

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Faktory ovlivňující ekotoxicitu průmyslově vyráběných nanomateriálů

Disertační práce

2019

Autor: Ing. Kateřina Hrdá

Školitel: doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology
Institute of Environmental and Chemical Engineering

The factors affecting ecotoxicity of engineered nanomaterials

Dissertation Thesis

2019

Author: Ing. Kateřina Hrdá

Supervisor: assoc. prof. Miloslav Pouzar

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 31. 7. 2019

Kateřina Hrdá

Poděkování

Na tomto místě bych ráda upřímně poděkovala školiteli doc. Ing. Miloslavu Pouzarovi, Ph.D., za vedení, konzultace a trpělivost během celé naší mnohaleté spolupráce. Velké díky patří také mé mamince a bratrovi, kteří pomáhali s hlídáním mé dnes již roční dcerky a umožnili mi tak tuto práci dokončit.

ANOTACE

Produkce průmyslově vyráběných nanomateriálů v posledních letech kontinuálně roste, a proto je značná pozornost věnována hodnocení rizik spojených s jejich uvolňováním do životního prostředí. Nanomateriály vykazují celou řadu unikátních fyzikálně chemických vlastností, jimiž se odlišují od chemikálií rozpustných v příslušném médiu či složce životního prostředí i od hmotných objektů větších rozměrů. Tyto vlastnosti vedou ke specifickým typům chování a způsobují, že pro hodnocení toxicity nanomateriálů nelze využít existující metodiky OECD, ISO atd. V posledních letech lze zaznamenat snahy stávající metodiky pro testování toxicity v akvatickém či terestrickém prostředí modifikovat. V dostupné literatuře můžeme sice nalézt mnoho studií zabývajících se ekotoxicitou nanomateriálů, ale jejich výsledky jsou z důvodu stále chybějící standardizace a často nedostatečné charakterizace těžko porovnatelné a reprodukovatelné.

Předložená disertační práce je zaměřena na problematiku testování ekotoxicity průmyslově vyráběných nanomateriálů. Konkrétně na vývoj metod testování ekotoxicity, které eliminují faktory ovlivňující správnost a reprodukovatelnost výsledků laboratorních testů. Disertační práce je rozdělena do tří tematických částí.

První část práce se zabývá studiem faktorů ovlivňujících aglomeraci nanočástic ve vodném prostředí a vlivem stupně aglomerace na výsledky testů ekotoxicity. Je zde popsána námi vyvinutá metoda testování toxicity nanočástic v podmínkách řízené aglomerace, která je založena na periodické výměně média během testu ekotoxicity. Tento přístup byl ověřen v testu toxicity nanočástic stříbra na plůdku kapra obecného (*Cyprinus carpio*). V této části práce byl použit matematický model, popisující závislost velikosti aglomerátů na čase v kapalném médiu daných vlastností (koncentrace nanočástic, iontová síla). Pomocí tohoto modelu byla navržena frekvence výměny média tak, aby byl experimentální organismus vystaven vždy pouze aglomerátům, jejichž velikost nepřesahovala zvolenou hraniční hodnotu. Výsledky ekotoxikologického experimentu ukázaly významný vliv aglomeračního stavu na mechanismus účinku a výslednou toxicitu materiálu. V této části práce byla dále diskutována alternativní metoda popisu kinetiky aglomerace nanočástic založená na podobnosti s elektrosorpčními procesy. Podobnosti obou procesů byly ověřeny na případu aglomerace nanočástic stříbra a elektrosorpce thiosíranu sodného.

I v terestrickém prostředí je aglomerace nanočástic častým jevem. Nehomogenní rozptýlení testovaného materiálu v expozičním médiu v kombinaci s únikovým chováním typickým pro některé půdní organismy vedou dále k nereprodukovatelným výsledkům prováděných testů. Také charakterizace nanočástic rozptýlených v půdní matrici je velice obtížným úkolem. Kvůli výše uvedeným skutečnostem se druhá část této práce zabývá ověřením použitelnosti agaru jako expozičního média při testech terestrické toxicity a dále optimalizací přípravy a charakterizace agarového expozičního média. Studie se zabývá toxicitou nanočástic oxidu zinečnatého na roupici *Enchytraeus crypticus*. V práci je kromě výhod spojených s využitím agaru diskutován také vliv způsobu vnášení částic do expozičního média na výsledný aglomerační stav a toxicitu částic. Dále je zde popsána námi navržená metoda pro stanovení obsahu zinku ve vzorcích biomasy *E. crypticus* a vzorcích agaru.

Třetí část práce je zaměřena na zvýšení environmentální relevance experimentů prováděných v agarovém živném médiu a na studium vlivu modelových půdních složek na toxicitu nanomateriálů. Za tímto účelem bylo agarové médium modifikováno kaolinem, rašelinou, huminovými kyselinami a jejich kombinacemi. Tyto modifikace agaru nám měly umožnit snadno sledovat, jak jednotlivé půdní složky interagují s testovanými částicemi oxidu zinečnatého, jak tyto interakce ovlivňují výsledný stav materiálu a s tím související změny v pozorované mortalitě roupic *E. crypticus*.

Výsledky prezentované v předložené práci ukazují, že námi navržené modifikace metod testování ekotoxicity nanomateriálu umožnily monitorovat aglomerační chování částic v expozičních médiích. Metoda navržená pro test akvatické toxicity umožnila testování ekotoxicity nanočástic a jejich aglomerátů o přesně definované velikosti. Expoziční médium na bázi agaru, které bylo v práci využito pro testy terestrické toxicity, umožňuje homogenní disperzi testovaných částic, potlačení dynamických procesů během experimentu a poskytuje možnost snadněji analyzovat fyzikálně-chemický stav částic přímo v expozičním médiu. Metoda založená na využití agarového expozičního média by mohla nalézt využití jako rychlý a jednoduchý nástroj v prvním stupni hodnocení environmentálních rizik nanomateriálů nebo pro studie zabývající se vlivem fyzikálně-chemických podmínek na toxicitu nanočástic.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nanočástice, stříbro, oxid zinečnatý, aglomerace, *Cyprinus carpio*, *Enchytraeus crypticus*, agar, huminové kyseliny, kaolin, rašelina

TITLE

The factors affecting ecotoxicity of engineered nanomaterials

ANNOTATION

The production of engineered nanomaterials has been growing continuously in recent years and therefore considerable attention is paid to the assessment of the risk associated with their release into the environment. Nanomaterials exhibit a number of unique physicochemical properties that distinguish them from chemicals soluble in the respective medium or environmental component, as well as from massive objects of larger size. These properties lead to specific types of behavior and cause standard OECD and ISO methodologies not applicable for assessing the toxicity of nanomaterials. In recent years, efforts have been noted to modify the existing methodology for testing toxicity in aquatic or terrestrial environments. While many studies on the ecotoxicity of nanomaterials can be found in the available literature, the results are difficult to compare and reproduce due to lack of standardization and often insufficient characterization.

The presented dissertation is focused on the issue of testing of engineered nanomaterials ecotoxicity. Specifically, on to development of a testing method that eliminates factors affecting the rightness and reproducibility of laboratory test results. The dissertation is divided into three thematic parts.

The first part of the thesis deals with the factors influencing the agglomeration of nanoparticles in the aqueous environment and the influence of the degree of agglomeration on the results of ecotoxicity tests. This part of the thesis contains a developed method for testing the toxicity of nanoparticles under controlled agglomeration conditions, which is based on periodic media exchange during the ecotoxicity test. This approach has been used in the experiments where the toxicity of silver nanoparticles to the common carp (*Cyprinus carpio*) fish embryos was tested. In this work was used mathematical model, which describes the dependence of agglomerate size on time in a liquid medium of given properties (nanoparticle concentration, ionic strength). Using this model, the frequency of media exchange was designed so that experimental organisms were exposed only to the agglomerates whose size did not exceed the selected limit value. The results showed a significant effect of the agglomeration state on the mechanism of action and the resulting toxicity of the material. Furthermore, kinetic of nanoparticle agglomeration based on similarity to electrosorption

processes was discussed. Similarities of both processes were verified on the case of agglomeration of silver nanoparticles and electrosorption of sodium thiosulfate. Alternative possibilities of interleaving and evaluation of some kinetic parameters of agglomeration were described.

The agglomeration is frequent phenomenon in the terrestrial environment too. The non-homogeneous dispersion of the tested material in the exposure medium in combination with the escape behavior typical for some soil organisms further leads to non-reproducible results of published studies. Also, characterization of nanoparticles dispersed in the soil matrix is a very difficult task. Due to the above, the second part of this thesis deals with the verification of the usability of agar as an exposure medium in terrestrial toxicity tests and further with the optimization of preparation and characterization of agar exposure medium. The study discusses the toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Enchytraeus crypticus* in agar exposure medium. In addition to the advantages associated with the use of agar, the study also discusses the influence of different spiking methods on the resulting agglomeration state and particles toxicity. Furthermore, a method developed for determining the zinc content in samples of *E. crypticus* biomass and agar is described here.

The third part focuses on increasing the environmental relevance of experiments carried out in agar medium and on the study of the influence of model soil components on the toxicity of nanomaterials. For this purpose, the agar medium was modified with kaolin, peat, humic acids and their combinations. These agar modifications were intended to allow us to easily see how the individual soil components interact with the zinc oxide particles, how these interactions affect the resulting state of the material in the exposure medium and the related changes in observed *E. crypticus* mortality.

The results presented in this thesis show that the proposed modifications of the methods for testing the ecotoxicity of nanomaterials have enabled effective monitoring of agglomeration behavior in the exposure media. The method proposed for the aquatic toxicity test has allowed testing of the ecotoxicity of nanoparticles and their agglomerates of precisely defined size. The agar-based exposure medium used for terrestrial toxicity tests allows a homogeneous dispersion of test particles, suppression of dynamic processes during the experiment, and provides the ability to more easily analyze the physico-chemical state of the particles directly in the exposure medium. This method, based on the use of agar exposure medium, could be used as a quick and simple tool in the first tier of environmental risk assessment of

nanomaterials or in studies dealing with the effect of physico-chemical conditions on nanoparticles toxicity.

KEYWORDS

Nanoparticles, silver, zinc oxide, agglomeration, *Cyprinus carpio*, *Enchytraeus crypticus*, agar, humic acids, kaolin, peat

OBSAH

CÍLE PRÁCE	16
ÚVOD	17
1 TEORETICKÁ ČÁST	18
1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti nanomateriálů	18
1.2 Osud nanomateriálů v životním prostředí	19
1.2.1 Osud nanomateriálů ve vodách	19
1.2.2 Osud nanomateriálů v půdách	21
1.3 Přístupy při testování ekotoxicity nanomateriálů	25
2 PRAKTICKÁ ČÁST	30
2.1 Plnění dílčího cíle 1 – Optimalizace metody testování akvatické toxicity NPs	30
2.1.1 Experimentální část – Modifikovaný test toxicity Ag-NPs na plůdku kapra obecného	30
2.1.1.1 Příprava a charakterizace Ag-NPs	31
2.1.1.2 Expoziční médium a testovací organismus	32
2.1.1.3 Testy toxicity Ag-NPs	33
2.1.2 Výsledková část – Modifikovaný test toxicity Ag-NPs na plůdku kapra obecného	34
2.1.2.1 Charakterizace Ag-NPs	34
2.1.2.2 Test toxicity Ag-NPs	34
2.1.3 Experimentální část – Popis kinetiky aglomerace Ag-NPs na základě podobnosti s elektrosorpcí thiosíranu sodného	39
2.1.3.1 Materiály a metody	39
2.1.4 Výsledková část – Popis kinetiky aglomerace Ag-NPs na základě podobnosti s elektrosorpcí thiosíranu sodného	40
2.2 Plnění dílčího cíle 2 – Optimalizace metody testování terestrické toxicity NPs...	44
2.2.1 Experimentální část – Testy toxicity ZnO-NPs v agarovém médiu	44
2.2.1.1 Chemikálie a testovací organismus	45
2.2.1.2 Experimentální design	45

2.2.1.3	Příprava expozičního média pro testy toxicity ZnCl ₂	46
2.2.1.4	Příprava expozičního média pro testy toxicity ZnO-NPs.....	46
2.2.1.5	Charakterizace ZnO-NPs v koloidech a v expozičním médiu	47
2.2.2	Výsledková část – Testy toxicity ZnO-NPs v agarovém médiu	47
2.2.2.1	Charakterizace ZnO-NPs v koloidech a v expozičním médiu	47
2.2.2.2	Testy toxicity	50
2.2.3	Experimentální část – ICP-OES metoda pro stanovení Zn ve vzorcích biomasy <i>E. crypticus</i> a agaru	53
2.2.3.1	Příprava vzorků	53
2.2.3.2	Stanovení mokré a suché hmotnosti roupic <i>E. crypticus</i>	54
2.2.3.2	Analytické přístroje	55
2.2.3.3	Standardní roztoky a certifikovaný referenční materiál	55
2.2.4	Výsledková část – ICP-OES metoda pro stanovení Zn ve vzorcích biomasy <i>E. crypticus</i> a agaru	55
2.2.4.1	Stanovení mokré a suché hmotnosti roupic <i>E. crypticus</i>	55
2.2.4.2	Validace a kontrola kvality metody ICP-OES	56
2.2.4.3	Požadovaná koncentrace zinku	57
2.2.4.4	Použitelnost metody v ekotoxikologických testech	57
2.3	Plnění dílčího cíle 3 – Studium vlivu interakcí NPs s půdními složkami na ekotoxicitu NPs.....	59
2.3.1	Experimentální část – Testy toxicity ZnO-NPs v modifikovaném agarovém médiu	59
2.3.1.1	Chemikálie, testovací organismus a experimentální design.....	60
2.3.1.2	Příprava expozičních médií	60
2.3.1.3	Charakterizace ZnO-NPs v koloidech a v expozičním médiu	61
2.3.2	Výsledková část – Testy toxicity ZnO-NPs v modifikovaném agarovém médiu	62
2.3.2.1	Charakterizace ZnO-NPs v koloidech a v expozičním médiu	62
2.3.2.2	Testy toxicity	65
2.3.3	Experimentální část – Vliv huminových kyselin na toxicitu ZnO-NPs v agarovém expozičním médiu	69
2.3.3.1	Chemikálie, testovací organismus a experimentální design.....	69
2.3.3.2	Příprava expozičního média	69

2.3.3.3	Charakterizace ZnO-NPs.....	70
2.3.4	Výsledková část – Vliv huminových kyselin na toxicitu ZnO-NPs	
	v agarovém expozičním médiu.....	70
2.3.4.1	Charakterizace ZnO-NPs.....	70
2.3.4.1	Testy toxicity.....	73
3	ZÁVĚR A BUDOUCÍ PERSPEKTIVY.....	76
4	POUŽITÁ LITERATURA.....	80
5	SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI.....	87
6	PŘÍLOHY.....	90

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Osud ENMs ve vodách	21
Obrázek 2 Osud ENMs v půdách	23
Obrázek 3 Výhody a nevýhody spojené s využitím metod pro konvenční chemikálie při testování ekotoxicity nanomateriálů	26
Obrázek 4 Složení média M203	32
Obrázek 5 a) AFM snímek Ag-NPs, b) AFM profil částice, c) snímek Ag-NPs pořízený pomocí SEM	34
Obrázek 6 Přežití embryí: a) experiment 1, b) experiment 2 s maximální velikostí aglomerátů 200 nm c) experiment 2 s maximální velikostí aglomerátů 400 nm. *** Statisticky významné rozdíly mezi testovanými koncentracemi 10 vs. 25 vs. 50 μM Ag (Mann-Whitney test, $p < 0,05$)	36
Obrázek 7 Příklad vlivu Ag-NPs na vývoj embryí kapra po 144hodinovém experimentu. a) plůdek z kontrolní skupiny, b) plůdek se zjevným zakřivením páteře a perikardiálním edémem (5 μM Ag, 200 nm), c) embryo s chorionem obaleným aglomeráty Ag-NPs (25 μM Ag, 400 nm)	37
Obrázek 8 (a) Příklad průběhu závislosti povrchového napětí Γ na koncentraci c pro adsorpci $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ a (b) závislosti D_H na t pro aglomeraci 10 μM Ag-NPs	41
Obrázek 9 Roupice <i>Enchytraeus crypticus</i>	45
Obrázek 10 Objekty pozorované s využitím SEM v agarech s 1 000 (a, c) a 50 (b, d) mg ZnO-NPs kg^{-1} agaru připravené postupem 1 (a, b) a postupem 2 (c, d) – e) EDX spektra zkoumaných objektů: velké (1) a malé (2) aglomeráty, bubliny (3) a povrch (4)	49
Obrázek 11 Mortalita roupic <i>E. crypticus</i> exponovaných po 96 h ZnCl_2 a ZnO-NPs vnášených prvním postupem (ZnO-NPs-Kryo) a druhým postupem (ZnO-NPs-Koloid)	50
Obrázek 12 Obsah zinku pocházejícího z ZnO-NPs a z ZnCl_2 v roupicích <i>E. crypticus</i> po 96 hodinové expozici v agarovém expozičním médiu	57
Obrázek 13 SEM snímky vzorků agarů s 50 mg ZnO-NPs kg^{-1} (vlevo) a 1 000 mg ZnO-NPs kg^{-1} (vpravo) ve čtyřech modifikacích expozičního média na bázi agaru. Příklady	

pozorovaných objektů analyzovaných pomocí EDX: (1) bublina agaru (2) malý aglomerát (3) plocha vzorku (4) velký aglomerát.....	64
Obrázek 14 Křivky dávka-účinek popisující akutní toxicitu zinku pocházejícího z ZnCl ₂ (a) a z ZnO-NPs (b) pro roupice <i>E. crypticus</i> ve čtyřech různých expozičních médiích na bázi agaru	65
Obrázek 15 Mortalita <i>E. crypticus</i> exponovaných zinku (250 mg kg ⁻¹) pocházejícího z ZnCl ₂ v agarovém médiu s různým obsahem fosfátového pufru.....	67
Obrázek 16 SEM snímky vzorků agarů s 50 mg ZnO-NPs kg ⁻¹ (vlevo) a 1 000 mg ZnO-NPs kg ⁻¹ (vpravo) ve třech modifikacích expozičního média na bázi agaru. Příklady pozorovaných objektů analyzovaných pomocí EDX: (1) bublina agaru (2) malý aglomerát (3) plocha vzorku (4) velký aglomerát	72
Obrázek 17 Křivky dávka-účinek popisující akutní toxicitu zinku pocházejícího z ZnCl ₂ (a) a z ZnO-NPs (b) pro roupice <i>E. crypticus</i> exponovaných 96 h ve třech různých médiích na bázi agaru	73
Tabulka 1 Složení umělé půdy OECD a přírodní půdy LUFA 2.2	28
Tabulka 2 Hodnoty 96h LC ₅₀ obou testovaných forem zinku pro roupice <i>E. crypticus</i> získané ve čtyřech různých expozičních médiích na bázi agaru	65
Tabulka 3 Hodnoty 96h LC ₅₀ obou forem zinku pro roupice <i>E. crypticus</i> zjištěné ve třech různých médiích na bázi agaru	73

SEZNAM ZKRATEK

ASTM	americká společnost pro testování a materiály
AFM	mikroskopie atomárních sil
BAF	bioakumulační faktor
CNTs	uhlíkové nanotrubičky
ČOV	čistírna odpadních vod
DLS	dynamický rozptyl světla
DOM	rozpuštěné organická hmota
DW	suchá hmotnost
EDX	energie disperzní rentgenová spektroskopie
ENMs	průmyslově vyráběné nanomateriály
FA	fulvinové kyseliny
FFFF	frakcionace toku ve fokusujících polích
HA	humínové kyseliny
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ISO	mezinárodní organizace pro normalizaci
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LOD	mez detekce
NOM	přírodní organická hmota
NPs	nanočástice
OECD	organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj
PVP	polyvinylpyrrolidon
ROS	reaktivní formy kyslíku
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SH	humát sodný
SOM	pevná organická hmota
SWCNTs	jednotěnné uhlíkové nanotrubičky
VK	variační koeficient
WW	mokrý hmotnost

CÍLE PRÁCE

Změny fyzikálně-chemických vlastností nanočástic po jejich uvolnění do životního prostředí a obtížná charakterizace částic v komplexních maticích představují hlavní faktory komplikující hodnocení environmentálních rizik nanomateriálů. V laboratorních testech, kde je vyžadována reprodukovatelnost, transformační procesy jako je aglomerace, agregace, sedimentace, rozpouštění atd. komplikují interpretaci výsledků. Vzhledem k často se vyskytujícím metodologickým artefaktům existuje vysoká míra nejistoty ohledně skutečné povahy fyzikálně-chemických vlastností a účinných dávek testovaných materiálů (konkrétně mikro a nanočástic). Tato nejistota snižující informativní hodnotu výsledků testů hraje významnou roli zejména v případě experimentů prováděných v komplexních expozičních médiích, kde během experimentu dochází k širokému spektru dynamických změn.

Hlavním cílem předložené disertační práce bylo proto navrhnout a vyvinout metody testování toxicity nanomateriálů, které vliv těchto faktorů eliminují či zredukuje v co nejvyšší možné míře.

