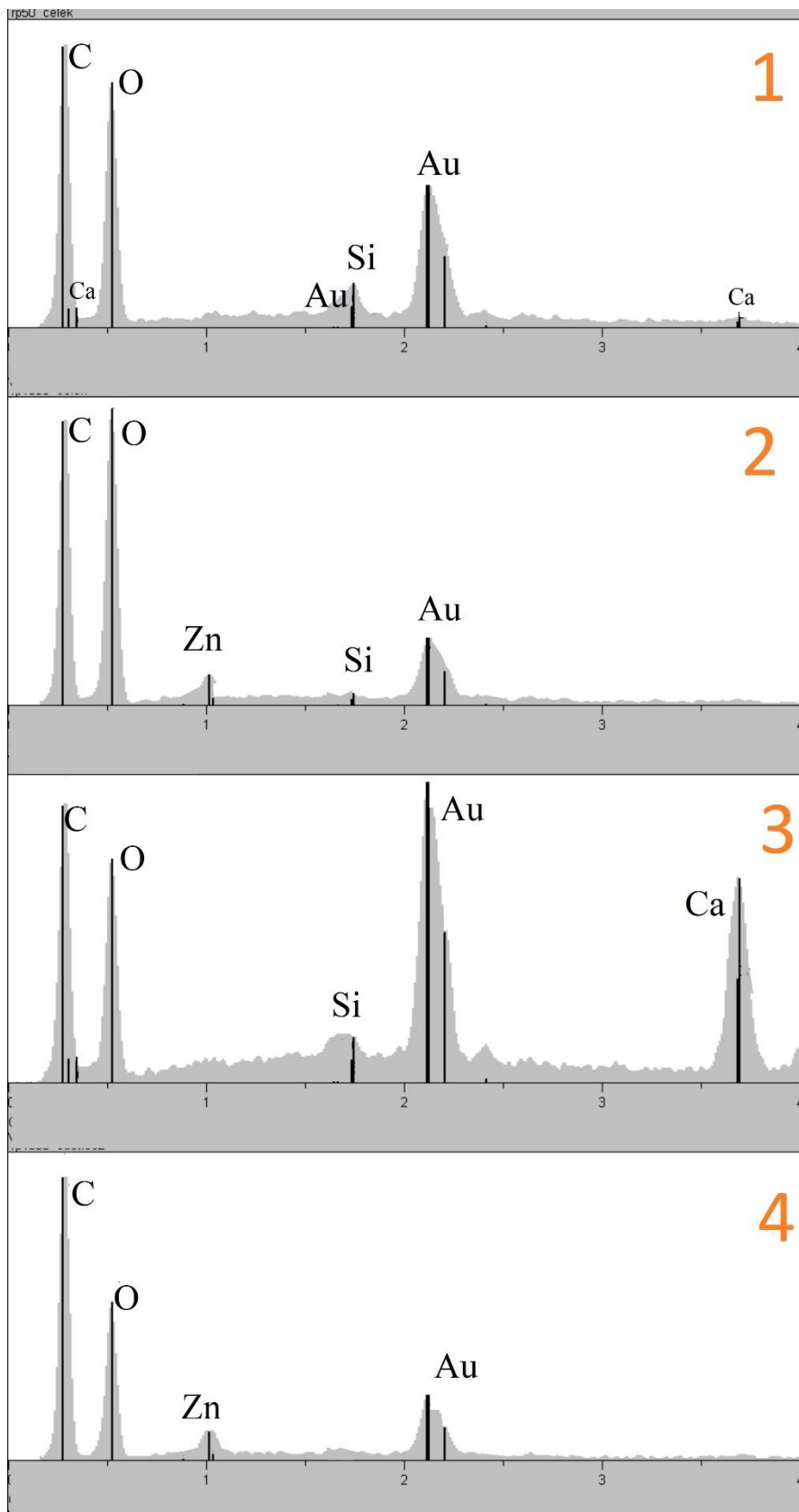
V agaru, který obsahuje kombinaci testovaných komponent (písek i rašelinu) bylo pozorováno podobné chování ZnO-NPs jako v případě agaru s přidavkem rašeliny. Přítomnost Zn v útvarech označených 3 a 4 na Obr. 18 potvrzuje intenzita čar zinku v rentgenofluorescenčních spektrech 3 a 4 Obr. 20. Pozorované útvary byly opět tvořeny převážně rašelinou a ze spektra 2 (Obr. 20) vyplývá, že ZnO-NPs byly detekovány v celém objemu agaru. V tomto případě nebyly nalezeny téměř žádné aglomeráty ZnO-NPs. Na Obr. 19 je možné vidět útvary agaru s rašelinou, jimž odpovídají spektra 3 a 4 (Obr. 20). Ve srovnání s agarem s přidavkem písku zde tedy nedocházelo k významné tvorbě aglomerátů.



