

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Diplomová práce

2017

Klára Stojarová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Prvková analýza nanomateriálů v mikrovzorcích tkání pro potřeby testů  
ekotoxicity

Klára Stojarová

Diplomová práce

2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára Stojarová**  
Osobní číslo: **C15627**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Prvková analýza nanomateriálů v mikrovzorcích živých organismů pro potřeby testů ekotoxicity**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Vypracujete literární rešerši zaměřenou na současný stav prvkové analýzy velmi malých vzorků biologické povahy, tj. možnosti a omezení dostupných analytických technik (ICP-OES, ICP-MS, ETV-ICP-MS, ET-AAS, F-AAS aj.), postupy přípravy mikrovzorků k analýze, dosažitelné detekční limity a možná úskalí spojená s analýzou tohoto typu vzorků pocházejících zejména z testů ekotoxicity.
2. Optimalizujte podmínky přípravy vzorku k analýze a vlastní analytickou koncepci pro stanovení Zn v roupici bělavé (*Enchytraeus albidus*). Proveďte validaci metody.
3. Ohodnoťte využití ETV-ICP-MS v prvkové analýze roupice bělavé zejména z hlediska analytických možností techniky.
4. Kriticky zhodnoťte dosažené výsledky. Posuďte možnosti a omezení použitého postupu z hlediska dosažitelných detekčních limitů, požadavků na laboratorní práci a relevance pro účely ekotoxikologických studií.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Anna Krejčová, Ph.D.**

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant diplomové práce: **Ing. Jan Patočka**

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

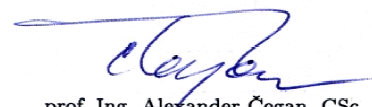
Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017



## **Prohlášení autora**

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 30. srpna 2017

.....

Klára Stojarová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala především doc. Ing. Anně Krejčové Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za odborné vedení a podporu při psaní práce. Děkuji také Ing. Kateřině Hrdé a Bc. Ince Vrzáčkové za přípravu agarů s roupicemi pro mé další zpracování v experimentální části práce a Nadě Špácové za cenné rady při samotných analýzách v laboratoři. V neposlední řadě patří mé díky Ing. Janu Patočkovi za jeho spolupráci v laboratoři a za dohled jak při analýzách, tak při zpracovávání experimentálních dat. Samozřejmě děkuji i členům své rodiny nejen za podporu, ale i za vytvoření klidného a vstřícného prostředí pro studium.

## **Anotace**

Byla vypracována literární rešerše zabývající se testy ekotoxicity, biodostupností a bioakumulací kovů v organismech. Jsou shrnuty informace o testovacích organismech (žížaly, roupice) a metodách prvkové analýzy používaných pro tyto testy. Byla vytvořena rychlá a spolehlivá metoda pro stanovení zinku ve vzorcích pocházejících z ekotoxikologických pokusů, tedy ve vzorcích testovacích organismů (roupice *Enchytraeus crypticus*) a agarových gelů jakožto testového prostředí. Kromě zinku byly pomocí ICP-OES analyzovány i další prvky vyskytující se v biomase testovaných živočichů, pomocí kterých bylo možné sledovat zejména opakovatelnost postupu. Roupice byly vyjmuty z agarového gelu, propláchnuty vodou, váženy a nakonec rozpuštěny v hydroxidu tetramethylamonném. Agarový gel byl rozpouštěn v kyselině dusičné. Detekční limit tohoto postupu pro zinek v roupicích je  $0,83 \text{ mg.kg}^{-1}$  a pro zinek v agarovém gelu  $0,0018 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Použitelnost metody pro účely ekotoxikologických testů byla ověřena při stanovení bioakumulačních faktorů pro  $\text{ZnCl}_2$  (BAF 57 – 180) a pro  $\text{ZnO}$  ve formě nanočástic (BAF 23 – 65). Pomocí ICP-MS bylo provedeno stanovení pozadových koncentrací zinku i dalších kovů (Ag, Au, Hg, Pb, Sn, Cd) v roupicích. Pro stanovení zlata byla využita ICP-MS ve spojení s elektrotermickým vypařováním, která umožňuje analýzu velmi malých vzorků.

## **Klíčová slova**

Prvková analýza, ICP-OES, ICP-MS, ETV-ICP-MS, příprava vzorku k analýze, bioakumulace, *Enchytraeus crypticus*, agarový gel

## **Annotation**

The literary research on ecotoxicity, bioavailability and bioaccumulation of metals in organisms has been worked. Information on test organisms (earthworms, enchytraeids) and methods of analysis of elements used for these tests are summarized. A rapid and reliable method for determining zinc in samples from ecotoxicological experiments, thus in test specimens (enchytraeid *Enchytraeus crypticus*) and agar gel as a test medium, has been developed. In addition to zinc, other elements found in the biomass of the test animals were analyzed using ICP-OES to monitor, in particular repeatability of the procedure. The enchytraeids were removed from the agar gel, washed with water, weighed, and finally dissolved in tetramethylammonium hydroxide. The agar gel was dissolved in nitric acid. The detection limit of procedure for zinc in the enchytraeids was  $0.83 \text{ mg.kg}^{-1}$  and for zinc in the agar gel  $0.0018 \text{ mg.kg}^{-1}$ . The applicability of the method for ecotoxicological testing was verified in the determination of the bioaccumulation factors for  $\text{ZnCl}_2$  (BAF 57 – 180) and ZnO in the form of nanoparticles (BAF 23 – 65). Using ICP-MS, background concentrations of zinc and other metals (Ag, Au, Hg, Pb, Sn, Cd) in the enchytraeids were determined. For the determination of gold, ICP-MS was used in combination with the electrothermal vaporization, which allows the analysis of very small samples.

## **Keywords**

Elemental analysis, ICP-OES, ICP-MS, ETV-ICP-MS, sample preparation for analysis, bioaccumulation, *Enchytraeus crypticus*, agar gel

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>11</b>
<b>Seznam obrázků</b> .....	<b>12</b>
<b>Seznam tabulek</b> .....	<b>12</b>
<b>Seznam grafů</b> .....	<b>13</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>12</b>
<b>1 Literární rešerše</b> .....	<b>13</b>
1.1 Ekotoxicita .....	13
1.2 Biodostupnost kovů.....	14
1.3 Bioakumulace kovů.....	15
1.3.1 Organismy ovlivňující biodostupnost a bioakumulaci .....	16
1.3.2 Bioindikátory bioakumulace .....	17
1.3.2.1 Žížaly.....	18
1.3.2.2 Roupice .....	19
1.4 Testy bioakumulace v suchozemských máloštetinacích.....	21
1.4.1 Testovací půdy.....	22
1.4.2 Příprava vzorků k analýze.....	25
1.5 Metody vhodné pro prvkovou analýzu malých vzorků.....	27
1.6 Prvková analýza vzorků z ekotoxikologických pokusů.....	31
<b>2 Experimentální část</b> .....	<b>36</b>
2.1 Chemikálie .....	36
2.2 Laboratorní pomůcky .....	36
2.3 Přístrojové vybavení.....	37
2.4 Příprava roztoků .....	37
2.5 Chov roupic.....	38
2.6 Chovné a testovací agary .....	39

2.7	Příprava práškového agaru a ovesných vloček k analýze .....	40
2.8	Příprava roupic k analýze.....	40
2.9	Příprava agarového gelu k analýze .....	42
2.10	ICP-OES analýza .....	43
2.11	ICP-MS analýza .....	45
2.11.1	ETV-ICP-MS analýza.....	45
<b>3</b>	<b>Výsledky a jejich diskuse .....</b>	<b>48</b>
3.1	Hodnocení postupu přípravy vzorku k analýze.....	49
3.2	Rozpouštění vzorku.....	50
3.3	Vhodnost ICP-OES analýzy.....	51
3.3.1	Posouzení vlivu matrice.....	51
3.3.2	Analytické charakteristiky a časová stabilita ICP-OES metody.....	52
3.4	Pozad'ové koncentrace .....	54
3.5	Bioakumulace sloučenin zinku v roupicích .....	56
3.6	ICP-MS stanovení kovů v roupicích .....	57
3.7	Potencionální využití ETV-ICP-MS .....	58
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>Seznam citací.....</b>	<b>64</b>



## Seznam zkratek

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
BAF	Bioakumulační faktor
BAF <sub>K</sub>	Kinetický bioakumulační faktor
BAF <sub>US</sub>	Bioakumulační faktor v ustáleném stavu
BSAF	Bioakumulační faktor biota-sediment
E.	Enchytraeus
ET	Elektrotermická atomizace
ETV-ICP-MS	Hmotnostní spektrometr s ionizací v indukčně vázaném plazmatu s elektrotermickým odpařováním
GF	Grafitová píčka
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu
KS	Kalibrační standard
LC <sub>50</sub>	Střední letální koncentrace
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
RVK	Retenční vodní kapacita (též WHC z angl. Water holding capacity)
TMAH	Hydroxid tetramethylamonný
TOF	Time-of-flight analyzátor
ZR	Zásobní roztok

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Interakce kovových kontaminantů s půdou a žížalou .....	16
Obrázek 2: Vnitřní stavba přední části žížaly druhu <i>Lumbricus terrestris</i> .....	27
Obrázek 3: Testový agar s roupicemi .....	41
Obrázek 4: Separování roupic z agaru .....	42
Obrázek 5: Deionizovaná voda s roupicemi .....	42
Obrázek 6: Roupice na filtračním papíru .....	42
Obrázek 7: Chovný agar s roupicemi .....	42
Obrázek 8: Vzorkování agaru .....	43

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Taxonomické zařazení roupic a žížal .....	18
Tabulka 2: Koncentrace detekovaných prvků v suché biomase <i>E. crypticus</i> .....	32
Tabulka 3: Koncentrace kalibračních roztoků a standardních přídavek pro ICP-OES .....	38
Tabulka 4: Příprava kalibračních roztoků pro vzorky roupic pro ICP-MS .....	38
Tabulka 5: Vybrané spektrální linie, korekce pozadí a napětí na fotonásobiči .....	44
Tabulka 6: Pracovní podmínky ICP-OES analýzy .....	44
Tabulka 7: Pracovní podmínky ICP-MS a ETV-ICP-MS analýzy .....	47
Tabulka 8: Mokrý hmotnost roupic .....	50
Tabulka 9: Směrnice použitých metod .....	52
Tabulka 10: Detekční limit metody a detekční limity postupu pro jednotlivé vzorky .....	53
Tabulka 11: Výsledky analýzy vzorku roupic obohaceného o cílové analyty .....	53
Tabulka 12: Stálost koncentrací prvků v čase .....	54
Tabulka 13: Opakovaná analýza kalibračních standardů .....	54
Tabulka 14: Pozadřové koncentrace analyzovaných vzorků .....	55

Tabulka 15: Bioakumulační faktor .....	56
Tabulka 16: Detekční limity pro ICP-MS s koncentrací prvků v roupicích.....	58

## **Seznam grafů**

Graf 1: Bioakumulace $ZnCl_2$ a ZnO-NPs v roupicích .....	57
Graf 2: Optimalizace teplotního programu pro ETV-ICP-MS .....	59

## Úvod

Životní prostředí a jeho ochrana je dlouhodobě aktuální téma. Existuje řada látek, které mohou životní prostředí nepříznivě ovlivnit. Nebezpečné látky již nejsou spojovány pouze s chemickými továrnami a výrobními provozy, ale stále častěji také s nezodpovědným přístupem či neznalostí jednotlivců. Riziko mohou představovat běžně používané věci, například hygienické přípravky, léky, plasty, pesticidy, dále kovové součástky a jejich špatná likvidace či spalování odpadu. Toxické působení látek má vliv na zdravý rozvoj a rovnováhu přírodních ekosystémů, a proto je ekotoxicita často skloňované téma. Pro získání dostatečného množství informací slouží ekotoxikologické testy, které sledují vliv látek především na přežívání a reprodukci testovaných organismů a na bioakumulaci látek v nich. Z pokusů lze usuzovat na míru nebezpečí látky nebo na mechanismus jejího působení, a tím získat základy pro nalezení vhodného způsobu řešení či prevence kontaminace. V posledních letech je stále více zmiňováno rozšiřující se využití nanotechnologií a nanočástic. Zastoupeny jsou v elektronice, automobilovém průmyslu, v medicíně při cílené dopravě léčiv či při transplantacích tkání, nalezneme je rovněž v textilním průmyslu nebo předmětech denní potřeby, jako jsou čisticí prostředky, zubní pasty, kosmetika apod. S rostoucím uplatněním nanomateriálů se jejich riziko na zdraví ekosystémů dostává do popředí zájmu. Některé teorie hovoří o vážných zdravotních rizicích, informace o nanomateriálech jsou však v řadě případů nedostatečné. Ekotoxikologické testy jsou nedílnou součástí testování látek před jejich uvedením na trh, jsou prostředkem pro sledování stavu životního prostředí a jsou klíčové pro získání informací, potřebných pro zavedení regulačních mechanismů pro některé látky. Pokusy jsou prováděny na organismech, které jsou vhodnými bioindikátory přírodního znečištění, a každé zjednodušení pracovních postupů může vést ke zvýšení efektivity těchto testů.

# 1 Literární rešerše

## 1.1 Ekotoxicita

Ekotoxicita je vlastnost daného materiálu, která jej charakterizuje z hlediska jeho toxických vlivů na životní prostředí a živé organismy a která vypovídá o jeho kvalitě. Předmětem zájmu je například ekotoxicita chemických látek, odpadů, kontaminovaného horninového prostředí, odpadních vod, stavebních hmot, sedimentů aj. Pro zjištění ekotoxicity jsou využívány ekotoxikologické testy, vyznačující se přesně definovanými podmínkami, za kterých je testovaný organismus vystaven působení testované látky. Reakcí organismu na testované látky může být smrt, genetické poškození, inhibice nebo naopak urychlení pohybu, růstu, reprodukce apod., tyto reakce se pak porovnávají s kontrolním stanovením neobsahujícím testovanou látku (Laboratoř monitoring Praha, 2017; Matějů, 2009; Holoubek, 2011). Testy ekotoxicity jsou užitečným nástrojem pro aktivní monitoring životního prostředí, sdružují záznamy účinků látek na živé organismy s metodami chemické analýzy. Umožňují sledovat chování látek v přírodě s následným vyhodnocením jejich nebezpečných vlastností. Díky těmto cenným znalostem lze zabránit vstupu škodlivých a nebezpečných látek do ekosystému (Havránek, 2009).

Prakticky se testy provádí ve vodném prostředí, kam patří aquatické testy, sloužící především ke stanovení toxicity vodných vzorků, a testy s výluhy pevných materiálů. Druhou možností jsou testy v pevných matricích, kterými jsou terestrické neboli kontaktní testy. Zde probíhají biochemické pochody výhradně v půdě. Další variantou jsou mikrobiální testy (Laboratoř monitoring Praha, 2017; Matějů, 2009; Holoubek, 2011). Dle doby expozice se testy dělí na akutní testy, kdy je organismus exponován po dobu 4 – 24 hodin a účinek látek se projevuje velmi rychle, dále na testy chronické, které trvají několik měsíců až několik let. Zatímco u akutní toxicity pozorujeme účinky na daném organismu, u chronické toxicity lze pozorovat její projevy i na dalších generacích (problémy s plodností, degenerace potomků). Přechodnou kategorii tvoří testy subchronické s vyhodnocením výsledků během 5 – 7 dní. Ty se zaměřují především na hodnocení růstu a fyziologické projevy (Sládečková a Sládeček, 1995; Knejzlík a Ruml, 1999).

V laboratořích se běžně kombinují různé druhy testů zahrnující více bioindikátorů z odlišných trofických úrovní. Sady testů by měly zahrnovat organismy nejméně ze tří trofických úrovní, a to jak pro kontaktní testy, tak i pro vodné výluhy, pokud je jejich příprava možná. Ve vodném prostředí se využívají například rostliny (hořčice bílá), řasy, koryšci

(perloočky), ryby nebo bioluminiscenční bakterie (*Vibrio fisheri*). Kontaktním testům mohou být podrobeny rostliny salátu setého nebo živočichové, např. roupice, žížaly a chvostoskoci. (Laboratoř monitoring Praha, 2017; Matějů, 2009). Omezujícím faktorem jsou fyzikálně-chemické vlastnosti látek, u pevných se jedná o rozpustnost, u kapalných pak mísitelnost a reaktivita s vodou. Testované látky by s vodou neměly vytvářet pěny, gely ani emulze. Pro zlepšení podmínek lze použít rozpouštědlo v koncentraci tolerované systémem (Knejzlík a Ruml, 1999).

## 1.2 Biodostupnost kovů

Případné riziko kovů v půdě pro organismy a prostředí je závislé především na jejich biodostupnosti (angl. bioavailability). Jedná se o frakci kontaminantu, která může být nebo je zpřístupněná pro příjem, díky čemuž může vyvolávat reakci organismu (van Gestel, 2008). Frakce kovu je jedincem přijímána pasivně i aktivně z vnějšího prostředí, což přímo souvisí s toxicitou, která se nemůže projevit, pokud není látka organismu biodostupná. Taktéž existuje termín vztahující se pouze k ingestci (angl. bioaccessibility), který zaujímá část kontaminantu rozpuštěnou z půdy žaludečními šťávami, čímž definuje maximální množství látky, které je dostupné pro příjem skrze střevní stěnu (Smith et al., 2010).

Biodostupnost je ovlivněna řadou faktorů. Zásadní je sorpce kovů, což je schopnost vázat se na pevné částice půd a sedimentu. Rozhodující je síla, kterou jsou kovy vázány složkami půdní matrice, ta je výrazně odlišná v různých částech půdy v důsledku rozdílných půdních vlastností. Je rozlišována adsorpce a absorpce. Adsorpce je spojena s vazbou látek na povrch částic, zatímco u absorpce dochází k průniku látky do vnitřních pórů částic. Tyto dva druhy sorpce snižují dostupnost kovů pro příjem rostlinami, živočichy i mikroorganismy. Riziko kovů je dané jejich schopností přecházet z pevné fáze do rozpustné formy, ve které mají možnost vázat se na receptory a reagovat s nimi (Allen, 2002).

Mezi vlastnosti půdy ovlivňující sorpční procesy patří kationová výměnná kapacita, redoxní podmínky, pH půdního roztoku, obsah organické hmoty a komplexotvorní činitele (Hund-Rinke a Kördel, 2003). Velkou roli hraje právě rozpustnost, která je výrazně ovlivněna hodnotou pH. Nízké pH podporuje vznik jednoduchých kovových iontů, oproti tomu při vyšším pH se ve vodě vylučují nerozpustné sraženiny. Obecně lze říci, že jsou kovy v kyselých podmínkách pohyblivější než v alkalickém prostředí, ve kterém se jejich pohyblivost snižuje, čímž se snižuje i jejich biodostupnost (Pavliš, 2005). Šíření různých



forem kovů není konstantní a souvisí také s dobou, po kterou je kov v půdě přítomen. Čím kratší dobu se kov v půdě vyskytuje, tím bývá pohyblivější a dostupnější. Stejně tak je rozdíl, zda je kontaminant přidáván ve formě vysoce rozpustných solí nebo spolu s komplexotvornou matricí s velkou sorpční kapacitou (Allen, 2002). Vedle vlastností prostředí závisí biodostupnost samozřejmě také na expoziční cestě kovu a fyziologii organismu, proto se u jednotlivých bioindikátorů liší (van Gestel, 2008).

### 1.3 Bioakumulace kovů

Při bioakumulaci se jedná o vzestup koncentrace látky v organismu, která se vztahuje ke koncentraci látky v okolním médiu. Látky pronikají do organismu, kde se ukládají v různých formách. Bioakumulace je výsledkem biokoncentračních a biomagnifikačních procesů. Biokoncentrace představuje zvýšení koncentrace látky v organismu výhradně z okolního média povrchem těla a ingescí půdy. U biomagnifikace neboli bioobohacování je vzrůst koncentrace látky v organismu zajištěn především příjmem kontaminované potravy. Tento způsob akumulace pak může vést k přestupu látek mezi potravními řetězci. Souhrn interakcí mezi kovovými kontaminujícími látkami, půdou a žížalami je vyobrazen na obrázku 1.

U kovů je bioakumulace závislá na formě, ve které se kov vyskytuje, a na jeho koncentraci, dále na fyzikálně-chemických vlastnostech půdy ovlivňující biodostupnost a na metabolické aktivitě organismu, která je druhově specifická. Bioakumulaci lze kvantitativně vyjádřit pomocí bioakumulačního faktoru (BAF). Pokud křivka příjmu zkoušené látky vykazuje rovnovážný stav, mluvíme o bioakumulačním faktoru v ustáleném stavu (BAF<sub>US</sub>, též BAF<sub>SS</sub> z angl. steady state), ten se rovná podílu koncentrace látky v testovaném organismu ( $c_a$ ) a koncentrace látky v půdě ( $c_s$ ), jak je uvedeno v následující rovnici.