Hlavní cíl práce byl naplňován v rámci dílčích cílů:

1. Studovat významné faktory ovlivňující reprodukovatelnost testů ekotoxicity nanomateriálů a optimalizovat metodu pro testování akvatické toxicity
2. Pro testování terestrické toxicity optimalizovat přípravu a charakterizaci expozičního média, které potlačuje dynamické procesy a zvyšuje reprodukovatelnost výsledků
3. Otestovat toxicitu nanomateriálu v expozičním médiu se zvýšenou environmentální relevancí – modifikovaném přídávkem modelových půdních složek (kaolin, huminové kyseliny, rašelina) za účelem studia vlivu interakcí s půdními složkami na chování nanočástic v expozičním médiu

ÚVOD

Jako nanomateriály jsou definovány materiály, které mají alespoň jeden rozměr v rozmezí 1–100 nm. Nanomateriály přítomné v životním prostředí pocházejí jak z přírodních (lesní požáry, sopečná činnost, eroze hornin), tak z antropogenních zdrojů. Průmyslově vyráběné nanomateriály (ENMs) našly kvůli svým unikátním vlastnostem uplatnění v řadě oblastí, a to například v medicíně, při úpravách pitných vod, v optice či v elektronice. ENMs v současnosti obsahuje také řada spotřebního zboží, a to zejména kosmetické či zdravotní výrobky¹. Produkce ENMs kontinuálně roste, a proto dochází ke zvýšení emisí různých forem ENMs do životního prostředí, a to během jejich výroby, přepravy, užívání i likvidace. Přímá aplikace ENMs například při sanačních pracích či uvolňování do odpadů z domácností představuje významné riziko přímé či nepřímé expozice pro živé organismy. Půdy a sedimenty pak na rozdíl od atmosféry či vodního prostředí mohou sloužit jako dlouhodobé rezervoáry ENMs^{2,3}.

Právě odlišné vlastnosti nanomateriálů od jiných forem hmoty (rozpuštěné látky, větší částice) vyvolávají obavy z jejich účinků na živé organismy. Nanomateriály odlišně interagují s biotickými i abiotickými složkami životního prostředí a tyto specifické interakce je nezbytné vzít v úvahu při hodnocení environmentálních rizik nanomateriálů. Základními fázemi hodnocení rizik chemických látek jsou identifikace nebezpečnosti, hodnocení expozice, analýza vztahu dávka-účinek a charakterizace rizika. Zatímco toto tradiční paradigma hodnocení rizik samozřejmě platí také pro nanomateriály, mnoho nástrojů, protokolů a pokynů pro stanovení a hodnocení fyzikálně-chemických vlastností, osudu, expozice a účinku používaných pro konvenční chemikálie pro nanomateriály nelze využít a dané nástroje musí být proto modifikovány².

Počet prací zabývajících se toxicitou nanomateriálů sice za posledních několik desítek let exponenciálně vzrostl, ale informace potřebné pro efektivní hodnocení jejich zdravotních a environmentálních rizik jsou stále nedostatečné³. Změny fyzikálně-chemických vlastností ENMs, ke kterým dochází v důsledku jejich interakce se složkami životního prostředí, znesnadňují hodnocení rizika spojeného s přítomností ENMs v životním prostředí. Pro účely regulace nanomateriálů jsou ale informace o objemu produkce ENMs a jejich účinku na živé organismy nezbytně nutné. Nicméně, pro studium osudu nanomateriálů v komplexních přírodních matricích zatím stále nemáme dostatek vhodných metod a nástrojů^{4,5}.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti nanomateriálů

Zatímco toxicita konvenčních chemikálií souvisí zejména s jejich chemickým složením, v případě nanomateriálů hrají roli další fyzikálně-chemické charakteristiky. Velikost a povrchová plocha částic jsou klíčové vlastnosti, které řídí interakce materiálů s biologickými systémy a následně také distribuci částic v organismu a jejich eliminaci. Se snižující se velikostí částic exponenciálně roste povrchová plocha v poměru k objemu částic, což činí povrch nanomateriálů reaktivnější. Bylo zjištěno, že funkce jednotlivých buněčných transportních mechanismů, včetně endocytózy, je závislá na velikosti částic. Částice, které jsou endocytózou transportovány do buňky, zde mohou modifikovat strukturu různých makromolekul, čímž narušují kritické biologické funkce. Jedním z hlavních mechanismů toxicity ENMs je indukce vzniku volných radikálů, které vyvolávají oxidativní stres. Tyto volné radikály mohou poškozovat DNA, způsobovat peroxidaci lipidů buněčné membrány s následným vznikem zánětlivé reakce organismu. Tvar ENMs ovlivňuje membránové procesy při endocytóze či fagocytóze. Endocytóza kulových částic je snazší a rychlejší v porovnání s částicemi ve tvaru trubic nebo vláken. U částic trubicového tvaru také hraje roli délka částice. Bylo pozorováno, že delší částice inertních materiálů jako je uhlík jsou podstatně toxičtější než trubice kratší⁶. Krystalická struktura také ovlivňuje toxicitu ENMs. Příkladem může být hojně využívaný oxid titaničitý. Rutilová forma často indukuje oxidativní poškození DNA, lipidní peroxidaci a vznik mikrojader, zatímco anatasová forma TiO_2 nanočástic o stejné velikosti nikoliv⁷.

Vlastnosti povrchu ENMs, zejména povrchový náboj, předurčují jejich chování. Selektivní adsorpce, vazba plazmatických proteinů na povrch ENMs či trans-membránová permeabilita ENMs jsou regulovány povrchovým nábojem. Pozitivně nabitě částice prostupují skrze buněčné membrány lépe než negativně nabitě či neutrální, a to díky podstatně výraznější opsonizaci (imunologický proces, při kterém jsou na částici navázány proteiny, které usnadňují interakci této částice s fagocytujícími buňkami a zvyšují efektivitu fagocytózy) povrchu plazmatickými proteiny^{8,9}. Povrchová úprava, sloužící ke stabilizaci částic či změně magnetických, elektrických nebo optických vlastností ENMs, současně mění reaktivitu, distribuci, akumulaci a toxicitu ENMs. Bylo například zjištěno, že přítomnost kyslíku, ozonu, kyslíkových radikálů a přechodných kovů na povrchu částic, vedla ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) a k indukci zánětu¹⁰. Na druhé straně, povrchová úprava může vést

i ke snížení toxicity materiálu, a to v případě, kdy znemožňuje uvolňování toxických iontů¹¹. To se týká například i kvantových teček, jejichž hydrofobní jádro je tvořeno toxickými těžkými kovy, jako je například kadmium. Obal pak zajišťuje vyšší chemickou odolnost jádra, brání uvolňování toxických iontů a zvyšuje dispergovatelnost teček ve vodě¹². Také struktura povrchu ENMs spolu s pórovitostí materiálu ovlivňuje interakce s buňkami. Strukturovanější povrch či přítomnost pórů podporuje buněčnou adhezi⁶.

Ve fyziologických tekutinách či v životním prostředí nanočástice často podléhají aglomeraci/agregaci. Zatímco u agregace vznikají shluky částic vázaných kovalentní vazbou, u aglomerace částice drží pohromadě přitažlivými Van der Waalsovými silami. Míra agregace/aglomerace závisí zejména na velikosti částic, povrchovém náboji, ale také na koncentraci ENMs. V testech toxicity je často pozorovaným jevem vyšší míra agregace u více koncentrovaných disperzí. Výsledkem je potom nižší toxicita při vyšších testovaných koncentracích⁶.

1.2 Osud nanomateriálů v životním prostředí

1.2.1 Osud nanomateriálů ve vodách

Naše představy o chování průmyslově vyráběných nanomateriálů ve vodném prostředí vychází ze znalostí o chování přírodních koloidních látek. Ve vodních systémech je koloid termínem používaným pro disperzní soustavu obsahující částice v rozsahu velikostí 1 nm až 1 μm . Přírodní koloidy zahrnují zejména makromolekulární organické materiály, jako jsou huminové kyseliny (HA) a fulvokyseliny (FA), proteiny, peptidy a anorganické látky, typicky oxidy železa a manganu¹³.

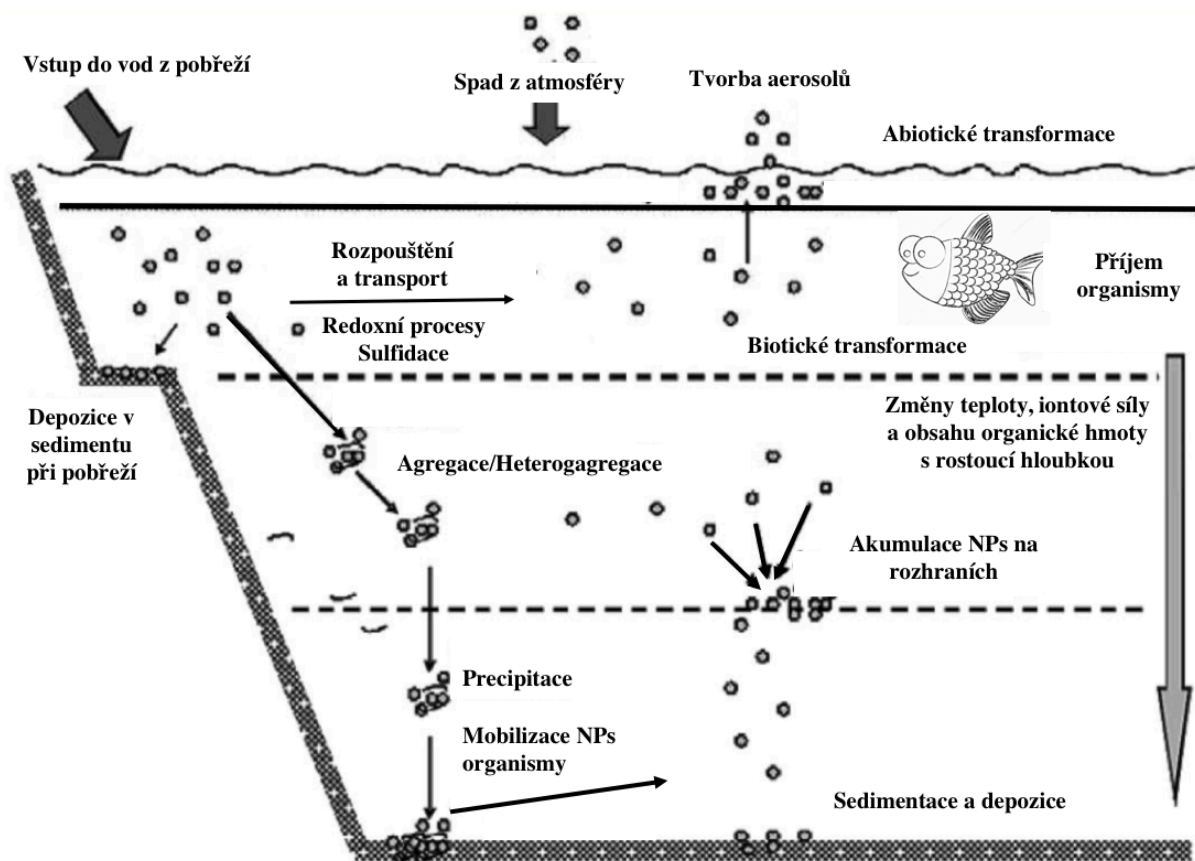
Osud nanočástic ve vodách je ovlivňován transformačními a transportními mechanismy do kterých patří zejména agregace, aglomerace, sedimentace, rozpouštění, adsorpce na povrch přírodních nanomateriálů, redoxní procesy a dále také biodegradace či abiotická degradace¹⁴. Agregace je řízena povrchovým nábojem a velikostí částic, iontovou silou a pH vodního prostředí. Významným parametrem je také tvar částic, který ovlivňuje sterické interakce. Povrchová úprava NPss (surfaktanty, polymery, polyelektrolyty atd.) jejímž cílem je nejčastěji zvýšení stability disperzí NPs, také významně ovlivňuje interakce částic s přírodními koloidy. Předpokládá se, že NPs s funkcionalizovaným povrchem jsou mobilnější. Tato skutečnost je dána silnějšími elektrostatičtými odporem mezi jednotlivými

nanočásticemi a nižší heterogenitou chemického složení povrchu částic. Důležitým procesem, který ovlivňuje osud nanočástic ve vodním prostředí je heteroagregace NPs a přírodních koloidů. Aglomerované či agregované částice mohou být imobilizovány depozicí v sedimentech¹⁵.

Studium interakce NPs s rozpuštěnými organickými látkami je ve většině publikací zaměřeno na vliv HA, méně pak na FA. Interakce nanomateriálů s HA bývá výrazně ovlivněna povrchovým nábojem částic, který závisí na hodnotě pH prostředí¹⁶. V závislosti na vlastnostech a koncentraci HA, byla pozorována schopnost HA koloidní systémy nanočástic stabilizovat i destabilizovat. K destabilizaci často dochází v přítomnosti vyšších koncentrací HA. Nanočástice pokryté vrstvou HA jsou totiž snadněji adsorbovány na povrchu částic přírodních koloidů^{17;18}.

Transport ENMs je obvykle redukován se zvyšující se iontovou silou disperzního prostředí. K tomuto zřejmě dochází v důsledku vyšší intenzity přitažlivých van der Waalových sil a snížení elektrostatické repulze což je v souladu s teorií Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO teorie). Elektrická dvojvrstva okolo NPs je komprimována kvůli vysoké koncentraci iontů, což vede k agregaci. V případě mořské vody je tedy agregace či aglomerace NPs urychlována právě vysokou iontovou silou prostředí¹⁹.

Rozpouštění materiálu je silně ovlivněno hodnotou pH, iontovou silou média, přítomností anorganických a organických sloučenin²⁰. Například ionty uvolňované z povrchu NPs jako jsou nanočástice stříbra, oxidu zinečnatého či oxidů mědi se často velkou měrou podílejí na toxicitě materiálu²¹. Kromě rozpouštění, je jedním z důležitých a dobře popsanych abiotických transformačních procesů sulfidace. Sulfidace závisí na redoxních podmínkách a nejčastěji jsou k sulfidaci náchylné nanočástice stříbra, ZnO, CuO a oxidy železa. Zejména u nanočástic stříbra bylo dobře popsáno, jak sulfidace významně ovlivňuje jejich osud a toxicitu. Sulfidace, ke které dochází nejčastěji v biologickém stupni čištění čistíren odpadních vod (ČOV), snižuje rozpustnost, mobilitu a tím i biologickou dostupnost NPs²². Na druhé straně, v práci Thalmann a kol.²³ bylo prokázáno, že proces ozonizace (používaný v ČOV pro odstranění organických mikropolutantů) vedl k oxidaci sulfidu stříbrného a tím došlo ke zvýšení toxicity stříbra. Zjednodušeně je osud ENMs ve vodách znázorněn na Obrázku 1.



Obrázek 1 Osud ENMs ve vodách¹³

1. 2. 2 Osud nanomateriálů v půdách

Půdy jsou tvořeny půdním vzduchem, pórovou vodou, organickou hmotou a minerály. Fyzikálně-chemické vlastnosti půd závisí na jejich geologickém původu, geografickém terénu a klimatických podmínkách dané oblasti. Půdní matrice významně ovlivňuje chování ENMs. Vlastnosti jako je velikost částic, pórovitost a obsah přírodních organických látek (NOM) ovlivňují míru retence či migrace ENMs v půdách. Složení půdy je zjednodušeně charakterizováno obsahem písku, jílu a organické hmoty^{24;25}. Přírodní nanočástice vyskytující se v půdách zahrnují zejména jíly, organické látky, oxidy železa a další minerály, které hrají důležitou roli v biogeochemických procesech¹³.

Faktory ovlivňující osud nanomateriálů v půdách jsou velmi podobné faktorům, které ovlivňují osud ve vodách, ale predikce chování ENMs je díky vyšší komplexnosti půdní matrice komplikovanější. Interakce mezi ENMs a půdními složkami řídí transport ENMs. Tyto interakce mohou být ovlivněny jak podmínkami prostředí, tak i fyzikálně-chemickými vlastnostmi ENMs. Obecně platí, že faktory, které ovlivňují stabilitu nanomateriálů (iontová

síla a pH), rovněž ovlivňují transport²⁶. Mobilita nanomateriálů je obecně snižována rostoucí velikostí částic. Zatímco menší částice jsou mobilnější a mají větší šanci proniknout do větších hloubek, kde dochází k jejich akumulaci, větší agregáty mají tendenci hromadit se v horních vrstvách půdy^{27;28}.

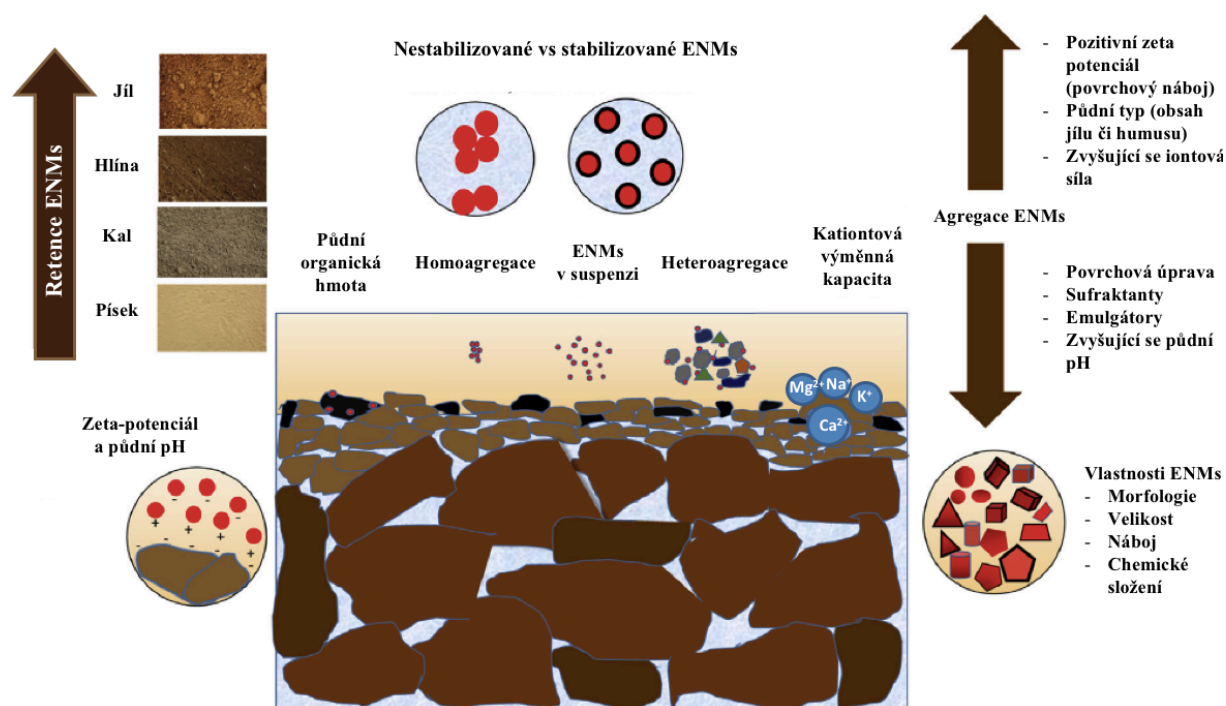
Půdní organickou hmotu lze rozdělit na rozpuštěnou organickou hmotu (DOM) a na pevnou organickou hmotu (SOM). Antropogenními zdroji makromolekul jsou pak organická hnojiva nebo kaly z čistíren odpadních vod²⁹. Výsledný efekt DOM na mobilitu a biodostupnost nanomateriálu závisí na koncentraci a typu DOM, iontové síle a pH pórové vody. DOM často zvyšuje biologickou dostupnost ENMs zvýšením jejich mobility. Například bylo zjištěno, že HA usnadnily transport stříbrných nanočástic (Ag-NPs) hlouběji do půd, čímž se zvyšovalo potenciální riziko kontaminace podzemních vod^{30;31}. Naopak u Ag-NPs, které byly stabilizovány polyvinylpyrrolidonem vedly interakce s přírodními koloidy k heteroagregaci, a tedy k redukci jejich mobility³⁰. Naproti tomu HA měly menší vliv na mobilitu uhlíkových nanotrubic (CNTs) než textura půdy, která často působí jako fyzikální bariéra dalšího transportu ENMs³². Adsorpce OM nejčastěji vede ke vzniku negativního povrchového náboje nanomateriálu, což může vést ke sterické stabilizaci, potlačení heteroagregace a snížení rychlosti depozice^{33;34}.

Stejně jako ve vodách, i v půdách je rozpustnost nanomateriálů ovlivňována vlastnostmi prostředí. Množství OM významně ovlivňuje kationtovou výměnnou kapacitu půdy. Ionty uvolněné z povrchu ENMs v průběhu rozpouštění jsou často vázány půdními částicemi nebo tvoří komplexy s chelatačními činidly, která mohou urychlit rozpouštění nebo transformaci ENMs²⁶.

Jíl, který je v půdách zastoupen v různém množství, také v závislosti na podmínkách prostředí interaguje s ENMs. Například Zhang a kol.³⁵ uvádí, že pozitivně nabitě nanočástice CeO₂ se vázaly na jílový minerál kaolin, zatímco negativně nabitě nanočástice se vázaly na částice písku. U nanočástic TiO₂ byla pozorována destabilizace illitovými koloidy (jílová slída) pouze v systému, kde pH bylo nižší než pH izoelektrického bodu TiO₂³⁶. Adrian a kol.³⁷ zjistili, že vyšší obsah Ca²⁺ iontů podpořil interakci stříbrných nanočástic s jílem.