Obrázek 18 Snímky agaru s pískem a rašelinou s koncentracemi nanočástic 50 a 1000 mg Zn/kg agaru pořízené SEM



Obrázek 19 Snímky SEM zobrazující zvětšené útvary částic při koncentraci 50 a 1000 mg Zn/kg agaru



Obrázek 20 Výstupy z EDX analýzy s příklady spekter analyzovaných útvarů: (1) plocha (50 mg/kg agaru), (2) plocha (1000 mg/kg agaru), (3) útvary agaru a rašeliny (50 mg/kg agaru), (4) částice NPs (1000 mg/kg agaru)

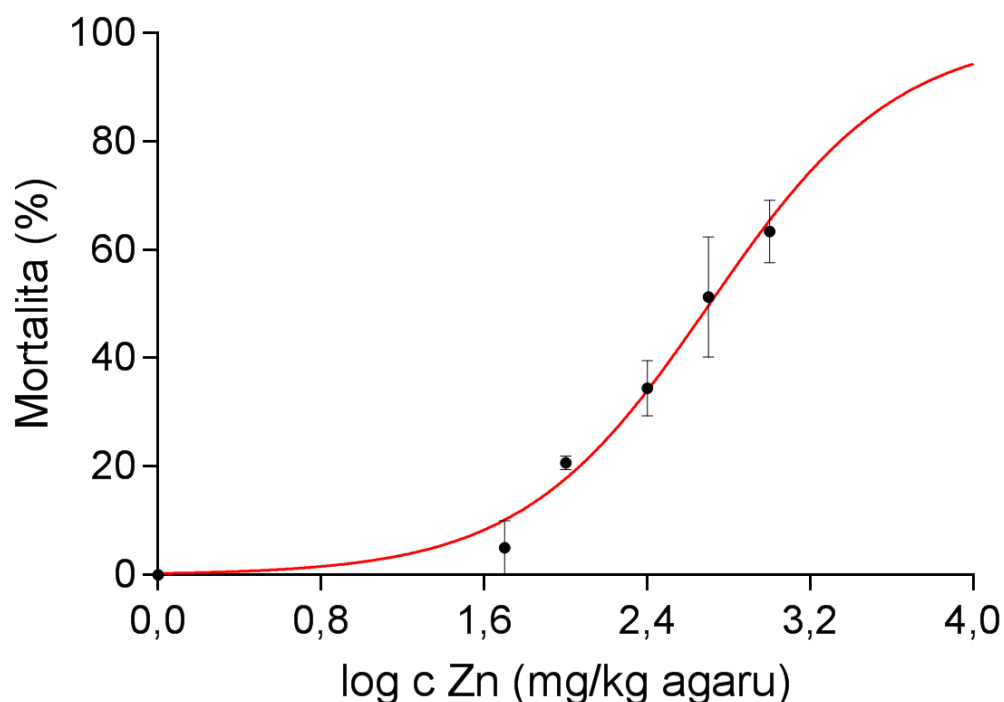
3.4.2 Toxicita ZnO-NPs v agaru s přidavkem písku a rašeliny

Výsledky testu toxicity ZnO-NPs v agaru s přidavkem písku a rašeliny jsou uvedeny v Tab. 8. Úmrtnost v kontrolní skupině byla zanedbatelná a nepřekročila 10 %. Během testování nebyla v žádné z koncentrací pozorována 100% úmrtnost, stejně jako v předchozím testu, kde byla do agaru přidávána rašelina.

Tabulka 8 Korigovaná mortalita rouspic (%) v jednotlivých koncentracích po 96 hodinové expozici ZnO-NPs v agaru s 1% přidavkem písku a rašeliny

Opak.	Koncentrace Zn (mg/kg agaru)				
	50	100	250	500	1000
1	10	20	30	55	60
2	5	20	40	60	70
3	0	22	33	39	60
Průměr	5	21	34	51	63
SD	5	1	5	11	6

Na Obr. 21 je zobrazena křivka dávka–účinek popisující vliv ZnO-NPs na mortalitu testovacího organismu. Hodnota koeficientu determinace R byla 0,9455. Výsledná hodnota LC₅₀ pro *E. crypticus* byla v agaru s přidavkem obou komponent 508,7 mg Zn/kg agaru (426,6–620).



Obrázek 21 Křivka dávka–účinek pro *E. crypticus* po 96 hodinové expozici ZnO-NPs v agaru s přidavkem rašeliny a písku

3.5 Testy toxicity supernatantu ZnO-NPs

Výsledky testů toxicity supernatantu z koloidního roztoku ZnO-NPs v jednotlivých typech úprav agarového média jsou zobrazeny v Tab. 9. Koncentrace Zn v supernatantu byla změřena pomocí optické emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu (ICP–OES) a dosahovala hodnoty 22,8 mg Zn/l. Po přidání supernatantu do agaru byla jeho výsledná koncentrace přepočítána na 8,15 mg Zn/kg agaru. Skutečné koncentrace naměřené metodou ICP–OES byly: pro písek 8 mg/kg, pro rašelinu 7,3mg/kg a pro kombinaci obou komponent 7,7mg/kg. Nejvyšší mortalita byla pozorována v agaru s přidavkem písku, ale nejednalo se o značné rozdíly oproti ostatním modifikacím agaru. Úmrtnost kontrolní skupiny byla zanedbatelná a nepřesáhla 5 %.