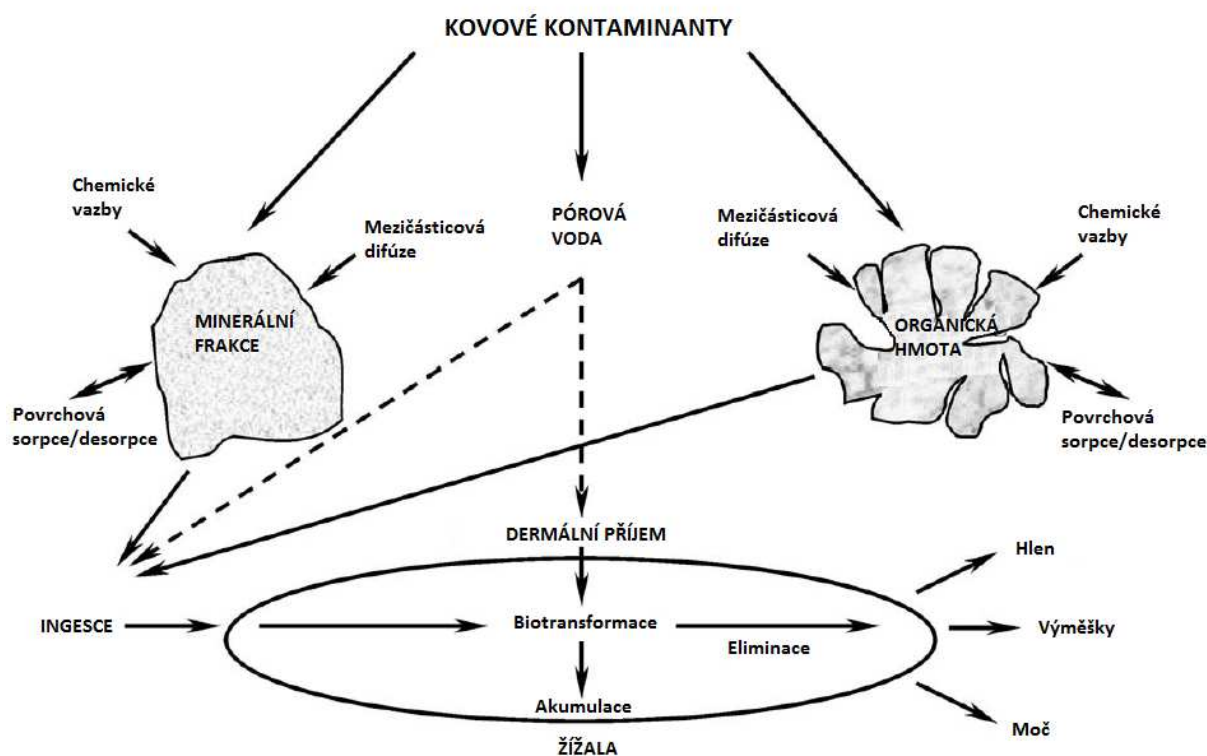
$$BAF = \frac{c_a}{c_s} \quad \text{[Rovnice 1]}$$

Není-li dosaženo rovnovážného stavu, pak je stanovován kinetický bioakumulační faktor (BAF<sub>K</sub>), který ve výpočtu zahrnuje poměr rychlostní konstanty příjmu ( $k_s$ ) k rychlostní konstantě eliminace ( $k_e$ ).

Pro půdy lze koncentraci látek v organismu standardizovat (viz rovnice 2) na frakci lipidů v organismu ( $f_{lip}$ ) a koncentraci organického uhlíku v půdě ( $f_{oc}$ ), pak hovoříme o BSAF (z angl. biota-soil accumulation factor) (OECD, 2010).

$$BSAF = BAF \cdot \frac{f_{oc}}{f_{tip}}$$

[Rovnice 2]



Obrázek 1: Interakce kovových kontaminantů s půdou a žířalou

Převzato a upraveno z: Langdon et al., 2003

### 1.3.1 Organismy ovlivňující biodostupnost a bioakumulaci

Mezi organismy narušující půdní rovnováhu patří mikroorganismy, jejichž aktivita mění podobu a dostupnost kovů. Svými metabolickými procesy, například exkrecí, modifikují své okolí. Je známa oxidace sulfidů kovů nebo vytváření kyselin, které lokálně snižují pH, čímž, jak již bylo zmíněno, je zvýšena rozpustnost kovů a tím i biodostupnost. Naopak ke snížení biodostupnosti kovů pro jiné organismy dochází v případech, kdy mikroorganismy žijící v koloniích vytváří biofilm, který váže kovy ve formě komplexů. Houby také snižují biodostupnost kovů v půdě tím, že je akumulují v buněčné stěně (Allen, 2002). Snižená dostupnost v prostředí je však vyvážena o to větší expozicí organismům, jako jsou chvostokoci a roztoči, kteří se houbami živí. Dalším mechanismem, který má významný dopad na organismy, je biomethylace, což je biogenní proces, kterým bakterie přeměňují

toxické kovy z anorganických forem na perzistentní organokovové sloučeniny. Děj je spojen s nárůstem toxicity a probíhá jak v aerobním půdním prostředí, tak i v anaerobním prostředí trávicího traktu obratlovců (Pavliš, 2005).

Suchozemské rostliny také přijímají kovy z půdy zejména kořeny ve formě volných iontů nebo chelátových komplexů. Jako první článek potravního řetězce tak rostliny představují expoziční cestu do vyšších trofických úrovní (Allen, 2002). Rostliny přijímají řadu potřebných esenciálních stopových prvků. Pro zvýšení jejich biodostupnosti mají vyvinuté strategie usnadňující vstup látek do kořenů pro zajištění dostatečného příjmu. Díky těmto postupům však mohou analogicky přijímat i toxické těžké kovy. Přijímané látky mohou být potenciálně fytotoxické, proto rostliny disponují tolerančními mechanismy a fyziologickými regulacemi, které rozhodují o uložení nebo nepřijetí kovu. (Hund-Rinke a Kördel, 2003). Rostliny mohou zabránit příjmu látky nebo omezí její transport do nadzemních částí, opakem je akumulace (Soudek et al., 2006).

### **1.3.2 Bioindikátory bioakumulace**

Pro suchozemské systémy je správné fungování půdy nezbytné, stejně tak pro lidskou činnost. Rizika poškození funkce půdy by tak měla být přijímána velmi vážně. Pro řešení případných problémů je třeba poznat vliv ekologických stresů. Chemický stres vzniká zvýšenou koncentrací látek oproti běžným místním hodnotám. Kvůli složitosti půdy a její prostorové heterogenitě by bylo náročné vyhodnocování systému jako celku, proto je věnována zvýšená pozornost výběru indikátorových organismů, které mohou hodnotit kvalitu půdního systému (Didden a Römbke, 2001). Potenciální organismy by měly:

- 1) být klíčové pro fungování půdního ekosystému, aby podávaly relevantní odpověď na otázky na systémové úrovni,
- 2) být zastoupeny v široké škále ekosystémů pro umožnění porovnávání systémů,
- 3) být zastoupeny hojně, aby byly široce dostupné a jejich reakce byla snadno hodnotitelná,
- 4) být snadno použitelné v přírodních i laboratorních podmínkách, tedy i snadno shromažditelné a kultivovatelné,
- 5) přijít do kontaktu s odlišnými podobami faktorů stresu (roztok půdy, pevné a plynné fáze půdy),
- 6) být dostatečně citlivé na rozsáhlé vlastnosti životního prostředí, ale zároveň ne natolik citlivé, aby v blízké době došlo k jejich vyhynutí.

Tato kritéria splňuje řada taxonomických skupin půdních zvířat, z nichž každá skupina má své výhody i nevýhody (Edward et al., 1996). Například zástupci mikrofauny, prvoci a hlístice, jsou hojně zastoupeny ve všech typech ekosystémů. Jsou citlivé na mnohé faktory stresu, avšak pouze kontaktem s půdním roztokem, navíc práci s nimi stěžuje nesnadná manipulace (Didden a Römcke, 2001). Dále jsou často využíváni například stejnonožci, plži, roupice a žížaly.

### 1.3.2.1 Žížaly

Půdní bezobratlí, kterými jsou žížaly a roupice, slouží jako potrava mnoha savců a ptáků, proto se také uplatňují jako přenašeči látek do vyšších stupňů potravního řetězce (Cortet et al., 1999; Fisher a Koszorus, 1992). Žížaly patří stejně jako roupice do třídy máloštětinatců a do čeledi žížalovitých pak spadá více druhů (viz tabulka 1). Jsou zodpovědné za promíchávání a provzdušňování půdy, což zvyšuje její úrodnost, zároveň pohlcují částečně rozložený odpad z povrchu půdy a dopravují ho do hlubších půdních vrstev (Fisher a Koszorus, 1992). Existují dvě skupiny žížal – povrchové a hlubinné. Hlubinné žížaly jsou oproti povrchovým větší, množí se pomaleji a dožívají se několik desítek let v hloubce až dva metry, proto jsou pro testování nevhodné.

Tabulka 1: Taxonomické zařazení roupic a žížal

Taxonomie	Roupice		Žížaly	
<b>Říše</b>	Animalia	Živočichové	Animalia	Živočichové
<b>Kmen</b>	Annelida	Kroužkovci	Annelida	Kroužkovci
<b>Podkmen</b>	Clitellata	Opaskovci	Clitellata	Opaskovci
<b>Třída</b>	Oligocheata	Máloštětinatci	Oligocheata	Máloštětinatci
<b>Podtřída</b>	Tubificata	Nítěnkovci	Diplotesticulata	-
<b>Řád</b>	Tubificata	-	Ophistopora	-
<b>Čeď</b>	Enchytraeidae	Roupicovití	Lumbricidae	Žížalovití
<b>Rod</b>	Enchytraeus	Roupice	Lumbricus Eisenia aj.	Žížaly

Převzato a upraveno z: BioLib, 2017

Podle OECD (2010) jsou pro ekotoxikologické testy doporučenými druhy *Eisenia fetida* (žížala hojná) a *Eisenia andrei* (neoficiálně žížala kalifornská) patřící do čeledi Lumbricidae. *Eisenia fetida* se odlišuje jasně žlutými intersegmentálními pruhy, oproti *Eisenia andrei* která má jednotnou tmavě červenou barvu. Obě se dnes uplatňují při

kompostování (Jaenike, 1982). Používají se také jako rybí návnady, díky čemuž jsou komerčně dostupné. Mají relativně krátký životní cyklus, kdy při pokojové teplotě dosahují dospělosti za 2 – 3 měsíce.

Oba druhy upřednostňují **kultivaci** ve vlhkém substrátu s téměř neutrálním pH a vysokým obsahem organických látek. Optimální teplota chovu je 20 – 24 °C. Lze je chovat v širokém rozmezí zvířecích odpadů (Venter a Reinecke, 1988; OECD, 1984). Dle ISO 11268-2 (1998) je pro chov doporučena směs koňského nebo statkového hnoje a rašeliny v poměru 50:50. Médium s nízkou iontovou vodivostí je upraveno uhličitanem vápenatým na hodnotu pH 6 – 7 a nemělo by být nadměrně kontaminováno amoniakem či zvířecí močí. Taktéž je možné využít komerční zahradnické půdy nebo umělé půdy (OECD, 1984). Pro získání červů standardního věku i hmotnosti se využívá kultury s kokony, jejichž tvorba je podpořena čerstvým substrátem. Ideální hustota pro dobrý reprodukční výsledek je 100 dospělých jedinců na kilogram mokré váhy substrátu. Dospělí červi jsou po 28 dnech odstranění a pro testování jsou použity žížaly vylíhlé z kokonů ve věku 2 – 12 měsíců. Pohyb jedinců skrz půdu je známkou jejich zdraví, substrát je však potřeba měnit dříve než dojde k vyčerpání živin (OECD, 2010).

### 1.3.2.2 Roupice

Roupice jsou zástupci třídy máloštětinatců, čeledi roupicovitých (viz tabulka 1). Hrají důležitou roli při rozkladu organické hmoty a bioturbaci (Didden a Römbke, 2001). Jsou rozšířené v mnoha typech půd a jsou v kontaktu s pórovou vodou. Způsoby expozice zahrnují dermální, střevní i respirační cestu (Römbke, 2003). Roupice jsou dostupné a chovy lze uspokojivě udržovat v laboratorních podmínkách.

Doporučeným zkušebním druhem je *Enchytraeus albidus* (roupice bělavá), který je jedním z největších druhů (až 15 mm). Nalézá se v mořském, sladkovodním i suchozemském biotopu, především v rozkládajících se organických látkách (mořské řasy, kompost) a zřídka v loukách (Kaspzak, 1982). Druh roupice bělavé je komerčně k dostání a lze ho zakoupit jako potravu pro ryby, avšak často je smíšený s jinými, obvykle menšími druhy (Römbke a Moser, 1999). V případě zanesení jinými druhy by měly být všechny roupice promyty vodou v Petriho misce a pomocí stereomikroskopu vybráni dospělci druhu *E. albidus*, čímž je založena nová kultura. Životnost tohoto druhu je krátká, dospělosti je dosaženo za 33 dní při

18 °C a 74 dní při 12 °C. Pro test jsou využity kultury, které v laboratoři přežívají bez problémů po dobu 5 týdnů (OECD, 2010).

Dalším použitelným druhem může být *E. luxuriosus*, dříve známý jako *E. „minutus“*. Objeven byl v Německu a dosahuje přibližně poloviny velikosti *E. albidus* (Smelz a Collado, 1999). Známým druhem je také *E. buchholzi*, u kterého je obtížné jedince morfologicky rozlišit. Nedoporučuje se ho proto používat pro potřeby testů, pokud nelze jedince s jistotou identifikovat. Vyskytuje se na loukách, ale také u silnic. Ve srovnání s jinými malými druhy je relativně snadno identifikovatelný *E. bulbosus*. Běžně se vyskytuje v minerálních půdách Německa a Španělska. Není však plně známo jeho chování v laboratoři nebo jeho citlivost vůči chemikáliím (OECD, 2004).

V posledních letech je stále častěji využíván druh *E. crypticus*, který patří do stejné skupiny jako *E. luxuriosus*. Jeho ekologické požadavky nejsou přesně známy a patří k malým druhům rousic (3 – 12 mm, v průměru 7 mm) (Westheide a Müller, 1996), což stěžuje manipulaci s jedinci oproti *E. albidus*. I přes menší velikost je plnohodnotnou alternativou k *E. albidus* navíc s řadou výhod. Pro porovnání lze *E. crypticus* snadněji kultivovat v agaru, vykazuje vyšší reprodukční rychlost, kratší generační dobu, kratší periodu testů (Römbke a Moser, 2002) a vyšší toleranci k různým typům půdy (Römbke a Moser, 2002; Jänsh et al., 2005). Generační doba druhu se pohybuje pod 20 dní při 20 ±2 °C (Achazi et al., 1999), Westheide a Graefe (1992) udává 18 dní při 21 °C. Jelikož je jeho generační doba kratší než u *E. albidus*, lze také zkrátit dobu reprodukčních testů z 6 týdnů například na 4 týdny (OECD, 2004) nebo až na 3 týdny bez snížení kvality testu. *E. crypticus* snáší rozsáhlé vlastnosti půdy, kterými jsou pH (4,4 – 8,2), obsah jílu (1 – 29 %) a obsah organické hmoty (1,2 – 42 %) (Van Gestel et al., 2011).

**Kultivace** druhu *E. albidus* stejně tak i jiných druhů může být provedena ve velkých plastových boxech (např. 30 x 60 x 10 cm nebo 20 x 12 x 8 cm) naplněných směsí umělé a přírodní nekontaminované zahradní zeminy v poměru 1:1. Důrazně se nedoporučuje použití kompostované půdy kvůli možnému obsahu toxických chemikálií, například těžkých kovů. Před použitím zeminy je třeba z ní odstranit doprovodnou faunu, což může být provedeno jejím opakovaným hlubokým zmrazením. Lze využít i substráty obsahující pouze umělou půdu, ve které je však předpoklad nižší míry reprodukce oproti smíšeným půdám. Substrát by měl mít hodnotu pH 6 ±0,5 a měl by být dostatečně vlhký, ne však mokrá. Dobrým ukazatelem je jemné stlačení půdy mezi prsty, kdy správnou vlhkost indikuje vznik malých kapek vody na kůži. Chov je udržován v inkubátoru bez osvětlení. Podle OECD (2010) je



třeba nepřekročit teplotu 23 °C a dodržet doporučenou teplotu 15 ±2 °C. Dostatečná výměna plynů je zajištěna potřebným množstvím otvorů ve víku nádoby a opatrným provzdušňováním substrátu jeho promícháním jednou týdně (OECD, 2004; 2010).

Roupice lze krmit ovesnými vločkami, které by měly být skladovány v uzavřených nádobách a před použitím ošetřeny vysokou teplotou v autoklávu, aby se zabránilo zamoření roztoči. Po dezinfekci jsou vločky rozmělněny pro jejich snadné dávkování na povrch půdy. Pokud chceme stimulovat reprodukci lze do vloček přidávat každé dva týdny vitaminy, mléko či rybí tuk. Dalšími vhodnými potravinami jsou pekařské droždí nebo krmení pro ryby. Krmení probíhá jednou až dvakrát týdně. Množství potravy závisí na množství roupic. Pokud je krmivo do jednoho dne spotřebováno, jeho dávka by měla být zvýšena, naopak pokud ani po týdně krmivo spotřebováno není, je třeba jeho dávku snížit (OECD, 2004).

Po třech měsících by měly být roupice převedeny do čerstvého kultivačního nebo chovatelského substrátu. Vyhovující kultivační podmínky se vyznačují relativně rychlým pohybem roupic, které se viditelně nesnaží substrát opustit. Dále více či méně bělavou barvou živočichů s lesklým povrchem, na kterém neulpívají částice půdy. V poslední řadě uspokojivou reprodukcí roupic, kdy jsou v chovu zastoupeny různé věkové kategorie (OECD, 2004; 2010).

#### **1.4 Testy bioakumulace v suchozemských máloštětináčích**

Testy jsou využívány pro sledování bioakumulace těžkých kovů či persistentních organických látek. Testovanými organickými látkami jsou např. povrchově aktivní nebo vysoce adsorpční látky, o kterých je známo, že mají potenciál bioakumulace v živých organismech, dále pak pro analogy zmíněných látek, jejichž bioakumulační potenciál je předpokládán v důsledku strukturních vlastností. Použity mohou být i pro radioaktivně značené látky (OECD, 2010). Při hodnocení vlivu látek je třeba zmínit, že lze rozlišit přímé a nepřímé efekty. Přímé účinky jsou způsobeny chemickými interakcemi působícími na fyziologii zvířat, zatímco nepřímé účinky nastávají prostřednictvím změn v prostředí (Didden a Römbke, 2001).

Testy bioakumulace zahrnují dvě fáze, fázi expozice a eliminační fázi. Zvířata jsou rozdělena do dvou skupin, z nichž první je vystavena působení testované látky a druhá skupina slouží jako kontrolní, která je chovaná ve stejných podmínkách, ale bez přídatku

kontaminantu. V testovaných organismech kontrolní skupiny lze stanovit obsah sušiny a tuků, stejně tak analytické hodnoty pozadí, které jsou sledovány i v půdě (OECD, 2010). V první etapě expozice je prováděno měření po dobu 14 dnů u roupicovitých a 21 dnů u žížal, dokud není dosaženo rovnovážného stavu. Ustálený stav je chápán jako tři po sobě jdoucí koncentrace, kdy se jejich hodnoty navzájem nemění o více než 20 % u vzorků odebraných v intervalu nejméně dvou dnů (Sousa et al., 2000).

Pokud není přijímaná koncentrace sledované látky zanedbatelná, je vyžadována druhá etapa v podobě eliminace. Jedná se o přenos organismů do nádob obsahujících stejný substrát, ale bez přídavku testované látky. Opět se provádí měření koncentrace dané látky v bioindikátorech po 14 dnů u roupicovitých, 21 dní u žížal nebo dokud nedojde k dřívějšímu snížení koncentrace sledované látky v organismech o 90 %. Množství látky na konci eliminační fáze se považuje za nevyložitelné zbytky. Vyhodnocením závislosti je získána rychlost, jakou jsou kontaminanty z organismů vylučovány. V případě, že v testu nebylo dosaženo rovnovážného stavu, nelze použít základní bioakumulační faktor, ale je zapotřebí určit z dat rychlostní konstantu příjmu a eliminace spolu s kinetickým bioakumulačním faktorem na základě počítačových modelových rovnic (OECD, 2010). U látek s vysokou lipofilitou je používán vztah pro BSAF pro snížení variability výsledků. Tento postup je založen na vztahu potenciálu bioakumulace a lipofility, který existuje u některých tříd chemických látek. Korelace s tímto vztahem byly nalezeny například u ryb, bentických organismů i suchozemských máloštětinatců (Connell a Markwell, 1990).

Podmínky testů by měly být velmi podobné těm pro chov. Například teplota, substrát a množství potravy, které by mělo být před zahájením testu smícháno se substrátem. Ideální je provést zkoušku alespoň ve třech replikách. Aby mohl být test považován za validní, neměla by celková mortalita na konci testu po obou etapách přesahovat 10 % z celkového počtu u žížal a 20 % u roupicovitých. U *Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* by pak neměly průměrné hmotnostní ztráty na konci testu překročit 20 % ve srovnání s původní hmotností na začátku každé fáze (OECD, 2010).

#### **1.4.1 Testovací půdy**

Pro roupicovité bylo vyvinuto několik odlišných laboratorních testovacích systémů, které mohou být rozděleny do dvou kategorií. První jsou krátkodobé testy ve vodním prostředí či agaru (Römbke a Knacker, 1989), druhé jsou krátkodobé až středně dlouhé testy

v homogenizované přírodní půdě nebo v dobře definované umělé (artificiální) půdě (Römbke, 1988). Očekává se, že ve vodním prostředí bude látka nejvíce dostupná, a proto bude citlivost organismu v tomto prostředí vyšší, což potvrzují Römbke a Knacker (1989), kteří porovnávali toxické účinky látek ve vodě a v půdě dle OECD na *E. albidus*. Testy v půdních médiích však mohou být mnohem důležitější pro realistické zhodnocení výsledků z důvodu fyzikálních vlastností, kterými jsou rozpustnost, adsorpce či interakce se složkami potravy. Z těchto důvodů je ale také obtížné napodobit v laboratoři přírodní podmínky, ke kterým patří i chemické a biologické půdní vlastnosti (Didden a Römbke, 2001).

Provedení zkoušky ve vodním prostředí mohou doplňovat testy v pevných substrátech a upřesnit tak způsob působení látky v půdě. V případě vodního prostředí jde o přímý efekt kontaminantů, kdy lze počítat se stejnou reakcí v pevných půdách. Existují ale situace, kdy se přímý toxický efekt ve vodním prostředí neobjeví, ale při testech v substrátu je efekt na biomasu viditelný pravděpodobně z důvodu nedostatku potravy či jiných nepřímých vlivů. Zařadit sem lze sekundární otravy prostřednictvím potravní sítě a fyzikálně-chemické změny životního prostředí (Römbke et al., 1994). Stockinger a kol. (1997) hovoří také o nepřímých efektech v důsledku nedostatku potravy při testování směsi kovů (Cu, Zn, Ni, Cd a V) na druhu *E. buchholzi*.