ENMs mají obecně tendenci mít relativně lepší retenci (nižší mobilitu) v hlinitých půdách v porovnání s písčitymi půdami (viz Obrázek 2). K výše uvedenému zjevně dochází z důvodu vyššího specifického povrchu a vyššího počtu vazebných míst půdních minerálů typu kaolin atp.^{38;39;40;41}. Nedávné studie ukázaly, že povrchový náboj matrice a zrnitost půdy hrají

významnou roli v transportu ENMs. Tyto faktory zřejmě spolu s pH systému a zeta potenciálem ENMs ovlivňují, zda dojde k depozici či transportu ENMs. Relativně vysoké pH vede nejčastěji ke zvýšení mobility ENMs, protože povrchy ENMs jsou obecně spíše záporně nabitě^{42;43}.



Obrázek 2 Osud ENMs v půdách⁴⁴

Chemismus pórové vody je dalším významným faktorem ovlivňujícím osud ENMs. Vliv pH, iontové síly a valence iontů je studován zejména v kolonových experimentech, při kterých jsou simulovány přirozené procesy transportu ENMs v půdách⁴⁴. Hodnota pH ovlivňuje zeta potenciál a tím stabilitu koloidů ENMs. K destabilizaci dochází v okamžiku, kdy je při určité hodnotě pH dosaženo bodu nulového náboje (pH_{pzc}) či izoelektrického bodu. Povrch ENMs je negativně nabitý, když je pH vody nad pH_{pzc} . Hodnota zeta potenciálu se snižuje se zvyšujícím se pH. Nižší absolutní hodnota zeta potenciálu vede k agregaci ENMs, zatímco vyšší hodnota podporuje stabilitu suspenze²⁴.

Obdobně jako ve vodním prostředí i v půdách je transport ENMs obvykle redukován zvyšující se iontovou silou. Například v experimentu provedeném v koloně naplněné pískem se depozice nanočástic fullerenu C_{60} zvyšovala se zvyšující se iontovou silou pórové vody. Příčinou daného jevu bylo pravděpodobně zvýšení přitažlivých sil v blízkosti povrchu zrn

písku a potlačení elektrické dvojvrstvy⁴⁵. V jiných studiích bylo pozorováno, že přítomnost bivalentního kationtu (Ca^{2+}) způsobila efektivnější retenci ENMs v matrici v porovnání s monovalentními ionty (Na^+/K^+)^{46;47}. Iontová síla současně ovlivňuje i zeta potenciál. Při nižší iontové síle se zeta potenciál zvyšuje a naopak⁴⁴.

Mezi další faktory, které mají vliv na osud ENMs patří půdní vlhkost, teplota a viditelné/UV záření. Půda blízko povrchu představuje nenasycenou zónu (vyznačuje se jen částečnou nasyceností všech pórů vodou, v závislosti na množství srážek apod.) a ve větších hloubkách v blízkosti vodonosné vrstvy se stává nasycenou (póry v nasycené zóně jsou zcela vyplněny vodou)⁴⁸. Conway a Keller⁴⁹ studovali osud nanočástic TiO_2 , CeO_2 a $\text{Cu}(\text{OH})_2$ v různých typech půd za nenasycených podmínek. Pozorovali, že po aplikaci nanočástic na povrch půdy s následným vysušením a působením pouhé gravitace se nanočástice nacházely po více než 72 hodinách nejdále v horních třech centimetrech půdy, což je přičítáno agregaci ENMs spolu s heteroagregací ENMs s OM. V případě studia vlivu proudění pórové vody na retenci ENMs byla pozorována vyšší retence nanočástic oxidu grafenu v nesaturovaných kolonách s pískem v porovnání se saturovanými za stejné iontové síly⁵⁰. V jiné studii redukce půdní vlhkosti podpořila retenci jedностěnných uhlíkových nanotrubic (SWCNTs) v porézním médiu⁵¹. Obecně jsou ENMs více mobilní při vyšším proudění pórové vody, avšak ve studii s nanočásticemi fullerenu C_{60} byl pozorován pouze malý vliv na jejich transport při změně rychlosti proudění⁵².

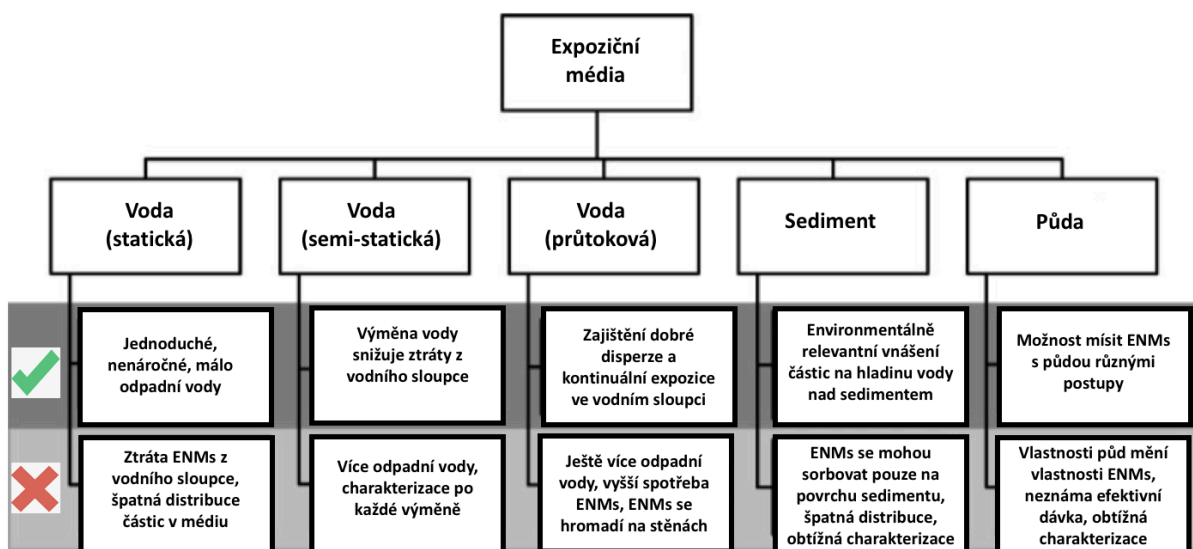
Teplota ovlivňuje chemismus půdy. Obecně lze předpokládat, že při zvýšení teploty v rozmezí 4–25 °C lze očekávat snížení transportu ENMs v půdách. Například retence latexových NPs v kolonách naplněných pískem (iontová síla 10–30 mM) se zvyšovala se zvyšující se teplotou⁵³. V obdobné studii bylo pozorováno také snížení retence nanočástic oxidu grafenu v kolonách (iontová síla 1–10 mM) naplněných pískem a půdou⁵⁴. McNew a LeBoeuf⁵⁵ pozorovali při nižších teplotách nízkou retenci fullerenu na imobilizovaných huminových a fulvinových kyselinách. Při vyšších teplotách docházelo ke zvýšení retence fulerenů, ale pouze na huminových kyselinách.

Interakce ENMs s viditelným a UV zářením může vést ke změnám fyzikálně-chemických vlastností ENMs. Provedené studie naznačují, že degradace povrchu ENMs působením záření může časem vést k transformacím materiálu a vyšší míře agregace. Navíc ROS produkované při expozici UV záření mohou způsobit oxidaci materiálů vedoucí k uvolňování toxických iontů^{56;57}.

V souvislosti se změnami, které ENMs po vstupu do životního prostředí prodělávají, jsou v současnosti předmětem zkoumání také účinky nanočástic, které prošly již nějakou změnou fyzikálně-chemických vlastností vlivem působení okolního prostředí tzv. „weathering“. Například bylo zjištěno, že OM mohou na povrchu kovových ENMs časem vytvořit obal, který brání dalším chemickým či biochemickým interakcím^{58:59}. Kyselina šťavelová, octová nebo citronová jsou důležitou součástí exsudátů kořenového systému rostlin a podílejí se tak na weatheringu materiálů v půdách. Tyto kyseliny ovlivňují lokálně pH, což má vliv na povrchový náboj a v důsledku toho i na agregaci⁶⁰. V laboratorní studii byly organické kyseliny v exsudátech rostlinných kořenů schopny rozpouštět nanočástice mědi, sorbovat se na jejich povrch nebo s nimi tvořit cheláty⁶¹.

1.3 Přístupy při testování ekotoxicity nanomateriálů

Jak bylo v předchozích kapitolách naznačeno, znalost transformačních procesů, jimž podléhají ENMs v reálném prostředí tvoří důležitou součást studia toxicity ENMs. Opakovaně bylo prokázáno, že osud ENMs je silně závislý na fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí. I přes množství provedených studií stále není dostatek informací o tom, jaký vliv má osud konkrétních nanočástic na jejich výslednou nebezpečnost pro vodní a půdní organismy. Při porovnání výsledků dostupných studií nalézáme velkou řadu rozporů a protichůdných informací, které neumožňují určit jasný vztah mezi fyzikálně-chemickými vlastnostmi ENMs, vlastnostmi daného prostředí a toxicitou nanomateriálů. Příčinami jsou zejména různý experimentální design studií, rozdíly ve složení expozičních médií a nedostatky v charakterizaci testovaného nanomateriálu. Testování ekotoxicity nanomateriálů s využitím metod navržených pro konvenční chemikálie přináší řadu komplikací (viz Obrázek 3), které jsou často důvodem pro vznik různých modifikací testování. Jako kritický faktor, ovlivňující reprodukovatelnost a vypovídací schopnost testů toxicity nanomateriálů, se ukázala aglomerace ENMs^{15:62}.



Obrázek 3 Výhody a nevýhody spojené s využitím metod pro konvenční chemikálie při testování ekotoxicity nanomateriálů⁶²

V roce 2006 byla zřízena pracovní skupina Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj pro průmyslově vyráběné nanomateriály (OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials), která poskytuje prostor pro globální diskusi o nanobezpečnosti. Program má zajistit rozvoj a odpovídající aktualizaci OECD metodik pro testování ENMs prostřednictvím konsenzu, který vychází jak z poznatků získaných vědeckou komunitou, tak z regulačních požadavků (relevance testu, reprodukovatelnost atd.)^{22:63}. Diskuze, týkající se modifikací OECD metodik pro testování ekotoxicity ENMs, zahrnuje všechny aspekty testování, od designu experimentu až po sledované end-pointy testu toxicity.

Otázky se týkají zejména vhodnosti expozičních scénářů, například zda měnit testovací médium během testu za účelem zajištění kontinuální expozice a současně splnění nároků testovacího organismu či nikoliv. Většina experimentů s ENMs byla doposud prováděna buď v režimu statickém nebo semistatickém, ve kterém je médium v průběhu experimentu pravidelně vyměňováno. Nicméně, u testů terestrické toxicity je výměna média velice nepraktická až nežádoucí. Při pokusu o přenos organismů z půdy by mohlo dojít k jejich poškození či indukci stresové odpovědi na jejich manipulaci. Také doba trvání testů byla diskutována. U testů chronické toxicity, které mohou v případě půdních organismů trvat i několik týdnů, může dojít například k úplnému rozpuštění testovaného materiálu, což ale nemusí odpovídat reálnému osudu ENMs v životním prostředí. V některých studiích tak byla expoziční doba zkrácena⁶².

Dalším problematickým aspektem je příprava testovaného materiálu před jeho aplikací do expozičního média. ENMs je zapotřebí dobře a reprodukovatelně dispergovat a za tímto účelem je používáno několik přístupů, založených na využití dispergačních činidel, sonikace, mechanické dispergace či jejich kombinace. V souvislosti s tím lze také předpokládat, že během testu může existovat rozdíl mezi nominální (do média přidanou) a efektivní (na organismus skutečně působící) koncentrací. Právě homogenita rozptýlení a aglomerace mohou ovlivnit expozici do takové míry, že nelze odhadnout, jaké koncentraci byl testovací organismus reálně vystaven. Na druhé straně existují práce, kde je preferována environmentálně relevantní expozice, při níž je procesu aglomerace ENMs ponechán přirozený průběh⁶⁴. Proto je zapotřebí využít vhodných metod ke zjištění reálného stavu testovaného materiálu v komplexních maticích během testu a po něm. Nicméně, situaci komplikují nedostatečná citlivost dostupných analytických metod, často velmi komplikovaná příprava vzorků, či nedostupnost nejmodernějších metod kvůli vysokým pořizovacím nákladům⁶².

Co se týká end-pointů testů, mortalita, růst a reprodukce jsou považovány za vhodné, nicméně často za málo citlivé, zejména pokud jsou testovány environmentálně relevantní koncentrace ENMs. Ve výzkumu jsou často využívány další subletální fyziologické end-pointy, například biochemické, molekulární a omické odezvy organismů^{62;63}.

Expoziční média používaná v rámci testů terestrické toxicity nanomateriálů bychom mohli rozdělit na uměle vytvořené půdy, jejichž složení vychází ze směrnic (OECD, ISO, ASTM atd.), přírodní půdy a ostatní půdy, do nichž můžeme zahrnout zjednodušené matrice. Uměle vytvořené půdy byly zavedeny v ekotoxikologii z pragmatických a ekonomických důvodů. Složení půdy je jasně definováno a výsledky testů prováděných v této půdě by měly být mezi sebou porovnatelné. Přesto složení a vlastnosti této půdy nejsou vhodné pro většinu testovacích organismů^{65;66}. Přírodní standardní půda LUFA je široce využívána pro testy s bezobratlými, jelikož vyhovuje většině testovacích organismů. Tato půda je komerčně dostupná a je k dispozici v několika variantách, v závislosti na požadovaných fyzikálně-chemických vlastnostech půdy⁶⁵. Typické složení OECD a LUFA 2.2 půd jsou uvedeny v Tabulce 1. Využití přírodní půdy LUFA v testech ekotoxicity nanomateriálů často vede k pozorování až řádově vyšší toxicity těchto materiálů, než je tomu v případě použití uměle vytvořené půdy, jelikož její vlastnosti podporují biodostupnost kovů^{67;68}.

Tabulka 1 Složení artificiální půdy OECD a přírodní půdy LUFA 2.2

Půda	pH	Obsah organických látek (%)	C/N	Jíl (%)	Jemnozrný písek (%)	Písek (%)
OECD	6.3	10	107.5	20	0	70
LUFA 2.2	5.5	3.9	13.5	6	17	77

C/N - poměr uhlíku a dusíku

V publikovaných studiích můžeme dále nalézt testy prováděné v přírodních půdách odebraných z lokalit v zemích, kde autoři působí. Fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti těchto půd (včetně obsahu těžkých kovů či polycyklických aromatických uhlovodíků) však musí být řádně charakterizovány před jejich použitím^{69;70;71}.

Testy v půdních matricích sice splňují požadavek vyšší environmentální relevance, nicméně často neumožňují splnit další požadavky, které jsou na laboratorní testy kladeny, například již zmiňovanou reprodukovatelnost (využití artificiální vs. přírodní půdy), homogenitu rozptýlení testovaného materiálu či možnost charakterizovat ENMs přímo v expozičním médiu. Několikrát bylo potvrzeno, že způsob zavedení testovaných částic do expozičního média ovlivňuje výslednou formu částic, zejména aglomerační stav. Aglomerace částic a nehomogenní distribuce pak často vede k pozorování nemotónního vztahu dávka-účinek. Nejčastěji jsou ENMs aplikovány ve formě prášku, který se smísí přímo s půdou, nebo jsou ENMs přidávány ve formě koloidu či je připravena zásobní disperze v půdním výluhu a ten je pak přidán do půdy⁷². V případě jednoho materiálu zavedeného do expozičního média různými postupy pak můžeme očekávat odlišný aglomerační stav ENMs a v souvislosti s tím pozorovat odlišnou odezvu testovacího organismu. I během samotného testu dochází k dalším změnám vlastností ENMs při jejich interakci se složkami média (rozpouštění, heteroagregace atd.). Z tohoto důvodu je pro správnou interpretaci pozorovaného účinku nezbytné zjištění reálného stavu ENMs v expozičním médiu. Ve většině studií jsou ale částice charakterizovány pouze před jejich přidáním do půdy. Charakterizace ENMs v půdní matrici však často vyžaduje řadu přípravných a extrakčních kroků, které mohou opět vést k dalším změnám fyzikálně-chemických vlastností materiálu⁷³.

Tyto problematické aspekty spojené s testy v půdní matrici vedly autoři několika studií k volbě méně komplexního média. Li a kol.⁷⁴ ve své studii akutní toxicity nanočástic oxidu zinečnatého (ZnO-NPs) na žížale hnojní (*Eisenia fetida*) zvolili jako expoziční médium agar. Za účelem získání environmentálně relevantnějších informací také provedli experiment na filtračním papíře, na který byly nanočástice aplikovány ve formě disperze připravené v půdním extraktu. Autoři konstatovali, že tento přístup zjednodušení expozičního média jim umožnil sledovat efekt ZnO-NPs na půdního kroužkovce bez vlivu půdních složek. Jako další výhody využití agaru autoři uvedli potlačení aglomerace a také možnost jednoduché charakterizace systému. V prostředí agaru je organismus exponován skrze obvyklé expoziční cesty, jelikož kromě přímého kontaktu povrchu těla, žížaly agar během testu pojídají.

Agarové médium je často využíváno v testech ekotoxicity nanomateriálů pro rostliny. V tomto případě autoři uvádí, že využití agaru při testování nerozpustných nanomateriálů, které mají tendenci v hydroponických roztocích či na filtračním papíře rychle aglomerovat, přináší opět výhodu ve formě homogennější distribuce částic a potlačení aglomerace. V agaru byla zjišťována například toxicita nanočástic oxidu ceričitého na hlávkovém salátu (*Lactuca sativa*)⁷⁵ či toxicita stříbrných nanočástic na fazolích mungo (*Phaseolus radiatus*) a čiroku dvoubarevném (*Sorghum bicolor*)⁷⁶.

Existují také studie, v nichž autoři pracují s médii, která obsahují jen určité složky půdy. Například toxicita nanočástic stříbra pro žížaly červené (*Lumbricus rubellus*) byla studována v prostředí obsahujícím pouze písek a půdní extrakt⁷⁷ a v jiné práci byla toxicita ZnO-NPs a TiO₂-NPs pro žížaly hnojní (*Eisenia fetida*) studována v písčitém médiu⁷⁸, které bylo tvořeno pískem a kravským hnojem.

Takové zjednodušení půdní matrice ve většině případů vyvolá až řádově vyšší toxicitu oproti experimentům, kde je použita půda. Tento jev může být důsledkem zejména vyšší biodostupnosti ENMs v méně komplexních médiích. Obecně lze říct, že čím více složek se v daném systému nachází, tím vyšší je pravděpodobnost vzniku interakcí, které mohou vést ke snížení biodostupnosti materiálu v důsledku agregace, heterogagregace, adsorpce, komplexace uvolněných iontů atp. V půdních matricích často dochází k agregaci zejména u vyšších testovaných koncentrací a v případě organismů, u nichž se projevuje únikové chování, a současně není testovaná látka homogenně rozptýlena v celém objemu expozičního média, může během testu v půdách dojít i k podhodnocení expozice.

2 PRAKTICKÁ ČÁST

Hlavním cílem předložené disertační práce bylo navrhnout a vyvinout metody testování toxicity nanomateriálů, které eliminují či zredukuje v co nejvyšší možné míře vliv faktorů ovlivňujících reprodukovatelnost testů. Tento cíl byl naplňován v rámci tří dílčích cílů: (i) studovat významné faktory ovlivňující reprodukovatelnost testů ekotoxicity nanomateriálů a optimalizovat metodu pro testování akvatické toxicity, (ii) pro testování terestrické toxicity optimalizovat přípravu a charakterizaci expozičního média, které potlačuje dynamické procesy a zvyšuje reprodukovatelnost výsledků a (iii) otestovat toxicitu nanomateriálu v expozičním médiu se zvýšenou environmentální relevancí – modifikovaném přídatkem modelových půdních složek (kaolin, huminové kyseliny, rašelina) za účelem studia vlivu interakcí s půdními složkami na chování nanočástic v expozičním médiu.

2.1 Plnění dílčího cíle 1 – Optimalizace metody testování akvatické toxicity NPs

Plnění prvního dílčího cíle práce spočívalo ve studiu významných faktorů ovlivňujících reprodukovatelnost testů ekotoxicity nanomateriálů, a to zejména ve studiu aglomeračního chování NPs. Získané znalosti pak měly být využity pro úpravu metody testování toxicity NPs ve vodném prostředí za účelem potlačení vlivu aglomerace na výsledky testů.

2.1.1 Experimentální část – Modifikovaný test toxicity Ag-NPs na plůdku kapra obecného

Reprodukovatelnost a spolehlivost testů ekotoxicity nanomateriálů závisí v první řadě na přípravě stabilní disperze ENMs a výsledné variabilitě velikosti ENMs ve vodných suspenzích. Několik mezinárodních projektů navrhlo specifické disperzní protokoly pro testování ekotoxicity (např. ENPRA, PROSPECt, NANOGENOTOX; MARINA), ale obecné pokyny doposud nebyly harmonizovány⁷⁹. Podle Hartmanna a kol.⁸⁰ obecným problémem takové harmonizace je, že harmonizace a standardizované protokoly budou vždy kompromisem mezi optimální disperzí na jedné straně a optimální biologickou/fyziologickou kompatibilitou média a požadovanou testovanou koncentrací v disperzi na straně druhé.