Tabulka 9 Korigovaná mortalita (%) *E. crypticus* v jednotlivých modifikacích agaru při koncentraci 8,15 mg Zn/kg agaru

modifikace agaru

Opak.	Písek	Rašelina	Kombinace
1	20	5	15
2	15	10	15
3	15	11	5
Průměr	17	9	12
SD	3	3	6

Při porovnání výsledků tohoto testu s testy toxicity Zn^{2+} iontů je možné vidět, že u supernatantu byla mortalita nižší v agaru s přidavkem písku. Naopak kombinace obou komponent vykazovaly mírně vyšší míru toxicity v testech se supernatantem oproti testům se Zn^{2+} ionty. V případě agaru s přidavkem rašeliny bylo dosaženo srovnatelných výsledků jak u Zn^{2+} iontů, tak i u supernatantu, kdy se mortalita výrazně nelišila. Porovnání mortalit v jednotlivých testech se Zn^{2+} ionty a se supernatantem je uvedeno v Tab. č.10.

Tabulka 10 Srovnání korigovaných mortalit pro Zn^{2+} a supernatant v upraveném agaru s přidavky půdních komponent

	koncentrace mg Zn/kg	médium	Korigovaná mortalita (%)	SD (%)
Zn²⁺	10	agar + písek	28	4
	10	agar + rašelina	5	5
	50	agar + kombinace	2	3
Supernatant	8,15	agar + písek	17	3
		agar + rašelina	9	3
		agar + kombinace	11	6

Rozdíl v toxicitě Zn^{2+} iontů a Zn^{2+} iontů pocházejících ze supernatantu mohl být způsoben odstředováním, kdy v supernatantu mohly zůstat některé ZnO-NPs. Vyšší toxicitu Zn^{2+} ionty ze supernatantu vykazovaly zejména v modifikaci agaru s rašelinou a obou komponent. Pro získání přesnějších výsledků a zjištění míry podílu NPs v supernatantu by bylo třeba provést

analýzu pomocí SEM. V mé studii nebylo možné analyzovat vzorky supernatantu pomocí SEM a to především z časových a finančních důvodů.

3.6 Porovnání toxicity Zn^{2+} iontů a ZnO-NPs v jednotlivých typech upraveného agarového média

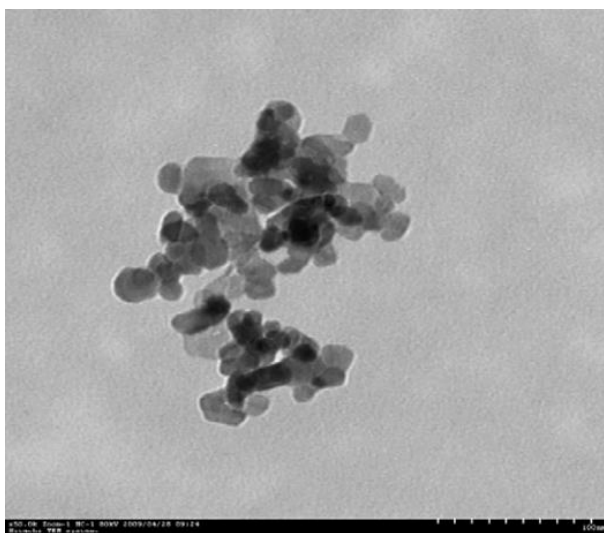
Z analýzy pomocí SEM plyne, že v agaru s přidavkem rašeliny nedocházelo ke vzniku pozorovatelných aglomerátů ZnO-NPs. V agaru s přidavkem písku byly naopak nalezeny aglomeráty ZnO-NPs, které nebyly dispergované v celém objemu. V případě média s přidavkem obou půdních komponent byly zjištěny téměř srovnatelné výsledky i chování NPs jako v agaru s přidavkem rašeliny. LC_{50} pro agar s přidavkem písku bylo vypočteno z křivky dávka-účinek na 14,045 mg Zn/kg, což je hodnota srovnatelná s výsledky z čistého agaru bez přidavku půdních komponent. Při porovnání hodnot LC_{50} je možné vyvodit závěr, že Zn^{2+} ionty jsou pro testovaný organismus *E. crypticus* značně toxičtější než ZnO-NPs. Srovnání hodnot LC_{50} je zobrazeno v Tab. 11.