Pokus je prováděn zpravidla s jednou koncentrací testované látky. Rozpustné testované látky by měly být před smísením s půdou zcela rozpuštěny ve vodě. Roztok lze vmíchat do půdy nebo ho lze využít pro namočení některé složky půdy, například část křemenného písku, kdy je roztok následně pomalu odpařen do sucha a suchý křemenný písek je vmíchán do vlhké půdy. Pro hůře rozpustné látky lze použít vhodné rozpouštědlo, které by mělo být mísitelné s vodou nebo takové, které lze odpařit, aby byla v půdě zanechána pouze testovaná látka. Mělo by být také ověřeno, zda je distribuce testované látky v půdě homogenní (OECD, 2010).

Je nutné, aby půda měla dostatečnou kvalitu umožňující přežití a reprodukci organismů jak po dobu aklimatizace, tak po dobu testů, aniž by zvířata vykazovala abnormální vzhled nebo chování. U substrátů je dobré znát před zahájením pokusu jejich původ, pH, obsah organického uhlíku, velikosti částic (zastoupení písku, bahna a jílu) a retenční vodní kapacitu (RVK, WHC z angl. water holding capacity). Přírodní zeminy nemusí být dostupné po celý rok a mohou obsahovat organismy a stopové kontaminanty ovlivňující test (OECD, 2010). OECD (1984) doporučuje používat umělou půdu, kterou lze před použitím uchovávat vysušenou při pokojové teplotě. Ta obsahuje:

- rašelinu 10 % rašeliny z rašeliníku dle pokynů OECD (1984)
- křemenný písek 70 % průmyslového křemenného písku sušeného na vzduchu, všechny částice by měly mít velikost  $\leq 2$  mm, z toho více než 50 % by mělo být v rozmezí 50 – 200  $\mu\text{m}$
- kaolinový jíl 20 %, obsah kaolinitu  $\geq 30$  %
- $\text{CaCO}_3$   $\leq 1$  %, práškový, chemicky čistý

Obsah organického uhlíku může být upraven snížením množství rašeliny na 4 – 5 % ve prospěch křemenného písku. Důsledkem je snížení adsorpce testované látky do půdy, čímž se může zvýšit dostupnost látky organismům (Van Gestel, 1992). Hodnota pH by měla být  $6 \pm 0,5$  a je upravována pomocí  $\text{CaCO}_3$ . Pro stanovení hodnoty pH je používán půdní výluh v 1M roztoku KCl nebo 0,01M  $\text{CaCl}_2$  (OECD, 2004). Suché složky směsi jsou promíchány v předstihu alespoň jednoho týdne před zahájením testu a alespoň 48 hodin před aplikací látky je substrát navlhčen deionizovanou vodou pro ustálení podmínek. Obsah vlhkosti je stanovován na začátku a na konci testu při 105 °C a měl by se pohybovat v rozsahu 40 – 60 % (OECD, 2010).

Mnoho studií využívá nekontaminovanou přírodní půdu, kterou je LUFA 2.2 od německé firmy Speyer (Bicho et al., 2016). Její pH je 5,5 (určené ve výluhu 0,01M roztokem  $\text{CaCl}_2$ ), obsahuje 1,77 % organické hmoty a její WHC je okolo 41,8 %. Součástí půdy je jíl (7,3 %), kal (13,8 %) a písek (78,9 %).

Další možností je umělá agarová půda, u které se předpokládá minimalizace aglomerace nanočástic, čímž jsou potlačeny dopady tohoto jevu na výsledky testů. Díky tomu lze s výhodou rozlišovat a porovnávat účinky nanočástic s účinky iontů uvolněných z rozpustných solí (Hrdá et al., 2016). Testovací půda je připravována z deionizované vody s obsahem přírodního agaru v rozmezí 1,5 – 2 %. V chovné půdě mohou být v malém množství zastoupeny i jiné složky např.  $\text{NaHCO}_3$ , KCl,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4$ . Maleri a kol. (2007) v testech s *Eisenia fetida* uvádí složení roztoku, který může být použit jako přírodní podzemní voda: v litru destilované vody je rozpuštěno 100 mg  $\text{NaHCO}_3$ , 20 mg  $\text{KHCO}_3$ , 200 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 180 mg  $\text{MgSO}_4$ .

Do roztoku je následně přidáno 15 g agarózy pro vytvoření pevné půdy. Arrate a kol. (2002) použil pro svůj test s *E. coronatus* také 1,5% agar s následujícími látkami v litru destilované vody: 1g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 250 mg  $\text{MgSO}_4$ , 250 mg  $\text{KNO}_3$  a 250 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

### 1.4.2 Příprava vzorků k analýze

Odebíranými vzorky pro účely testů jsou jak organismy, tak půda, která by měla být odebrána před zahájením testu a v průběhu obou fází testu. Živočichové jsou odebíráni nejméně šestkrát během expoziční i eliminační fáze. Pokud je prokázána stabilita testované látky může být počet odběrů půdy nižší, kdy jsou odběry situovány na počátek a konec fáze expozice. Jestliže se však koncentrace testované látky liší o více než 30 %, je třeba provést analýzu půdy častěji (OECD, 2010).

Živočichové jsou při každém odběru vzorků z dané repliky odstraněni z půdy. Substrát lze rozprostřít na mělkou nádobu a organismy vybrat například klenotnickou pinzetou. Dále jsou organismy rychle opláchnuty vodou na skleněné či ocelové ploše a přebytečná voda je odstraněna jemným dotykem jejich těla o okraj misky nebo opatrným osušením navlhčenou papírovou utěrkou. Zvířata jsou pak přenesena do předem zvážené nádoby a jsou ihned zvážena i s obsahem střev. U rousic je toto vážení většinou finální, jelikož je technicky složité kvůli jejich malé velikosti vyčkat na vyčištění střev. Oproti tomu u žížal by mělo druhé vážení následovat po vyprázdnění střev, které může probíhat přes noc například na vlhkém filtračním papíru v překryté Petriho misce (OECD, 2010; Svobodová, 2011). West a kol. (2011) uvádí u *Lumbricus rubellus* dobu vyprázdnění obsahu střev po 4 dny při denní výměně filtračního papíru. Tento krok umožňuje posouzení případného poklesu biomasy v průběhu zkoušky.

Po stanovení hmotnosti by měli být živočichové usmrceni rychlou a vhodnou metodou, kterou je ponoření do kapalného dusíku či zmrazení pod teplotou  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Bigorgne a kol. (2011) udává teplotu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Odebrané vzorky by měly být analyzovány co nejdříve po přípravě, tj. během 1 – 2 dnů, aby bylo zabráněno degradaci nebo jiným ztrátám. V případě, že analýzu nelze provést, lze vzorky uchovávat při teplotě  $\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (OECD, 2010; Svobodová, 2011).

Pro získání suché hmotnosti živočichů lze vysušit lyofilizací. Jde o metodu vymrazování, kdy jsou organismy nejprve hluboce zmrazeny na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následně se voda ve formě ledu nechá sublimovat za kontrolované teploty a vysokého podtlaku v lyofilizátoru. Vzorky jsou přikryté vrstvou buničiny a u žížal může trvat převedení vody do plynného skupenství zhruba dva dny. Po tomto kroku následuje opětovné vážení (Svobodová, 2011). Vysušení žížal může být provedeno také za vysokých teplot, například v peci při  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  po 24 hodin (West et al., 2001), zatímco rousicím by měla postačovat teplota  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  po 24 hodin (Bigorgne et al., 2011). Arrate a kol. (2002) nejprve umístil živočichy druhu *E. cronatus* do

vody z vodovodu zbavené chloru ( $\text{pH} = 7,19$ ;  $411 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;  $42 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ) po dobu 2 hodin, aby se živočichové zbavili obsahu střev a očistili se od agaru. Po té umístil roupice na předem umyté, vysušené a zvážené filtry ze skleněných mikrovláken (Whatman; průměr 2,5cm), na kterých byly sušeny 12 hodin při  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ . Následně filtry se vzorky umístil do exsikátoru na několik hodin, po ustálení pokojové teploty byly filtry opět váženy.

Převedení vzorků žížal do roztoku je pak často prováděno pomocí mikrovlnného rozkladu. Svobodová (2011) do teflonových nádob navažovala 200 mg homogenního suchého vzorku. Po přidání 4 ml podvarové  $\text{HNO}_3$  a 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  byly patrony uzavřeny a umístěny do mikrovlnného zařízení. Po ukončení programu rozkladu byly vychlazeny ve studené vodě a jejich obsah je kvantitativně převeden do 50ml odměrných baněk, ve kterých byl vzorek doplněn deionizovanou vodou po rysku. Roztoky lze dále uchovávat v plastových dekontaminovaných lahvičkách. Stejným způsobem byly zpracovány i slepé vzorky. Zheng a kolektiv (1997) provedli rozklad ve směsi 3 ml  $\text{HNO}_3$  + 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Kvůli nižší hmotnosti roupic uvádí Cedergreen (2013) jen 1 – 20 mg suchého vzorku roupic, který je rozložen rovněž v mikrovlnném záření po přidání 250  $\mu\text{l}$  koncentrované  $\text{HNO}_3$  a 125  $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Po stanovení suché hmotnosti lze roupice rozmíchat také v 300  $\mu\text{l}$  směsi  $\text{HClO}_4$  s  $\text{HNO}_3$  v objemovém poměru 1:7 (Van Straalen a Van Wensem, 1986). Bigorgne a kol. (2011) uvádí odlišnou metodu rozpouštění žížal přidáním 2 ml 68%  $\text{HNO}_3$ , kdy je po 2 hodinách zvýšena teplota z laboratorní na  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  na dalších 20 hodin. Po vychladnutí vzorku jsou přidány 2 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Po dvou a více hodinách je vzorek přefiltrován a konečný objem upraven deionizovanou vodou na 10 ml.

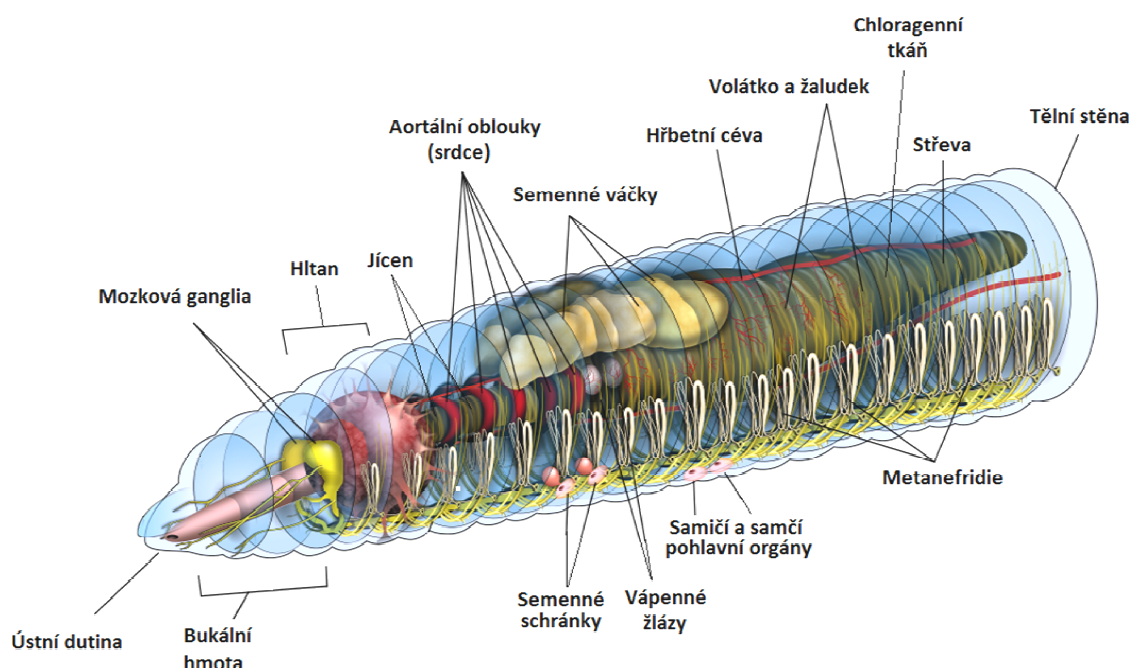
Žížaly lze pro prvkovou analýzu připravit také nestandardně až po rozdělení na části. Jedná se o tři frakce, kdy první z nich je přední část, kam patří bukální hmota, jícen spojený s vápennými žlázami, volátka a žaludek. Do druhé zadní části patří střeva a chloragenní tkáň. Poslední frakci tvoří tělní stěny, reprodukční tkáň a metanefridie, viz obrázek 2. Usušené tkáňe jsou pak rozpuštěny v koncentrované  $\text{HNO}_3$ . Vápenné žlázy totiž v těle udržují homeostázu Ca, díky čemuž mohou žížaly druhu *Lumbricus* obývat půdy s širokým rozsahem koncentrací Ca. Díky rozdělení na frakce, lze detailněji zkoumat působení bioakumulace v odlišných tkáních (West et al., 2001).

Pro výpočet bioakumulačních faktorů je třeba znát nejen koncentrace látek v bioindikátorech, ale také v chovných a testovacích půdách. Stanovení kovů v půdách se provádí nejčastěji v jejich extraktech. Existuje velmi široká škála extrakčních postupů, např. Caetano a kol. (2012) odebírali 1 g půdy do teflonových kádinek se závitovým uzávěrem, do



kterých přidávali lučavku královskou (3 ml 37% HCl + 1 ml 65% HNO<sub>3</sub>). Směs mírně zahřívají na plotýnce při 100 °C do vysušení. Následně do nádob přilili 10 ml HNO<sub>3</sub> a roztok filtrovali přes 0,2 mm filtry pro odstranění hrubších částic a před vlastní analýzou doplnili na výsledný objem 25 ml.

Pro správnou interpretaci výsledků je dobré ověřit homogenitu půdy analýzou vzorků půd odebraných z různých míst a hloubek testovací nádoby. Například u agarových půd v Petriho miskách, se půda odebírá jak ze dna misky, tak i z jejího víčka. Homogenita půdy je pak statisticky hodnocena (Hrdá et al., 2016).



Obrázek 2: Vnitřní stavba přední části žížaly druhu *Lumbricus terrestris*

Převzato a upraveno z: Wikimedia commons, 2016

## 1.5 Metody vhodné pro prvkovou analýzu malých vzorků

Elementární analýza malých vzorků je předmětem neustálého výzkumu, neboť pro mnoho analytických aplikací je velikost či objem vzorku limitujícím faktorem. Pro sledování stopových koncentrací prvků v malém množství vzorku jsou nutné velice citlivé techniky, mezi které bezesporu patří atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET-AAS) nebo hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu (ICP-MS). Těmito technikami jsou běžně analyzovány vzorky v kapalném stavu. Při obvyklém

způsobu rozkladu vzorků o nízké hmotnosti např. mikrovlnnou mineralizací dochází k vysokému zředění původního materiálu a detekční schopnosti celého analytického postupu jsou tak velmi omezeny. Samotná úprava malých vzorků před analýzou je značnou výzvou, jelikož malé množství vzorku navíc zvyšuje riziko ztrát a kontaminace cílového analytu (Takasaki a kol, 2011; Todolí a Mermet, 2005, Todolí a Mermet, 2006). Příprava takových vzorků klade extrémní nároky na čistotu prostředí, čistotu používaných činidel, laboratorního nádobí a na manipulaci se vzorky (Pettersson a Olsson, 1998). Kromě dostupného množství vzorku je při volbě vhodné analytické techniky nutné brát v úvahu i koncentrace sledovaného analytu. V případě vyšších nikoliv stopových koncentrací je možné volit kompromis mezi stupněm naředění vzorku při jeho převedení do roztoku a výslednou koncentrací a využít dále např. optickou emisní spektrometrii s buzením v indukčně vázaném plazmatu (ICP-OES) či atomovou absorpční spektrometrii s atomizací v plameni (F-AAS). V analýze malých vzorků se mohou uplatnit i další speciální techniky jako např. ICP-MS s elektrotermickým vypařováním (ETV-ICP-MS), která podobně jako ET-AAS umožňuje analýzu vzorků i ve formě suspenze či přímo pevných materiálů (Takasaki a kol, 2011; Todolí a Mermet, 2005, Todolí a Mermet, 2006; Pettersson a Olsson, 1998).

Při vývoji analytického postupu musí být zváženy přípravné kroky a jejich důsledky, např. naředění vzorku při rozkladu či použité chemikálie, které mohou ovlivňovat následné analytické stanovení (vlivy matrice, spektrální interference). Musí být respektovány i fyzikálně-chemické vlastnosti analytu, aby byly eliminovány možné ztráty analytu ve fázi přípravy vzorku. Při těchto speciálních aplikacích musí být zváženy i možné cesty kontaminace vzorku. Pokud je koncentrace analytu v upraveném vzorku pod detekčními schopnostmi dostupné instrumentální techniky, je nutné zahrnout i prekoncentrační kroky, které mohou zároveň separovat analyt od matrice vzorku.

Limitující může být i objem potřebný pro promytí systému a pro analýzu daný použitou technikou i počtem sledovaných analytů. U ICP technik je čas potřebný k provedení kompletní analýzy standardním systémem vnášení vzorků (zmlžovač a mlžná komora) 1 až 5 minut v závislosti na počtu analyzovaných prvků a zvoleném systému detekce. Objem dávkovaného vzorku pro ET-AAS či ETV-ICP-MS je řádově v jednotkách až desítkách  $\mu\text{l}$ , v případě pevných vzorků navážky i v  $\mu\text{g}$  (Todolí a Mermet, 2005, Todolí a Mermet, 2006).

**Optická emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu** umožňuje elementární analýzu v široké škále vzorků. Vzorek je převeden do formy aerosolu ve zmlžovači a přes mlžnou komoru je veden do plazmové hlavičky. Argonové plazma je

vhodným budícím (excitačním) zdrojem, ve kterém je vzorek atomizován (případně zčásti ionizován). Jednotlivé atomy nebo ionty emitují charakteristické čárové spektrum různých vlnových délek, které je detekováno. Intenzita spektrálních čar je úměrná obsahu prvku. (Koplík, 2017; Airproducts, 2017; Černohorský a Jandera, 1997).

Metoda dosahuje detekčních limitů v řádu  $1 - 10 \mu\text{g.l}^{-1}$  až k sub-ppb koncentracím, pro některé prvky je citlivost horší  $10 - 100 \mu\text{g.l}^{-1}$  (Tyler, 2017; Černohorský a Jandera, 1997). Nevýhodou techniky mohou být vysoké provozní náklady kvůli vysoké spotřebě argonu. Spektrální interference jsou odstraňovány odečtem hodnot pozadí, či výběrem jiné spektrální čáry, která není rušena jiným prvkem. Nespektrální interference jsou kompenzovány přítomností porovnávacího prvku nebo kalibrací standardním přídatkem. (Koplík, 2017). Problém může nastat v případě malého množství vzorku. Vzhledem k rychlosti dodávání vzorku okolo  $0,5 - 2 \text{ ml.min}^{-1}$  a době analýzy okolo  $1 - 5 \text{ min}$  v závislosti na počtu stanovovaných vzorků, je požadovaný objem vzorku v rozmezí od 1 do 10 ml. Tato skutečnost může být komplikací pro analýzu mikrovzorků o objemu nižším než 1 ml například při forenzních, biologických a klinických analýzách. Lze použít zmlžovače s průtokem analytu pod  $100 \mu\text{l.min}^{-1}$ , což však může být spojeno s degradací přesnosti metody. Z těchto důvodů jsou stále vyvíjeny nové systémy vnášení vzorků (Beauchemin, 2002).

**ICP-MS** je další metodou využívající indukčně vázané plazma. Plazma slouží jako zdroj iontů, které jsou vedeny do hmotnostního spektrometru, kde jsou děleny podle poměru jejich hmotnosti a náboje  $m/z$ . Expanzní komora propojuje prostředí atmosférického tlaku, ve kterém se nachází plazmový hořák, s prostředím vysokého vakua, ve kterém je umístěn detektor iontů. Vakuum je potřebné pro pohyb vzniklých iontů z plazmy do analyzátoru tlakovým gradientem a zároveň zajišťuje prostředí nerušené částicemi vzduchu. Nosným plynem je opět argon, jehož nečistoty mohou způsobovat více nezanedbatelných problémů oproti ICP-OES, v důsledku vyšší citlivosti metody ICP-MS, která se pohybuje až do řádů  $\text{ng.l}^{-1}$ . Argon samotný či jako součást polyatomických iontů může být zdrojem spektrálních interferencí (Tyler, 2017; Černohorský a Jandera, 1997; Airproducts, 2017; Mihaljevič, 2004).

Základním vybavením MS technik je kvadrupólový analyzátor, který propouští jen ionty s určitým poměrem  $m/z$  a ostatní jsou na tyčích zachyceny. Průletový analyzátor (TOF z angl. time of flight) umožňuje o několik řádů vyšší rychlost záznamu a pokrývá celý rozsah hmot. Principem analyzátoru je měření doby, za kterou ionty překonají určitou dráhu. Ionty

urychlené vysokonapěťovým pulzem vstupují ortogonálně do průletové trubice, ve které nepůsobí elektrické pole. Všechny ionty získávají stejnou energii, ale díky odlišným poměrům  $m/z$  vyvinou různou rychlost, která je detekována. Lehčí ionty putují rychleji než ty těžší (Cvačka, 2016; Černohorský a Jandera, 1997).

Výhodou ICP-MS oproti ICP-OES, je nižší spotřeba vzorku a vyšší rychlost multielementární analýzy s možností stanovení izotopových poměrů včetně možnosti použití techniky izotopového zředování. Mezi nevýhody patří vysoké náklady spojené s cenou přístroje a nezbytností klimatizované laboratoře s vysokými nároky na čistotu prostředí (Koplík, 2017). Vzorek má omezený způsob přípravy, kdy je k jeho úpravě žádoucí používat nejlépe jen  $\text{HNO}_3$ , ale ne v příliš vysoké koncentraci, aby nezpůsobovala korozi částí přístroje. Množství tuhých látek je třeba snížit ředěním alespoň na  $1 - 2 \text{ g.l}^{-1}$ , z důvodu zanášení přístroje solemi. Obecně platí, že se lépe analyzují ionty těžké, protože snáze prolétnou přístrojem až k detektoru. Spektrální i nespektrální interference jsou oběma metodám společné (Mihajlevič, 2004; Černohorský a Jandera, 1997).