Kvůli výše uvedeným skutečnostem je tato část práce zaměřena na vývoj a testování přístupu, kde je maximální velikost aglomerátů, jimž je testovaný akvatický organismus během testu vystaven, řízena koncentračně závislou proměnlivou frekvencí výměny média během testu. V této práci byl použit matematický model, popisující závislost velikosti aglomerátů na čase v kapalném médiu daných vlastností (koncentrace částic, iontová síla média). Pomocí tohoto modelu byla navržena frekvence výměny média tak, aby byl experimentální organismus vystaven vždy pouze aglomerátům, jejichž velikost nepřesahovala zvolenou hraniční hodnotu. Tento přístup byl ověřen v modifikovaném testu toxicity nanočástic stříbra na plůdku kapra obecného (*Cyprinus carpio*). K volbě nanočástic stříbra vedly předpoklady, že patří mezi nejvíce užívané nanomateriály a lze je snadno připravit v laboratorních podmínkách. Karp obecný byl zvolen proto, že v odvětví rybolovu představuje sladkovodní rybu vysokého obchodního významu v Evropě i v Asii. V rámci studie byla modifikována metoda pro testování toxicity chemických látek pro rybí embrya OECD 212.

2. 1. 1. 1 Příprava a charakterizace Ag-NPs

Ag-NPs byly připraveny redukcí dusičnanu stříbrného (AgNO_3) glukózou ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Příprava proběhla v Erlenmayerově baňce, ve které bylo smícháno 10 ml destilované vody, 10 ml roztoku 5mM AgNO_3 , 10 ml 25mM amoniaku, 10 ml 50mM NaOH a 10 ml 50mM glukózy. Směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 15 minut a poté byla převedena do tmavé nádoby, ve které byl zásobní roztok Ag-NPs skladován.

Ověření skutečné koncentrace Ag proběhlo pomocí metody ICP-OES. Současně byla tato metoda využita na analýzu volných Ag^+ iontů v koloidech. Koloidy Ag-NPs o koncentraci 5-250 μM byly ponechány po dobu 30 min a 6 h aglomerovat a následně bylo odebráno vždy 15 ml z každého koloidu. Odebrané vzorky byly centrifugovány při 10 000 x g po dobu 30 minut a poté bylo 10 ml supernatantu odebráno z každé centrifugační baňky a analyzováno na obsah Ag pomocí ICP-OES (IntegraXL2, GBC, Dandenong, Austrálie).

Hydrodynamický průměr D_H a zeta potenciál Ag-NPs byly měřeny pomocí metody DLS na přístroji ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corp., USA). Měření probíhalo za vlnové délky 660 nm, světelného výkonu 35 mW a D_H byl měřen po dobu 30 s (10 replik). Metoda mikroskopie atomárních sil (AFM) byla využita k vizualizaci syntetizovaných Ag-NPs. Analýza proběhla na zařízení SolverProM (NT-MDT, Rusko) se sondou HA_NC (rezonanční frekvence 185 kHz, $k = 4,6 \text{ N m}^{-1}$) v semikontaktním módu nastaveném na 40 % volné

oscialace. Vzorky k analýze byly připraveny pomocí metody „spin coating“ (90 x g) na vysoce uspořádaném pyrolytickém grafitu (HOPG) a poté sušeny za vakua. Současně byla k charakterizaci Ag-NPs využita metoda skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Vzorky k analýze byly připraveny stejným postupem jako v případě AFM, ale navíc byly pro potřeby SEM potaženy tenkou vrstvou zlata. Analýza proběhla na přístroji JEOL JSM-7500F.

2. 1. 1. 2 Expoziční médium a testovací organismus

Kapalné médium M203 připravené podle metodiky OECD 203 bylo zvoleno jako testovací médium pro testy toxicity na embryích kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Složení tohoto živného média, včetně koncentrací jednotlivých složek je uvedeno na Obrázku 4.

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

Obrázek 4 Složení média M203

Vysoká iontová síla média M203 však ovlivňovala stabilitu Ag-NPs a zvyšovala jejich aglomeraci. Proto bylo přistoupeno k ředění média M203. Experimentálně bylo zjištěno, že maximální možné zředění média 203, které ještě nezpůsobovalo změny ve zdravém vývoji embryí, bylo 75 %. Toto ředění bylo proto použito i v testech toxicity.

Jikry *C. carpio* byly získány z komerčního rybářství (Třeboň, Česká republika). Jikry byly převezeny do laboratoře bezprostředně po oplodnění, poté opláchnuty a vyšetřeny

pod mikroskopem (XTL-101, GX, Optical, UK). Mrtvé nebo neoplodněné jikry byly odstraněny.

2. 1. 1. 3 Testy toxicity Ag-NPs

Experimentální design vycházel z metodiky OECD 212 (Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages). Experiment I trval 144 hodin, přičemž každý ze 6 dnů experimentu probíhala 6-ti hodnová expozice Ag-NPs, která byla střídána 18 h periodou, ve které byla embrya převedena do čistého média bez Ag-NPs. Testované koncentrace byly 5, 10, 25, 50, 100 a 250 μM Ag. Pro testy byla použita 1 den stará, zdravá, oplodněná embrya. Do každé testovací nádoby (skleněné kádinky) bylo převedeno 10 embryí. Experiment I byl proveden ve statickém módu (6h expozice + 18h v médiu bez NPs). Při tomto experimentu došlo ke vzniku velkých aglomerátů a sedimentaci ve všech testovaných koncentracích. Experiment II byl proveden v semistatickém módu, umožňujícím řídit maximální velikost aglomerátů působících na testovaný organismus. Čas výměny kapalného média závisel na zvolené maximální velikosti aglomerátů v jednotlivých testovaných koncentracích. Perioda výměny byla určena následovně.

Nejprve byla zjišťována míra aglomerace Ag-NPs pomocí DLS v daném koloidu během doby před dosažením ustáleného stavu. Získaná data byla použita k nalezení rychlostní konstanty k v rovnici 1, která popisuje růst aglomerátů (zvýšení D_H) v čase:

$$D_H^t = D_H^{inf} + (D_H^0 - D_H^{inf}) \times e^{-kt} \quad (1)$$

Kde D_H^0 je hydrodynamický průměr částic koloidu bezprostředně po přípravě (zředění primárního koloidu Ag-NPs zředěným médiem 203). D_H^{inf} je hydrodynamický průměr při ustáleném stavu a t je čas. Rychlostní konstanta k silně závisí na počáteční koncentraci Ag-NPs, a proto musí být stanovena pro každou testovanou koncentraci zvlášť. D_H^t představuje průměrný hydrodynamický průměr v čase t . Tedy, pokud je dosazena požadovaná hodnota tohoto parametru, lze pomocí rovnice (1) vypočítat čas, kdy bude této velikosti dosaženo. Jinými slovy, pokud je médium vyměněno v čase t , velikost aglomerátů teoreticky nepřesahuje zvolenou hodnotu D_H^t vypočtenou pomocí rovnice (1).

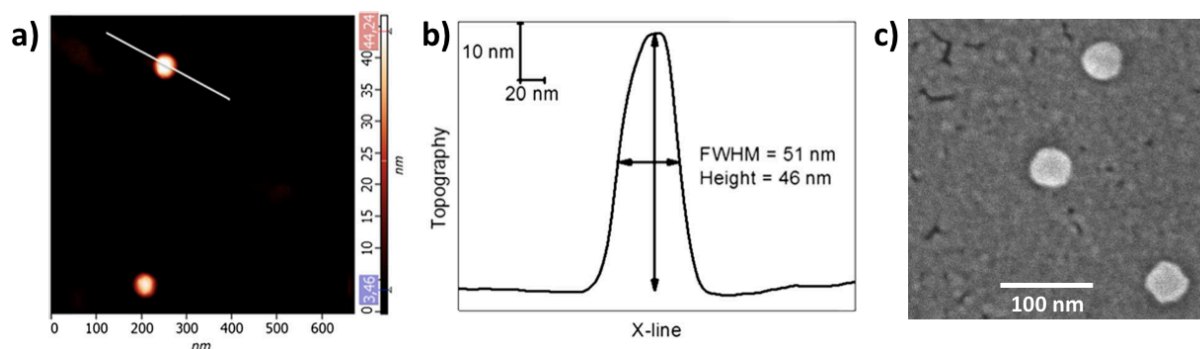
Podmínky a doba trvání experimentu II byly stejné jako v případě experimentu I. V experimentu II byly testovány koncentrace 5–50 μM Ag a zvoleny byly dvě maximální velikosti aglomerátů a to 200 a 400 nm (čas výměny média se pohyboval v rozmezí

20–120 minut v závislosti na testované koncentraci a zvolené maximální velikosti aglomerátů).

2. 1. 2 Výsledková část – Modifikovaný test toxicity Ag-NPs na plůdku kapra obecného

2. 1. 2. 1 Charakterizace Ag-NPs

Koncentrace volných Ag^+ iontů v koloidech Ag-NPs o koncentracích 5–250 μM byla měřena pomocí ICP-OES. Koncentrace změřená v supernatantu byla ve všech případech pod detekčním limitem přístroje (0,1 μM Ag). Jelikož médium M203 obsahuje vysoké koncentrace chloridů, předpokládá se, že rozpuštěné Ag^+ ionty vytvořily s chloridy prakticky nerozpustné AgCl, které zůstaly v patroně na dně centrifugační baňky spolu s Ag-NPs. Analýza pomocí AFM a SEM ukázala (viz Obrázek 5), že připravené Ag-NPs měly průměrnou velikost okolo 50 nm.



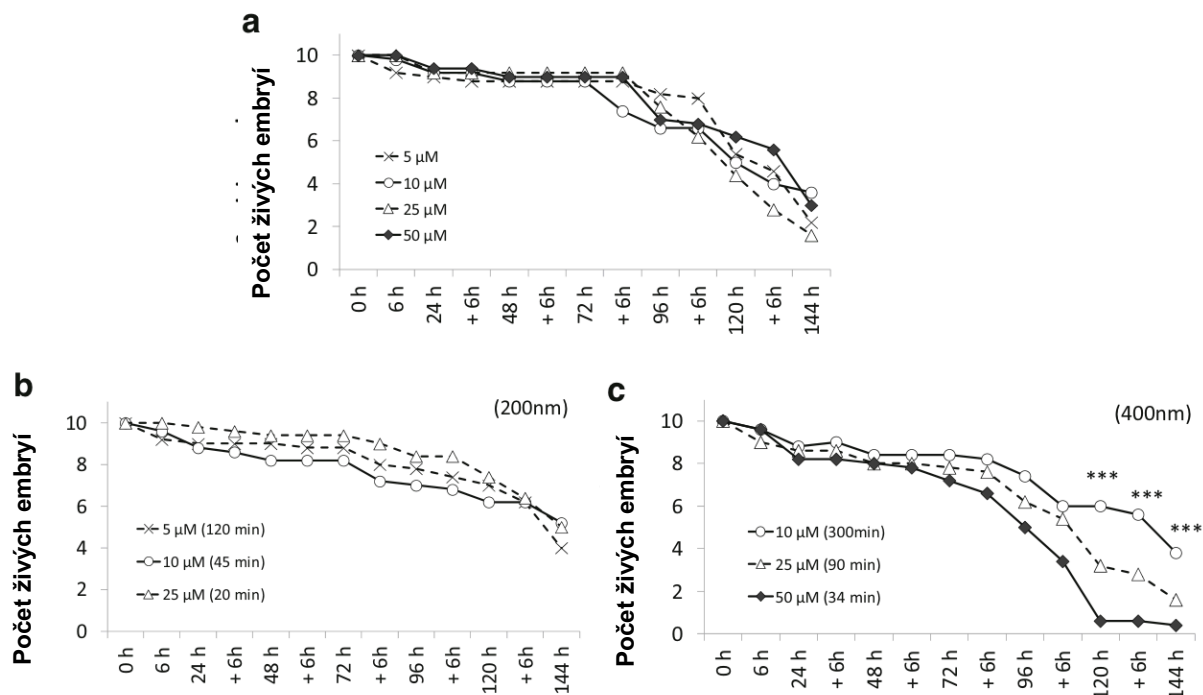
Obrázek 5 a) AFM snímek Ag-NPs, b) AFM profil částice, c) snímek Ag-NPs pořízený pomocí SEM

2. 1. 2. 2 Test toxicity Ag-NPs

Analýza expozičního média pomocí DLS během experimentu I (po 6h expozici) odhalila tvorbu aglomerátů. Čím vyšší byla testovaná koncentrace, tím nižší byl výskyt částic o původní velikosti 50 nm a vyšší výskyt aglomerátů o průměrné velikosti 400 nm a více. Výsledky jasně ukázaly vznik částic, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti jsou naprosto odlišné od částic původního koloidu. Aglomeráty během experimentu rychle sedimentovaly

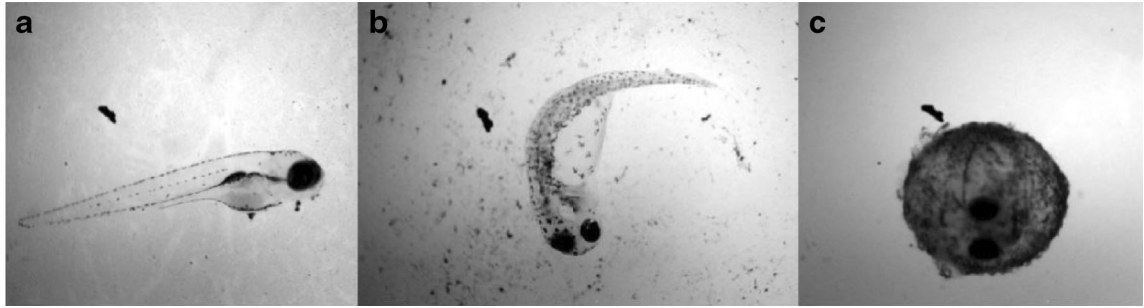
na dno testovacích nádob. Za pomoci metody uvedené výše byly vypočteny časy výměny expozičního média, což umožnilo kontrolovat formaci aglomerátů v experimentu II.

V experimentu I byla pozorována 60–90% mortalita embryí ve všech testovaných koncentracích. Mezi mortalitami v jednotlivých koncentračních úrovních nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly (Mann-Whitney test, $p > 0,05$) a nebyl pozorován žádný zjevný vztah dávka-účinek (Obrázek 6a). Experiment II poskytl jinak strukturované výsledky. U experimentu s maximální velikostí aglomerátů 200 nm (Obrázek 6b) byly získány obdobné výsledky jako v případě experimentu I, avšak s mírně nižší mortalitou embryí (30–50 %). Naproti tomu, v experimentu s maximální velikostí aglomerátů 400 nm již byl pozorován vztah dávka účinek (statisticky významné rozdíly mezi třemi testovanými koncentracemi, Mann-Whitney test $p < 0,05$, Obrázek 6c). Nejvyšší testovaná koncentrace (50 μM Ag) vedla k 90–100% mortalitě (poprvé pozorováno po 120 h experimentu). Vyšší toxicita pro embrya a plůdky byla způsobena vyššími koncentracemi aglomerátů Ag-NPs ve vodním sloupci v porovnání s experimentem I. Kontinuální přítomnost aglomerátů (zajištěná periodickou výměnou média) byla pro embrya a plůdky nejtoxičtější, zatímco stejná koncentrace (50 μM) Ag-NPs bez výměny média vedla k rychlé sedimentaci aglomerátů na dno testovacích nádob a nižší toxicitě (porovnání efektu při koncentraci 25 a 50 μM Ag-NPs na Obrázku 6a, c). Nižší mortalita *C. carpio* po 144 h v experimentu s maximální velikostí aglomerátů 200 nm, byla zřejmě výsledkem nižší míry sedimentace aglomerátů na embrya, než tomu bylo v případě aglomerátů s maximální velikostí 400 nm. Sorpce aglomerátů na chorionu embryí mohla dramaticky zvýšit koncentraci stříbra na biologickém povrchu a vést k mechanickému i chemickému narušení biologických funkcí. Částice primárního koloidu (množství těchto částic naopak vyšší v experimentu s maximální velikostí aglomerátů 200 nm) rozptýlené ve vodním sloupci, pak ovlivňovaly zejména plůdek po vykolení embryí (přibližně 3 den expozice).



Obrázek 6 Přežití embryí: a) experiment 1, b) experiment 2 s maximální velikostí aglomerátů 200 nm c) experiment 2 s maximální velikostí aglomerátů 400 nm. * Statisticky významné rozdíly mezi testovanými koncentracemi 10 vs. 25 vs. 50 μM Ag (Mann-Whitney test, $p < 0,05$)**

Specifický účinek částic různých velikostí byl zjištěn i při analýze mikroskopických snímků jednotlivých embryí a plůdků. Obrázek 7 ukazuje kromě vývojových vad (b) také zjevnou sorpci větších aglomerátů stříbra na chorionu embryí (c). V práci autorů Chen a kol.⁸¹ byla zjištěna významně vyšší bioakumulace železa v rybách (Medaka japonská) vystavených aglomerovaným částicím Fe_3O_4 . Naopak nižší bioakumulace železa byla zaznamenána u ryb vystavených stabilnímu koloidu elementárního železa. Podobně, v další práci bylo zjištěno, že embrya *Danio rerio* vystavená aglomerátům nanočástic oxidu železa vykazovala vyšší mortalitu a vyšší míru výskytu morfologických malformací v porovnání se stabilizovanými částicemi⁸².



Obrázek 7 Příklad vlivu Ag-NPs na vývoj embryí kapra po 144hodinovém experimentu. a) plůdek z kontrolní skupiny, b) plůdek se zjevným zakřivením páteře a perikardiálním edémem ($5\mu\text{M}$ Ag, 200 nm), c) embryo s chorionem obaleným aglomeráty Ag-NPs ($25\mu\text{M}$ Ag, 400 nm)

Uvedená data demonstrují, jak aglomerace ovlivňuje výsledky testů ekotoxicity prováděných v akvatickém médiu. Podmínky testu (statický, semistatický), chemismus kapalných médií, zejména koncentrace a valence přítomných iontů, ale i samotná koncentrace testovaných částic ovlivňují rychlost a míru aglomerace. Jednotlivé velikostní frakce mají odlišné vlastnosti a odlišné účinky na testovací organismus. Charakterizace aglomeračního stavu NPs v kapalných médiích je nezbytná při interpretaci výsledků, jelikož je patrné, že ke změnám dochází již při přidavku částic do média a již po velmi krátké době může dojít k úplnému odstranění NPs z vodního sloupce sedimentací vzniklých aglomerátů. Význam monitorování aglomerace během experimentů byl opakovaně zdůrazňován i v jiných studiích. Například ve studii Auffan a kol.⁸³, ve které byla testována toxicita nanočástic CeO_2 pro *Daphnia pulex*, autoři zjistili, že skutečná doba expozice ve vodě byla pouhé 2 hodiny, jelikož NPs byly odstraněny z vodního sloupce rychlou aglomerací a sedimentací. Aglomerace nanočástic může ovlivňovat biologickou dostupnost jiných toxikantů, například těžkých kovů⁸⁴, či může jinak modifikovat podmínky testu. Práce autorů Campos a kol.⁸⁵ prokázala rychlou depleci potravy z akvatického média způsobenou heteroagregací TiO_2 -NPs s řasou *Chlorella vulgaris*, což vyústilo ve snížení růstu, reprodukce a zhoršení kondice *Daphnia magna*.

Stabilita částic v médiu tedy silně ovlivňuje výslednou toxicitu NPs v daném systému. OECD obecně doporučuje, aby koncentrace NPs v médiu během experimentu odpovídala $\pm 20\%$ teoretické koncentrace. Při testování nestabilizovaných částic (preferováno v metodikách OECD) a často i stabilizovaných částic, v kapalných médiích o vysoké iontové síle, je ale téměř nemožné udržet v systému primární částice bez jejich aglomerace s následnou

sedimentací. Pouze v několika studiích byla ověřována stabilita NPs v médiích relevantních pro regulační testy ekotoxicity⁷⁹. Vyšší stabilitu vykazovaly NPs v až desetkrát zředěných médiích (např. OECD M7) či v médiích, kde byly chloridy nahrazeny dusičnany či sírany^{86;87}. V práci Cupi a kol.⁸⁸ doporučují před testováním NPs zjištění izoelektrického bodu v příslušných expozičních médiích, aby se identifikovaly optimální parametry jako je pH a iontová síla. V literatuře je dále pro udržení konstantní expozice navrhováno využití modifikovaných testovacích systémů založených na cirkulaci média či periodické výměně média. Průtokové uspořádání však není vhodné pro všechny testovací organismy, zejména pro ty, které jsou citlivé na turbulence, například pro dafnie⁷⁹. Modifikace metody OECD 212 spočívající v nalezení vhodnějšího složení média a využití matematického modelu pro výpočet času výměny média umožnila efektivní kontrolu aglomeračního stavu a možnost interpretovat pozorovaný účinek ve vztahu k expozici konkrétní velikosti aglomerátů částic. Výsledky prezentované v této části práce se staly součástí publikace (viz Příloha 1):

Oprsal J, Blaha L, Pouzar M, Knotek P, Vlcek M a **Hrda K**: Assessment of silver nanoparticle toxicity for common carp (*Cyprinus carpio*) fish embryos using a novel method controlling the agglomeration in the aquatic media. *Environ Sci Pollut Res* 2015, 22:19124-19132.