Tabulka 11 Vypočtené hodnoty LC_{50} pro *E. crpyticus* v jednotlivých úpravách agaru při testech se Zn^{2+} ionty a ZnO-NPs

	Médium	LC_{50} (mg Zn/kg agaru)
ZnCl₂	agar + písek	14
	agar + rašelina	194
	agar + písek + rašelina	185
ZnO-NPs	agar + písek	61
	agar + rašelina	304
	agar + písek + rašelina	509

Grillo et al. (2015) ve své studii uvádí že přírodní organické látky, jako jsou huminové látky, snižují agregaci NPs, čímž dochází ke zvýšení jejich stability a za určitých okolností může dojít i ke zvýšení či snížení jejich toxicity v závislosti na charakteru daného prostředí. Půdy s rozdílnými fyzikálně–chemickými vlastnostmi mohou významným způsobem ovlivnit výslednou toxicitu NPs pro půdní organismy [71]. Vzhledem k malé dostupnosti studií o testování ekotoxicity ZnO-NPs na půdních organismech uvádím pro srovnání údaje získané během testování v různých mediích.

Lian-Zhen, et al. (2011) ve své studii prováděli testy ekotoxicity ZnO-NPs na žížale *Eisenia foetida*. Jako expoziční médium byl využit agar, filtrační papír a filtrační papír s huminovými kyselinami (HA). ZnO byl ve formě nanoprášku s čistotou min. 99,9 % a průměrem 30 ± 5 nm. Testováno bylo celkem pět koncentrací v rozmezí 1–1000 mg ZnO/kg. Velikost a morfologie částic byla charakterizována pomocí H-600 TEM. Na Obr. 22 je snímek TEM zobrazující nanočástice ZnO.

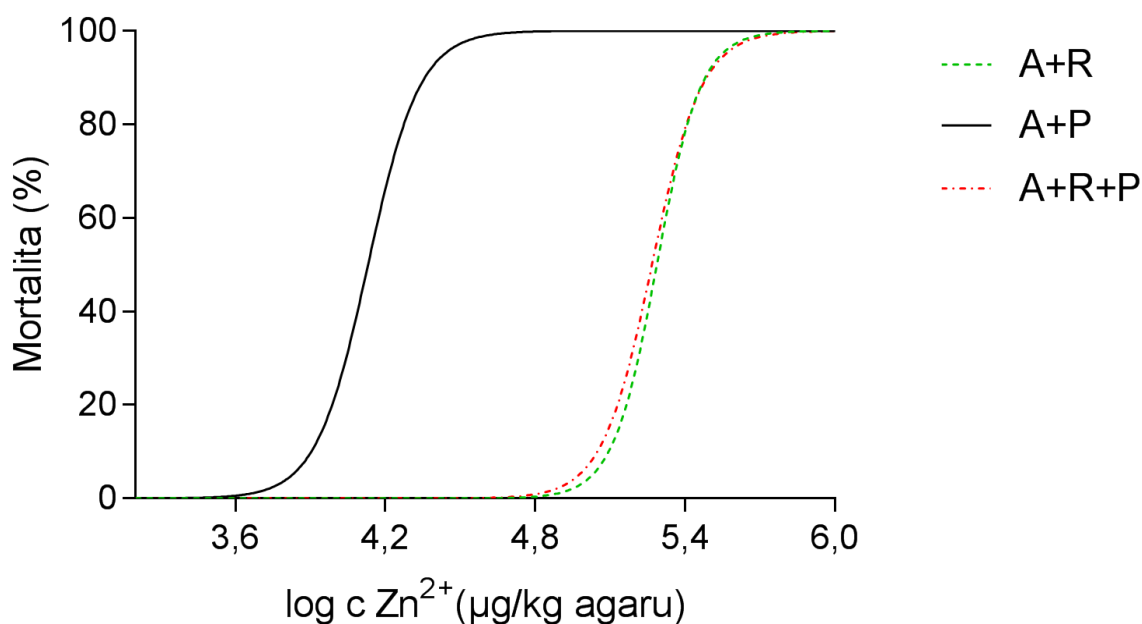


Obrázek 22 TEM zobrazující nanočástice ZnO

Jednotlivé testy probíhaly po dobu 96 hodin. Výsledkem pro test s agarem jako expozičním médiem byla hodnota LC_{100} při koncentraci 1000 mg ZnO/ kg agaru. Dle testů na filtračním papíře bylo možné vidět, že se zvyšující se koncentrací ZnO-NPs roste i mortalita testovacího organismu. A testy s přidavkem HA ukázaly, že v přítomnosti huminových kyselin dochází ke snížení toxicity ZnO-NPs [72]. Hooper et al. (2011) ve své studii uvádí porovnání výsledků chronického testu se ZnO-NPs a $ZnCl_2$ na žížale *Eisenia veneta*. Test byl prováděn se dvěma koncentracemi, nižší 250 mg Zn/kg agaru a vyšší 750 mg Zn/kg agaru. Modelová živná půda byla složena z komerčně dostupné jílové hlíny s 5 % organické hmoty, pH bylo upraveno na hodnotu 7,1. Kvůli aglomeračnímu chování bylo zvoleno dávkování suchého nanoprášku ZnO přímo do půdy, $ZnCl_2$ byl přidáván jako vodný roztok. Po 21 denní expozici bylo možné porovnat výsledky, kdy $ZnCl_2$ vykazoval vyšší toxicitu než ZnO-NPs [73]. Canas et al. (2011) pozorovali akutní toxicitu ZnO-NPs o velikosti nanočástic v rozmezí 40–100 nm. Jako expoziční médium pro testovaný organismus *Eisenia fetida* byl zvolen písek. Výsledkem byla mortalita testovaných jedinců, v koncentracích 10 a 100 mg/kg byla pozorována 10% úmrtnost a při koncentraci 10 000 mg/kg 20% úmrtnost [34]. Při porovnání všech využívaných médií je možné pozorovat, že k nejvyšší úmrtnosti testovaného organismu