**Atomová absorpční spektrometrie (AAS)** je založena na specifické absorpci záření rezonanční spektrální čáry volnými atomy měřeného prvku v základním energetickém stavu (Koplík, 2017). Zdroj primárního čárového záření může tvořit výbojka s dutou katodou, bezelektrodová výbojka nebo tzv. superlampa. Velikost vyzářené energie neovlivňuje velikost absorbance, ale ovlivňuje velikost rozdílu signálu od šumu, čímž je ovlivněna mez detekce. Paprsek záření je veden od zdroje záření skrz absorpční prostředí až do detektoru. Výsledný signál je dále vyhodnocován po korekci pozadí. Zdrojem a rezervoárem volných atomů je atomizátor, který zpravidla slouží i jako absorpční prostředí. Podle typu atomizátoru a způsobu vnášení analytu jsou rozlišeny jednotlivé druhy AAS (Černohorský a Jandera, 1997).

**F-AAS** využívá atomizaci v plameni. Jejím principem je převedení roztoku na aerosol, který je smíchán se směsí oxidovadla a paliva a veden do plamene. Metoda je vhodná pro stanovení vyšších koncentrací v řádu desetin až desítek  $\text{mg.l}^{-1}$ . Přístroje umožňují automatizaci a jsou cenově přijatelné s nízkými provozními náklady.

Citlivost F-AAS je ovlivněna účinností zmlžování vzorku či ionizací analytu (analyt v ionizované formě neabsorbuje záření). Tzv. ionizačním puffem bývá sloučenina snadno ionizovatelného prvku, např.  $\text{CsCl}$  nebo  $\text{KCl}$ , přidávaná v nadbytku. Důležitým krokem ovlivňujícím citlivost měření je optimalizace složení palivové směsi. Nejčastěji používaným

palivem je acetylen, výjimečně pak propan/butan nebo vodík, jako oxidovadlo slouží vzduch nebo oxid dusný (Černohorský a Jandera, 1997; Koplík, 2017).

Při **AAS s elektrotermickou atomizací** je nejběžnějším atomizátorem vyhřívána grafitová píčka, odkud pochází jiné značení metody GF-AAS (graphite furnace). Pomocí ET-AAS lze stanovit stopové až ultrastopové koncentrace v řádech setin až desítek  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výhodou při analýze mikrovzorků je velmi malá spotřeba analytu pohybující se v rozmezí 10 – 50  $\mu\text{l}$ . Celý objem se nastříkuje jednorázově do atomizátoru, kde je vzorek termicky zpracován a atomizován. Grafitová kyveta je elektricky vyhřívána a proplachována inertním plynem (Ar nebo  $\text{N}_2$ ). Po nástřiku vzorku do kyvety je odpařeno rozpouštědlo. V dalším kroku pyrolýzy dochází k termickému rozkladu matrice na plynné produkty. Po odstranění produktů matrice proudem inertního plynu následuje velmi rychlý ohřev na teploty 1400 – 2700 °C, který má za úkol odpařit analyt a rozštěpit ho na atomy. Po tomto procesu je zaznamenávána celková absorbance a signál pozadí.

Je důležité korigovat nescifickou absorpci a optimalizovat všechny kroky termického zpracování roztoku v analyzátoru. Citlivost metody lze ovlivnit i výběrem vhodného modifikátoru matrice, která má zvláště v ET-AAS vliv na správnost analýzy. Mez detekce ET-AAS je o 2 – 3 řády nižší než u F-AAS (Černohorský a Jandera, 1997; Koplík, 2017).

**Elektrotermické vypařování (ETV)** je systém zpracování vzorku převzatý z elektrotermické atomizace a využívá se zejména ve spojení s ICP-MS či ICP-OES. Malá část kapalného, ale i suspenzního či pevného vzorku (řádově  $\mu\text{g}$  či jednotky  $\mu\text{l}$ ) je zaváděna do grafitové (případně wolframové) píčky. Vzorek je termicky zpracován, plynné produkty jsou vedeny do plazmatu a následně analyzovány. Výhodou systému je výrazné snížení spotřeby vzorku a optimalizovaný teplotní program dokáže odstranit matriční vlivy, což přispívá ke snížení detekčních limitů. Reprodukovatelnost měření je závislá především na geometrii dávkování vzorku do kyvety a na jeho množství (Mihajlevič, 2004).

## 1.6 Prvková analýza vzorků z ekotoxikologických pokusů

Cedergreen a kol. (2013) zkoumali korelaci mezi množstvím biomasy a obsahem elementů v organismech z bioakumulačních testů se zaměřením na *Enchytraeus crypticus* a *Caenorhabditis elegans*. Jedinci druhu *Enchytraeus crypticus* byli shromážděni z kontrolní

půdy LUFA 2.2, opláchnuti a vysušení v peci při 80 °C. Převedení organismů do roztoku bylo zajištěno mikrovlnnou mineralizací s koncentrovanou HNO<sub>3</sub> a 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pomocí ICP-MS bylo sledováno 40 prvků (Ag, Al, As, Ba, Be, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Gd, Ho, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Nd, Ni, P, Pb, Pr, Sb, Sc, Se, Sm, Tb, Th, Tm, U, V, Y, Yb a Zn). Pro stanovení Cd byla použita ET-AAS s 0,1 % Pd a 0,2 % Mg použitými jako modifikátor. V případě nízkých koncentrací byly metodou ET-AAS stanoveny i jiné elementy. Cílem bylo najít prvky, které budou dobře reprezentovat množství biomasy. Podmínkou byla stabilita prvků a jejich koncentrace nad detekčním limitem metod, která nebude ovlivněna zacházením s organismy během experimentu. Mezi prvky splňující tato kritéria pro oba testované organismy patří K, Mg a P, které vykazují spojení mezi obsahem prvku a množstvím suché biomasy. V tabulce 2 jsou uvedeny koncentrace detekovatelných prvků v mg.kg<sup>-1</sup> vztahující se k suché hmotnosti roupic.

**Tabulka 2: Koncentrace detekovaných prvků v suché biomase *E. crypticus***

Prvek	c [mg.kg <sup>-1</sup> ]	Prvek	c [mg.kg <sup>-1</sup> ]	Prvek	c [mg.kg <sup>-1</sup> ]
<b>K</b>	4308 ±854	<b>V</b>	5,6 ±2,0	<b>Pr</b>	0,29 ±0,15
<b>Co</b>	0,50 ±0,11	<b>Ba</b>	16 ±6	<b>Y</b>	0,86 ±0,46
<b>P</b>	4722 ±1,022	<b>Sr</b>	4,2 ±1,7	<b>La</b>	1,37 ±0,73
<b>Mg</b>	543 ±139	<b>Mn</b>	55 ±23	<b>Ce</b>	2,5 ±1,4
<b>Zn</b>	82 ±23	<b>Fe</b>	855 ±376	<b>Nd</b>	1,2 ±0,6
<b>U</b>	0,29 ±0,08	<b>Al</b>	1504 ±681	<b>Sb</b>	0,10 ±0,06
<b>Ca</b>	1153 ±382	<b>Li</b>	1,5 ±0,7	<b>Ni</b>	2,4 ±1,8
<b>Pb</b>	4,1 ±1,5	<b>Th</b>	0,36 ±0,18	<b>Cr</b>	3,9 ±3,2

Upraveno a převzato z: Cedergreen et al., 2013

Zhang a Van Gestel (2017) pozorovali toxické účinky sloučenin olova Pb(NO)<sub>3</sub> a PbCl<sub>2</sub> v půdních bezobratlých *E. crypticus*. Chovnou půdou bylo agarové médium, zkušební půdou standardní půda LUFA 2.2. Koncentrace Pb v roupicích rostla se stoupající koncentrací Pb v půdě. Zmražené roupace byly po testu rozloženy směsí HNO<sub>3</sub> a HClO<sub>4</sub> v poměru 7:1 při zahřívání z 85 na 180 °C v intervalu dvou hodin. Obsah olova byl sledován pomocí ET-AAS. Střední letální koncentrace (LC<sub>50</sub>), při které zemřelo 50 % jedinců, byla pro Pb(NO)<sub>3</sub> 543 a pro PbCl<sub>2</sub> 779 mg Pb.kg<sup>-1</sup> suché půdy. Koncentrace v roupicích po testu s Pb(NO)<sub>3</sub> byla 78,2 a pro PbCl<sub>2</sub> 81,1 mg Pb na kg mokré hmotnosti roupic. Hodnoty LC<sub>50</sub> jsou pro obě sledované látky ve stejném řádu a koncentrace Pb v roupicích jsou podobné. Bioakumulace i toxicita těchto dvou sloučenin je tedy podobná, zřejmě díky jejich podobné schopnosti disociace.

Svobodová (2011) použila žížaly *Eisenia fetida* při hodnocení biodostupnosti arsenu v průmyslovém kalu a po jeho úpravě kompostováním. Kontrolní chovnou půdou byla směs hnoje, zahradního substrátu a rašeliny v poměru 40:50:10 s 60 – 80% WHC a pH mezi 6 – 7. Test trval 11 dní při 20 ±2 °C. Po ukončení testu byli živočichové vyjmuti z půdy, omyti a zváženi. Po 24 hodinách na filtračním papíru byli znovu omyti, vysušeni lyofilizací při -80 °C a opět zváženi. Převedení vzorků žížal do roztoku bylo provedeno mikrovlnným rozkladem v prostředí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku. V takto připravených vzorcích byl měřen obsah arsenu pomocí ICP-MS. Bylo zjištěno, že bioakumulace arsenu souvisí s jeho mobilitou, která je spjatá s jeho biodostupností. Ukázalo se, že kompostování může být vhodnou metodou pro zpracování kalů, jelikož tento způsob snižuje dostupnost arsenu pravděpodobně jeho vazbou na organickou hmotu. Bioakumulační faktor arsenu získaný pro samotný kal bez úpravy byl výrazně vyšší.

West a kol. (2011) provedli stanovení Ca a Sr u žížal druhu *Lumbricus rubellus* chovaných v různých přírodních půdách. Po třech týdnech byly žížaly přeneseny na filtrační papír, který byl měněn denně po dobu 4 dnů. Žížaly byly usmrceny kapalným dusíkem a usušeny v peci při 80 °C. Vzorky byly analyzovány pomocí ICP-MS. Experiment ukázal, že žížaly pocházející z kyselějších půd mají tendence akumulovat Sr a Ca efektivněji oproti živočichům ze zásaditějších míst. Analýza jednotlivých frakcí (viz kapitola 1.4.2) pak potvrdila nejvyšší koncentrace Ca a Sr v první frakci tkání obsahující vápenné žlázy, které udržují homeostázu Ca a hrají významnou roli v bioakumulaci prvků.

Bicho a kol. (2017) se zabývali účinkem nanočástic mědi CuONMs (nepotažené, průměr asi 10 nm) a CuCl<sub>2</sub>. Testovaným organismem byly roupice druhu *Enchytraeus crypticus* chované na agarovém médiu. Reprodukční test s různými koncentracemi sloučenin mědi byl proveden ve standardní půdě LUFA 2.2. Použitou analytickou metodou byla ET-AAS. Rozpustnější forma CuCl<sub>2</sub> vykazovala toxičtější účinky při nižších koncentracích, kdy střední letální koncentrace, byla okolo 303 mg Cu.kg<sup>-1</sup> půdy. Měď ve formě nanočástic působila stejný efekt až při koncentraci okolo 2103 mg Cu.kg<sup>-1</sup>. Hodnoty LC<sub>50</sub> pro nanočástice, které jsou o řád vyšší, vypovídají o nižší dostupnosti a toxicitě Cu v podobě částic.

Bicho a kol. (2016) porovnávali u *E. crypticus* také rozdíly v účinku nanočástic stříbra AgNM300K (nepotažené, průměr asi 15 nm) a AgNO<sub>3</sub>. Roupice z chovu na agarovém médiu byly použity pro reprodukční testy ve standardní půdě LUFA 2.2. Na přežívání i reprodukci měly vliv obě formy Ag. LC<sub>50</sub> pro dusičnan stříbrný byla okolo 75 mg Ag.kg<sup>-1</sup>, oproti formě

AgNM300K která působila stejný výsledek při koncentraci  $657 \text{ mg Ag.kg}^{-1}$ . Kontrolní test samotného rozpouštědla na organismy byl negativní. Opět bylo potvrzeno, že forma nanočástic je méně dostupná a toxická pro organismy bez ohledu na její akumulaci.

Testem se stříbrnými nanočásticemi AgNM300K (nepotažené, průměr asi 15 nm) a AgNO<sub>3</sub> se zabývali i Riberio a kol. (2015). Na jeho základě hodnotili mechanismy oxidativního stresu. Padesát jedinců *E. crypticus* z chovu na agarovém médiu bylo přesunuto do testovacího média LUFA 2.2 s různými koncentracemi AgNO<sub>3</sub> a AgNM300K. Po ukončení reprodukčního testu byly roupice opatrně shromážděny, opláchnuty vodou, zváženy ve zkumavce, usmrceny tekutým dusíkem a vysušeny při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Roupice byly dále použity pro analýzu biochemických markerů oxidativního stresu, kterými jsou enzymy kataláza, glutathion-peroxidáza, glutathiontransferáza, lipidová peroxidáza aj. V rámci reprodukčního testu byly hodnoceny střední účinné koncentrace Ag v půdě, při kterých došlo k 50% inhibici reprodukční schopnosti roupic. Pro AgNO<sub>3</sub> se jednalo o 60 a pro AgNM300K  $170 \text{ mg Ag.kg}^{-1}$  suché půdy. Výsledky korelují s toxicitou volných Ag<sup>+</sup> iontů, které jsou hojněji disociované z AgNO<sub>3</sub> oproti méně disociované formě nanočástic AgNM300K, u kterých je třeba vyšší bioakumulace látky pro vyvolání srovnatelných účinků na organismy.

Topuz a Van Gestel (2015) se rovněž zaměřili na kinetiku toxicity sloučenin stříbra, konkrétně AgNO<sub>3</sub> a nanočástic potažených citrátem AgNP-Cit a polyvinylpyrrolidonem AgNP-PVP (průměr asi 25 nm). Roupice druhu *Enchytraeus crypticus* byly z chovného agarového gelu přeneseny do testovacího inertního křemenného písku, který neobsahoval organický uhlík a který byl obohacen testovanými sloučeninami stříbra o různých koncentracích. Roupice byly na konci testů lyofilizovány, zváženy a převedeny do zkumavek s 300 ml HNO<sub>3</sub> + HClO<sub>4</sub> v poměru 7:1. Dále byly zahřívány při 85; 120 a 165 °C po dobu 30; 30 a 45 minut a nakonec byla směs plně odpařena při 180 °C. Před stanovením Ag pomocí ET-AAS byly usušené vzorky rozpuštěny v 1M HCl. Střední letální koncentrace byly (v  $\mu\text{g Ag.l}^{-1}$ ) pro AgNO<sub>3</sub> 81, AgNP-Cit 322 a AgNP-PVP 47. Pro dusičnan a nanočástice potažené polyvinylpyrrolidonem je tato koncentrace o jeden řád nižší, jelikož vykazují podobnou disociaci Ag<sup>+</sup> iontů do roztoku. Nanočástice potažené citrátem jsou náchylnější k aglomeraci zvláště v přítomnosti Ca<sup>2+</sup>, čímž je snížena jejich biologická dostupnost v tělních tekutinách. Tento fakt potvrzuje i nalezená koncentrace Ag v roupicích, která pro dusičnan i AgNP-PVP dosahuje 21,8 a pro AgNP-Cit  $57,6 \text{ mg Ag.kg}^{-1}$  suché váhy roupic. Obsah AgNP-Cit v roupicích je tedy pro LC<sub>50</sub> nejvyšší, avšak díky malé biodostupnosti Ag



v této formě je toto množství svým účinkem srovnatelné s mnohem nižšími koncentracemi ostatních forem stříbra.

Hrdá a kol. (2016) porovnávala vliv sloučenin zinku na organismy *E.crypricus*. Použit byl  $ZnCl_2$  a nanočástice ZnO-NPs (nepotažené, průměr 10 nm). Test probíhal v agarovém médiu a nanočástice byly připraveny dvěma způsoby. V prvním případě byl prášek s částicemi kryogenně smíchán se suchým agarem a až poté byla přidána voda. Druhým způsobem byla příprava suspenze částic s vodou a dispergantem pyrofosfátem sodným. Až takto připravený koloidní roztok byl vmíchán do horkého agarového gelu. Použití kryogenně připravených částic nevykazovalo úmrtnost závislou na jejich koncentraci, oproti koloidní suspenzi, kde byla tato závislost patrná. Kryogenně připravené částice vykazovaly velmi vysokou aglomeraci, čímž byla zřejmě způsobena nepravidelná úmrtnost organismů. Pomocí ICP-OES byla určena koncentrace zinečnatých iontů pro  $ZnCl_2$  v půdě odpovídající  $LC_{50}$   $37,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Nanočástice při této koncentraci nepůsobily žádný efekt zřejmě z důvodů nižší disociace sloučeniny, a tím i její nižší biodostupnosti pro organismus, čímž je způsobena i velmi malá toxicita těchto nanočástic pro roupice.

## 2 Experimentální část

### 2.1 Chemikálie

- Deionizovaná voda (Ultra Clear, SG, Německo)
- 65% kyselina dusičná (Lach-Ner s. r. o., Neratovice, ČR)
- 25% hydroxid tetramethylamonný (TMAH) (Sigma-Aldrich, USA)
- Jednoprvkové kalibrační standardní roztoky: Ca, K, Mg, Mn, Na, P 1,000 ±0,002 g.l<sup>-1</sup> (Analytika s. r. o., Praha, ČR); Fe, S 1,000 ±0,002 g.l<sup>-1</sup> (SPC Science, Kanada); Zn 1,000 ±0,002 g.l<sup>-1</sup> (CPI, Santa Rosa, USA); Au 1,000 ±0,002 g.l<sup>-1</sup> (VÚK, ČR); Ag, Cd, Sn, Hg, Pb 1,000 ±0,002 g.l<sup>-1</sup> (Analytika s. r. o., Praha, ČR)

### 2.2 Laboratorní pomůcky

- Plastové nádoby s víčky pro uchovávání vzorků a standardních roztoků
- Plastová špachtle
- Malý štětec (Milan 121, vel. 2)
- Filtrační papíry (KA 4 pro kvantitativní analýzu, Papírna Perštejn s. r. o., ČR)
- Plastové kádinky o objemu 25 a 50 ml
- Skleněné kádinky o objemu 50 ml
- Plastové odměrné baňky 10, 25, 50, 100, 250 ml
- Skleněné odměrné baňky 10 ml
- Plastové zkumavky
- Automatický dávkovač 100 – 1000 µl, 0,5 – 5 ml (Eppendorf research, Hamburk, Německo), 1 – 10 ml a 20 – 200 µl (Biohit proline, Helsinky, Finsko)
- Plastové stříkačky 20 ml
- Stříkačkové filtry (1,5 µm, Nylon, Labicom s. r. o., ČR)

Skleněné laboratorní nádoby užívané pro přípravu vzorků agarového gelu bylo před použitím důkladně vmyto deionizovanou vodou. Plastové laboratorní nádoby bylo před použitím 24 hod louženo ve 2M HNO<sub>3</sub>, několikrát vypláchnuto deionizovanou vodou a vysušeno.

## 2.3 Přístrojové vybavení

- Zařízení pro přípravu deionizované vody SG Ultra Clear (SG, Hamburg, Německo)
- Podvarový destilátor BSB 939 IR (Berghof, Německo)
- Přístroj pro mikrovlnný rozklad vzorků Speedwave MWS 2 (Berghof, Německo)
- Elektronické laboratorní váhy Shinko Denshi Vibra SA 120E (Japonsko)
- Elektronické laboratorní váhy Mettler Toledo New Classic MS (ČR)
- Topná deska Stuart CB300 (UK)
- Ultrazvuková lázeň UCC1 (Notus – Powersonic s. r. o., Slovensko)
- Optický emisní spektrometr s buzením v indukčně vázaném plazmatu GBC Integra XL (GBC, Austrálie)
- Hmotnostní spektrometr s ionizací v indukčně vázaném plazmatu TOF-ICP-MS GBC Optimass 9500 (GBC, Austrálie)
- Zařízení pro elektrotermické odpařování GF 5000 (GBC, Austrálie)

## 2.4 Příprava roztoků

Pro ICP-OES byly připraveny kalibrační roztoky obsahující K, P, Ca, Mg a Zn o koncentracích vhodných pro analýzu práškového agaru, ovesných vloček, agarového gelu a roupic a standardní roztok pro metodu standardních přídavek (STP). Z komerčně dostupných standardů o koncentraci  $1 \text{ g.l}^{-1}$  byl připraven multielementární standard, který byl dále ředěn. Pro potřebu metody standardních přídavek (STP) byl naředěn zásobní roztok s koncentracemi K, P 100, Zn 5, Ca a Mg  $20 \text{ mg.l}^{-1}$  v 0,65%  $\text{HNO}_3$  (v/v). Kalibrační standardy byly připraveny v deionizované vodě nebo obsahovaly přídavek kyseliny dusičné či TMAH podle typu analyzovaného vzorku. Teoretické koncentrace přídavek, koncentrace připravených kalibračních roztoků pro ICP-OES a složení matrice jsou uvedeny v tabulce 3.

Pro ICP-MS analýzu byly ze standardních roztoků o koncentraci  $1 \text{ g.l}^{-1}$  naředěny zásobní roztoky (ZR) a z nich pak dále jednoprvkové kalibrační řady pro Ag, Au a Zn a multiprvková kalibrační řada pro Sn, Cd, Pb, a Hg v 0,65%  $\text{HNO}_3$  (v/v) (tabulka 4).

Pro ETV-ICP-MS analýzu byl připraven ZR zlata o koncentraci  $100 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ , ze kterého byla ředěna řada kalibračních roztoků o koncentracích 0,5; 0,05 a  $0,01 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$  v 0,65%  $\text{HNO}_3$ .