Můj podíl na tvorbě publikace byl zhruba 25 %. Účastnila jsem se charakterizace primárního koloidu, spolu s kolegy jsem prakticky prováděla část Experimentu I a II a podílela jsem se na tvorbě manuscriptu.

2. 1. 3 Experimentální část – Popis kinetiky aglomerace Ag-NPs na základě podobnosti s elektrosorpcí thiosíranu sodného

Jedním z nejaktuálnějších témat výzkumu vlivu NPs na životní prostředí, je studium chování nanočástic. Aglomerace nanočástic je významným faktorem ovlivňujícím jejich osud. Nedávné studie ukázaly, že kinetika aglomerace nanočástic vykazuje určité podobnosti s elektrosorpčními procesy. Ve většině prací je aglomerační chování nanočástic v koloidech popisováno jako kinetika prvního řádu. Tento jednoduchý model aplikovaný ve velkém rozsahu koncentrací však poskytuje pouze přibližné hodnoty příslušných kinetických parametrů. Proto se při studiu aglomerace nanočástic pozornost zaměřila na poznatky týkající se procesů adsorpce/elektrosorpce. Znalost průběhu aglomeračního chování v expozičních médiích, tedy počáteční stav a následně časově závislé změny velikosti NPs, lze studovat pomocí fyzikálně-chemických metod. Experimentální sledování parametrů kinetiky aglomerace bývá poměrně náročné. Popis kinetiky aglomerace NPs s využitím vztahů původně určených k popisu jiných procesů (adsorpce, elektrosorpce) pak umožňuje odhadnout klíčové parametry koloidního roztoku nanočástic např. výchozí velikost, průměrnou střední velikost anebo maximální velikost aglomerátů méně náročným postupem. Tato část práce se tedy zabývá popisem kinetiky aglomerace nanočástic stříbra, založeném na částečné podobnosti s elektrosorpčními procesy. Podobnosti obou procesů byly ověřeny na případu aglomerace nanočástic stříbra a elektrosorpce thiosíranu sodného.

2. 1. 3. 1 Materiály a metody

Adsorpční data thiosíranu sodného při konstantním potenciálu $E = -0,1$ V (oproti referenční nasycené kalomelové elektrodě, SCE) byla získána pomocí elektrokapilárních měření a laboratorní aparatury pro měření technikou doby kapky s řízenou akumulací. Technika nám umožnila získat data o závislosti povrchového napětí γ na potenciálu E při různých koncentracích thiosíranu sodného. Roztok byl během růstu kapek míchán, aby se zajistilo dosažení adsorpční rovnováhy. 10 s před odkápnutím kapky bylo míchání zastaveno. Reprodukovatelnost metody byla lepší než $\pm 0,3$ mN m⁻¹. Elektrokapilární měření byla kalibrována s využitím předpokladu, že elektrokapilární maximum při teplotě 20 °C v základním elektrolytu bylo $\gamma = 426$ mN m⁻¹. Experimentální uspořádání zahrnovalo počítačově řízený voltametrický analyzátor PC-ETP (Eco-Trend Plus Co., Česká republika),

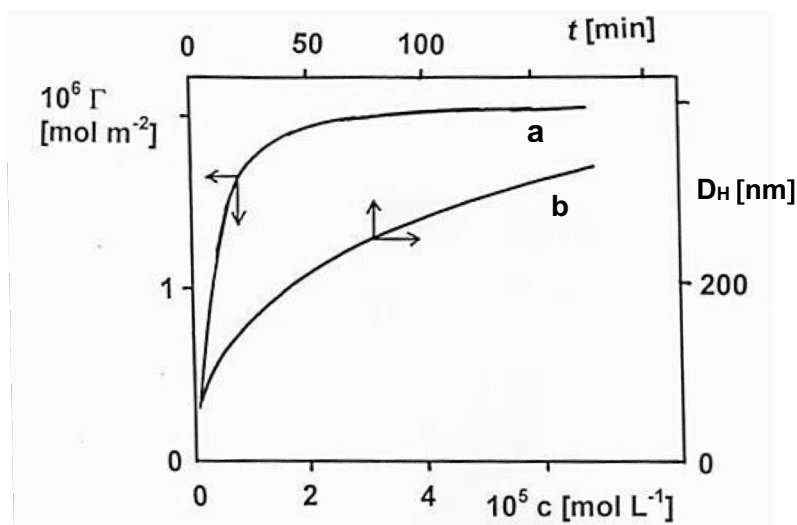
pracovní vřetenovou rtuťovou kapající elektrodou a referentní nasycenou kalomelovou elektrodou s dobou kapky 70 s a digitální čítač odkapávání.

Pro studium aglomeračního chování nanočástic stříbra byl využit primární koloid o koncentraci 1 mM připravený modifikovaným Tollensovým procesem, tedy chemickou redukcí dusičnanu stříbrného (AgNO_3) glukózou ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), který je podrobně popsán v kapitole 2. 1. 1. 1 Příprava a charakterizace Ag-NPs. Studovaný roztok Ag-NPs o koncentraci $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ byl připraven ředěním zásobního roztoku kapalným živným médiem M203, jehož složení, včetně koncentrací jednotlivých složek, je uvedeno na Obrázku 4 (viz kapitola 2. 1. 1. 2 Expoziční médium a testovací organismus). Hodnota pH disperze byla 6,8. Koncentrace stříbra byla ověřena pomocí metody ICP-OES (přístroj IntegraXL2, GBC, Austrálie). Hydrodynamický průměr (D_H) syntetizovaných Ag-NPs byl měřen pomocí metody DLS na přístroji ZetaPALS Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., USA).

Anionty thiosíranu byly přidány ve formě jejich sodné soli $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (p.a., Sigma-Aldrich). Zásobní roztoky byly připraveny z dvakrát destilované a byly skladovány při laboratorní teplotě. Pracovní roztoky byly připraveny denně, ředěním zásobních roztoků.

2. 1. 4 Výsledková část – Popis kinetiky aglomerace Ag-NPs na základě podobnosti s elektrosorpcí thiosíranu sodného

Na základě dříve zjištěných poznatků týkajících se podmínek stanovení iontů thiosíranu sodného pomocí adsorpčních voltametrických technik bylo předpokládáno, že na rtuťové polarizované elektrodě při potenciálu okolo $-0,1 \text{ V (SCE)}$ dochází ke specifickým interakcím mezi thiosíranem a povrchem elektrody vedoucí ke vzniku $\text{Hg}_2(\text{S}_2\text{O}_3)$. Výsledky ukázaly přítomnost silných interakcí mezi částicemi v adsorbované vrstvě $\text{Hg}_2(\text{S}_2\text{O}_3)$. Při konstantním potenciálu $E = -0,1 \text{ V (SCE)}$, byla při použití výše uvedené elektrokapilární techniky získána závislost povrchového napětí na logaritmu koncentrace thiosíranových aniontů.



Obrázek 8 (a) Příklad průběhu závislosti povrchového napětí Γ na koncentraci c pro adsorpci $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ a (b) závislosti D_H na t pro aglomeraci $10 \mu\text{M}$ Ag-NPs

Z Rovnice (2) byla vypočtena a vynesena (Obrázek 8a) odpovídající adsorpční izoterma thiosíranu sodného, tj. závislost povrchové koncentrace Γ na objemové koncentraci c .

$$d\gamma = -qdE - \Gamma d\mu, \text{ and } \Gamma = -(d\gamma/d\mu)_E \quad (2)$$

Kde γ , q , E , Γ a μ jsou povrchové napětí, hustota povrchového náboje, potenciál, koncentrace adsorbátu a chemický potenciál. Se vzrůstající koncentrací c se koncentrace adsorbátu přibližila k maximální (limitní) hodnotě Γ_{\max} . To umožnilo určit závislost relativního pokrytí povrchu adsorbentu $\theta = \Gamma/\Gamma_{\max}$ na koncentraci c . Na základě těchto poznatků by tato závislost mohla být vyjádřena (nebo fitována) matematicky například modelovým vztahem:

$$\frac{\theta}{1-\theta} \exp\left(-\sum_{i=1}^n A_i \theta^i\right) = \beta c, \quad (3)$$

kde A_i , i a β představují koeficienty, stupeň polynomu a koeficient interakce (adsorpce).

Rovnice (3) reprezentuje speciální případ obecnější podoby Rovnice (4):

$$f_1(Y) \exp[f_2(Y)] = kx \text{ or } f(X, Y), \quad (4)$$

která v obecném případě zahrnuje funkce (relativních) veličin definovaných jako nezávislé (X) a závislé (Y) proměnné následujícím způsobem:

$$X = \frac{x-x_0}{x_m-x_0} \text{ or } (x-x_0) \text{ or } \frac{x}{x_m}; Y = \frac{y-y_0}{y_m-y_0} \text{ or } \frac{y}{y_m}$$

kde x , y , X , Y označují obecné nebo relativní veličiny a x_0 , y_0 , x_m , y_m parametry. Zlogaritmování a úprava Rovnice (3) vyústila v Rovnici (5):

$$Z = \ln \frac{\theta}{(1-\theta)^c} = \sum_{i=0}^n A_i \theta^i = A_0 + A_1 \theta + A_2 \theta^2 + \dots \quad (5)$$

V případě thiosíranu byla studována závislosti Z na θ při různých odhadovaných hodnotách Γ_{\max} . Závislost byla proložena kvadratickým polynomem. Optimální proložení (s nejvyšší hodnotou korelačního koeficientu) bylo zjištěno při hodnotě $\Gamma_{\max} = 2,07 \cdot 10^{-6} \text{ mol m}^{-2}$.

Pro elektrosorpci thiosíranu sodného lze předpokládat, že počátek adsorpce látky je následován zvýšením relativního pokrytí povrchu adsorbentu θ se zvyšující se koncentrací c nebo s časem t . V blízkosti $c = 0$ nebo $t = 0$ může proložení závislostí pokrytí povrchu na koncentraci nebo na čase (zejména při malých a středních hodnotách c nebo t) odhalit, zda a do jaké míry došlo k uvedeným počátečním adsorpčním procesům a jak pokračuje další proces adsorpce.

Za předpokladu podobnosti průběhu procesů adsorpce a aglomerace nanočástic, založené na skutečnosti, že růst relativní velikosti částic D/D_m , jejich relativních objemů V/V_m atd., dosahuje za daných podmínek jejich mezní hodnoty (schematicky znázorněno na Obrázku 8b), lze rovnice použité v případě thiosíranu také použít pro popis tvorby a růstu nano a mikroaglomerátů a odhad parametrů D_0 a $D=D(t)$. Rovnice (6), která je obdobou Rovnice (5) (kde Y značilo v případě adsorpce relativní pokrytí povrchu adsorbentu a v případě Ag-NPs relativní změnu průměru částice mezi počátečním průměrem D_0 a limitním průměrem D_m) umožnila odhadnout parametr D_0 a D_m u studovaného koloidu (10 μM Ag-NPs) stejným postupem, který byl použit v případě thiosíranu pro odhad Γ_{\max} :

$$Z = \ln \frac{Y}{(1-Y)^t} = \sum_{i=0}^n A_i Y^i, \quad (6)$$

$$Y = \frac{\Delta D}{\Delta D_m}; \Delta D = D - D_0; \Delta D_m = D_m - D_0; x = t \text{ or } \Delta t$$

Tedy byla vynesena závislost Z na Y při různých odhadovaných hodnotách D_0 (20, 30, 40, 50, a 60 nm) a optimální proložení bylo zjištěno při hodnotě $D_0 = 50 \text{ nm}$. Tato hodnota odpovídala velikosti naměřené experimentálně. Obdobně, odhadnutá hodnota D_m byla 400 nm.

Srovnání pozorovaného, časově závislého růstu nanočástic stříbra v roztoku s diskutovanou adsorpcí thiosíranu sodného na konstantním potenciálu -0,1 V (vs. SCE) na polarizované rtuťové elektrodě naznačilo částečnou modelovou analogii mezi oběma procesy. Studie ukázala, že vztahy a izotermy navržené pro adsorpci umožňují do jisté míry popis kinetiky aglomerace nanočástic. Tento předpoklad byl potvrzen na základě matematicky odhadnutých hodnot, jež odpovídaly hodnotám zjištěným experimentálně. Výsledky prezentované v této části práce se staly součástí publikace (viz Příloha 2):

Novotny L, Kabutey A a **Hrda K**: Tentative assessment of the agglomeration kinetics of waste nanoparticles based on its partial similarity to the electrosorption processes. *Waste Forum* 2018, (2):124-131.

Můj podíl na tvorbě publikace byl zhruba 20 %, prováděla jsem charakterizaci primárního koloidu a studium aglomerace nanočástic pomocí DLS a účastnila jsem se na tvorbě manuscriptu.

2.2 Plnění dílčího cíle 2 – Optimalizace metody testování terestrické toxicity NPs

Druhým dílčím cílem předložené disertační práce byl vývoj metody testování ekotoxicity NPs na půdních organismech. Plnění cíle spočívalo zejména v optimalizaci přípravy a charakterizace expozičního média. Vlastnosti expozičního média, měly umožnit potlačit dynamické procesy, které probíhají po přidavku tetovaných NPs i během samotného experimentu a které ovlivňují reprodukovatelnost testů. Navržený postup měl též umožnit homogennější dispergaci částic v médiu a jednodušší charakterizace dispergovaných částic.

2.2.1 Experimentální část – Testy toxicity ZnO-NPs v agarovém médiu

I v terestrickém prostředí je aglomerace nanočástic častým jevem. Nehomogenní rozptýlení testovaného materiálu v expozičním médiu v kombinaci s únikovým chováním typickým pro některé půdní organismy vedou dále k nereprodukovatelným výsledkům prováděných testů. Také charakterizace nanočástic rozptýlených v půdní matrici je velice obtížným úkolem. Kvůli výše uvedeným skutečnostem se tato část práce zabývá ověřením použitelnosti agaru jako expozičního média při testech akutní terestrické toxicity. V půdách je často pozorována až řádově nižší toxicita stejného materiálu, než je tomu ve vodním prostředí. Z tohoto důvodu nebylo možné při využití námi připravených koloidů nanočástic stříbra v agaru zajistit testování toxikologicky významné koncentrace. Proto byly pro další práci v agarovém expozičním médiu vybrány nanočástice oxidu zinečnatého (ZnO-NPs) v práškové formě, které díky širokému spektru aplikací představují další významný kontaminant životního prostředí. Vzhledem k tomu, že většina studií naznačuje, že toxicita ZnO-NPs je spjata spíše s uvolněnými ionty, než s účinkem samotných nanočástic, byla testována také toxicita rozpustného chloridu zinečnatého. Jako testovací organismus byly zvoleny roupice *Enchytraeus crypticus*. Roupice *E. crypticus* jsou ekologicky relevantní půdní organismus navrhovaný jako alternativa za *E. albidus* v testech toxicity s roupicemi^{89;90}. Hlavními výhodami tohoto organismu jsou rychlá generační doba, vysoká natalita a snadná kultivace na agaru.

2. 2. 1. 1 Chemikálie a testovací organismus

Nanočástice ZnO-NPs o čistotě 99,5 % (Bochemie Group, Bohumín, Česká republika) měly výrobcem deklarovanou velikost v rozmezí 5–50 nm a průměrnou velikost 10 nm. Částice byly sférické s hexagonální krystalickou strukturou (zinkit). Jako dispergační a stabilizační činidlo byl použit pyrofosforečnan sodný dekahydrát ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, USA). Kultivační médium bylo připraveno z Bacto-Agaru (BD, USA) destilované vody a solí (NaHCO_3 , KCl , MgSO_4 , Lach-ner, Česká republika a CaCl_2 , PENTA, Česká republika). Chov testovacího organismu byl realizován v plastových Petriho miskách s ventilací umístěných ve tmě, v termoboxu, při teplotě $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$. Roupice byly krmeny dvakrát týdně jemně namletými ovesnými vločkami. Do testů byly použity roupice s viditelným opaskem s vajíčky.



Obrázek 9 Roupice *Enchytraeus crypticus*

2. 2. 1. 2 Experimentální design

Roupice byly v akutním testu toxicity exponovány po dobu 96 hodin, ve tmě, při teplotě $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$. Do každé testovací nádoby bylo převedeno 10 roupic. Každá testovaná koncentrace a kontrolní skupina byly připraveny ve třech opakováních. Testování toxicity probíhalo v plastových Petriho miskách s ventilací, naplněných 2% agarem. Sledovaným end-pointem testu byla procentuální úmrtnost testovacích organismů ve srovnání s kontrolní skupinou. Roupice, které nereagovaly na mechanickou stimulaci, byly považovány za mrtvé.

2. 2. 1. 3 Příprava expozičního média pro testy toxicity ZnCl₂

K přípravě agaru byla použita pouze destilovaná voda, Bacto-Agar a roztok ZnCl₂. Vzniklá směs byla na magnetických míchadlech zahřáta na teplotu (85 ± 5) °C a udržována při této teplotě po dobu jedné hodiny. Nejprve byly testovány koncentrace 0; 83,7; 167,5; 334,9; 837,3 a 1 674,6 mg ZnCl₂ kg⁻¹ agaru (mokrá hmotnost). Tyto koncentrace byly zvoleny proto, aby množství zinku v testovacích nádobách odpovídalo množství zinku v následných testech s ZnO-NPs (0, 50, 100, 200, 500 a 1 000 mg ZnO-NPs kg⁻¹ agaru). Horký agar byl poté rozlit do Petriho misek i na jeho víčka, což mělo zabránit úniku roupic na víčka Petriho misek a následnému podhodnocení expozice. Po zchladnutí byly do agaru vytvořeny vrypy, které měly usnadnit zavrtávání roupic do celého objemu expozičního média. Koncentrace zinku byla ověřována pomocí metody ICP-OES (Integra XL, GBC, Austrálie). Vzorky na analýzu agaru byly odebrány z různých hloubek a míst (miska i víčko) z každé testované koncentrace. Relativní směrodatná odchylka koncentrace zinku nebyla vyšší než ±3 %. Po předběžném testu, kde byla zjištěna 100% mortalita při koncentraci 100 mg Zn kg⁻¹ agaru, byly dále testovány koncentrace 0, 2, 4, 6, 10, 20, 40 a 60 mg Zn kg⁻¹ agaru. Kvůli možnému příspěvku chloridů k toxicitě zinku, byl proveden také test s NaCl. V tomto experimentu byly testovány koncentrace 43,6; 87,1; 174; 436 a 871 mg Cl⁻ kg⁻¹ agaru, jelikož odpovídaly koncentracím chloridu v předběžném experimentu s ZnCl₂.

2. 2. 1. 4 Příprava expozičního média pro testy toxicity ZnO-NPs

V případě experimentu s nanočásticemi byly využity dva způsoby vnášení NPs do agaru. K tomuto rozhodnutí vedl fakt, že volba metody vnášení může zásadním způsobem ovlivnit výslednou formu NPs v expozičním médiu a současně také toxicitu. První postup byl založen na kryogenním mletí suchého agaru s práškovými ZnO-NPs v kryogenním mlýnu (6970EFM Freezer/Mill, SPEX SamplePrep). Mletím byly připraveny koncentrace 0, 50, 100, 200, 500 a 1 000 mg ZnO-NPs kg⁻¹ agaru. Každá testovaná koncentrace byla připravena zvlášť. Podmínky mletí byly následující: doba předchlazení 10 min, délka mlecího cyklu 1 min, chlazení mezi cykly 1 min, počet cyklů 3, frekvence impaktoru 12 Hz. Vzniklá směs byla následně smísena s destilovanou vodou a zahřáta na teplotu (85 ± 5) °C a udržována při této teplotě po dobu jedné hodiny. Poté byl postup stejný jako v předchozím případě.

Druhý postup vnášení spočíval v přípravě vodné disperze ZnO-NPs. Experimentálně bylo zjištěno, že nejlepší velikostní distribuce je dosaženo po 45 minutách v ultrazvukové lázni (Bandelin Sonorex) v přítomnosti 0,02% $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Dispergační činidlo bylo přidáno i do agaru kontrolní skupiny. Agar byl na magnetických míchadlech zahřát na $(85 \pm 5)^\circ\text{C}$. Po 45 minutách od dosažení 85°C byla zbývajících 15 minut do agaru po kapkách přidávána disperze nanočástic. Poté byl postup opět stejný jako v případě přípravy expozičního média pro testy toxicity ZnCl_2 .

2. 2. 1. 5 Charakterizace ZnO-NPs v koloidech a v expozičním médiu

K charakterizaci disperze ZnO-NPs byla použita metoda DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern). Za účelem zjištění vlivu stabilizace na množství uvolněných zinečnatých kationtů byly připraveny disperze stabilizovaných a nestabilizovaných NPs ($\sim 50\text{--}1\,000\text{ mg ZnO kg}^{-1}$ agaru). Množství Zn^{2+} iontů bylo ověřováno 10 minut a 96 hodin po přípravě disperzí. 20 ml z každé disperze bylo centrifugováno po dobu 120 minut při $11\,000 \times g$ a supernatant byl následně analyzován pomocí ICP-OES.