dochází v agaru, kde nejsou přítomny půdní složky. Je patrné, že toxicita ZnO-NPs pro žížaly v půdě je podstatně nižší než pro *E. crypticus* v agaru.

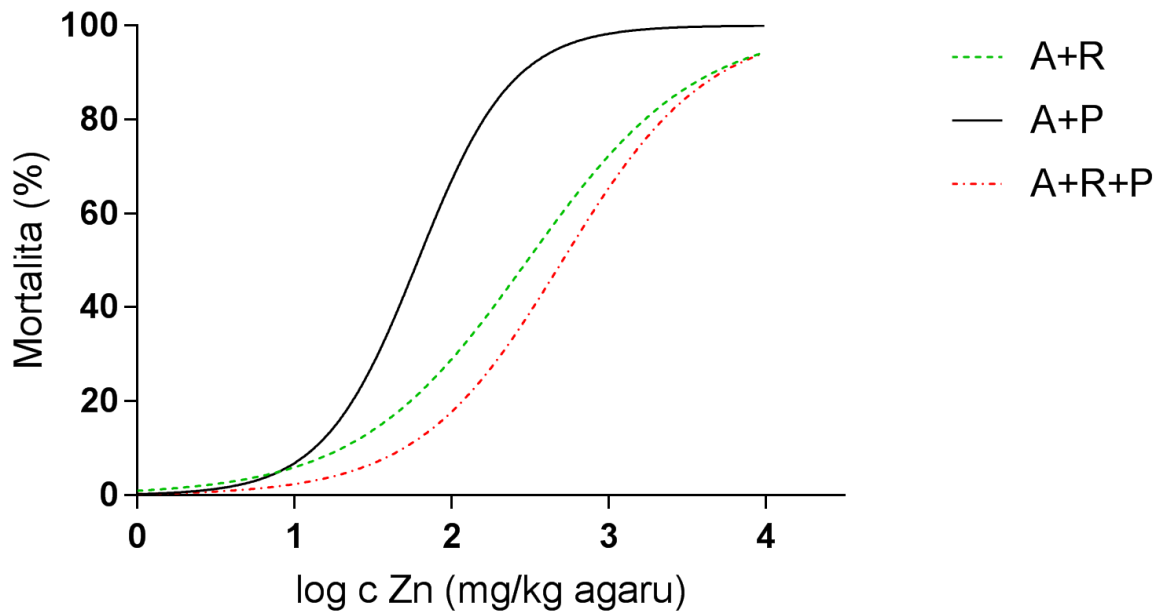
Z výsledků toxicity je zřejmé, že v případě testování Zn^{2+} iontů a ZnO-NPs v různě upravených agarových médiích, vykazoval zinek nejvyšší toxicitu v agaru s přidavkem písku. Toxicita zinku v agaru s přidavkem rašeliny a obou půdních komponent byla srovnatelná. Přidání půdních složek do agaru mělo vliv na chování zinku v testovacím médiu, na jeho biologickou dostupnost a dále na toxicitu. Přidáním rašeliny do agaru došlo k výraznému snížení toxicity ZnO-NPs. Naopak přidavek písku neměl v porovnání s čistým agarem žádný vliv na výslednou toxicitu ZnO-NPs. Obr. 23 znázorňuje křivky dávka-účinek, kdy s rostoucí koncentrací Zn^{2+} iontů roste mortalita *E. crypticus*. Z výsledků je zřejmé že nejvyšší míru toxicity vykazuje agar s přidavkem písku (A + P). Naopak agar s přidavkem rašeliny (A + R) či s přidavkem obou půdních komponent (A + R + P) vykazuje téměř srovnatelný průběh křivky.



Obrázek 23 Křivky dávka-účinek Zn^{2+} iontů v různých modifikacích agarového média

Obr. 24 zobrazuje křivky dávka-účinek pro ZnO-NPs ve všech typech modifikovaných agarových médií. Z průběhu křivek je možné odvodit, že půdní komponenty mají jak v případě Zn^{2+} iontů, tak i ZnO-NPs stejný vliv na biologickou dostupnost a toxicitu

těchto částic. V případě ZnO-NPs mají křivky pozvolnější průběh. Stoprocentní mortalita byla při testování ZnO-NPs pozorována pouze v agaru s přidavkem písku.