**Tabulka 3: Koncentrace kalibračních roztoků a standardních přídavek pro ICP-OES**

Vzorky	K	P	Zn [mg.l <sup>-1</sup> ]	Ca	Mg	Matrice
Ovesné vločky Práškový agar	100	50	1	10	10	0,65% HNO <sub>3</sub>
	50	25	0,5	5	5	
	20	10	0,2	2	2	
	10	5	0,1	1	1	
	1	0,5	0,01	0,1	0,1	
Roupice	10	10	0,5	5	2	1. 0,65% HNO <sub>3</sub> 2. 2,5% TMAH 3. H <sub>2</sub> O
	5	5	0,25	2,5	1	
	2	2	0,1	1	0,4	
	1	1	0,05	0,5	0,2	
	0,1	0,1	0,005	0,05	0,02	
Agarový gel	10	10	0,5	5	2	13% HNO <sub>3</sub>
	5	5	0,25	2,5	1	
	2	2	0,1	1	0,4	
	1	1	0,05	0,5	0,2	
	0,1	0,1	0,005	0,05	0,02	
			25	25		
			12,5	12,5		
			5	5		
			1	1		
STP	1	1	0,05	0,5	0,2	0,65% HNO <sub>3</sub>
	2	2	0,1	1	0,4	
	3	3	0,15	1,5	0,6	

**Tabulka 4: Příprava kalibračních roztoků pro vzorky roupic pro ICP-MS**

Prvek	ZR [mg.l <sup>-1</sup> ]	S1	S2	S3	S4
Ag, Au	10	0,5	0,1	0,05	0,01
Zn	10	20	10	5	1
Sn, Cd, Pb, Hg	10	1	0,5	0,1	0,05

ZR – zásobní roztok, S1-S4 – řada kalibračních roztoků

## 2.5 Chov roupic

Testovacím organismem byly roupice druhu *Enchytraeus crypticus*. Jedinci k založení chovu byli získáni z Centra pro výzkum toxických látek v prostředí (RECETOX, Brno). Roupice jsou na Ústavu environmentálního a chemického inženýrství chovány již přes rok a jsou uchovávány v plastových Petriho miskách o rozměrech 90 x 14,2 mm (aseptické,

Fisherbrand, USA) s ventilací. Jednou za 1 – 2 měsíce jsou roupice pro udržení chovu přeneseny v hojném počtu do vychladlého čerstvého chovného agaru a misky jsou umístěny do termoboxu (WTWTS 606 CZ/2, ČR) při teplotě 21 °C do tmy. Dvakrát týdně probíhá krmení ovesnými vločkami (Globus), které jsou namleté a alespoň jednou za dva měsíce sterilizované v sušárně (Memmert UN55 Single DISPLAY, Německo) za teploty 160 – 180 °C po dobu 2 – 6 hodin. Při ekotoxikologických testech je do každé testovací i kontrolní misky s 55 ml agaru umístěno 20 roupic a po dobu probíhání testu, který trvá 96 ±1hod, nejsou roupice krmeny. Nádoby jsou během této doby uloženy také v termoboxu ve tmě při 21 °C.

## 2.6 Chovné a testovací agary

Pro účely chovu roupic je použit agarový gel připravený z práškového agaru (přírodní agar, Dr. Hoffmann, ČR), destilované vody a vodných roztoků solí NaHCO<sub>3</sub> (Lach-ner, ČR); KCl (Lach-ner, ČR); MgSO<sub>4</sub> (Lach-ner, ČR) a CaCl<sub>2</sub> (PENTA, ČR). Do 772 ml vody bylo přidáno 13,6 g práškového agaru, 6 ml 0,1M NaHCO<sub>3</sub>, 6,4 ml 0,01M KCl, 8 ml 0,2M CaCl<sub>2</sub> a 8 ml 0,1M MgSO<sub>4</sub>. Chovný agarový gel je nutné sterilizovat za zvýšeného tlaku při 120 °C po dobu alespoň 30 min (tlakový hrnec Barazzoni 5 l, Itálie; jednoplotnový elektrický vařič ETA 3109, ČR). Ještě za horka je agar rozléván v digestoři do Petriho misek.

Agar pro účel testů byl připraven v Erlenmeyerových baňkách (250 ml), ve kterých byl smíchán pouze práškový agar s vodou a byl přidán roztok ZnCl<sub>2</sub> (PENTA, ČR) v odpovídajícím množství. Kontrolní agary byly připraveny stejným způsobem, bez přídavku ZnCl<sub>2</sub>. Všechny takto připravené směsi byly umístěny na magnetické míchačky (IKA-RH digital; VWR, VMS-C4; Německo) a po 30 min udržovány při teplotě 95 ±5 °C pro získání dostatečné tuhosti agaru.

Ve druhé části testovacích agarů byly zastoupeny nepotažené nanočástice ZnO-NPs (Biochemie Group, ČR; 95,5% čistota, průměr částic 10 nm s rozsahem 5 – 50 nm). Z celkového objemu potřebné destilované vody byly 2/5 použity pro přípravu vodné disperze nanočástic. Nejprve bylo v tomto množství vody rozpuštěno poloviční množství dispergačního činidla pyrofosforečnanu sodného a poté potřebné množství ZnO-NPs. Disperze byla umístěna do ultrazvukové lázně na 45 minut (Bandelin Sonorex Digitec, Německo). Mezitím byl v Erlenmeyerových baňkách připraven agar ve zbylém množství vody s druhou polovinou dispergačního činidla. Agar byl zahřán na 95 ±5 °C za stálého

míchání a po 15 minutách byla dalších 15 min postupně po kapkách přilévána disperze ZnO-NPs. Nakonec byl horký agar rozlit do Petriho misek. Do kontrolních agarů byl také přidán dispergant.

Každá testovací koncentrace byla připravena vždy ve třech opakováních včetně kontrolních agarů. Do všech agarů v testu byly vytvořeny vrypy kopistí pro snadnější pronikání roupic do média.

## 2.7 Příprava práškového agaru a ovesných vloček k analýze

Pro ICP-OES analýzu byly přírodní agar a krmné ovesné vločky rozloženy mikrovlnnou mineralizací. Bylo naváženo 200 mg vzorku, který byl převeden do teflonových patron, do kterých bylo přidáno 6 ml 65% kyseliny dusičné. Po 10 min reagování za pokojové teploty rozklad dále probíhal v mikrovlnném zařízení Speedwave MWS-2 dle teplotního programu. Prvním krokem bylo udržování teploty 160 °C po dobu 5 min při 80% výkonu. V druhém kroku byla teplota zvýšena na 200 °C po dobu 10 min při stejném výkonu zařízení. Posledním krokem bylo ochlazení na 20 °C při 10% výkonu přístroje, které trvalo 10 minut. Čirý roztok mineralizátu byl kvantitativně převeden do 50ml odměrné baňky a doplněn deionizovanou vodou po rysku. Výsledný roztok byl před analýzou uchováván v polypropylenových označených lahvičkách při -20 °C. Stejným způsobem byly upraveny i slepé vzorky.

Speedwave MWS-2 (Berghof, Německo) je mikrovlnné zařízení z nerezové oceli o výkonu 1000 W umožňující rutinní rozklady malých objemů vzorků s minimálními paměťovými efekty. Zařízení je vybaveno pěti patronami z inertních polymerů na bázi teflonu a křemenného skla propustných pro mikrovlny (Berghof, 2017; Laboratory Journal, 2013).

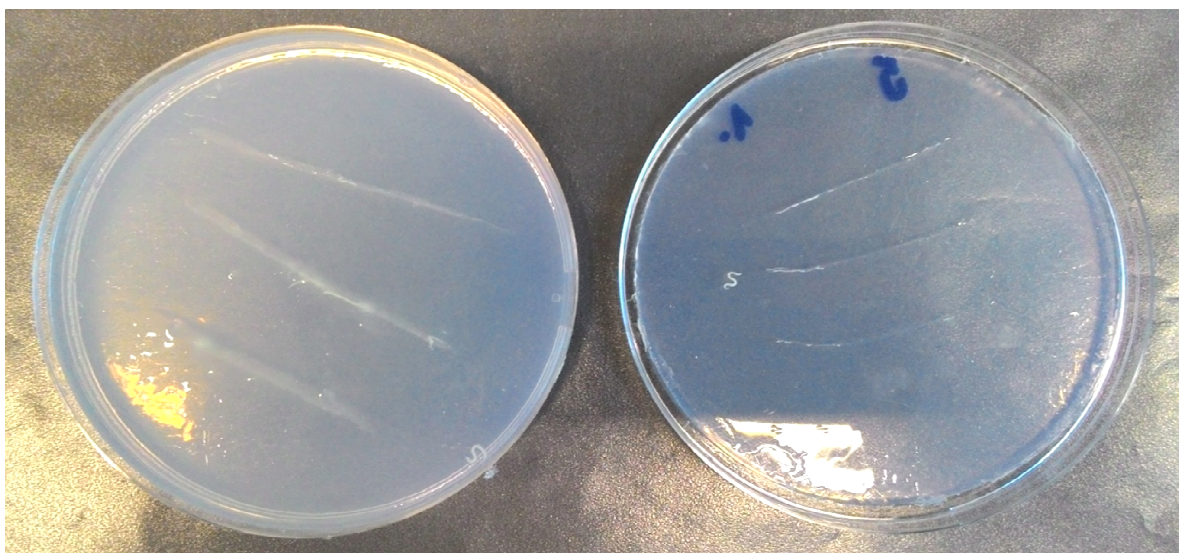
## 2.8 Příprava roupic k analýze

Každá testovací Petriho miska, jako je na obrázku 3, obsahující agarový gel o určité koncentraci Zn obsahovala 20 jedinců druhu *E. crypticus*. Jeden vzorek roupic pro ICP-OES tvořili vždy všichni živí jedinci z jedné misky; ti, kteří nereagovali na mechanickou stimulaci, byli považováni za mrtvé. Živočichové byli z agaru opatrně vyjmuti malým štětcem (viz obr. 4) a přeneseni do kádinky s deionizovanou vodou. Pomocí stejného štětečku byl obsah

kádinky mírně promíchán. Pro důkladné očištění roupic od zbytků půdy byly roupice štětečkem přeneseny do další kádinky s deionizovanou vodou, jak je vidět na obrázku 5.

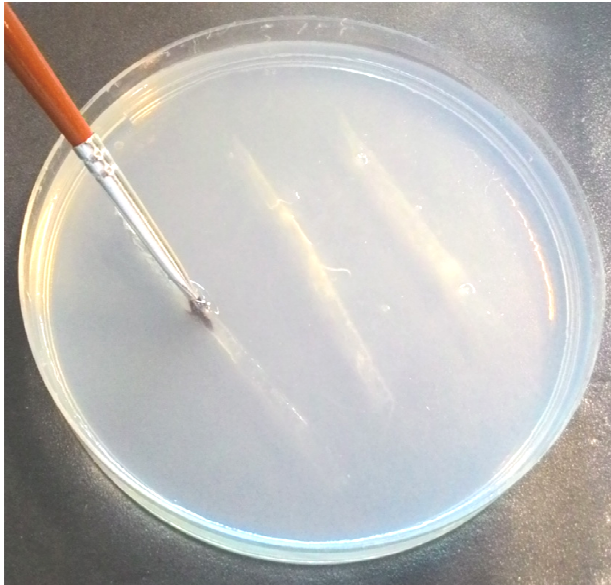
Roupice byly dále přeneseny po menším počtu (např. 5 jedinců) štětečkem na filtrační papír, aby byly zbaveny přebytečné vody, jak je vidět na obrázku 6. Mezitím byl filtračním papírem osušen i malý štětec, kterým byli živočichové postupně přeneseni do předem zvážené 10ml plastové odměrné baňky. Po vložení všech roupic byla baňka opět zvážena pro získání hmotnosti živočichů. Pro rozklad jedinců byl do baňky následně přidán 1 ml 25% TMAH. Po úplném rozpuštění roupic byla baňka doplněna deionizovanou vodou na požadovaný objem. Stejným způsobem byly připraveny i vzorky roupic z chovných misek (obr. 7) k získání pozad'ových koncentrací sledovaných prvků. Pro účely standardního přídávku, kdy bylo potřebné mít k dispozici větší objem vzorku, bylo z chovných misek do 50ml baňky odebráno 100 roupic, které byly rozpuštěny v 5 ml 25% TMAH a doplněny deionizovanou vodou na výsledný objem.

Příprava roupic z chovného agaru pro ICP-MS a ETV-ICP-MS analýzu byla obdobná jako pro ICP-OES. Vzorek byl připraven z 20 roupic v plastových zkumavkách, do kterých bylo přidáno 0,5 ml 25% TMAH. Před doplněním vzorku na objem 10 ml deionizovanou vodou byly zkumavky umístěny do ultrazvukové lázně, dokud živočichové nebyli zcela rozpuštěni (10 – 15 min).



**Obrázek 3: Testový agar s roupicemi**

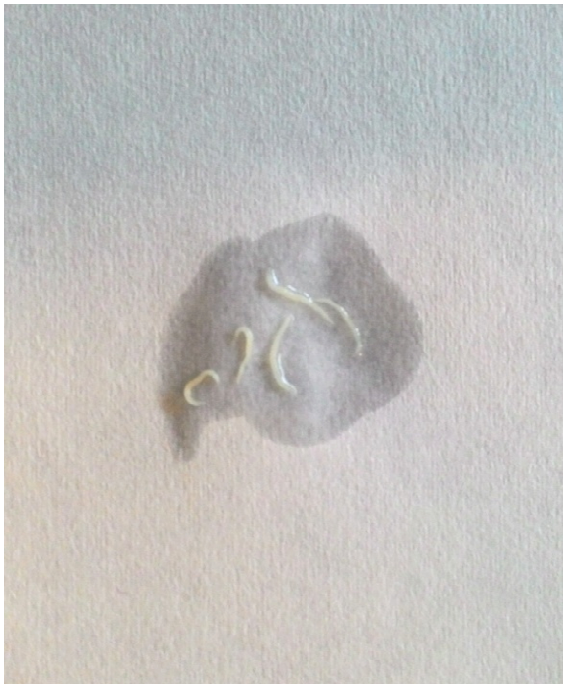




**Obrázek 4: Separování roupic z agaru**



**Obrázek 5: Deionizovaná voda s roupicemi**



**Obrázek 6: Roupice na filtračním papíru**



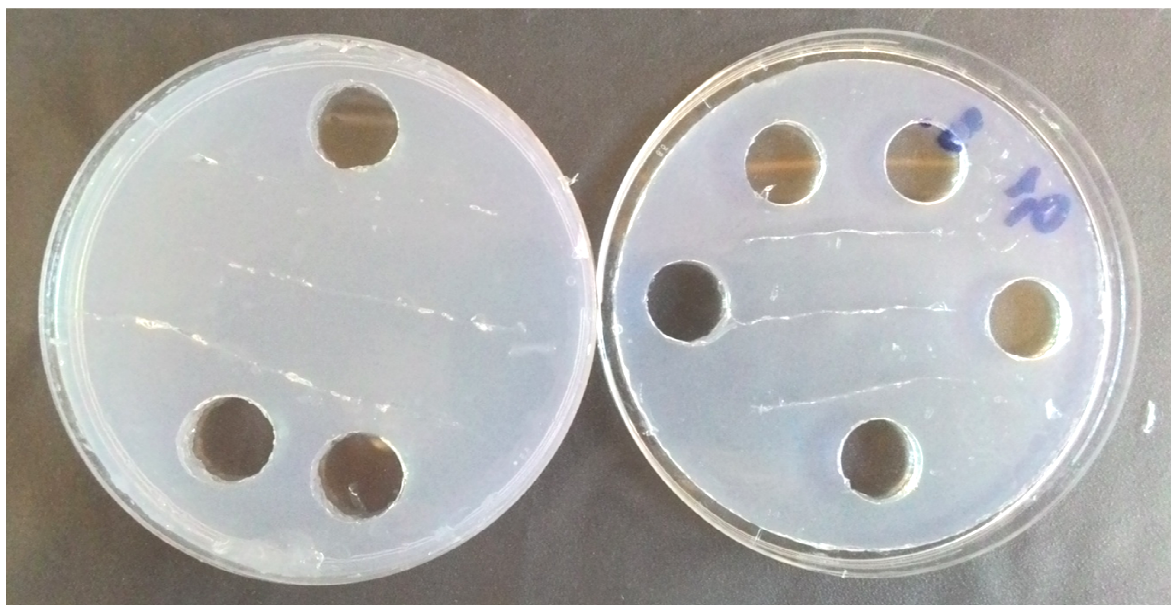
**Obrázek 7: Chovný agar s roupicemi**

## **2.9 Příprava agarového gelu k analýze**

Po vybrání roupic byl následovně k analýze použit i agarový gel. Vzorkovány byly jak testové, tak kontrolní agarové gely ze dna i z víčka Petriho misky, přičemž se odebírané oblasti vyhýbaly zářezům pro roupice z důvodu možné přítomnosti jejich mrtvých těl. (viz obr. 8). Do skleněných kádinek bylo naváženo okolo 4,5 g agarového gelu, ke kterému byly



přidány 2 ml 65%  $\text{HNO}_3$  a kádinka byla umístěna na varnou desku. Po rozpuštění gelu při 80 °C byl obsah kádinky převeden do 10ml baňky a vzorek byl doplněn deionizovanou vodou. V případě nedokonalého rozpuštění vzorku případně vysrážení látek v roztoku, lze vzorky přefiltrovat například přes 1,5  $\mu\text{m}$  nylonový stříkačkový filtr.



Obrázek 8: Vzorkování agaru

## 2.10 ICP-OES analýza

V práci byl využit spektrometr ICP-OES Integra XL (GBC, Austrálie). Přístroj je vybaven univerzálním proplachovým, termicky stabilizovaným monochromátorem typu Czerny-Turner s rozsahem vlnových délek 160 – 800 nm a detekčním systémem se dvěma fotonásobiči. Spektrometr disponuje velmi jemným nastavením vlnových délek s přesností na 0,0001 nm a umožňuje rychlý scan. Vysokofrekvenční plazma je produkováno volně běžícím generátorem (40,68 MHz) velmi stabilním i při analýze vzorků s problémovými maticemi. Uspořádání spektrometru zajišťuje vysoký přenos energie do plazmatu, čímž je zajištěna vysoká účinnost buzení. GBC Mass Flow zajišťuje průtoky plynů s uspokojivou krátkodobou (pod 0,5 %) i dlouhodobou stabilitou (v průběhu čtyř hodin pod 1 %). Systém pro aplikaci vzorků je snadno rozebíratelný s počítačem řízeným zvlhčovačem argonu, díky kterému je umožněna analýza roztoků s obsahem solí až 30 % (m/v). Cyklonickou mlžnou komoru lze přímo využít i pro analýzu suspenzí, emulzí a olejů a zároveň minimalizuje paměťové efekty (RMI, 2017).

Vytvoření ICP-OES metody zahrnuje sérii na sebe navazujících kroků. Je volena vhodná spektrální linie, obvykle s nejvyšší citlivostí, způsob záznamu a odečtu signálu a korekce spektrálního pozadí. Jsou nastavovány jednotlivé toky argonu, napětí na fotonásobiči, výška pozorování a příkon do plazmatu. Obvykle, z důvodu větší rychlosti analýzy, a tím i menší spotřeby vzorku, jsou voleny kompromisní podmínky, které upřednostňují spíše méně citlivé a méně koncentrované prvky. Intenzita signálu při vysokých hodnotách může být omezena snížením napětí na fotonásobiči, případně může být použita méně citlivá spektrální čára. Při vývoji metody jsou obvykle pro kontrolu přítomnosti spektrálních interferencí využívány dvě (i více) spektrální čáry, pro rutinní použití dále postačuje využít pouze jednu.

Při analýze byl použit koncentrický pneumatický zamlžovač o průtoku vzorku 1,5 ml a mlžná komora o objemu 50 ml (obojí Glass Expansion, Austrálie). Byly sledovány prvky charakterizující biomasu (K, P, Mg, Ca) a Zn. Měření probíhalo vždy ve třech replikách. Zvolené emisní čáry, korekce pozadí a napětí na fotonásobiči pro jednotlivé prvky jsou uvedeny v tabulce 5, další pracovní podmínky v tabulce 6. Rozsahy koncentrací kalibračních standardů byly nastaveny pomocí orientačního měření intenzit signálu vzorků a dostupných standardních roztoků o známé koncentraci (viz kapitola 2.4).

**Tabulka 5: Vybrané spektrální linie, korekce pozadí a napětí na fotonásobiči**

Prvek	Čára $\lambda$ [nm]	Korekce pozadí [nm]	PTV [V]
<b>K</b>	766,490	0,0410	600
<b>P</b>	213,618	0,0250	600
<b>Zn</b>	213,856	0,0240	500
<b>Ca</b>	396,847	0,0450	500
<b>Mg</b>	285,213	0,0420	450

PTV – napětí na fotonásobiči

**Tabulka 6: Pracovní podmínky ICP-OES analýzy**

Parametr	Hodnota	Parametr	Hodnota
<b>Příkon plazmatu</b>	1000 W	<b>Průtok nosného plynu</b>	0,65 l.min <sup>-1</sup>
<b>Výška pozorování</b>	6 mm	<b>Rychlost pumpy</b>	10 otáčky.min <sup>-1</sup>
<b>Průtok plazmového plynu</b>	10 l.min <sup>-1</sup>	<b>Doba integrace signálu</b>	0,15 s (0,5 s pro P)
<b>Průtok vnějšího plynu</b>	6 l.min <sup>-1</sup>	<b>Stabilizační doba</b>	30 s

## 2.11 ICP-MS analýza

V práci byl použit hmotnostní spektrometr s ionizací v indukčně vázaném plazmatu s detektorem doby průletu iontů TOF-ICP-MS Optimass 9500 (GBC, Austrálie). Přístroj tvoří tři části, první z nich je argonové plazma se systémem vnášení vzorku, zde dochází k atomizaci a následné ionizaci vzorku do prvního ionizačního stavu. Zařízení je vybaveno Mass Flow technologií na všech tocích plynů. Ve druhé části, v interface tvořeném tříkonusovým systémem, jsou ionty extrahovány z vysokoteplotního plazmatu do spektrometru a při přechodu z atmosférického tlaku na velmi nízký tlak ve spektrometru dochází k urychlení iontů. Třetí částí je hmotnostní spektrometr. Před vstupem do průletové oblasti, kdy jsou všechny ionty vzorkovány ortogonálně z iontového paprsku v jeden časový okamžik, lze filtrovat nežádoucí ionty pomocí filtračního zařízení Smartgate, v průletové zóně jsou pak ionty fokusovány do detektoru. Výsledkem analýzy je simultánní záznam kompletního hmotnostního spektra, které velmi přesně zachovává poměry jednotlivých izotopů. Zařízení dokáže analyzovat při plné multiprvkové analýze až 120 vzorků za 1 hodinu (RMI (2), 2017).