Homogenita rozptýlení částic v expozičním médiu byla ověřována pomocí metody ICP-OES. Vzorky na analýzu agaru byly odebírány z různých hloubek a míst (miska i víčko) z každé testované koncentrace. Vzorky agaru s koncentracemi nanočástic 50 a $1\,000\text{ mg kg}^{-1}$ agaru, vnášenými oběma postupy byly analyzovány pomocí SEM ((SEM; JSM-5500LV, JEOL, Japonsko) s rentgenovým energiově-disperzním (EDX) mikroanalyzátozem IXRF Systems (detektor GRESHAM Sirius 10). Vzorky byly připraveny rozlitím horkého agaru s nanočásticemi mezi sklíčka, vysušením vzorku lyofilizací při teplotě menší než -50°C a tlaku menším než 60 Pa po dobu minimálně 6 hodin a následně zvýšením vodivosti povrchu vzorku jeho pozlacením. Vzorky byly analyzovány za nízkého urychlovacího napětí 10 kV pro zvýšení povrchové citlivosti.

2. 2. 2 Výsledková část – Testy toxicity ZnO-NPs v agarovém médiu

2. 2. 2. 1 Charakterizace ZnO-NPs v koloidech a v expozičním médiu

Hydrodynamické průměry částic, zjištěné pomocí metody DLS v koloidech (~ 50 a $1\,000\text{ mg ZnO-NPs kg}^{-1}$ agaru) stabilizovaných pyrofosforečnanem po 45minutové sonikaci, byly 164 nm a 240 nm. Množství zinečnatých kationtů v nestabilizovaných

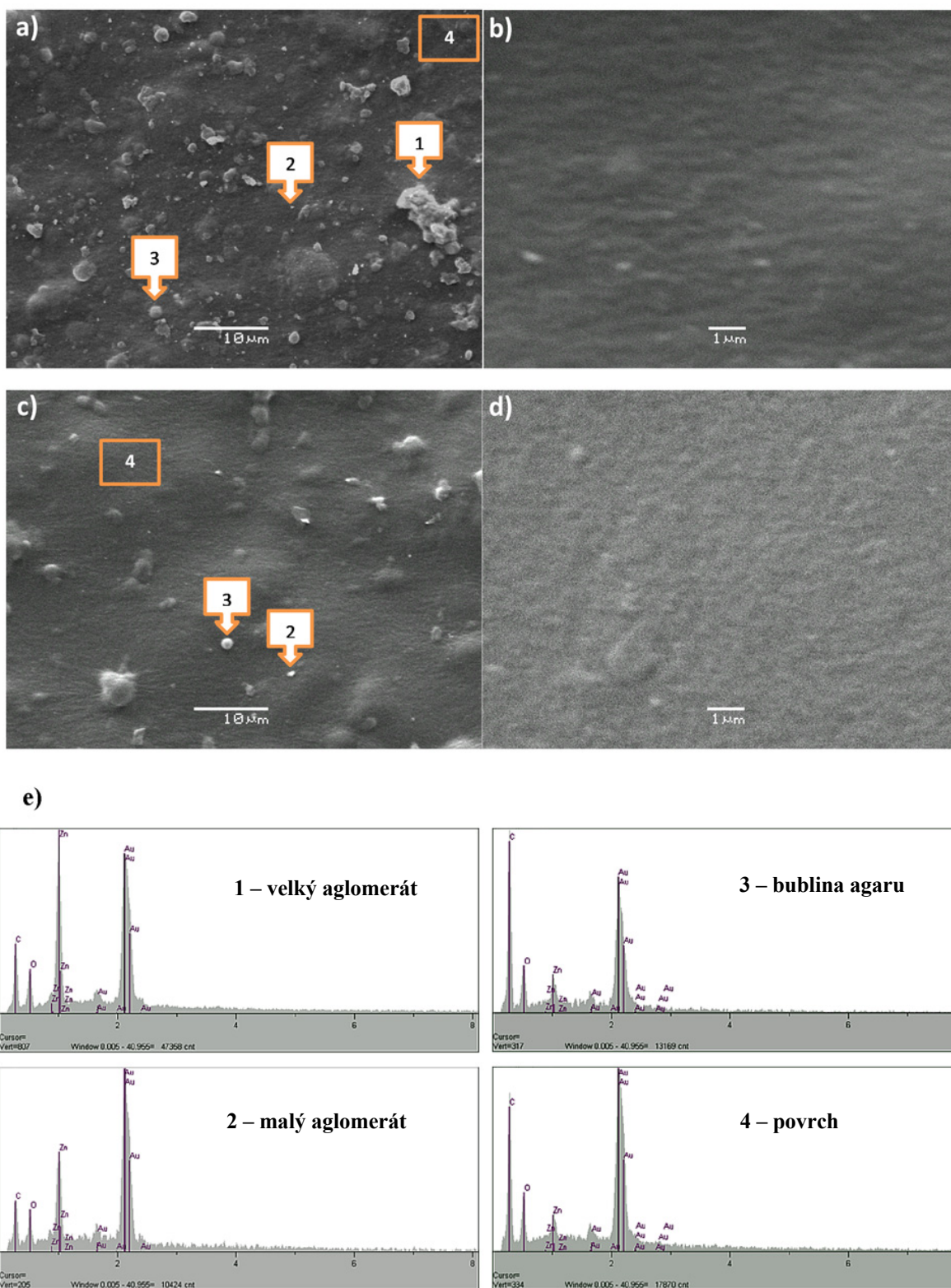
koloidech ($\sim 50\text{--}1\,000\text{ mg ZnO-NPs kg}^{-1}$ agaru) rostlo s rostoucí koncentrací ZnO-NPs v disperzi. Ve vzorcích odebraných po 10 minutách od přípravy se množství Zn pohybovalo v rozmezí $2,2\text{--}8,1\text{ mg l}^{-1}$ a po 96 hodinách v rozmezí $2,9\text{--}6,8\text{ mg l}^{-1}$. U stabilizovaných koloidů bylo zjištěno podstatně vyšší množství zinku a to $17,7\text{--}20,3\text{ mg l}^{-1}$ po 10 minutách a $15,3\text{--}19,2\text{ mg l}^{-1}$ po 96 hodinách. Výsledky naznačují, že rozpouštění ZnO-NPs je závislé na velikosti částic.

SEM snímky vzorků agaru s ZnO-NPs (50 a $1\,000\text{ mg kg}^{-1}$ agaru) vnášených kryogenním mletím jsou uvedeny na Obrázku 10 (a, b) a snímky vzorků agaru s ZnO-NPs vnášených přikapáváním vodné disperze do horkého agaru jsou uvedeny na Obrázku 10 (c, d). Spektra z EDX analýzy (Obrázek 10e) ukazují chemické složení jednotlivých objektů identifikovaných v jednotlivých vzorcích.

První postup vnášení ZnO-NPs do agaru vedl ve vzorcích s $1\,000\text{ mg ZnO-NPs kg}^{-1}$ agaru ke vzniku aglomerátů o velikosti $1\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$. Na světlých místech snímku ze SEM byla EDX analýzou potvrzena zvýšená koncentrace zinku (Obrázek 10e: 1-velké aglomeráty). U těchto aglomerátů je relativní poměr intenzit čar zinku a uhlíku větší než 2. Naproti tomu, stejný poměr v ploše vzorku a v tzv. bublinách agaru je menší než $1/3$. Z předchozího je patrné, že v tomto případě jsou nanočástice aglomerovány do různě velikých shluků, ale jistě je část dispergována v agaru. Naproti tomu ve vzorku s koncentrací nanočástic 50 mg kg^{-1} agaru nebyly aglomeráty pozorovány až na úrovni rozlišovací schopnosti přístroje (100 nm).

Ve vzorku agaru s $1\,000\text{ mg ZnO-NPs kg}^{-1}$ vnášených druhým postupem byly pozorovány aglomeráty s maximální velikostí $1\text{ }\mu\text{m}$. Na stejné ploše byly zjištěny maximálně dva, zatímco v předchozím případě bylo nalezeno cca $20\text{--}30$ kusů. Lepší dispergaci naznačuje i zvýšené množství zinku detekovaného v ploše vzorku v porovnání s prvním postupem vnášení. U vzorků agaru s $50\text{ mg ZnO-NPs kg}^{-1}$ nebyly pozorovány aglomeráty až na úrovni rozlišovací schopnosti přístroje a plošná koncentrace zinku k uhlíku byla podobná. Z výše uvedeného lze usuzovat, že druhý postup vnášení nanočástic do expozičního média vedl k menší míře aglomerace a k lepší dispergaci nanočástic v agaru.

Na základě údajů získaných pomocí SEM a DLS bylo konstatováno, že většina nanočástic byla přítomna ve formě aglomerátů menších než 500 nm v médiu s $1\,000\text{ mg ZnO-NPs kg}^{-1}$ agaru a ve formě aglomerátů menších než 200 nm v médiu s $50\text{ mg ZnO-NPs kg}^{-1}$ agaru.



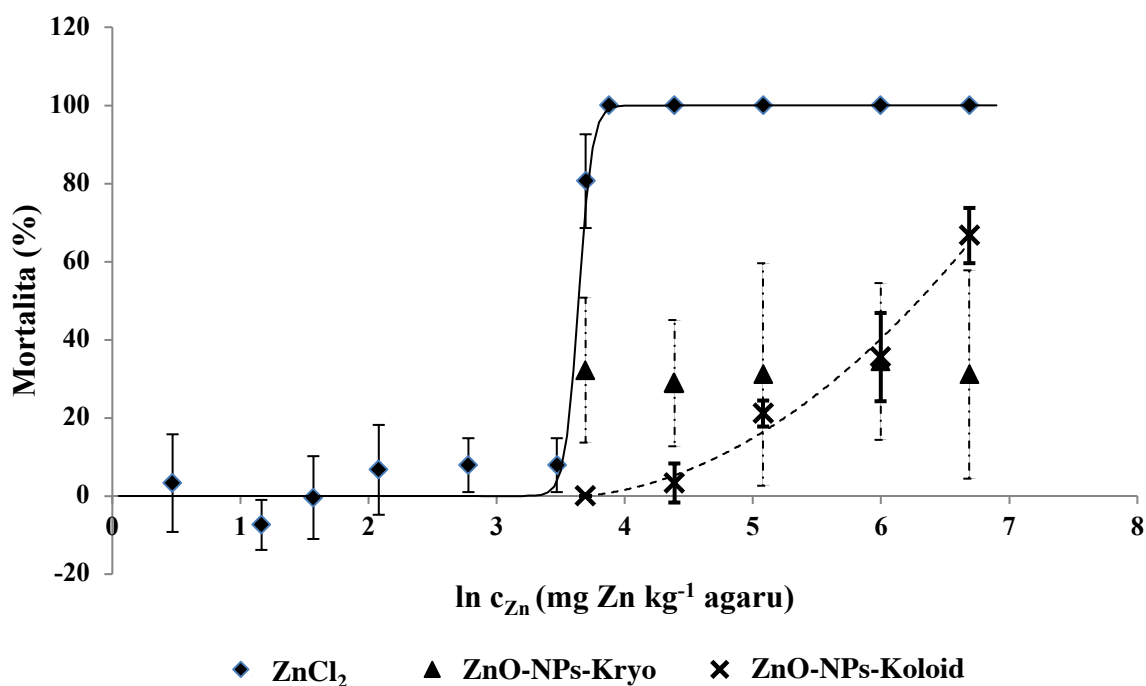
Obrázek 10 Objekty pozorované s využitím SEM v agarech s 1000 (a, c) a 50 (b, d) mg ZnO-NPs kg⁻¹ agaru připravené postupem 1 (a, b) a postupem 2 (c, d) – e) EDX spektra zkoumaných objektů: velké (1) a malé (2) aglomeráty, bubliny (3) a povrch (4)

2.2.2.2 Testy toxicity

Křivky dávka-účinek popisující akutní toxicitu zinečnatých kationtů pocházejících z ZnCl_2 a z ZnO-NPs vnášených oběma postupy, jsou uvedeny na Obrázku 11. K vyhodnocení dat byl využit program OPstat. K proložení dat a k výpočtu hodnoty LC_{50} byla použita metoda nelineární regrese a Boltzmannův model:

$$y = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) / (1 + \exp((P_1 - x) / P_2)) \quad (7)$$

kde y je úmrtnost oproti kontrolní skupině v %, x je \ln koncentrace Zn , P_1 inflexní bod (LC_{50}) a P_2 směrnice křivky.



Obrázek 11 Mortalita roupic *E. crypticus* exponovaných po 96 h ZnCl_2 a ZnO-NPs vnášených prvním postupem (ZnO-NPs-Kryo) a druhým postupem (ZnO-NPs-Koloid)

V případě testu s rozpustnou solí zinku byla vypočtena hodnota 96h LC_{50} (s odpovídajícím 95% intervalem spolehlivosti) 37,2 (35,5–38,8) mg Zn kg⁻¹ agaru. Kvůli možnému příspěvku chloridů k toxicitě zinku, byl proveden také test s NaCl. V testu nebyla pozorována mortalita v žádné z testovaných koncentrací.

Co se týká ZnO-NPs, odlišný postup vnášení NPs do expozičního média způsobil naprosto odlišnou odezvu *E. crypticus*, V experimentu, kde byly nanočástice vnášeny prvním postupem (Obrázek 11 – ZnO-NPs-Kryo), byla pozorována mortalita v rozmezí 29–34 %. Úmrtnost roupic se nezvyšovala s rostoucí koncentrací ZnO-NPs v agaru a data jsou charakteristická velkým rozptylem. Tento jev mohl být důsledkem heterogenního rozložení toxické formy zinku, které bylo potvrzeno SEM analýzou a pozorovaným únikovým chováním organismů. Během testů se roupice nacházely na víčkách či stěnách Petriho misek a pouze ve velmi malé míře zavrtané v agaru či na jeho povrchu, a to často bez ohledu na testované množství ZnO-NPs v médiu. Analýza množství uvolněných zinečnatých kationtů potvrdila, že v případě nestabilizovaných aglomerovaných částic se v systému nacházelo menší množství iontů. Z výše uvedeného lze předpokládat, že pozorovaná toxicita pro roupice byla indukována nehomogenně rozptýlenými neaglomerovanými nanočásticemi.

Zatímco v agarech připravených prvním postupem vnášení ZnO-NPs bylo pozorováno únikové chování, během testů v agarech připravených druhým postupem, se roupice nacházely ve většině případů zavrtané v agaru, případně na jeho povrchu. Druhý způsob vnášení vedl k užší distribuci velikosti částic s podstatně nižší střední velikostí částic. Tato skutečnost se projevila v monotónně se zvyšujícím vztahu mezi koncentrací ZnO-NP a pozorovanou mortalitou (Obrázek 11 – ZnO-NPs-Koloid), která se pohybovala v rozmezí 0–67 %. Koncentrace rozpuštěných zinečnatých kationtů v koloidech vykazovaly velmi úzké distribuční rozmezí v celé oblasti testovaných koncentrací (50–1 000 mg ZnO-NP kg⁻¹ agaru). Předpokládáme, že i v tomto případě byla pozorovaná mortalita důsledkem příjmu zejména malých částic.

V naší studii volba metody vnášení nanočástic do expozičního média dramaticky ovlivnila výslednou velikost a ekotoxicitu ZnO-NPs. Naproti tomu, ve studii prezentované autory Waalewijn-Kool a kol.⁹¹, metoda vnášení (mokrou a suchou cestou) neovlivnila distribuci ZnO-NPs v půdě. Autoři konstatovali, že ekotoxicita nanočástic pro chvostosky *Folsomia candida* nezávisela na jejich velikosti (původní velikosti 30 a 200 nm). Avšak v této studii byly prezentovány pouze velikosti primárních částic, nikoliv data týkající se sekundární charakterizace částic v půdě. Homogenitu rozptýlení částic v půdě autoři posuzovali na základě výsledků stanovení celkové koncentrace zinku měřené ve vzorcích odebraných z různých míst půdy. Informace o reálné velikosti částic v půdě tedy chybí. Naše výsledky získané pomocí DLS a SEM umožnily vyhodnocení distribuce velikosti částic a typu částic

reálně přítomných v expozičním médiu. Tato měření ukázala klíčovou úlohu malých aglomerátů a dobře dispergovaných nanočástic v celkovém toxickém účinku ZnO-NPs.

Z našich výsledků vyplývá, že toxicita zinku ve formě ZnO-NPs je podstatně nižší než toxicita zinku ve formě rozpustné soli. Tyto výsledky jsou v souladu s jinými studiemi. Například pro chvostoskoky *Folsomia candida*⁹² byl v umělé půdě zinek ve formě rozpustné soli toxičtější než ZnO-NPs a v jiné studii byl stejný fenomén pozorován v testech s žížalami *Eisenia fetida* v přírodní půdě⁷⁰.

Výsledky prezentované v této části práce se staly součástí publikace (viz příloha 3):

Hrda K, Oprsal J, Pouzar M, Knotek P a Vlcek M: Toxicity of zinc oxide nanoparticles to the annelid *Enchytraeus crypticus* in agar-based exposure media. *Chem pap* 2016, 70(11):1512-1520.

Můj podíl na tvorbě publikace byl 70 %, účastnila jsem se plánování designu studie, provedla jsem experimentální část práce a vyhodnocení dat a účastnila jsem se na sepsání manuscriptu.

2. 2. 3 Experimentální část – ICP-OES metoda pro stanovení Zn ve vzorcích biomasy *E. crypticus* a agaru

Jelikož je v rámci ekotoxikologických studií důležité také hodnocení příjmu polutantů organismem, v návaznosti na předchozí studii bylo zapotřebí vytvořit metodu pro analýzu prvků obsažených ve vzorcích tkání rourpic *E. crypticus* a agarového expozičního média. Kvantitativní analýza prvků obsažených ve tkáních rourpic, které jsou často využívány v terestrických testech toxicity, je komplikována nízkou hmotností těchto organismů. Nejčastěji se obsah polutantu v organismu vztahuje k mokré či suché biomase. S ohledem na velmi malou hmotnost rourpic (typicky méně než 1 mg na jednotlivce) a na obsah vody vyšší než 80 %, mohou během přípravy vzorků (vážení, stanovení suché hmotnosti) vzniknout systematické i náhodné chyby ovlivňující výsledky analýzy^{93;94;95}. Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem si tato část práce kladla za cíl (i) vytvořit jednoduchý, spolehlivý a rutinně použitelný postup pro separaci organismů *Enchytraeus crypticus* z testovacího gelu, (ii) vyvinout co nejjednodušší způsob převodu biomasy *E. crypticus* a vzorků agarového expozičního média do roztoku, (iii) najít vhodnou, spolehlivou a nenákladnou analytickou metodu a (iv) nakonec metodu ověřit v reálných laboratorních testech.

2. 2. 3. 1 Příprava vzorků

Vzorky pro analýzu obsahu zinku pocházely z ekotoxikologického experimentu, který je detailněji popsán v kapitole 2. 2. 1 Experimentální část – Testy toxicity ZnO-NPs v agarovém médiu. Pro ověření metody byl proveden experiment v agarovém expozičním médiu, ve kterém byly rourpice vystaveny po dobu 96 hodin zinku, pocházejícího z rozpustného chloridu zinečnatého (PENTA, Česká republika) a z nanočástic oxidu zinečnatého (Bochemie Group, Česká republika). V tomto experimentu byly rourpice (vždy 20 jedinců na testovací nádobu) vystaveny oběma formám zinku o koncentracích 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5 a 5 mg Zn kg⁻¹ agaru. Testované koncentrace a kontrolní skupina byly připraveny ve třech replikách. Agar byl připraven z práškového agaru (Dr. Hoffmann, Česká republika), destilované vody a roztoku ZnCl₂/disperze ZnO-NPs.

Příprava vzorků rourpic byla následující: živé rourpice (po 96 hodinách reagovaly na mechanickou stimulaci) byly opatrně odděleny od agaru pomocí štětečku a přeneseny do 25ml kádinky s destilovanou vodou. Následně byly převedeny do další kádinky o objemu 25ml, aby se odstranily případné zbytky agaru. Poté byly umístěny na několik desítek sekund

na filtrační papír, aby se jejich těla vysušila. Nakonec byly přeneseny do předem zvážených 10ml odměrných baněk. Pro rozpuštění vzorků byl použit 1 ml 25% roztoku tetramethylamoniumhydroxidu (TMAH, Sigma-Aldrich, USA). Hmotnost roupic z jedné testovací nádoby se pohybovala mezi 5 až 15 mg v závislosti na mortalitě. Současně byly také analyzovány roupice z chovu, pro stanovení požadové koncentrace zinku.

Vzorky agaru byly odebírány z různých míst víčka i dna testovací nádoby. Hmotnost jednoho vzorku byla cca 4,5 g. Vzorek agaru byl přenesen do kádinky o objemu 50 ml a následně byly přidány 2 ml 65% HNO₃ (Lach-ner, Česká republika). Kádinky byly zahřívány až na teplotu cca 80 °C, dokud se vzorek nerozložil. Obsah kádinky byl přenesen do 10ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou. Pro stanovení požadové koncentrace byl analyzován také agar kontrolní skupiny. Také práškový agar a ovesné vločky, jimiž jsou roupice krmeny, byly analyzovány na obsah zinku. Vzorky byly rozloženy mikrovlnou mineralizací (SpeedwaveTM MWS-2, Německo) v přítomnosti HNO₃. Cca 0,2 g vzorku bylo vloženo do nádoby pro rozklad spolu se 6 ml destilované 65% HNO₃ a směs byla ponechána reagovat po dobu 10 minut. Poté byl použit následující tříkrokový teplotní program: (1) 160 °C, 5 min, 80% výkonu (maximální výkon 1000 W); (2) 200 °C, 10 min, 80% výkonu; a (3) 10 minut bez zahřívání. Mineralizát byl doplněn na objem 50 ml. Společně s těmito vzorky byly připraveny také slepé vzorky. Kromě Zn, byly ve všech vzorcích sledovány také koncentrace K, P, Ca a Mg.