Obrázek 24 Křivky dávka–účinek ZnO-NPs v různých modifikacích agarového média

4 ZÁVĚR

Má práce byla zaměřená na optimalizaci agarového média pomocí půdních složek (písku a rašeliny) a zjištění, jak tyto půdní složky ovlivňují toxicitu nanočástic ZnO. Přídavek půdních komponent zvýšil environmentální relevanci výsledků těchto ekotoxikologických testů. Doposud byla toxicita v upraveném agarovém médiu testována se čtyřmi přidanými komponenty, s přídavkem huminových kyselin a kaolinu (Nováková 2017) a s přídavkem písku a rašeliny v této práci.

V experimentální části jsem vycházela z práce Hrdá et al. (2016) a z diplomové práce Nováková (2017) a potvrdila jsem vhodnost využití agarového kultivačního média při ekotoxikologických testech s modelovým půdním organismem *E. crypticus*.

Z výsledků uvedených v mé práci je zřejmé, že toxicita nanočástic ZnO v agaru je značně vyšší než toxicita těchto částic v půdě. Důvodem mohl být fakt, že půda je komplexní systém organického materiálu, minerálů a půdních organismů, a oproti ní představuje agar mnohem jednodušší médium, bez obsahu těchto půdních komponent. Veškeré půdní složky mohou interagovat s nanočásticemi a ovlivňovat tak jejich biologickou dostupnost a toxicitu pro půdní organismy. Z výsledků vyplývá, že přídavkem rašeliny do agarového média docházelo ke značné redukci toxicity ZnO-NPs, zatímco přítomnost písku nezpůsobila žádné změny toxicity ve srovnání s čistým agarem. Do budoucna by bylo vhodné provést další výzkum, a to v kombinaci všech uvedených půdních složek. Dále by bylo žádoucí otestovat nejen širší rozmezí koncentrační řady pro Zn²⁺ ionty, ale také vyšší koncentrace jednotlivých půdních komponent přidávaných do agaru. Při porovnání výsledků Zn²⁺ iontů a ZnO-NPs vyplývá, že pro *Enchytraeus crypticus* jsou více toxické Zn²⁺ ionty než rozpuštěné nanočástice ZnO.

5 POUŽITÁ LITERATURA

1. KUBÍNEK, R., STRÁNSKÁ, V. Úvod do problematiky nanotechnologií. [online], [cit.2016-05-04].Dostupné z: <http://exfyz.upol.cz/didaktika/oprlz/nanotechnologie.pdf>.
2. Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., & Nowack, B. (2009). Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental science & technology*, 43(24), 9216-9222.
3. OSKAM, Gerko. Metal oxide nanoparticles: synthesis, characterization and application. *Journal of sol-gel science and technology*, 2006, 37.3: 161-164.
4. WANG, Zhong Lin. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. *Journal of physics: condensed matter*, 2004, 16.25: R829.
5. LEITNER, Jindřich a SEDMIDUBSKÝ, David. Příprava, vlastnosti a využití nanostrukturovaného ZnO. *Chemické listy*, 2016, 110, 406–417.
6. BOXALL, Alistair BA; TIEDE, Karen; CHAUDHRY, Qasim. Engineered nanomaterials in soils and water: how do they behave and could they pose a risk to human health?. 2007.
7. GOTTSCHALK, Fadri, et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental science & technology*, 2009, 43.24: 9216-9222.
8. KAHRU, Anne; DUBOURGUIER, Henri-Charles. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 2010, 269.2-3: 105-119.
9. BRUNNER, Tobias J., et al. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental science & technology*, 2006, 40.14: 4374-4381.
10. HEINLAAN, Margit, et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 2008, 71.7: 1308-1316.
11. MA, H., et al. Comparative phototoxicity of nanoparticulate and bulk ZnO to a free-living nematode *Caenorhabditis elegans*: the importance of illumination mode and primary particle size. *Environmental Pollution*, 2011, 159.6: 1473-1480.
12. ADAMS, Laura K.; LYON, Delina Y.; ALVAREZ, Pedro JJ. Comparative ecotoxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water research*, 2006, 40.19: 3527-3532.