Před každou analýzou pomocí ICP-MS je pracovníky laboratoře provedena optimalizace pracovních podmínek spektrometru, kdy je sledována intenzita signálu izotopu  $^{238}\text{U}$  (roztok o koncentraci  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) a cílem je dosažení nejvyšší intenzity signálu při zachování nejlepšího rozlišení. Napětí na detektoru bylo nastaveno na 3000 V, výkon 1200 W, průtoky plazmového, vnějšího a nosného plynu byly 11; 0,55 a  $0,99 \text{ l.min}^{-1}$ . Parametry iontové optiky a pozice plazmového hořáku byly nastaveny před každým měřením, jejich typické hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7. Průměrná intenzita signálu  $^{238}\text{U}$  byla 40000 countů a průměrné rozlišení 1600.

Metoda ICP-MS byla použita pro analýzu Ag, Au, Hg, Pb, Sn, Cd a Zn ve vzorcích roupic z chovných agarů.

### 2.11.1 ETV-ICP-MS analýza

Pro stanovení zlata (izotop  $^{197}\text{Au}$ ) bylo použito ICP-MS ve spojení s elektrotermickým odpařováním. Jednotka ETV GF 500 je modifikací zařízení pro elektrotermickou atomizaci vyráběného firmou GBC (Austrálie). Přístroj je vybaven grafitovou píčkou, která slouží jako zdroj aerosolu pro hmotnostní spektrometr. Maximální dosažitelná teplota je až  $3000 \text{ }^\circ\text{C}$

a maximální rychlost ohřevu je  $2000\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ . Vzorek je do grafitové pícky dávkován pomocí autosampleru (PAL Furnance autosampler, GBC, Austrálie), který obsahuje 40 pozic pro vzorky a deset pro standardy, dávkovaný objem může být až  $100\text{ }\mu\text{l}$ . Autosampler zajišťuje také dávkování modifikátoru. Spojení jednotky ETV s ICP-MS je realizováno pomocí  $95\text{ cm}$  dlouhé transportní trubičky z materiálu Tygon® o vnitřním průměru  $4\text{ mm}$ .

Příprava ETV-ICP-MS metody zahrnuje optimalizaci pracovních podmínek hmotnostního spektrometru, optimalizaci teplotního programu jednotky elektrotermického vypařování, volbu modifikátoru a jeho dávkování. Optimalizaci pracovních podmínek činí obtížnou přechodový charakter ETV-ICP-MS signálů, proto je počáteční nastavení prováděno pracovníky laboratoře pomocí výše uvedeného optimalizačního roztoku. Typické pracovní podmínky optimalizované na  $^{238}\text{U}$  získané pomocí kontinuálního měření optimalizačního roztoku jsou shrnuty v tabulce 7. Typické hodnoty intenzity při akvizici  $1\text{ s}$  byly kolem  $15000\text{ countů}$ , rozlišení kolem  $1300$ . Po nalezení optimálních podmínek byl přístroj vypnut a systém vnášení kapalných vzorků byl vyměněn za ETV jednotku. Průtoky nosného, plazmového a vnějšího plynu byly  $0,93; 13\text{ a }0,55\text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Výkon byl nastaven na  $1200\text{ W}$  a zvolené napětí na detektoru bylo  $2500\text{ V}$ . Do grafitové pícky bylo dávkováno  $20\text{ }\mu\text{l}$  vzorku.

Optimalizace pracovních parametrů ETV jednotky je obdobou zpracování teplotního programu pro ET-AAS. Jde o volbu vhodných kroků teplotního programu, vyhovujícího modifikátoru a jeho dávkování. Podmínky použité v této práci vycházely ze studia literatury a prací věnovaných ET-AAS a jsou diskutovány v kapitole 3.7.

Tabulka 7: Pracovní podmínky ICP-MS a ETV-ICP-MS analýzy

Parametr	Hodnota		Parametr	Hodnota	
	ICP-MS	ETV-ICP-MS		ICP-MS	ETV-ICP-MS
<b>Torch X position</b>	9,9 mm	10 mm	<b>Fill</b>	-40 V	-37 V
<b>Torch Y position</b>	0,1 mm	-0,2 mm	<b>Fill bias</b>	0,01 V	-1,2 V
<b>Torch Z position</b>	0 mm	0 mm	<b>Fill grid</b>	-10 V	-30 V
<b>Nebulizer flow</b>	0,99 l.min <sup>-1</sup>	0,93 l.min <sup>-1</sup>	<b>Pushout grid</b>	-465 V	-486 V
<b>Plasma flow</b>	11 l.min <sup>-1</sup>	13 l.min <sup>-1</sup>	<b>Pushout plate</b>	540 V	655 V
<b>Auxiliary flow</b>	0,55 l.min <sup>-1</sup>	0,55 l.min <sup>-1</sup>	<b>Blanker</b>	200 V	150 V
<b>Generator power</b>	1200 W	1200 W	<b>Reflectron</b>	640 V	670 V
<b>Skimmer</b>	-1300 V	-870 V	<b>Multiplier gain</b>	3000 V	2500 V
<b>Extraction</b>	-1200 V	-1100 V	<b>Detector time C0</b>	-803 ns	-823 ns
<b>Z1</b>	-900 V	-900 V	<b>Detector time C1</b>	2023 ns	2016 ns
<b>Y mean</b>	-280 V	-220 V	<b>Blanker time C0</b>	186 ns	158 ns
<b>Y deflection</b>	0 V	0 V	<b>Blanker time C1</b>	252 ns	248 ns
<b>Z lens mean</b>	-1100 V	-1200 V	<b>Sample intro time</b>	10 s	0 s
<b>Z lens deflection</b>	-40 V	-2 V	<b>Pump speed</b>	10 rpm	0 rpm
<b>Lens body</b>	-130 V	-195 V	<b>Acquisition time</b>	5 s	12 s

### 3 Výsledky a jejich diskuse

Cílem práce bylo připravit metodu pro stanovení zinku ve vzorcích pocházejících z ekotoxikologických pokusů. Šlo o vzorky jednak testovacích organismů, jimiž jsou roupice *Enchytraeus crypticus*, jednak o vzorky testového prostředí - agarové gely. Pro úplnost informací byly analyzovány i původní práškový agar a ovesné vločky, kterými byly roupice krmeny. Kromě zinku byly analyzovány i další prvky vyskytující se v biomase testovaných živočichů, pomocí kterých bylo možné sledovat zejména opakovatelnost postupu. Praktická aplikovatelnost metody byla posuzována v testech, ve kterých byla hodnocena a vzájemně porovnávána bioakumulace zinku ve formě nanočástic ZnO-NPs a ve vodě dobře rozpustného, snadno biodostupného  $Zn^{2+}$  ze  $ZnCl_2$ .

Východiskem pro přípravu metody byly literárně dostupné údaje. V literatuře (viz kapitola 1.6) je postup přípravy obvykle popsán dost zjednodušeným způsobem, některé nezbytné kroky, např. separace testovacích organismů z půdy, jsou vynechány. Často používaným dílčím krokem je lyofilizace, sušení vzorků klasickým postupem v sušárně je využito zřídka. Výsledky jsou pak vztahovány na suchou hmotu. Vážení organismů je pokládáno za kritický krok vzhledem k jejich velmi malým hmotnostem před i po sušení. Převedení vzorků do roztoku je pak často prováděno pomocí mikrovlnného rozkladu v kyselině dusičné ve směsi s peroxidem vodíku / kyselinou chloristou či mineralizací přidávkem kyselin dusičné / chlorovodíkové na topné desce. K analýze bývají využity ICP-MS či AAS nejčastěji s elektrotermickou atomizací.

Roupice jsou velmi malých rozměrů, nízké hmotnosti a mají velmi křehká těla. Proto bylo záměrem vyvinout metodu s minimální manipulací se vzorkem, jednoduchým rozkladem a navazující nenáročnou, robustní analytickou koncovkou. Dalším, spíše vedlejším požadavkem, bylo použití malého množství chemikálií ne příliš zátěžových pro životní prostředí i pro obsluhu a co nejnižší časové nároky metody. Roupice po oddělení od gelu byly váženy bez předchozího stanovení sušiny a rozpuštěny bez použití mikrovlnné mineralizace v prostředí TMAH. Přednostně byla používána ICP-OES, ačkoliv je pracoviště vybaveno i ICP-MS, která posloužila ke kontrolnímu stanovení zinku a orientačnímu stanovení dalších kovů a jako výchozí bod pro ETV-ICP-MS. ICP-OES je metoda rutinně využívaná, značně robustní vůči přítomným chemikáliím ve vzorku. Případně vlivy složek matrice jsou relativně snadno rozpoznatelné a řešitelné. Úskalím mohou být detekční schopnosti metody, zejména je-li k dispozici malé množství analyzovaného materiálu a nízká koncentrace analytu ve

vzorku. V omezené míře lze situaci řešit minimálním naředěním vzorku při jeho přípravě. Při použití ICP-MS je potřeba kvůli horší toleranci k obsahu matrice ve vzorku vzorky více ředit, což vzhledem k velmi nízkým detekčním limitům není problém. Výsledné nižší koncentrace analytu mohou být doprovázeny zvýšeným rizikem chyb / kontaminací a podmínkou je také vysoká čistota laboratorního prostředí a použitých chemikálií. ETV-ICP-MS se jeví perspektivně vzhledem k možnosti dávkování malého množství vzorku s koncentrovanou matricí. Byla posuzována vhodnost použitých metod a byly hledány jejich optimální pracovní podmínky.

### **3.1 Hodnocení postupu přípravy vzorku k analýze**

Záměrem práce bylo zjednodušení přípravy malých vzorků oproti dohledaným postupům v literatuře. Při vyhodnocení ekotoxikologických testů z počtu přeživších organismů je testovací půda rozmíchána ve vodě a organismy jsou fixovány etanolem, obarveny bengálskou červení a případně vybrány z půdy (OECD, 2004; Kobetičová et al., 2011). Tento způsob separace je zmiňován i v pracích, kdy jsou analyzována těla jedinců z pokusu. Tento postup se jeví jako velmi destruktivní, těla roupic mohou být takto rozlámána zejména po jejich uhynutí v prostředí etanolu a nemusí být z testové půdy oddělena kvantitativně.

V našem případě byla veškerá manipulace s roupicemi prováděna malým štětečkem, který zajistil šetrné přenášení. Z obavy o přežití jedinců byly roupice nejprve promyty v kádince s pitnou vodou a poté v další kádince s deionizovanou vodou. Ukázalo se, že lze používat pouze deionizovanou vodu, protože omytí roupic trvá poměrně krátkou dobu, během které nedojde k usmrcení roupic. Roupice byly přeneseny štětečkem na filtrační papír, kde byly zbaveny přebytečné vody, a dále do 10ml plastové odměrné baňky, ve které byly zváženy. V tabulce 8 jsou uvedeny navážky 100 chovných roupic získaných čtyřmi osobami. Hodnota RSD 12,9 % je velmi příznivá. Pro hodnocení vhodnosti stanovení mokré hmotnosti je velikost směrodatné, respektive relativní směrodatné odchylky důležitá. Hrdá ve své diplomové práci (2015) uvádí pro 70 ks roupic RSD pro mokrou hmotnost 15,6 %, pro hmotnost vysušených roupic 20,3 %. Suchý zbytek (sušina) představoval 17,3 % původní mokré hmotnosti a byl stanoven s RSD 9,2 %. Cedergreen (2013) ve své práci uvádí relativní směrodatné odchylky výsledků prvkové analýzy požadových koncentrací vztažených na suchou hmotnost pro roupice 20 – 80 %. Tyto hodnoty jsou závislé na množství sledovaného

analytu. Navíc jsou to hodnoty pro celý analytický postup nikoliv jenom pro určení hmotnosti. V porovnání s těmito daty a vzhledem k velmi malé velikosti i hmotnosti roupic a s ohledem na práci více lidí první krok práce, tedy shromáždění roupic k analýze, vykazuje uspokojivou reprodukovatelnost. Výsledná hmotnost není příliš zatížena chybou způsobenou zbytkovou vodou na povrchu těl a zároveň svědčí o dobrém odseparování agarového gelu při přípravě roupic k analýze. Uplatňovat se bude patrně variabilita hmotnosti jedinců. Navážka *Enchytraeus crypticus* z testů závisela na počtu přeživších jedinců (8 – 20) a pohybovala se v rozmezí 5 – 18 mg s průměrnou hmotností jedné roupic 0,6 mg. Data odpovídají informaci z OECD (2010) o průměrné hmotnosti 5 – 10 mg pro jedince druhu *E. albidus*, který je jen o něco větší než jedinec druhu *E. crypticus*.

**Tabulka 8: Mokrý hmotnost roupic**

	1	2	3	4	5	6
<b>Navážka 100 roupic [mg]</b>	75,57	59,71	60,75	56,39	59,84	72,07
<b>Medián [mg]</b>			60,3			
<b>Směrodatná odchylka [-]</b>			1,19			
<b>RSD [%]</b>			12,91			

### 3.2 Rozpouštění vzorku

Při rozpouštění vzorku byl hledán nejjednodušší postup s minimální zátěží pro životní prostředí. U vzorků, u kterých to bylo možné, bylo cílem optimalizovat postup a dosáhnout čirého roztoku bez použití mikrovlákné mineralizace. Pro rozklad 20 roupic v baňce bylo nejprve voleno různé množství 2M a 65% HNO<sub>3</sub>. V prostředí zředěné kyseliny se však roupic nerozpouštěly téměř vůbec a v koncentrované kyselině byl jejich rozklad velmi zdoluhavý a v řadě případů nedokonalý s viditelným zbytkem. Vyhovujícím způsobem se nakonec ukázal být přídavek 1 ml 25% TMAH (pro výsledný objem 10 ml), který zajišťuje převedení roupic do roztoku v řádu desítek minut. Rozklad lze urychlit vložením do ultrazvukové lázně nebo mícháním. Pokud je žádoucí snížit zastoupení organické matrice, lze přidat pouze 0,5 ml TMAH v celkovém objemu 10 ml (ETV-ICP-MS) při mírném navýšení doby vzorku v ultrazvukové lázni.

U vzorků agarového gelu bylo zkoušeno rozpouštění jeho různého množství na topné desce také v TMAH v poměru 1:9 pro zachování stejné matrice vzorků jako u vzorků roupic. Rozpuštěný agarový gel však po vychladnutí opět ztuhnul. Zvýšením poměru TMAH na 2:8 bylo bez opětovného zatuhnutí docíleno rozpuštění cca 3,5 g agaru. Pro zpracování zhruba



4,5 g agaru bylo nejefektivnější přidání 2 ml podvarové  $\text{HNO}_3$  a zahřívání na topné desce při občasném míchání s následným kvantitativním převedením do baňky a doplněním na objem 10 ml. Agarový gel byl zpracováván ve stejný den jako roupice, z důvodu postupného vysychání a zakoncentrovávání gelu. U testovacích agarů především s vyšší koncentrací Zn, nastával problém s mrtvými těly roupic, která komplikovala rozpouštění agaru, jelikož se roupice v  $\text{HNO}_3$  rozpouští částečně. Vzorkování testových agarů proto bylo prováděno rovnoměrně mimo vrypy. Roztok analytu byl čirý, ale existovalo riziko, že bude mít vyšší viskozitu oproti kalibračním standardům, což by při stanovení Zn mohlo vnášet systematickou chybu. Roztoky sypkých látek (práškový agar, ovesné vločky) byly připraveny mikrovlnnou mineralizací postupem běžně používaným v laboratoři pro tento typ materiálu. Mineralizáty byly doplněny demineralizovanou vodou na požadovaný objem.

### **3.3 Vhodnost ICP-OES analýzy**

ICP-OES byla užita pro analýzu mineralizátů roupic, agarového gelu, práškového agaru a krmných vloček. Byl stanovován zinek a prvky, které mohou charakterizovat biomasu (K, P, Mg a Ca). Pracovní podmínky metody, která byla pro tento účel použita, jsou uvedeny v kapitole 2.10. Před jejím rutinním použitím pro potřeby ekotoxikologických pokusů bylo třeba ověřit její vhodnost. Bylo třeba vyhodnotit (i) detekční schopnosti metody, její analytické charakteristiky, (ii) posoudit vliv původní matrice vzorku i chemikálií, které byly použity pro rozklad vzorku, a (iii) provést opatření pro kontrolu stability metody v čase.

#### **3.3.1 Posouzení vlivu matrice**

Pro přípravu vzorků byly používány různé postupy a odlišné chemikálie v různém množství (kyselina dusičná v kalibračních standardech a její zbytek po mineralizaci, TMAH). Mineralizáty a kalibrační standardy mohou mít odlišné fyzikální vlastnosti, které jsou příčinou odlišného chování při vnášení roztoku do plazmatu a mohou ovlivňovat výsledek analýzy. Provedeno bylo srovnání směrnic kalibračních řad připravených v 0,65%  $\text{HNO}_3$ , 2,5% TMAH a v čisté vodě se směrnicí závislosti standardního přídávku (STP). Výsledky metody standardního přídávku jsou pokládány na nejméně ovlivněné složením matrice. V tabulce č. 9 jsou uvedeny směrnice jednotlivých metod s procentuálně vyjádřeným

rozdílem hodnot směrníc. Rozdíly jsou patrné a lze pozorovat vliv matrice, který je zdrojem systematické chyby.

V praxi by bylo možné eliminovat vliv matrice pomocí porovnávacího prvku, eliminace pomocí STP v rutinních analýzách není možná kvůli nedostatečnému množství vzorku z ekotoxikologických testů. Vzhledem ke zjednodušení analýzy, pro kterou by byla příprava několika kalibračních řad komplikací, byly pro další rutinní analýzy roupic používány standardní roztoky v 0,65% HNO<sub>3</sub>. Systematická chyba nebyla dále korigována. Analýzou vzorků ve 2,5% TMAH s využitím kalibračních standardů obsahujících HNO<sub>3</sub> lze očekávat asi o 10 % nižší výsledky, což při vyhodnocení bioakumulačního faktoru není závažný problém.

**Tabulka 9: Směrnice použitých metod**

Prvek	STP	KS		KS		KS	
		v 0,65% HNO <sub>3</sub>	[%]	v 2,5% TMAH	[%]	v H <sub>2</sub> O	[%]
<b>K</b>	2626	2992	114	2644	101	3212	122
<b>P</b>	5123	5313	104	5474	107	5413	106
<b>Zn</b>	133306	158940	119	141459	106	166401	125
<b>Ca</b>	481317	507952	106	466688	97	504115	105
<b>Mg</b>	379133	449923	119	398879	105	470787	124

STP – směrnice standardního přídávku, KS – směrnice kalibračních standardů

### 3.3.2 Analytické charakteristiky a časová stabilita ICP-OES metody

Instrumentální detekční limit vypovídá o detekčních schopnostech přístroje. ICP-OES software jej vyhodnocuje jako koncentraci analytu, která odpovídá trojnásobku směrodatné odchylky intenzity pozadí měřené v místě korekce pozadí (tabulka 12). Celý analytický postup ovšem zahrnuje více kroků, při nichž dochází k naředění původního vzorku. Tuto skutečnost je třeba zahrnout do hodnoty detekčního limitu pracovního postupu, který je součinem instrumentálního detekčního limitu a ředícího faktoru. Například při přípravě mineralizátů s navázkou 0,2 g a výsledným objemem 50 ml nabývá ředící faktor hodnoty 250. Detekční limity postupu udávají minimální množství analytu detekovatelné v původním vzorku (tabulka 10). Při vývoji metody pro více prvků rozdílně koncentrovaných a rozdílně citlivých může být potlačena odezva prvku snížením napětí na fotonásobiči, jako to bylo v případě vápníku a hořčíku.

**Tabulka 10: Detekční limit metody a detekční limity postupu pro jednotlivé vzorky**

Prvek	Detekční limit	Metoda	E. crypticus	Agarový gel	Práškový agar Ovesné vločky
		[ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	[ $\text{mg.kg}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ]	[ $\text{mg.kg}^{-1}$ ]
<b>K</b>		270	300	640	68
<b>P</b>		20	23	48	5,1
<b>Zn</b>		0,83	0,91	2,0	0,21
<b>Ca</b>		0,050	0,060	0,12	0,013
<b>Mg</b>		0,46	0,51	1,1	0,12

Pravdivost výsledků analýzy lze ověřit použitím matricového certifikovaného referenčního materiálu, je-li k dispozici. V tomto případě analýzy mokré biomasy vhodný materiál dostupný nebyl, proto byla použita metoda standardního přídatku. V tabulce 11 jsou porovnány teoreticky přidané a nalezené koncentrace sledovaných prvků v jednom z roztoků použitých pro vyhodnocení metody standardního přídatku. Návratnosti se pohybovaly od 94,5 % (hořčík) do 103 % (vápník), relativní směrodatné odchylky od 1,31 % (hořčík) do 6,68 % (draslík).

**Tabulka 11: Výsledky analýzy vzorku roupic obohaceného o cílové analyty**

Prvek	Skutečný přídavek [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]	Teoretický přídavek	Návratnost [%]	RSD [%]
<b>K</b>	2,96	3	98,7	6,68
<b>P</b>	2,81	3	93,8	2,30
<b>Zn</b>	0,14	0,15	95,1	1,83
<b>Ca</b>	1,55	1,5	103	1,36
<b>Mg</b>	0,57	0,6	94,5	1,31

Přestože byly připravené vzorky analyzovány nejpozději druhý den od jejich přípravy, byla zjišťována stálost roztoků. Ke změnám v koncentracích může docházet vlivem např. adsorpce na stěny nádob, v nichž byly uchovávány. Jeden z roztoků použitých pro vyhodnocení metody standardního přídatku byl uchováván v chladničce a znovu proměřován po jednom a dvou týdnech. Z tabulky 12 je patrné, že rozdíly v koncentracích jednotlivých prvků v rozmezí tří týdnů jsou zanedbatelné stejně jako RSD a vzorek by tedy bylo možné analyzovat i po delším uchovávání.