2. 2. 3. 2 Stanovení mokré a suché hmotnosti roupic *E. crypticus*

Koncentrace testovaných prvků nebo chemikálií se obvykle vztahuje k suché hmotnosti (DW), mokré hmotnosti (WW) nebo jednomu organismu. Znalost DW je nezbytná pro vzájemné srovnání výsledků, protože různý obsah vody v těle může ovlivnit výsledky chemické analýzy. Hmotnosti WW i DW mohou být ovlivněny nedokonalým oddělením organismů *E. crypticus* od agaru. Zbytky agaru z ekotoxikologických experimentů obsahující testované chemikálie mohou také vést k získání vyšších koncentrací sledovaných analytů. Použití mokré hmotnosti namísto suché v navrhované metodě umožnilo značné zjednodušení metody. Odhad střední hodnoty a reprodukovatelnosti WW jednotlivých roupic byl založen na opakovaném vážení 100 jedinců *E. crypticus* z chovu. Obsah sušiny byl zjištěn ze třech opakovaných vážení 70 jedinců *E. crypticus* z chovu.

2. 2. 3. 2 Analytické přístroje

Měření koncentrace Zn byla prováděna za použití metody ICP-OES, na přístroji Integra XL (GBC, Austrálie) vybaveného koncentrickým skleněným nebulizátorem (2 ml min^{-1}) a 50 ml skleněnou cyklonovou rozprašovací komorou (Glass Expansion, Austrálie). Optimalizované pracovní podmínky přístroje byly následující: výkon 1 000 W, výška pozorování 6 mm, průtok plazmového, pomocného a nebulizačního plynu 10, 0,6 a $0,65 \text{ l min}^{-1}$, on-peak integrační čas 1 s. Emisní čáry (v nm) byly: Zn 213 a 856, K 766 a 460, P 213 a 618, Ca 396 a 847 a Mg 285 a 213.

2. 2. 3. 3 Standardní roztoky a certifikovaný referenční materiál

Jednoprvkové standardní roztoky $1,000 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1}$ K, P, Zn, Ca a Mg (Analytika®, Česká republika) byly použity na přípravu víceprvkových kalibračních standardů. Sada pěti kalibračních standardních roztoků obsahovala koncentrace 0,1; 1; 2; 5; 10 mg l^{-1} K a P, 0,005; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 mg l^{-1} Zn, 0,05; 0,5; 1; 2,5; 5 mg l^{-1} Ca a 0,02; 0,2; 0,4; 1; 2 mg l^{-1} Mg.

Pro validaci navrhované metody byly použity certifikované referenční materiály BCR 185R hovězí játra (IRMM, Belgie) a EnviroMAT Pitná voda EP-H-2 (SCP Science, Kanada). BCR 185R hovězí játra byla rozložena pomocí TMAH stejně jako mokrá biomasa *E. crypticus*: k 0,1 g vzorku bylo přidáno 5 ml 25% TMAH a destilovaná vodou byla doplněna odměrná baňka na konečný objemu 50 ml. Referenční roztok EnviroMAT Pitná voda EP-H-2 byl zředěn 1000krát podle doporučení výrobce.

2. 2. 4 Výsledková část – ICP-OES metoda pro stanovení Zn ve vzorcích biomasy *E. crypticus* a agaru

2. 2. 4. 1 Stanovení mokré a suché hmotnosti roupic *E. crypticus*

Z výsledků opakovaných vážení prováděných jednou osobou v období dlouhém 6 měsíců byla zjištěna střední hodnota WW pro jednu roupic $0,64 \text{ mg}$ s variačním koeficientem (VK) 11%. Z opakovaného měření prováděného čtyřmi osobami během 1 dne byla zjištěna krátkodobá střední hodnota WW $0,64 \text{ mg}$ s VK 16%. F-test prokázal homogenitu rozptylu obou datových sad (p hodnota 0,6203). Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v jednotlivých hodnotách WW (t test, p hodnota 0,9805). Střední hodnota WW pro jeden organismus *E. crypticus* se zdá být uspokojivě reprodukovatelná. Odráží tak skutečnou tělesnou hmotnost

E. crypticus, bez zjevného příspěvku zbytků agaru. Střední hodnota WW odpovídá orientačním hodnotám OECD (OECD 2010)⁹⁴. Mokrá hmotnost přeživších organismů (10–20 červů) z jednoho testu se pohybovala mezi 5 a 15 mg v závislosti na mortalitě.

Obsah sušiny, zjištěný ze třech opakovaných vážení 70 jedinců *E. crypticus*, byl 17,3% (VK 9,1%), což odpovídá datům ve směrnici OECD 2010⁹⁴. Ve většině publikací, kde jsou sledovány analyty běžně vztahované k DW, hodnoty DW obvykle chybí, protože autoři použili lyofilizaci vzorku, a ne kalkulaci DW provedenou na základě vážení před a po sušení.

Kromě obsahu zinku byly ve vzorcích *E. crypticus* analyzovány vápník, hořčík, draslík a fosfor. Tyto prvky byly přítomny v řádově vyšších koncentracích než zinek. Variační koeficient stanovení jednotlivých prvků byl 1,7% pro hořčík, 9,5% pro fosfor, 11% pro draslík, 16% pro vápník a 18% pro zinek. Například Cedergreen a kol.⁹⁵ pro tyto prvky stanovované v biomase uvedli VK 20–33%. Autoři také doporučili sledování obsahu hořčíku v biomase jako indikátoru množství biomasy.

2. 2. 4. 2 Validace a kontrola kvality metody ICP-OES

Mez detekce (LOD) pro stanovení Zn v rozpuštěné biomase *E. crypticus* měla hodnotu 0,90 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$. Při přepočtu na mokrou hmotnost tkáně roupice by pak byla hodnota LOD 14 mg Zn kg^{-1} . Pro stanovení Zn v agaru byla hodnota LOD 0,0018 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$ a pro stanovení Zn v mineralizátech práškového agaru a ovesných vloček měla LOD hodnotu 0,23 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$. Validace celého analytického procesu včetně kompletního postupu přípravy vzorků byla provedena pomocí určení výtěžnosti analytu při měření certifikovaných referenčních materiálů (CRM) BCR 185R hovězí játra a EnviroMAT Pitná voda EP-H-2. V játrech je certifikováno 138,6 $\pm 2,1$ mg Zn kg^{-1} . Bylo nalezeno 136,1 $\pm 9,3$ mg Zn kg^{-1} (n = 5, digesce v TMAH stejným postupem jako u vzorků *E. crypticus*). Rozšířená nejistota VK se rovnala dvojnásobku směrodatné odchylky, měla hodnotu 3,4%. Výtěžnost zinku byla 97,7 %. V CRM pitné vodě EnviroMAT EP-H-2 byl deklarován obsah zinku 42,5 $\pm 15,5$ $\mu\text{g l}^{-1}$. Nalezená hodnota byla 39,4 $\pm 1,4$ $\mu\text{g l}^{-1}$, VK 2,0% a výtěžnost 92,7% (n = 5, ředění vodou podle doporučení výrobce). Dlouhodobá stabilita analytického procesu byla hodnocena s využitím kontrolních standardních roztoků zinku (0,05; 0,25; 0,5 mg l^{-1}), které byly měřeny ve fázi validace a v každém analytickém cyklu. Dlouhodobá výtěžnost během 6 měsíců byla 97,6–99,8 % s VK 0,80% až 2,1%.

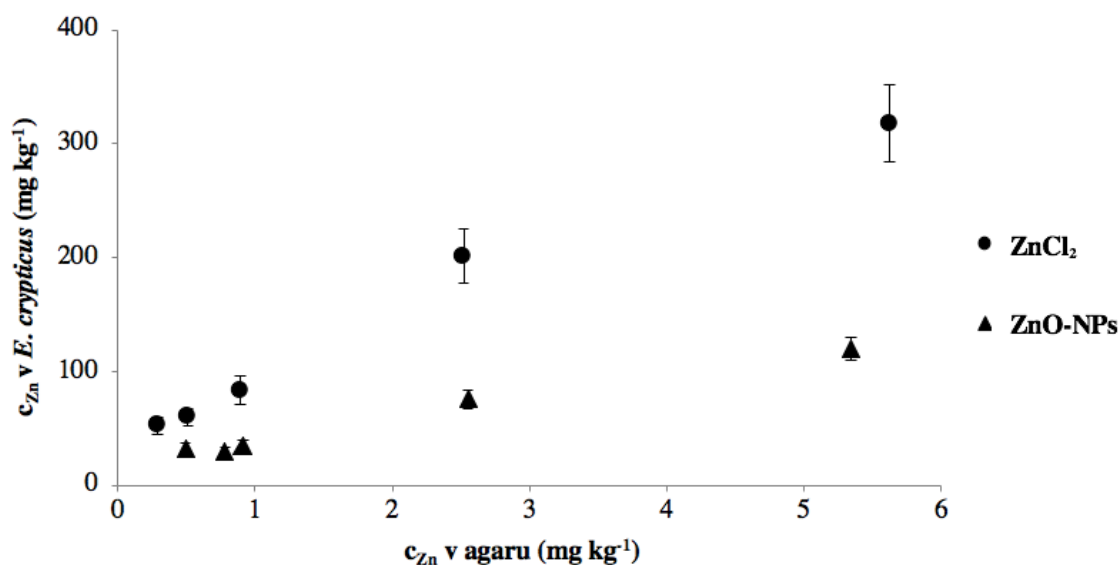
2. 2. 4. 3 Pozad'ová koncentrace zinku

Zjištěné pozad'ové koncentrace byly (průměr ± směrodatná odchylka, v mg kg⁻¹): pod 0,70 v práškovém agaru, 0,06 ± 0,01 v agarovém gelu, 32 ± 2 v ovesných vločkách, 61 ± 4 ve káních *E. crypticus* z chovu (výsledky se týkají mokré biomasy). Průměrný obsah Zn v jedné roupici byl 38 ± 8 ng (n = 10). Pro srovnání, Cedergreen a kol.⁹⁵ uvádí 82 ± 23 mg kg⁻¹ suché hmotnosti. Pokud by byly naše výsledky převedeny na suchou hmotnost byly by koncentrace zinku o řád nižší. To může být způsobeno odlišnými podmínkami chovu. V práci Cedergreen a kol.⁹⁵ chovají roupice na půdě LUFA, zatímco roupice použité pro tuto studii jsou chované pouze na agaru.

2. 2. 4. 4 Použitelnost metody v ekotoxikologických testech

Možnost praktického využití navržené metody byla ověřena ve studii, ve které byl zjišťován příjem zinku ze ZnO-NPs a ZnCl₂ (viz Obrázek 12). Byly připraveny dvě paralelní sady agarových médií (0; 0,1; 0,5; 1; 2,5 a 5 mg Zn kg⁻¹ agaru). Koncentrace zinku v testovaném organismu a v agaru byly stanoveny metodou ICP-OES. Po odečtení pozad'ové koncentrace zinku byly pro obě formy zinku vypočteny bioakumulační faktory:

$$\text{BAF} = C_{\text{Zn}} \text{ v } E. \text{ crypticus} / C_{\text{Zn}} \text{ v agarovém gelu} \quad (8)$$



Obrázek 12 Obsah zinku pocházejícího z ZnO-NPs a z ZnCl₂ v roupicích *E. crypticus* po 96 hodinové expozici v agarovém expozičním médiu

Výsledky ukazují, že příjem organismem *E. crypticus* je vyšší, když je Zn přidán do expozičního média ve formě $ZnCl_2$. BAF pro $ZnCl_2$ klesl ze 180 pro nejnižší testovanou koncentraci ($0,1 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ agaru) na 57 pro nejvyšší testovanou koncentraci (5 mg Zn kg^{-1} agaru) a u ZnO-NPs BAF klesl z 65 u nejnižší testované koncentrace na 23 u nejvyšší testované koncentrace. To odpovídá zhruba třikrát vyšší biodostupnosti zinečnatého kationtu, pokud je zinek v prostředí ve formě rozpustné soli.

V této studii byl vyvinut rychlý a poměrně jednoduchý postup přípravy vzorků biomasy *E. crypticus* a agarů z ekotoxikologických testů k prvkové analýze. Metoda ICP-OES se jeví jako spolehlivá a vhodná, s uspokojivým limitem detekce a přijatelnou opakovatelností. Metoda je snadno proveditelná, nevyžadující speciální obsluhu, čas ani chemikálie. Celý postup může být snadno rutinně provozován. Výsledky prezentované v této části práce se staly součástí publikace (viz Příloha 4):

Patocka J, Krejcová A, Stojárová K, **Hrda K** a Pouzar M: The ICP-OES method for determination of zinc in *Enchytraeus crypticus* and agarose gel from ecotoxicological tests. *Chem Pap* 2018, 73(1):159-164.

Můj podíl na tvorbě publikace byl zhruba 40 %, účastnila jsem se plánování designu studie, provedla jsem část experimentální práce (expoze roupic a příprava vzorků k analýze) a účastnila jsem se na tvorbě manuscriptu.

2.3 Plnění dílčího cíle 3 – Studium vlivu interakcí NPs s půdními složkami na ekotoxicitu NPs

Třetí část předložené disertační práce si kladla za cíl otestovat toxicitu nanočástic na rouspici kultivované v agarovém expozičním médiu se zvýšenou environmentální relevancí. Agar byl modifikován přísadkou modelových půdních složek (kaolin, huminové kyseliny, rašelina) za účelem studia vlivu interakcí nanočástic s půdními složkami na chování a výslednou toxicitu nanočástic v expozičním médiu.

2.3.1 Experimentální část – Testy toxicity ZnO-NPs v modifikovaném agarovém médiu

Studium transformačních procesů NPs v půdách a popis interakcí NPs s anorganickými a organickými půdními složkami by měly být integrální součástí studií zabývajících se ekotoxicitou nanomateriálů⁶⁹. Tyto procesy ovlivňují osud NPs a jsou silně závislé na podmínkách prostředí. Podíl anorganických a organických složek významně ovlivňuje biologickou dostupnost NPs v půdě a tím i toxicitu⁹⁶. Pro detekci nanočástic v půdě a studium jejich chování jsou nejčastěji využívány metody frakcionace tokem ve fokusujících polích (FFFF), UV spektroskopie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) a kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LCMS/MS)^{96;73}. Metody však vyžadují přípravu vzorku, která spočívá v extrakci NPs z půdní matrice a následném zakoncentrování vzorků. Příprava vzorků pro analýzu je jedním z hlavních zdrojů variability dat. Vzhledem k vyšším úrovním detekčních limitů analytických metod je obvykle vyžadován velký počet extrakčních kroků, což dále zhoršuje reprodukovatelnost výsledků. Pro studium vlivu konkrétních půdních složek na osud NPs bylo pro nás výhodnější použití méně komplexního média. Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem, se tato část práce zabývá testováním terestrické toxicity nanomateriálu pomocí námi navržené a optimalizované metody (viz kapitola 2. 2. 1 Experimentální část – Testy toxicity ZnO-NPs v agarovém médiu). Agar byl modifikován kaolinem, huminovými kyselinami a jejich kombinacemi. Tyto modifikace agaru nám měly umožnit snadno sledovat, jak půdní složky interagují s testovanými částicemi oxidu zinečnatého, jak tyto interakce ovlivňují výsledný stav materiálu a s tím související změny v pozorované toxicitě. Vzhledem k tomu, že jedním z možných mechanismů toxického účinku ZnO-NPs je uvolňování iontů, byla paralelně testována také toxicita rozpustného chloridu zinečnatého.

2.3.1.1 Chemikálie, testovací organismus a experimentální design

Použité nanočástice ZnO-NPs a dispergační činidlo byly stejné jako v případě testů v čistém agaru (viz kapitola 2. 2. 1. 1 Chemikálie a testovací organismus). Kultivační médium bylo připraveno z agaru (Dr. Hoffmann, Česká republika), destilované vody a solí (NaHCO₃, KCl, MgSO₄, Lach-ner, Česká republika a CaCl₂, PENTA, Česká republika). Chov testovacího organismu byl realizován stejně, jak je popsáno v kapitole 2. 2. 1. 1 Chemikálie a testovací organismus. Experimentální design testů se v podstatě shodoval s designem popsáním v kapitole 2. 2. 1. 2 Experimentální design. V této studii ale bylo do každé testovací nádoby převedeno 20 roupic namísto 10 a testování toxicity probíhalo v méně koncentrovaném agaru (1,5% vs. 2%)

2.3.1.2 Příprava expozičních médií

K přípravě agaru pro testy toxicity ZnCl₂ byla použita destilovaná voda, agar, roztok ZnCl₂ a pH směsi bylo v případě této studie upraveno pomocí fosfátového pufru (LACHEMA, Česká republika) vždy na hodnotu 7. Další postup přípravy a analýzy agarů byl téměř shodný s postupem popsáním v kapitole 2. 2. 1. 3 Příprava expozičního média pro testy toxicity ZnCl₂. Rozdíly spočívaly ve vyšší teplotě zahřívání agaru (95 °C namísto 85 °C) a doba, po kterou se agary udržovaly při této teplotě se zkrátila z 60 minut na 30 minut. Koncentrace pufru ve směsi se pohybovala v rozmezí 0,3–10 mM. Testované koncentrace zinku byly 0, 1, 10, 20, 30 a 60 mg kg⁻¹ (mokrá hmotnost). Toto koncentrační rozmezí bylo zvoleno proto, že v předchozí práci byla v čistém agaru zjištěna hodnota 96h LC₅₀ pro roupace 37,2 mg Zn kg⁻¹.

Toxicita zinku byla testována také ve třech modifikacích agaru, a to v přítomnosti 1 % kaolinu (Dr. Hoffmann, Česká republika), 0,1 % huminových kyselin pocházejících ze zvětralého hnědého uhlí zvaného oxyhumolit (Humatex, Česká republika) a za přítomnosti obou složek. Půdní složky byly přidány také do kontrolní skupiny. Příprava expozičního média a experimentální podmínky byly stejné jako v případě čistého agaru. V experimentech s kaolinem bylo do agaru navíc přidáno červené potravinářské barvivo (0,05 %, Babeta, Česká republika), pro zlepšení viditelnosti bílých červů v původně bílém prostředí. V rámci série předběžných testů nebyla prokázána toxicita barviva. Testované koncentrace zinku byly 0, 1, 25, 50, 100, 250, 500 a 1 000 mg kg⁻¹ agaru. Rozsah testovaných koncentrací byl širší než v případě čistého agaru, protože jsme očekávali, že složky půdy mohou snížit biologickou

dostupnost zinku. Vzhledem k potenciální toxicitě chloridového aniontu byl proveden také test s NaCl. Příprava expozičního média s NaCl a experimentální podmínky byly stejné jako u dříve popsaného testu s čistým agarem. Koncentrace chloridového aniontu v médiu odpovídala koncentraci chloridového aniontu v testu se ZnCl₂ (50, 100, 250, 500, 1 000 mg Zn kg⁻¹ agaru): 54,2, 108, 271, 542, 1 084 mg Cl⁻ kg⁻¹ agaru.

Příprava ZnO-NPs koloidů (stabilizovaných pyrofosforečnanem sodným) před jejich aplikací do agaru odpovídala postupu popsaném v kapitole 2. 2. 1. 4 Příprava expozičního média pro testy toxicity ZnO-NPs. Směs agaru, destilované vody, pyrofosforečnanu sodného a fosfátového pufru (pH upraveno na hodnotu 7) byla na magnetických míchadlech zahřata na (95 ± 5) °C. Stabilní a dobře charakterizované koloidní roztoky byly poté přidávány do horkého agaru po kapkách zbývajících 15 minut. Další postup a experimentální podmínky byly stejné jako u dříve popsaného testu s ZnCl₂. I v tomto případě byla zjišťována toxicita ZnO-NPs pro roupiče ve třech modifikacích agaru – 1 % kaolinu, 0,1 % HA a jejich kombinace. Půdní složky byly přidány také do kontrolní skupiny. Testované koncentrace ZnO-NPs byly 0, 50, 100, 250, 500, 750 a 1 000 mg kg⁻¹ agaru (~ 40, 80, 201, 402, 603 a 804 mg Zn kg⁻¹ agaru).

2. 3. 1. 3 Charakterizace ZnO-NPs v koloidech a v expozičním médiu

Hydrodynamický průměr koloidů (~ 50–1 000 mg ZnO-NPs kg⁻¹ agaru), připravených za využití kombinace sonikace (45 minut) a dispergačního činidla (Na₄P₂O₇·10H₂O) byly měřeny metodou DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK). Podmínky redispergace práškových NPs a jejich stabilizace byly vybrány na základě předchozí optimalizace.

Dále byl zjišťován vliv zahřívání na rozpouštění ZnO-NPs. Primární koloidy byly připraveny ve stejných koncentracích jako při přípravě agarového média (~ 50, 100, 250, 500, 750, 1 000 mg ZnO-NPs kg⁻¹ agaru) ve dvou sériích. Koloidy byly potom umístěny do ultrazvukové lázně na 45 minut. Jedna série byla potom na magnetických míchačkách zahřata na teplotu (95 ± 5) °C a udržována při této teplotě po dobu 15 minut. Obě série byly následně centrifugovány po dobu 2 hodin při 11 000 x g. Supernatanty všech vzorků pak byly analyzovány na obsah zinku pomocí metody ICP-OES.