13. ARUOJA, Villem, et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the total environment*, 2009, 407.4: 1461-1468.
14. POYNTON, Helen C., et al. Differential gene expression in *Daphnia magna* suggests distinct modes of action and bioavailability for ZnO nanoparticles and Zn ions. *Environmental science & technology*, 2010, 45.2: 762-768.
15. BORM, Paul JA, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and fibre toxicology*, 2006, 3.1: 11.
16. REED, Robert B., et al. Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, 31.1: 93-99.
17. BIAN, Shao-Wei, et al. Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. *Langmuir*, 2011, 27.10: 6059-6068.
18. MUDUNKOTUWA, Imali A., et al. Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: a study of size effects in the presence and absence of citric acid. *Langmuir*, 2011, 28.1: 396-403.
19. MIAO, Ai-Jun, et al. Zinc oxide-engineered nanoparticles: Dissolution and toxicity to marine phytoplankton. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2010, 29.12: 2814-2822.
20. FERIS, Kevin, et al. Electrostatic interactions affect nanoparticle-mediated toxicity to gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Langmuir*, 2009, 26.6: 4429-4436.
21. DIAMOND, Stephen A., et al. Assessment of the risk of solar ultraviolet radiation to amphibians. III. Prediction of impacts in selected northern midwestern wetlands. *Environmental science & technology*, 2002, 36.13: 2866-2874.
22. LIPOVSKY, Anat, et al. EPR study of visible light-induced ROS generation by nanoparticles of ZnO. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2009, 113.36: 15997-16001.
23. KOČI, Vladimír. Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů latek na životní prostředí. *Chemické listy*, 2006, 100.10: 882-888.
24. ALDENBERG, Tom; JAWORSKA, Joanna S.; TRAAS, Theo P. Normal species sensitivity distributions and probabilistic ecological risk assessment. *Species sensitivity distributions in ecotoxicology*, 2002, 49-102.

25. ŠUDOMA, Marek. *Využití kontaktních testů při hodnocení ekotoxicity kalů a kompostů*. 2001. PhD Thesis. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
26. CRANE, Mark, et al. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 2008, 17.5: 421.
27. TRAN, C., et al. A scoping study to identify hazard data needs for addressing the risks presented by nanoparticles and nanotubes. 2005.
28. COLVIN, Vicki L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature biotechnology*, 2003, 21.10: 1166.
29. HANDY, Richard D., et al. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 2008, 17.4: 287-314.
30. HRDÁ, K., OPRŠAL, J., KNOTEK, P., POUZAR, M. a VLČEK, M. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to the annelid *Enchytraeus crypticus* in agar-based exposure media. *Chemical Papers*, 2016, 70(11), s. 1512-1520.
31. BICHO, Rita C., et al. Enchytraeid Reproduction TestPLUS: hatching, growth and full life cycle test—an optional multi-endpoint test with *Enchytraeus crypticus*. *Ecotoxicology*, 2015, 24.5: 1053-1063.
32. HUND-RINKE, Kerstin, et al. Regulatory ecotoxicity testing of nanomaterials—proposed modifications of OECD test guidelines based on laboratory experience with silver and titanium dioxide nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2016, 10.10: 1442-1447.
33. HANDY, Richard D., et al. Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far?. *Ecotoxicology*, 2012, 21.4: 933-972.
34. CAÑAS, Jaclyn E., et al. Acute and reproductive toxicity of nano-sized metal oxides (ZnO and TiO₂) to earthworms (*Eisenia fetida*). *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13.12: 3351-3357. rative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm *Eisenia veneta* in a soil matrix. *Environment international*, 2011, 37.6: 1111-1117.
35. KOBETIČOVÁ, Klára. *Efekty a rizika kontaminantů pro rouspice v půdním prostředí*. 2011. PhD Thesis. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
36. NAVARRO, Enrique, et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 2008, 17.5: 372-386.
37. MUELLER, Nicole C.; NOWACK, Bernd. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental science & technology*, 2008, 42.12: 4447-4453.

38. JOHNSON, Andrew C., et al. An assessment of the fate, behaviour and environmental risk associated with sunscreen TiO₂ nanoparticles in UK field scenarios. *Science of the Total Environment*, 2011, 409.13: 2503-2510.
39. TIEDE, Karen, et al. Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216.3: 503-509.
40. STONE, Vicki, et al. Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of the total environment*, 2010, 408.7: 1745-1754.
41. JIANG, Jingkun; OBERDÖRSTER, Günter; BISWAS, Pratim. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 2009, 11.1: 77-89.
42. FARRÉ, Marinella, et al. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393.1: 81-95.
43. LIN, Hung-Wen; HWU, Wen-Hwa; GER, Ming-Der. The dispersion of silver nanoparticles with physical dispersal procedures. *journal of materials processing technology*, 2008, 206.1-3: 56-61.
44. ROSICKÁ, Dana; ŠEMBERA, Jan. Assessment of influence of magnetic forces on aggregation of zero-valent iron nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*, 2011, 6.1: 10.
45. PIPAN-TKALEC, Živa, et al. Zinc bioaccumulation in a terrestrial invertebrate fed a diet treated with particulate ZnO or ZnCl₂ solution. *Toxicology*, 2010, 269.2-3: 198-203.
46. WANG, Huanhua; WICK, Robert L.; XING, Baoshan. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*, 2009, 157.4: 1171-1177.
47. JEMEC, Anita, et al. Effects of ingested nano-sized titanium dioxide on terrestrial isopods (*Porcellio scaber*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27.9: 1904-1914.
48. TOURINHO, Paula S., et al. Metal-based nanoparticles in soil: Fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, 31.8: 1679-1692.
49. DUNPHY GUZMAN, Katherine A.; FINNEGAN, Michael P.; BANFIELD, Jillian F. Influence of surface potential on aggregation and transport of titania nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40.24: 7688-7693.