**Tabulka 12: Stálost koncentrací prvků v čase**

Prvek	C <sub>0</sub>	C <sub>1. týden</sub> [mg.l <sup>-1</sup> ]	C <sub>2. týden</sub>	RSD [%]
<b>K</b>	4,74	4,75	5,13	1,56
<b>P</b>	5,97	6,34	5,83	0,36
<b>Zn</b>	0,22	0,22	0,22	0,68
<b>Ca</b>	1,76	1,67	1,45	3,99
<b>Mg</b>	0,74	0,82	0,77	2,07

Výsledky uvedeny jako medián

Za účelem sledování stability metody v čase byly v průběhu celého měření do rutinních analýz několikrát zařazeny kalibrační standardy jako kontrolní vzorky. Šlo o kalibrační standardy pro roupice v 0,65% HNO<sub>3</sub> a o kalibrační standardy pro agarový gel v 13% HNO<sub>3</sub> o koncentracích uvedených v tabulce 13. Návratnosti pro tyto roztoky se pohybovaly v rozmezí od 96 do 103 % s RSD od 0,56 do 1,90 %. Velmi nízká variabilita výsledků svědčí o dostatečné stálosti metody v čase.

**Tabulka 13: Opakovaná analýza kalibračních standardů**

Prvek	Standard v 0,65% HNO <sub>3</sub> [mg/l]	Návratnost [%]	RSD
<b>K</b>	5	98 - 100	0,72
<b>P</b>	5	97 - 98	0,99
<b>Zn</b>	0,25	98 - 100	1,21
<b>Ca</b>	2,5	101 - 102	0,56
<b>Mg</b>	1	96 - 99	1,90
Prvek	Standard v 13% HNO <sub>3</sub> [mg/l]	Návratnost [%]	RSD
<b>K</b>	5	99 - 101	0,80
<b>P</b>	5	97 - 100	1,67
<b>Zn</b>	0,25	99 - 101	0,90
<b>Ca</b>	2,5	100 - 103	1,12
<b>Mg</b>	1	98 - 100	1,10

### 3.4 Pozad'ové koncentrace

Pro všechny typy materiálů, které nějakým způsobem souvisí s ekotoxikologickým testem, byly stanoveny pozad'ové koncentrace sledovaných prvků. Tyto informace jsou nezbytné pro správné zhodnocení dat ekotoxikologických testů. Mimo Zn byly sledovány

i další prvky jako možné indikátory biomasy. Koncentrace jednotlivých prvků ve vzorcích jsou uvedeny v tabulce 14.

**Tabulka 14: Pozad'ové koncentrace analyzovaných vzorků**

Prvek	Práškový agar	Ovesné vločky	Agarový gel	<i>E. crypticus</i>	Jedinec <i>E. crypticus</i>
	[mg.kg <sup>-1</sup> ]				[μg]
<b>K</b>	260 ±43	4196 ±75	5,19 ±0,49	1390 ±6,8	0,882 ±0,085
<b>P</b>	38,2 ±1,7	4857 ±74	0,46 ±0,0023	1984 ±130	1,31 ±0,12
<b>Zn</b>	2,0 ±1,9	32,2 ±2,3	0,06 ±0,01	60,1 ±11	0,0383 ±0,0088
<b>Ca</b>	1461 ±40	616 ±96	17,0 ±0,25	173 ±114	0,117 ±0,075
<b>Mg</b>	580 ±24	1475 ±23	3,14 ±0,012	116 ±6,6	0,0748 ±0,0071

Výsledky jsou uvedeny jako průměr ±směrodatná odchylka

Zinek byl v roupicích nalezen v koncentraci 60,1 ±11 mg.kg<sup>-1</sup>. Tato hodnota je ve výborné shodě s výsledky pozad'ové koncentrace zinku 60,3 ±3,5 mg.kg<sup>-1</sup> stanovené pomocí ICP-MS (viz kapitola 3.6). Koncentraci nelze přímo porovnat s hodnotami nalezenými v literatuře, jelikož koncentrace jsou udávány především na suchou hmotnost roupic. Odlišné je i stáří organismů a zejména testovací podmínky používající jiné půdy. Většina dostupných experimentů pracuje s nekontaminovanou přírodní půdou LUFA 2.2 stejně jako Cedergreen a kol. (2013), kteří uvádějí nalezenou koncentraci Zn 82 ±23 mg.kg<sup>-1</sup> vztaženou na suchou hmotnost roupic. Pokud použijeme údaj o obsahu sušiny roupic, který uvádí ve své diplomové práci Hrdá (2015), je námi nalezený údaj obsahu zinku v suché hmotě 10,4 ±1,9 mg.kg<sup>-1</sup>.

Van Straalen a Van Wensem (1986) stanovovali koncentrace Pb, Zn a Cd v několika druzích malých členovců v nizozemské oblasti znečištěné emisemi zinkové továrny (koncentrace Zn v půdě: 25500 ±3690 μmol.kg<sup>-1</sup> suché půdy). Z výsledků nelze potvrdit původní teorii závislosti množství kovů v organismech na jejich velikosti a trofické úrovni. Rozhodující je pravděpodobně především fyziologie jednotlivých druhů. Množství Zn bylo uvedeno v μmol.kg<sup>-1</sup> suché hmotnosti živočichů pro brouky různých druhů 860 – 3600, stonožky 2850 – 6050, pavouky 4370, roztoče 5580 a chvostokoky 700 – 1100. Van Straalen a kol. (2001) stanovovali také obsah některých kovů u bezobratlých odebraných z půdy v okolí Kosogorské hutě v ruské oblasti Tula (Zn 276 ±44 mg.kg<sup>-1</sup> suché hmotnosti). Obsah Zn byl uveden v mg vztažených na kilogram suché hmotnosti organismů, u žížal různých druhů byl v rozmezí 355 – 480, u chvostokoků 50 – 79, stejnonožců 79 – 170, pavouků 272, stonožek 582 a roztočů 2638.

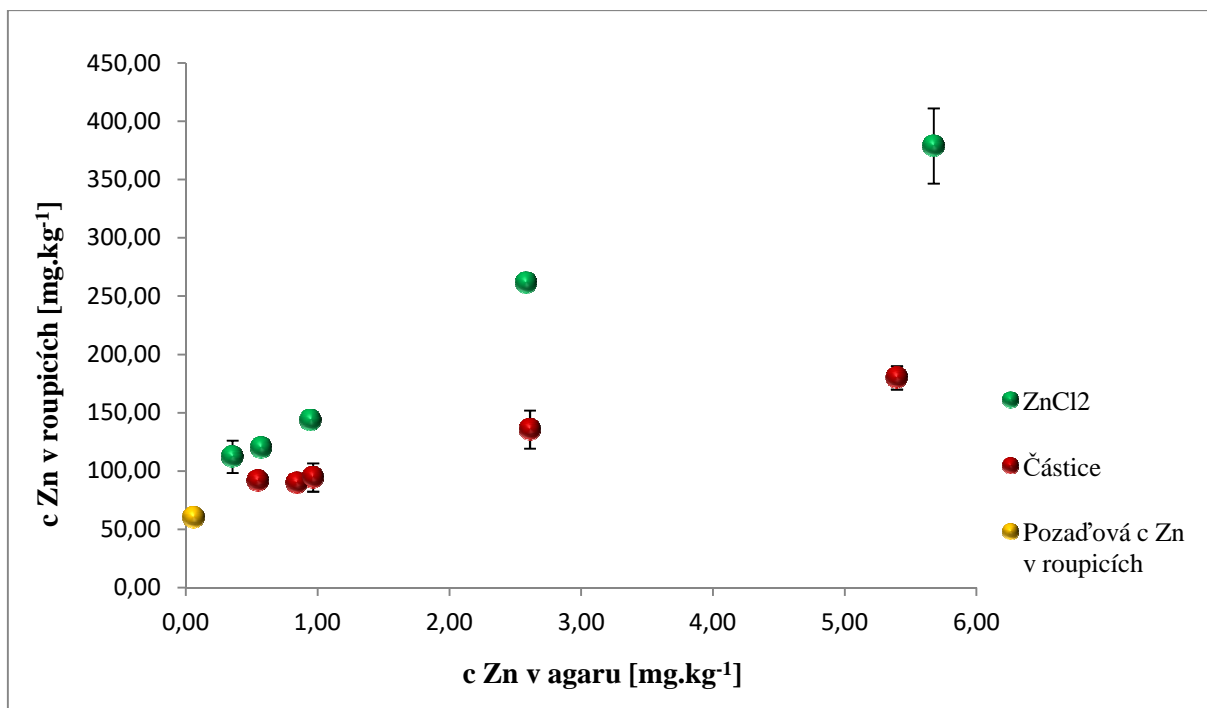
Cedergreen a kol. (2013) vztahují koncentrace stanovovaných prvků také k Mg jako prvku určujícího biomasu pro přesnější hodnocení výsledků. Poměr koncentrace Zn a koncentrace Mg v roupicích z naší přípravy vzorků vykazovala RSD 20,1 %, což nepřináší zlepšení oproti RSD 19,2 % náležící pouze k pozad'ovým koncentracím Zn v roupicích. Tato hodnota RSD vztažená k mokré váze roupic z našich výsledků je nižší než hodnota 28 %, kterou uvádí Cedergreen při práci se suchou hmotností roupic. Na základě tohoto srovnání lze usuzovat na spolehlivost výsledků při použití mokré hmoty, která je srovnatelná s výsledky při použití hmoty suché.

### 3.5 Bioakumulace sloučenin zinku v roupicích

ICP-OES byla využita pro stanovení zinku v testovacích roupicích a agarovém gelu pocházejících z pokusů, ve kterých byla sledována bioakumulace zinku ze  $ZnCl_2$  a z nanočástic ZnO-NPs. Z nalezených dat byl vypočítán bioakumulační faktor zinku v roupicích *E. crypticus*. Výsledky pro obě formy Zn jsou uvedeny v tabulce 15 i graficky (graf 1). Z grafu je patrné, že obsah zinku v roupicích převyšuje pozad'ovou koncentraci. Zinek ze  $ZnCl_2$  je akumulován ve větší míře, lze tedy předpokládat jeho vyšší biodostupnost pro *E. crypticus*, pravděpodobně díky dobré rozpustnosti a disociaci chloridu na ionty. Vyšší koncentrace iontů ve vodné fázi agaru umožňuje efektivnější prostup Zn povrchem těla roupic. Oproti tomu částice ZnO-NPs vykazovaly nižší bioakumulaci v roupicích zřejmě z opačného důvodu. Výsledky korelují se závěry nalezenými v literatuře. Tímto způsobem bylo zároveň ověřeno, že vyvinutá metoda je funkční, splnila svůj účel a je tedy vhodná pro sledování zinku i dalších kovů v roupicích v rámci ekotoxikologických pokusů. ICP-OES může být v postupu nahrazena jinou adekvátní analytickou koncovkou, v nejjednodušším případě např. F-AAS.

Tabulka 15: Bioakumulační faktor

$ZnCl_2$				Částice ZnO-NPs			
Agarový gel	Roupace	BF	RSD	Agarový gel	Roupace	BF	RSD
c Zn [ $mg \cdot kg^{-1}$ ]		[-]	[%]	c Zn [ $mg \cdot kg^{-1}$ ]		[-]	[%]
0,354	112	328	5,21	0,547	91,7	192	12,2
0,573	120	209	2,83	0,845	89,8	114	5,67
0,946	144	154	6,21	0,965	94,4	104	15,5
2,58	261	101	2,56	2,61	135,5	53	10,5
5,68	379	67	11,2	5,40	180	34	5,30



Graf 1: Bioakumulace ZnCl<sub>2</sub> a ZnO-NPs v roupicích

### 3.6 ICP-MS stanovení kovů v roupicích

ICP-MS je běžně používanou metodou, která má oproti ICP-OES menší spotřebu vzorku, což může být důležitou výhodou při analýze malých navážek vzorku. Nevýhodou je potřeba práce s dostatečně naředěnými vzorky kvůli přítomnosti matrice vzorku i činidel, která byla použita k jeho rozkladu. Větší ředění vzorku je při hmotnostní spektrometrii v indukčně vázaném plazmatu vyváženo instrumentálními detekčními limity, které jsou ve srovnání s ICP-OES o několik řádů nižší. Vzorky roupic pro analýzu byly připraveny stejným jednoduchým postupem, tedy rozpuštěny v TMAH. Pro snížení matricových efektů bylo oproti ICP-OES použito poloviční množství hydroxidu pro získání roztoků s obsahem TMAH 1,25 %.

ICP-MS byla použita pro analýzu požadovaných koncentrací v chovných roupicích. Kromě zinku byly stanoveny i koncentrace dalších kovů, jejichž sloučeniny často nalézají uplatnění ve formě nanočástic, nebo které představují riziko pro životní prostředí (Ag, Au, Hg, Pb, Sn, a Cd). Dále byly vypočteny instrumentální detekční limity. Získány byly ze tří měření jako koncentrace odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky intenzity pro nejnižší standard (Ag, Au) či pro druhý nejnižší standard (Hg, Pb, Sn, Cd a Zn). Detekční limity instrumentální, postupu a nalezené koncentrace kovů jsou uvedeny v tabulce 16. Prvky Cd

a Sn nebyly ve vzorcích detekovány, jejich množství ve vzorcích bylo pod detekčním limitem přístroje. Metoda nebyla validována.

Obsah zinku ve vzorcích je oproti ostatním prvkům řádově vyšší. Nalezená koncentrace  $61,3 \pm 3,8 \text{ mg.kg}^{-1}$  mokré hmoty je ve výborné shodě s výsledky požadové koncentrace zinku  $60,1 \pm 11 \text{ mg.kg}^{-1}$  stanovené pomocí ICP-OES. Obě metody jsou tedy vhodné pro stanovení obsahu Zn v roupicích pro potřeby ekotoxikologických testů. I přes rychlejší čas stanovení pomocí hmotnostní spektrometrie je pro účely rutinní analýzy vhodnější použití ICP-OES díky jeho nižším nákladům na provoz. ICP-OES je pro potřeby experimentu dostačující a má nižší požadavky na čistotu chemikálií a laboratorního nádobí bez nutnosti klimatizované, čisté laboratoře. V případě, že by bylo limitováno množství vzorku například na jednotlivé jedince nebo na jejich části, bylo by třeba převést analýzu do mikroměřítka, pak by ICP-MS stanovení vyhovovalo patrně více.

**Tabulka 16: Detekční limity pro ICP-MS s koncentrací prvků v roupicích**

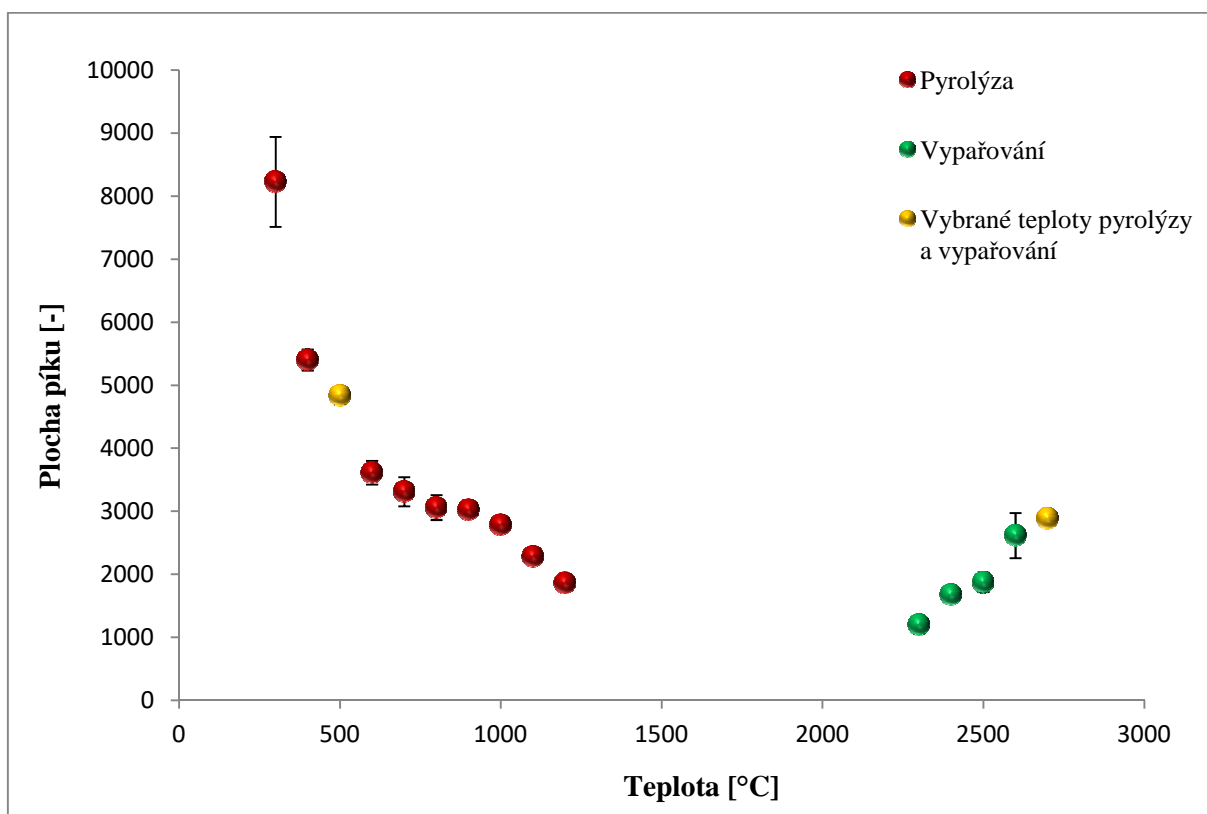
Prvek	Izotop	DL metody [ng.l <sup>-1</sup> ]	DL postupu [μg.kg <sup>-1</sup> ]	C v roupicích [mg.kg <sup>-1</sup> ]	RSD [%]
Ag	107	0,35	0,29	0,047	10,6
	109	0,17	0,14	0,048	10,8
Au	197	0,26	0,21	0,037	22,4
Hg	202	3,33	2,73	0,18	71,9
Pb	206 + 207 + 208	0,19	0,15	0,051	5,85
Zn	66	7,83	6,43	61,3	6,20
Sn	118	0,28	0,23	-	-
Cd	111	0,39	0,34	-	-

### 3.7 Potencionální využití ETV-ICP-MS

Při zmiňované nutnosti převedení analýzy do mikroměřítka z důvodu limitovaného množství vzorku by mohla být s výhodou použita metoda ICP-MS s elektrotermickým vypařováním. ETV-ICP-MS dokáže pracovat s velmi malými objemy vzorku v řádech μl a není nezbytné větší ředění vzorku jako u klasické ICP-MS. Pokud jsou vhodně zvoleny teploty, případně přidán vhodný modifikátor, dokáže ETV v kroku pyrolýzy úspěšně eliminovat vlivy matrice. Pro ověření možností ETV-ICP-MS analýzy bylo vybráno Au, které je rovněž používáno v některých sloučeninách jako nanočástice.



Před vlastním vyhodnocením byla provedena optimalizace teplotního programu. Na základě informací o teplotě vypařování Au při 2600 °C byla zvolena o něco vyšší prvotní teplota vypařování 2700 °C. Pro optimalizaci pyrolýzy byl proměřován standard o koncentraci Au 0,1  $\mu\text{g.l}^{-1}$  v 0,65%  $\text{HNO}_3$  vždy ve dvou replikách při zvyšující se teplotě pyrolýzy v rozmezí 300 – 1200 °C. Po sestrojení křivky pyrolýzy z ní byla následně určena optimální teplota 500 °C. Tato hodnota byla kompromisem mezi maximální intenzitou signálu a nejlepší opakovatelností měření s RSD 2,8 %. Podobně byla provedena optimalizace teploty vypařování, kdy při zvolené teplotě pyrolýzy 500 °C byla v průběhu stanovení standardu měněna teplota vypařování v rozsahu 2300 – 2700 °C. Vyšší teploty dosahující 2800 °C nebyly použity s ohledem na teplotní odolnost připojené transportní trubice. Z výsledků byla jako ideální teplota vypařování vybrána teplota 2700 °C (viz graf 2). Teplota čistícího kroku byla nastavena na 2750 °C.



Graf 2: Optimalizace teplotního programu pro ETV-ICP-MS

Za těchto podmínek byla provedena analýza vzorku roupic. Stejně jako u předchozích dvou metod byly vyhodnoceny detekční limity metody a postupu. Detekční limit metody nabývá hodnoty 0,14  $\text{ng.l}^{-1}$  a detekční limit postupu 0,15  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , což je méně než 0,21  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  dosažených ICP-MS analýzou přímo vnášeného roztoku. Celková koncentrace Au v roupicích

dosahovala  $1,53 \text{ mg.kg}^{-1}$  s RSD 35 %. Takto vysoká koncentrace překračující o několik řádů koncentraci získanou pomocí ICP-MS ( $0,037 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) a vysoká hodnota RSD svědčí o nedostatečné optimalizaci metody. Jednou z možností odlišných výsledků je nedostatečná teplota vypařování, kdy by mohl být použit vhodný modifikátor zvyšující těkavost Au, čímž by byla umožněna práce s nižšími teplotami vypařování. Wu a kol. (2007) použili jako modifikátor chelatační pryskyřici YPA4, díky které docílili snížení teploty vypařování Au a Pb o  $700 \text{ }^\circ\text{C}$ , tudíž pro kvantitativní vypaření těchto kovů postačovala teplota  $1900 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dalším důvodem vysokých odchylek byla pravděpodobně odlišná transportní účinnost analytu pro vzorek a standardy. Organická matrice obsažená ve vzorku umožňuje během pyrolýzy vznik uhlíkových částic, které transportní účinnost analytu zvyšují, oproti standardním roztokům, které organickou matrici neobsahovaly. Li a kol. (2004) použili 6% polytetrafluorethylen (PTFE) pro eliminaci matricových efektů při měření prvků (V, Cr, Mo, Ba, La, Ce, a W) v lidském séru. PTFE zamezilo ztrátám prvků při pyrolýze do teploty  $600 \text{ }^\circ\text{C}$  a tím i kolísání signálu během měření.

Jelikož vhodné modifikátory nebyly k dispozici, nebyly pro optimalizaci podniknuty další kroky. Výhodou metody stále zůstává její vysoká citlivost, nízké detekční limity a možnost analýzy mikrovzorků. Nevýhodou zůstává složitost optimalizace metody, avšak při nalezení vhodného modifikátoru eliminujícího vliv organické matrice by byla ETV-ICP-MS perspektivní metodou, jelikož příprava vzorku v TMAH je z pohledu ICP-MS techniky nevyhovující kvůli možné tvorbě interferujících polyatomických sloučenin z matrice.

## 4 Závěr

Byla vypracována literární rešerše zaměřená na ekotoxikologické testy, biodostupnost a bioakumulaci kovů v organismech a organismy využívané jako bioindikátory v testech bioakumulace. Podrobněji byly popsány žížaly a roupice patřící k půdním bezobratlým. Přiblíženy byly principy ekotoxikologických testů včetně používaných substrátů a postupů přípravy vzorků k analýze. Popsány byly metody prvkové analýzy především z hlediska dosažitelných detekčních limitů a možnosti zpracování malých množství vzorku z ekotoxikologických testů.

Cílem práce bylo vypracovat metodu pro stanovení zinku ve vzorcích z ekotoxikologických pokusů, která by minimalizovala manipulaci se vzorkem. Záměrem bylo zjednodušit rozklad vzorku a snížit nároky na množství chemikálií, přístrojové vybavení a potřebný čas. V literatuře není tato problematika příliš jasně popsána, některé přípravné kroky před analýzou často nejsou komentovány nebo jsou popsány nedostatečně. Obvykle je používána lyofilizace, případně umístění vzorku do sušárny s následným vážením a mikrovlnným rozkladem. Navržený postup zahrnoval oddělení roupic z agarového gelu pomocí štětce, omytí gelu z těl roupic, jejich vážení a rozpouštění v 25% TMAH. Při postupu byl vynechán uváděný krok vymražování či vysoušení vzorku, což snížilo počet kroků přípravy. Vážena byla mokrá hmotnost roupic oproti literatuře pracující s jejich suchou hmotností. Porovnáním opakovaných navážek sta roupic získaných několika osobami bylo potvrzeno, že separování roupic z agaru, odstranění zbytkové vody z těl roupic a jejich shromáždění k analýze vykazuje uspokojivou reprodukovatelnost a výsledná hmotnost není příliš zatížena chybou. Agarový gel byl rozpouštěn v 65% kyselině dusičné. Vzorky práškového agaru a ovesných vloček byly zpracovány mikrovlnnou mineralizací.

Analýza metodou ICP-OES byla první volbou díky jejím menším nárokům na čistotu chemikálií bez nutnosti klimatizované laboratoře. Pomocí ní byly u vzorků roupic sledovány vlivy matrice (2,5% TMAH), která byla odlišná od matrice ostatních vzorků ( $\text{HNO}_3$ ). Porovnány byly směrnice standardního přídávku se směrnici kalibračních řad připravených v 2,5% TMAH, 0,65%  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ . Pro zjednodušení testů byla vybrána kalibrační řada s 0,65%  $\text{HNO}_3$  i přes vnesení určité systematické chyby, která však nebyla pro další stanovení závažným problémem. Kromě zinku byly stanoveny i prvky sledující biomasu K, P, Ca a Mg. Porovnáním teoretické a skutečné koncentrace STP byla sledována návratnost metody, opakovaným měřením roztoku STP v rozmezí třech týdnů byla ověřena stabilita roztoků

v čase, což je informace důležitá k plánování práce v laboratoři. Opakovaným měřením kalibračních standardů v průběhu jedné analýzy byla ověřena stálost metody v čase. Zjištěné detekční limity postupu a metody pro jednotlivé vzorky byly vyhovující pro stanovení Zn daným postupem, který by mohl být aplikován například i na jednu roupici nebo její část. Byly stanoveny pozadřové koncentrace uvedených prvků u celé sady vzorků vstupujících do experimentu. Pozadřová koncentrace zinku je odlišná oproti hodnotám nalezených v literatuře, jelikož dostupné studie využily jiné testové prostředí než agarové půdy, nejčastěji standardní půdu LUFA 2.2 nebo přírodní kontaminované půdy.

Jelikož byly detekční limity ICP-OES vyhovující pro analyzované vzorky, byla metoda ověřena analýzou vzorků z testů bioakumulace  $ZnCl_2$  a  $ZnO-NPs$  v roupicích. Výsledky byly vyhodnoceny porovnáním bioakumulačních faktorů. Je zřejmé, že  $ZnCl_2$  se v těle roupic akumuluje ochotněji oproti formě nanočástic  $ZnO-NPs$ . Mnoho experimentů zkoumá toxický vliv látek na organismus s určováním středních letálních koncentrací apod. a hodnota BAF je v řadě případů nedostupná. Přesto je v mnoha studiích usuzováno, že rozpustnější formy látek vykazují snadnější či rychlejší bioakumulaci, což koreluje s výsledky uvedenými v práci. Vzorky z testů byly postupem analyzovatelné, nalezené koncentrace zinku významně převyšovaly detekční limit a získané výsledky z pohledu interpretace testů dávaly smysl. Metoda tedy splnila svůj účel a je vhodná pro použití při ekotoxikologických testech s robustní analytickou koncovkou pro stanovení zinku v roupicích.

Pro případ nutnosti převedení testů do mikroměřítka byly použity i metody s nižšími detekčními limity. Koncentrace zinku a koncentrace dalších kovů, jejichž sloučeniny se často nalézají ve formě nanočástic, nebo které představují riziko pro životní prostředí (Ag, Au, Hg, Pb, Sn, a Cd), byly stanoveny metodou ICP-MS. Obsah Zn ve vzorku stanovený MS spektrometrem se výborně shodoval s koncentrací stanovenou metodou ICP-OES. Metodou ETV-ICP-MS byl stanoven izotop  $^{197}Au$ . Byla optimalizována teplota pyrolýzy a následně teplota vypařování. Jelikož získaná koncentrace zlata o několik řádů překračovala hodnotu získanou metodou ICP-MS, bylo by třeba použít vhodný modifikátor pro snížení teploty vypařování a pro potlačení matricových efektů. Vhodné modifikátory pro dostačující optimalizaci teplotního programu nebyly v průběhu práce k dispozici.

Bylo zjištěno, že postup přípravy vzorků roupic z ekotoxikologických testů lze zjednodušit, v postupu je možné vynechat vysušení roupic bez výrazného zhoršení reprodukovatelnosti metody, což velmi ulehčuje manipulaci s organismy a snižuje časovou náročnost přípravy vzorků k analýze. V případě dostatečného množství vzorku, které bylo

použito v práci, je pro rutinní stanovení Zn metoda ICP-OES svými detekčními limity dostačující. V případě převedení do mikroměřítky by byla zřejmě nejperspektivnější ETV-ICP-MS analýza díky možnosti práce s opravdu malým množstvím vzorku. Bylo by žádoucí pokusit se získat vhodné modifikátory pro dostatečnou optimalizaci a provést další řadu testů ověřených například metodou standardního přídatku či přídatkem vnitřního standardu.

## 5 Seznam citací

**2-Lab.** Microwave decomposition system Berghof Speedwave MWS-2 + DAQ-10. *2-Lab.ru* [online]. c2013 [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: <http://2-lab.ru/kupit-SVCh-mineralizatory-moskva-cena-rossiya/Berghof-SPEEDWAVE-MWS-2-DAQ-10>

**Achazi**, RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C. The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta), *Newsletter on Enchytraeidae* 6. 1999; 117–126

**Airproducts.** Indukčně vázané plazma (ICP) [online]. c2017 [cit. 2017-05-31]. Dostupné z: <http://www.airproducts.cz/industries/Analytical-Laboratories/analytical-labapplications/product-list/inductively-coupled-plasma-icp-analyticallaboratories.aspx?itemId=8E471387439C4B518218FC44F3748E3D>

**Allen**, HE. Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: Importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes, and plants. *SETAC*. 2002; ISBN: 1880611465

**Arrate** JA, Rodriguez P, Martinez-Madrid M. Effects of three chemicals on the survival and reproduction of the oligochaete worm *Enchytraeus coronatus* in chronic toxicity tests. *Pedobiologia*. 2002; 46, 136–149

**Beauchemin** D. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2002; 74(12), 2873–2894

**Berghof.** Speedwave entry [online]. c2017 [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: <http://www.berghof-instruments.com/en/laboratory-equipment/digestion-technology/microwave-digestion/speedwave-entry/>

**Bicho** RC, Ribeiro T, Rodrigues NP, Scott-Fordsmand JJ, Amorim JBM. Effects of Ag nanomaterials (NM300K) and Ag salt ( $\text{AgNO}_3$ ) can be discriminated in a full life cycle long term test with *Enchytraeus crypticus*. *Journal of Hazardous Materials*. 2016; 318, 608–614

**Bicho** RC, Santos FCF, Scott-Fordsmand JJ, Amorim MJB. Effects of copper oxide nanomaterials (CuONMs) are life stage dependent – full life cycle in *Enchytraeus crypticus*. *Environmental Pollution* [online]. 2017; 224, 117–124 [cit. 2017-07-11]. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.01.067. ISSN 02697491

**BioLib:** *Biological library* [online]. Česká Republika, c1999-2017 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/main/>

- Caetano** AL, Gonçalves F, Sousa JP, Cachada A, Pereira E, Durate AC, Ferreira da Silva E, Pereira R. Characterization and validation of a Portuguese natural reference soil to be used as substrate for ecotoxicological purposes. *Journal of Environmental Monitoring*. 2012; 14(3), 925–936
- Cedergreen** N, Holm PE, Marcussen H. The use of elements as a substitute for biomass in toxicokinetic studies in small organisms. *Ecotoxicology* 2013; 22(10), 1509–1515
- Connell** DW and **Markwell** RD. Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere*. 1990; 20, 91–100
- Cortet** J, Gomot-De Vaufleury A, Poinso-Balaguer N, Gomot L, Texier Ch, Cluzeau D. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European journal of soil biology*. 1999; 35, 115–134
- Cvačka** J. Hmotnostní analyzátoři I – *pomocný text k předmětu Hmotnostní detekce v separačních metodách*. 2016
- Černohorský** T a **Jandera** P. *Atomová spektroskopie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997. ISBN 80-7194-114-x
- Didden** W and **Römbke** J. Enchytraeids as indicator organisms for chemical stress in terrestrial ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2001, 50(1), 25–43 [cit. 2017-04-28]. DOI:10.1006/eesa.2001.2075. ISSN 01476513. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651301920755>
- Edwards** CA, Subler S, Chen SK, Bogomolow DM. Essential criteria for selecting bioindicator species, processes, or systems to assess the environmental impact of chemicals on soil ecosystems. In *Bioindicator Systems for Soil Pollution*. (van Straalen NM, Krivolutsky DA, Eds.). 1996; 67–84. Kluwer, Dordrecht
- Evoqua**: Water technologies. *Evoqua Ultra Clear: Products* [online]. c2016 [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: <http://www.evoqua.com/en/brands/lab/Pages/Evoqua-UltraClear-Products.aspx>
- Fischer** E and **Koschorus** L. Sub lethal effects, accumulation capacities and elimination rates of As, Hg and Se in the manure worm, *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Pedobiologia*. 1992; 36, 172–178
- GBC Scientific equipment**, AAS Accessories. [online]. 2017 [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <http://www.gbcscientific.com/aasaccessories.html>

- Havránek I.** *Kontaktní testy ekotoxicity* [online]. Ostrava, 2009 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://theses.cz/id/dvp8wa>
- Hrdá K, Opršal J, Knotek P, Pouzar M, Vlček M.** Toxicity of zinc oxide nanoparticles to the annelid *Enchytraeus crypticus* in agar-based exposure media. *Chemical Papers*. 2016; 70(11)
- Hrdá K.** Testy ekotoxicity nanomateriálů dispergovaných v agarózovém gelu. Pardubice, 2015. *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Miroslav Pouzar
- Hund-Rinke K and Kördel W.** Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability: experimental methods. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2003; 56, 52–62
- ISO (International Standard Organization)** Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), *Part 2: Determination of effects on reproduction*. 1998; No.11268-2. ISO, Geneve.
- ISO (International Standard Organization).** Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), *Part 2: Determination of effects on reproduction*. 1998; No. 11268-2. ISO, Geneve
- Jaenike J.** “*Eisenia foetida*” is two biological species, *Megadrilologica*. 1982; 4, 6–8
- Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J.** Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species, *Environ*. 2005; Reviews 13, 51–83
- Kaspzak K,** “Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems,” *Pedobiologia*. 1982; 23, 217–232
- Knejzlík Z and Ruml T.** Nepříznivý vliv xenobiotik na lidský organismus a metody jeho testování. *Chemické listy*. 1999; 93(1), 607–615
- Kobetičová K, Šimek Z, Brezovský J, Hofman J.** Toxic effects of nine polycyclic aromatic compounds on *Enchytraeus crypticus* in artificial soil in relation to their properties. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2011; 74(6), 1727–1733 ISSN 01476513
- Koplík R.** *Metody atomové spektrometrie – pomocný text k předmětu Analytické metody ve forenzní analýze*. 2017
- Laboratory Journal:** Business Web for Users in Science and Industry. *Speedway Entry* [online]. 2013 [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: <http://www.laboratory-journal.com/products/laborgeraete/microwave-digestion-system-speedwave-mws-2>



**Laboratoř monitoring Praha.** *Ekotoxicita* [online]. Praha, c2017 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <https://www.moni.cz/rozbory-a-analyzy/ekotoxicita/>

**Li S, Hu B, Jiang Z, Chen R.** Direct determination of trace refractory elements in human serum by ETV-ICP-MS with in-situ matrix removal. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004; 379, 1076–1082 [cit. 2017-07-28]. DOI: 10.1007/s00216-004-2678-y

**Luo W, Verweij RA, Van Gestel CAM.** Contribution of soil properties of shooting fields to lead bioavailability and toxicity to *Enchytraeus crypticus*. *Soil Biology and Biochemistry.* 2014; 76, 235–241

**Maleri RA, Reinecke AJ, Reinecke SA.** A comparison of nickel toxicity to pre-exposed earthworms (*Eisenia fetida*, *oligochaeta*) in two different test substrates. *Soil Biology and Biochemistry.* 2007; 39(11), 2849–2853

**Matějů V.** *Ekotoxicita v české legislativě* [online]. Praha, 2009 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: [http://www.ekomonitor.cz/sites/default/files/file/prezentace-seminaru/05\\_Mateju\\_0.pdf](http://www.ekomonitor.cz/sites/default/files/file/prezentace-seminaru/05_Mateju_0.pdf)

**MClabor.** *SG: Ultra Clear UV Plus: Analyse Laborgeräte* [online]. c2016 [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: [http://mclabor.de/DE~SG--Ultra-Clear-UV-Plus-\[AL.16.N.0.10208\]~eArtNr.asp](http://mclabor.de/DE~SG--Ultra-Clear-UV-Plus-[AL.16.N.0.10208]~eArtNr.asp)

**Mihaljevič M, Strnad L, Šebek O.** Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. *Chemické listy.* 2004; 98, 123–130

**OECD Test Guideline No. 207:** *OECD Guidelines for the testing of chemicals: Earthworm, acute toxicity test.* 1984; Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France

**OECD Test Guideline No. 220:** *OECD Guidelines for the testing of chemicals: Enchytraeid reproduction test.* 2004; Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France

**OECD Test Guideline No. 317:** *OECD guidelines for the testing of chemicals: Bioaccumulation in terrestrial oligochaetes.* 2010; Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France

**Pavliš M.** *Toxické kovy - Pomocný studijní text k předmětu Ekotoxikologie. Předmět Ekotoxikologie* (RNDr. Petr Hekera, Ph). 2005

**Pettersson RP a Olsson M.** A nitric acid-hydrogen peroxide digestion method for trace element analysis of milligram amounts of plankton and periphyton by total-reflection X-ray

fluorescence spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1998; 13(7), 609–613. ISSN 02679477. DOI: 10.1039/A708575C

**Riberio M**, Maria V, Scott-Fordsmand J, Amorim M. Oxidative Stress Mechanisms Caused by Ag Nanoparticles (NM300K) are Different from Those of AgNO<sub>3</sub>: Effects in the Soil Invertebrate *Enchytraeus Crypticus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2015; 12(8), 9589–9602 [cit. 2017-07-11]. DOI: 10.3390/ijerph120809589. ISSN 1660-4601

**RMI** (2): Analytical and Testing Instruments. *Optimass 9500* [online]. c2017 [cit. 2017-05-24]. Dostupné z: <http://www.rmi.cz/optimass-9500>

**RMI**: Analytical and Testing Instruments. *Integra XL* [online]. c2017 [cit. 2017-05-24]. Dostupné z: <http://www.rmi.cz/integra-xl>

**Römbke J** and **Knacker Th**. Aquatic toxicity test for enchytraeids. *Hydrobiologia*. 1989; 180, 235–242

**Römbke J** and **Moser Th**. Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test, *UBA-Texte*. 1999; 4(99), 373

**Römbke J**, Knacker T, Förster B, Marcinkowski A. Comparison of effects of two pesticides on soil organisms in laboratory tests, microcosms and in the "eld. In *Ecotoxicology of Soil Organisms*" (M. Donker, H. Eijsackers, and F. Heimbach, Eds.). 1994; 229–240. Lewis, Chelsea, MI

**Römbke J**. Die Enchytraeen eines moderbuchenwaldes. Ihre rolle beim streuabbau und ihre reaktion auf umweltbelastungen. *Diss*, 1988; Frankfurt an Main.

**Römbke J**. Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: a review. *Pedobiologia*. 2003; 47, 607–616

**Schmelz RM** and **Collado R**. *Enchytraeus luxuriosus* sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolinea*. 1999; 57, 93-100

**Sládečková A** and **Sládeček V**. *Hydrobiologie*. Praha: České vysoké učení technické, 1995. ISBN 80-01-01298-0

**Soudek P**, Víchová L, Valenová Š, Podlipná R, Malá J, Vaněk T. Arsen a jeho příjem rostlinami. *Chemické listy*. 2006; 100, 323–329

- Sousa JP**, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM. Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000; 19, 2557–2563
- Stockinger A**, Bauer R, Kandeler E. Der einfluss von schwermetallen auf enchytraeus buchholzi und auf die aktivität der mikroorganismen in einem mikrokosmenversuch. *Mittl. Deut. Bodenkundl.* 1997; 85(2), 611–614
- Svobodová M**. Bioakumulace arsenu z kompostovaného průmyslového kalu. Brno, 2011. *Bakalářská práce*. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Jakub Hofman
- Takasaki Y**, Inagaki K, Sabarudin A, Fujii S-I, Iwahata D, Takatsu A, Chiba K a Umemura T. Multielement analysis of micro-volume biological samples by ICP-MS with highly efficient sample introduction system. *Talanta.* 2011; 87, 24–29. ISSN 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.09.022
- Todolí JL** a **Mermet JM**. Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.* 2006; 61(3) 239–283. ISSN 05848547. DOI: 10.1016/j.sab.2005.12.010
- Todolí JL** a **Mermet JM**. Elemental analysis of liquid microsamples through inductively coupled plasma spectrochemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2005; 24(2), 107–116. ISSN 01659936. DOI: 10.1016/j.trac.2004.11.005
- Topuz E** a **Van Gestel CAM**. Toxicokinetics and toxicodynamics of differently coated silver nanoparticles and silver nitrate in Enchytraeus crypticus upon aqueous exposure in an inert sand medium. *Environmental toxicology and chemistry.* 2015; 34(12), 2816–2823
- Tyler, G**. ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared. *ICP Optical Emission Spectroscopy: Technical note* [online]. 2017, (05) [cit. 2017-05-31]. Dostupné z: [http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Downloads/OpticalSchool\\_CN/TN/ICP/ICP-OES\\_\\_ICP-MS\\_and\\_AAS\\_Techniques\\_Compared.pdf](http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Downloads/OpticalSchool_CN/TN/ICP/ICP-OES__ICP-MS_and_AAS_Techniques_Compared.pdf)
- Van Gestel CAM**, Borgman E, Verweij RA, Diez Ortiz M. The influence of soil properties on the toxicity of molybdenum to three species of soil invertebrates. *Ecotoxicology and environmental safety.* 2011; 74, 1–9
- Van Gestel CAM**. Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *Science of total environment.* 2008; 406, 385–395

- Van Gestel CAM.** The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, *In: Ecotoxicology of Earthworms* (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). *Intercept Press*. 1992; Andover (GB)
- Van Straalen NM a Van Wensem J.** Heavy metal content of forest litter arthropods as related to body-size and trophic level. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*. 1986; 42(3), 209–221 ISSN 01431471
- Van Straalen NM, Butovsky RO, Pokarzhevskii AS, Zaitsev AS, Verhoef SC.** Metal concentrations in soil and invertebrates in the vicinity of a metallurgical factory near Tula (Russia). *Pedobiologia*. 2001; 45, 451–466
- Venter JM and Reinecke AJ.** The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta), *South African J. Zool.* 1988; 23, 161–165
- West HK, Davies MS, Morgan AJ, Herbert RJ.** Intraspecific variation in calcium and strontium accumulation / depuration in an epigeic earthworm species. *Eur. J. Soil Biol.* 2001; 37, 329–332
- Westheide W and Graefe U.** Two new terrestrial Enchytraeus species (Oligochaeta, Annelida), *J. Nat. Hist.* 1992; 26, 479–488
- Westheide W and Müller MC.** Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology, *Hydrobiologia*. 1996; 334, 263–267
- Wikimedia commons.** *Earthworm head* [online]. 2016 [cit. 2017-06-29]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Earthworm\\_head.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Earthworm_head.svg)
- Wu Y, Jiang Z, Hu B, Duan J.** Electrothermal vaporization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry determination of gold, palladium, and platinum using chelating resin YPA4 as both extractant and chemical modifier. *Talanta*. 2004; 63(3), 585–592 [cit. 2017-07-28]. DOI: 10.1016/j.talanta.2003.11.042. ISSN 00399140
- Zhang L a Van Gestel CAM.** The toxicity of different lead salts to *Enchytraeus crypticus* in relation to bioavailability in soil. *Environmental toxicology and chemistry*. 2017; 1–9
- Zheng J, Gossler W, A Geislinger, Kosmus W, Chen B, Zhuang G, Xu K a GS.** Multi-element determination in earthworms with instrumental neutron activation analysis and inductively coupled plasma mass spectrometry: A comparison. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*. 1997; 223(1-2), 149–155