50. BADAUWY, Amro M. El, et al. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental science & technology*, 2010, 44.4: 1260-1266.
51. STEBOUNOVA, Larissa V.; GUIO, Ethan; GRASSIAN, Vicki H. Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution. *Journal of Nanoparticle Research*, 2011, 13.1: 233-244.
52. JU-NAM, Yon; LEAD, Jamie R. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the total environment*, 2008, 400.1-3: 396-414.
53. BUETTNER, Katherine M.; RINCIOG, Claudia I.; MYLON, Steven E. Aggregation kinetics of cerium oxide nanoparticles in monovalent and divalent electrolytes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2010, 366.1-3: 74-79.
54. LEAD, Jamie R.; WILKINSON, Kevin J. Aquatic colloids and nanoparticles: current knowledge and future trends. *Environmental Chemistry*, 2006, 3.3: 159-171.
55. BUFFLE, Jacques, et al. A generalized description of aquatic colloidal interactions: the three-colloidal component approach. *Environmental Science & Technology*, 1998, 32.19: 2887-2899.
56. UNRINE, Jason; BERTSCH, Paul; HUNYADI, Simona. Bioavailability, trophic transfer, and toxicity of manufactured metal and metal oxide nanoparticles in terrestrial environments. *Nanoscience and Nanotechnology: Environmental and Health Impacts*, 2008, 345-366.
57. HU, C. W., et al. Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42.4: 586-591.
58. GIMBERT, Laura J., et al. Partitioning and stability of engineered ZnO nanoparticles in soil suspensions using flow field-flow fractionation. *Environmental Chemistry*, 2007, 4.1: 8-10.
59. FRENCH, Rebecca A., et al. Influence of ionic strength, pH, and cation valence on aggregation kinetics of titanium dioxide nanoparticles. *Environmental science & technology*, 2009, 43.5: 1354-1359.
60. HOOPER, Helen L., et al. Comparative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm *Eisenia veneta* in a soil matrix. *Environment international*, 2011, 37.6: 1111-1117.

61. ASHARANI, P. V., et al. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 2008, 19.25: 255102.
62. UNRINE, Jason M., et al. Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms (*Eisenia fetida*). *Environmental science & technology*, 2010, 44.21: 8308-8313.
63. KOOL, Pauline L.; ORTIZ, Maria Diez; VAN GESTEL, Cornelis AM. Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl₂ to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Pollution*, 2011, 159.10: 2713-2719.
64. PENNELL, Kurt D.; COSTANZA, Jed; WANG, Yonggang. Transport and retention of nanomaterials in porous media. *Nanoscience and nanotechnology: Environmental and health impacts*, 2008, 91-106.
65. FANG, Jing, et al. Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns. *Environmental pollution*, 2009, 157.4: 1101-1109.
66. Castro-Ferreira, M. P., Roelofs, D., van Gestel, C. A., Verweij, R. A., Soares, A. M., & Amorim, M. J. (2012). *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. *Chemosphere*, 87(11), 1222-1227.
67. R mbke, J. (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review: The 7th international symposium on earthworm ecology· Cardiff· Wales· 2002. *Pedobiologia*, 47(5), 607-616.
68. Alves, Paulo R.L., Cardoso, Elke J.B. Overview of the Standard Methods for Soil. Croatia : InTech, 2016. ISBN 978-953-51-2246-3.
69. HRDÁ, K. Testy ekotoxicity nanomateriálů dispergovaných v agarózovém gelu: diplomová práce. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2015. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.
70. NOVÁKOVÁ, D. Optimalizace složení agarového kultivačního média pro testy ekotoxicity nanočástic na kroužkovci *Enchytraeus crypticus*: diplomová práce. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2017. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.
71. GRILLO, Renato; ROSA, André H.; FRACETO, Leonardo F. Engineered nanoparticles and organic matter: a review of the state-of-the-art. *Chemosphere*, 2015, 119: 608-619.

72. LI, Lian-Zhen, et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. *Environment International*, 2011, 37.6: 1098-1104.
73. HOOPER, Helen L., et al. Comparative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm *Eisenia veneta* in a soil matrix. *Environment international*, 2011, 37.6: 1111-1117.

Údaje pro databázi knihovny

Název práce	Testy ekotoxicity nanočástic ZnO na roupících <i>Enchytraeus crypticus</i> prováděné v agarových médiích se zvýšenou environmentální relevancí
Autor práce	Bc. Inka Vrzáčková
Obor	Ochrana životního prostředí
Rok obhajoby	2018
Vedoucí práce	doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.
Anotace	
Klíčová slova	Ekotoxikologie, nanočástice, zinek, agar, organismy, půda