Homogenita rozptýlení částic v expozičním médiu byla ověřována pomocí metody ICP-OES (Integra XL, GBC, Austrálie). Vzorky na analýzu agaru byly odebírány z různých hloubek a míst (miska i víčko) z každé testované koncentrace.

Vzorky agaru s 50 a 1 000 mg ZnO-NPs kg⁻¹ připravené ve všech čtyřech modifikacích (čistý agar, s přidávkou kaolinu, s přidávkou HA, s přidávkou obou složek) byly charakterizovány metodou SEM (JSM-5500LV, JEOL, Japonsko) s rentgenovým energiově-disperzním (EDX) mikroanalyzátozem IXRF Systems (detektor GRESHAM Sirius 10). Vzorky byly připraveny stejným postupem, který je popsán v kapitole 2. 2. 1. 5 Charakterizace ZnO-NPs v koloidech a v expozičním médiu.

2. 3. 2 Výsledková část – Testy toxicity ZnO-NPs v modifikovaném agarovém médiu

2. 3. 2. 1 Charakterizace ZnO-NPs v koloidech a v expozičním médiu

Hydrodynamický průměr (D_H) ZnO-NPs ve stabilizovaných koloidních roztocích (~ 50 – $1\ 000$ mg kg⁻¹), byl měřen za použití metody DLS. Měření ukázala relativně úzký rozsah hydrodynamického průměru všech koloidů. Průměrná hodnota D_H nanočástic byla 268 ± 28 nm. Výsledky ICP-OES analýzy supernatantů potvrdily, že zahřívání nemá žádný vliv rozpouštění. Průměrná koncentrace zinku v supernatantech byla $29,7 \pm 2,7$ mg l⁻¹ v případě nezahřátých koloidů a $29,9 \pm 3,7$ mg l⁻¹ v případě zahřátých koloidů.

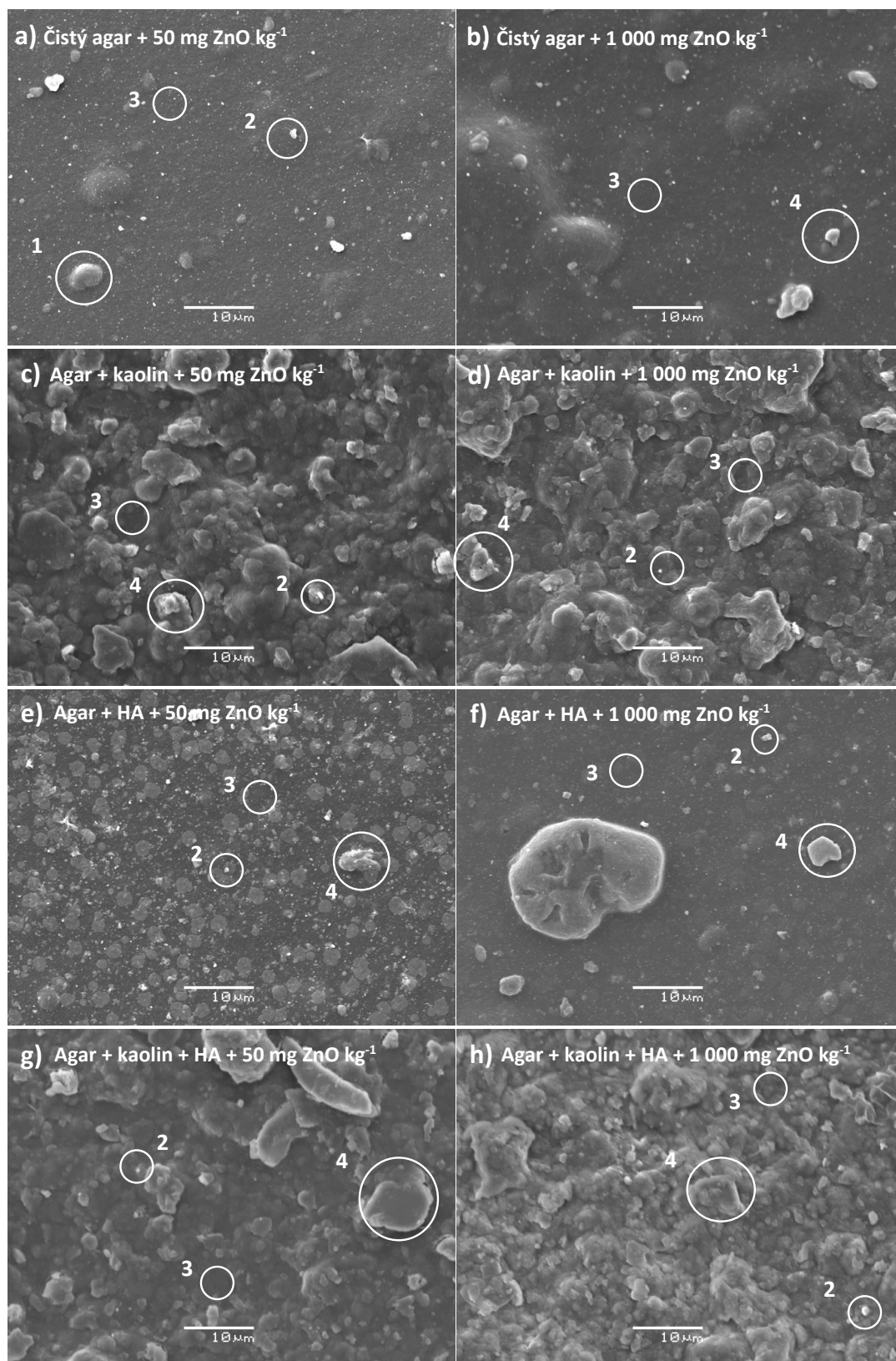
Pro charakterizaci nanočástic v expozičním médiu byl použit SEM s mikroanalyzátozem EDX. SEM snímky agarových vzorků s 50 (levý sloupec) a 1 000 mg ZnO-NPs kg⁻¹ (pravý sloupec) jsou uvedeny na Obrázku 13. Ve vzorcích čistého agaru byly pozorovány tzv. bubliny agaru (na obrázku označeny číslem „1“). Analýza chemického složení ukázala, že neobsahují detekovatelný zinek. Na kompozitu ZnO-NPs-agar byly detekovány aglomeráty ZnO s různými rozměry. U vzorků s 50 mg ZnO-NPs kg⁻¹ byly objeveny zejména malé aglomeráty (na obrázku označeny číslem „2“, velikost < 1 μm) u vzorků s 1 000 mg ZnO-NPs kg⁻¹ pak i mikrometrické aglomeráty (na obrázku označeny číslem „4“, velikost > 1 μm). Analýza plochy vzorků (na obrázku označená číslem „3“) ukázala, že ZnO byl dispergován po celém objemu agaru. Velmi jasné objekty pozorované na povrchu vzorku jsou výsledkem topologie povrchu, a ne vždy se jednalo o aglomeráty ZnO-NPs.

V agaru obsahujícím 1 % kaolinu byly pozorovány objekty, které vykazovaly vždy vyšší intenzitu čar křemíku a hliníku ve srovnání se zinkem. Výsledky EDX analýzy vedly k závěru, že se nejedná o aglomeráty ZnO, ale o struktury kaolinu. V těchto vzorcích nebyly objeveny aglomeráty ZnO až do úrovně rozlišovací schopnosti přístroje a poměr intenzity čar Zn/C měřený na různých místech plochy vzorku byl podobný. V přítomnosti kaolinu byly

nanočástice lépe dispergovány než v případě čistého agaru. ZnO-NPs byly detekovatelné vždy uvnitř studovaných struktur kaolinu. Tvorba těchto kompozitů ZnO-kaolin s největší pravděpodobností zabránila tvorbě větších aglomerátů ZnO.

Chování ZnO-NPs bylo zcela odlišné v přítomnosti 0,1 % HA. Větší aglomeráty ZnO ($>1 \mu\text{m}$, označené číslem „4“) byly také pozorovány, avšak v menším množství na stejné ploše než v čistém agaru. I v tomto případě byl zinek detekován v celém objemu agaru. Poměr intenzity čar Zn/C v ploše vzorku byl vyšší než v případě čistého agaru, což naznačuje, že větší množství zinku bylo dispergováno v agaru.

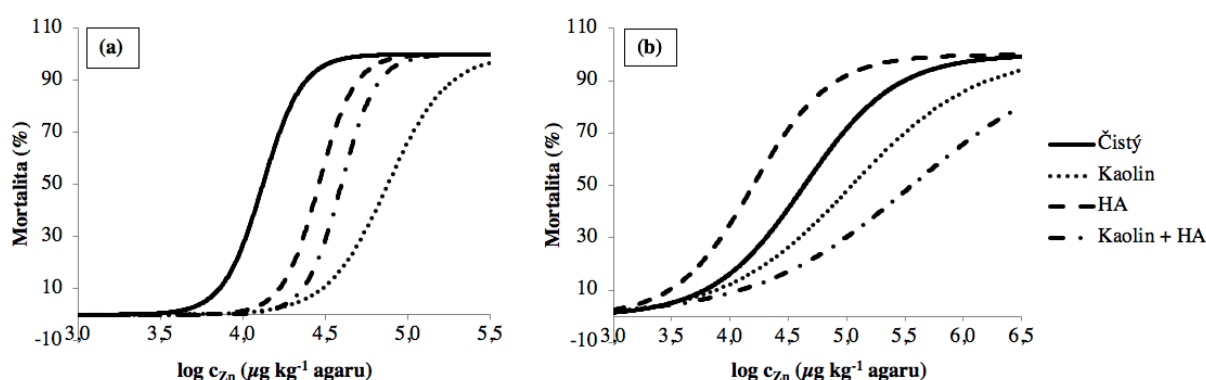
Ve vzorcích obsahujících obě půdní složky byly pozorované obdobné struktury jako u vzorků obsahujících kaolin. EDX analýza ukázala, že pozorované struktury byly opět tvořeny kaolinem a zinek byl detekován v celém objemu agaru. V tomto případě byly v obou vzorcích nalezeny malé aglomeráty ZnO (označené číslem „2“). Velikost a počet nalezených aglomerátů však byly stále nižší než u čistého agaru nebo agaru s HA.



Obrázek 13 SEM snímky vzorků agarů s 50 mg ZnO-NPs kg⁻¹ (vlevo) a 1 000 mg ZnO-NPs kg⁻¹ (vpravo) ve čtyřech modifikacích expozičního média na bázi agaru. Příklady pozorovaných objektů analyzovaných pomocí EDX: (1) bublina agaru (2) malý aglomerát (3) plocha vzorku (4) velký aglomerát

2.3.2.2 Testy toxicity

Křivky dávka-účinek popisující akutní toxicitu zinku pocházejícího ze $ZnCl_2$ (a) a ZnO -NPs (b) pro roupičce *E. crypticus* jsou uvedeny na Obrázku 14. Pro tvorbu křivek dávka-účinek a pro výpočet hodnot LC_{50} byl použit modul nelineární regrese v softwaru GraphPad Prism 7. Vypočtené hodnoty 96h LC_{50} (s odpovídajícím 95% intervalem spolehlivosti) jsou uvedeny v Tabulce 2.



Obrázek 14 Křivky dávka-účinek popisující akutní toxicitu zinku pocházejícího z $ZnCl_2$ (a) a z ZnO -NPs (b) pro roupičce *E. crypticus* ve čtyřech různých expozičních médiích na bázi agaru

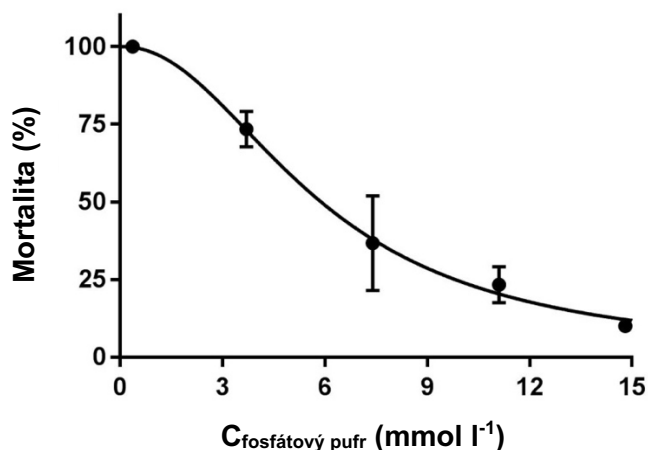
Tabulka 2 Hodnoty 96h LC_{50} obou testovaných forem zinku pro roupičce *E. crypticus* získané ve čtyřech různých expozičních médiích na bázi agaru

Expoziční médium	96h LC_{50} (mg Zn kg ⁻¹ agaru)	
	$ZnCl_2$	ZnO -NPs
Čistý agar	13,2 (12,1–14,3)	43,5 (23,8–60,1)
Agar s kaolinem	75,4 (65,8–86,5)	111 (73,6–157)
Agar s HA	28,8 (27,7–30,0)	15,8 (3,3–36,9)
Agar s kaolinem a HA	39,4 (36,7–42,2)	122 (80,1–171)

Toxicita zinku pocházejícího z $ZnCl_2$ byla nejvyšší v čistém agaru ($LC_{50} = 13,2$ mg kg⁻¹), nižší toxicita byla pozorována v agaru s HA ($LC_{50} = 28,8$ mg kg⁻¹), v agaru s kaolinem a HA ($LC_{50} = 39,4$ mg kg⁻¹) a nejnižší toxicita byla pozorována v agaru s kaolinem ($LC_{50} = 75,4$ mg kg⁻¹). Pro srovnání, v naší předchozí práci (viz Příloha 3), kde byl použit 2% agar připravený z Bacto-agaru, byla zjištěná hodnota 96h LC_{50} pro roupičce v čistém agaru

37,2 (35,5–38,8) mg Zn kg⁻¹ agaru. Vyšší toxicita pozorovaná v této studii mohla být způsobena použitím agaru od jiného výrobce a odlišnou koncentrací agaru ve výsledném médiu. Z výsledků je patrné, že přídavek i malého množství půdních složek vedl ke snížení toxicity zinku. Toxicita zinečnatého kationtu je často nižší v půdách než v méně komplexních médiích či v akvatickém prostředí. Agarové médium obsahuje polysacharidy (agaróza, agaropectin), které mohou interagovat s ionty zinku a snižovat jejich biologickou dostupnost. Půda je mnohem komplexnější médium, kde půdní složky a fyzikálně-chemické transformační procesy ovlivňují toxicitu chemikálií. Například Phipps a kol.⁹⁷ studovali toxicitu kationtu zinku pro *Lumbriculus variegatus* v přírodní vodě. Hodnota LC₅₀ po 10denní expozici byla pouze 3 mg l⁻¹. Posthuma a kol.⁹⁸ uvádí hodnotu LC₅₀ pro *E. crypticus* 336 (266–425) mg Zn kg⁻¹ modifikované OECD půdy po čtyřtýdenní expozici zinku.

V experimentech s vysokými koncentracemi ZnCl₂ (500 a 1 000 mg Zn kg⁻¹ agaru) provedených v modifikovaných agarech, kde byly použity větší objemy pufru, byl pozorován efekt pufru na toxicitu zinku. Při koncentraci 250 mg Zn kg⁻¹ agaru byla pozorována 100% mortalita ve všech třech modifikacích agaru, ale ve vyšších testovaných koncentracích byly objeveny přeživší roupice. Zvýšení koncentrace Zn z 500 na 1 000 mg Zn kg⁻¹ agaru způsobilo snížení mortality ve všech modifikovaných médiích (mortalita 100% vs. 57% na agaru s HA; 42% vs. 33% na agaru s kaolinem a 95% vs. 82% v agaru s oběma složkami). Úmrtnost pozorovaná v těchto koncentracích proto nebyla zahrnuta do křivek dávka-účinek a výpočtů hodnot LC₅₀. Pro ověření předpokládaného původu jevu byl proveden experiment s různými objemy pufru a jednou koncentrací zinku. Testovaná koncentrace zinku byla 250 mg kg⁻¹ agaru. Testované objemy fosfátového pufru byly 3, 7, 37, 74, 111 a 148 ml l⁻¹ expozičního média. Experiment byl proveden s přidáním obou složek (0,1n % HA a 1 % kaolinu) s 20 dospělými roupicemi na testovací nádobu. Hodnota pH médií ve všech testovacích nádobách byla 6 ±0,2. Výsledky tohoto experimentu jsou uvedeny na Obrázku 15.



Obrázek 15 Mortalita *E. crypticus* exponovaných zinku (250 mg kg^{-1}) pocházejícího z ZnCl_2 v agarovém médiu s různým obsahem fosfátového pufru

Při nejnižším testovaném objemu pufru byla mortalita 100%, přežití se zvyšovalo se zvyšujícím se objemem pufru a při nejvyšším testovaném objemu byla mortalita pouze 10%. Dvě nejvyšší koncentrace zinku (500 a $1\,000 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ agaru) byly také testovány ve všech třech modifikacích bez použití pufru. Pro vyloučení vlivu pH na přežití červů byl proveden další experiment. Roupice se umístili na 96 hodin do nádob naplněných agarem o pH 5 a 6. Úmrtnost v pokusech s 500 a $1\,000 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ agaru bez pufru byla 100% ve všech třech modifikacích. V kontrolním experimentu na agaru bez Zn s pH 5 a 6 po 96 hodinách bylo přežití 100%. Co se týká účinku chloridového aniontu, v experimentu s NaCl po 96 hodinách expozice nebyla pozorována mortalita v žádné z testovaných koncentrací (nejvyšší testovaná koncentrace $1\,084 \text{ mg Cl kg}^{-1}$ agaru).

Toxicita zinku pocházejícího z ZnO-NPs byla nejvyšší v agaru s HA ($\text{LC}_{50} = 15,8 \text{ mg kg}^{-1}$), nižší toxicita byla zjištěna v čistém agaru ($\text{LC}_{50} = 43,5 \text{ mg kg}^{-1}$), v agaru s kaolinem ($\text{LC}_{50} = 111 \text{ mg kg}^{-1}$) a nejnižší toxicita byla pozorována v agaru s oběma složkami ($\text{LC}_{50} = 122 \text{ mg kg}^{-1}$). Ve srovnání s výsledky ZnCl_2 , HA dokonce zvýšily biologickou dostupnost a toxicitu zinku. Přítomnost kaolinu naopak snížila toxicitu zinku pocházejícího ze ZnO-NP téměř desetkrát ve srovnání s ZnCl_2 v čistém agaru. Při kombinaci obou půdních složek se ukázal být dominantní vliv kaolinu, což ukazuje téměř srovnatelný tvar křivek (Obrázek 15b, agar s kaolinem a agar s oběma složkami). Owojori a kol.⁹⁹ také pozorovali významně rozdílnou mortalitu žíhal *Eisenia fetida*, vystavených koncentrací $1\,000 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ půdy v přítomnosti 5 a 40 % kaolinu. Analýza vzorků pomocí SEM naznačuje, že přítomnost HA zvýšila rozpustnost ZnO-NPs. Tato zjištění jsou v souladu s dalšími studiemi, kde byla

prokázána schopnost HA zvýšit disociaci zinku nebo jiných kovů^{100;101}. Pozorovaná mortalita byla tedy zjevně indukována dobře dispergovanými částicemi a uvolněnými zinečnatými kationty. Stejně jako v případě ZnCl₂ je i zde zjevný rozdíl mezi čistým agarem a agarem s přídavkem půdních složek. Pro srovnání Canas a kol.⁷⁸ studovali akutní a chronickou toxicitu ZnO-NPs (40 ~ 100 nm) pro žížaly *Eisenia fetida* na filtračním papíru, v písčitém médiu a v umělé půdě. Nejvyšší akutní toxicita byla pozorována na filtračním papíru, významně nižší v písčitém prostředí (10% mortalita při koncentracích 10 a 100 mg kg⁻¹ a pouze 20% mortalita při koncentraci 10 000 mg kg⁻¹) a v umělé půdě nebyla pozorována žádná mortalita žížal. Khare a kol.¹⁰² naproti tomu zjistili hodnoty LC₅₀ ZnO-NPs (< 25 vs. < 100 nm) pro háďátko *Caenorhabditis elegans* pouze 0,32 a 2,0 mg l⁻¹. V této práci byla konstatována závislost výsledné toxicity na velikosti částic. V obou studiích však nebyla provedena sekundární charakterizace ZnO-NPs, a je zde uvedena pouze počáteční velikost. Z našich charakterizačních dat je zřejmé, že velikost částic se během přípravy experimentu významně změnila. Výchozí velikost byla v průměru 10 nm, v disperzích měly částice více než 200 nm a v expozičních médiích byly přítomny aglomeráty, některé o velikosti i více než 1 μm. Z dostupných informací je patrný trend, který ukazuje, že s rostoucí komplexností systému roste velikost částic a klesá toxicita. V případě tak rozdílných velikostí NPs pak hraje roli i velikost samotného organismu (bakterie vs. žížala).

Výsledky prezentované v této části práce se staly součástí publikace (viz Příloha 5):

Hrda K, Pouzar M a Knotek P: Study of zinc oxide nanoparticles and zinc chloride toxicity to annelid *Enchytraeus crypticus* in modified agar-based media. *Environ Sci Pollut Res* 2018, 25(23):22702-22709.

Můj podíl na tvorbě publikace byl 60 %, účastnila jsem se plánování designu studie, provedla jsem část experimentální práce a vyhodnocení dat a účastnila jsem se na tvorbě manuscriptu.

2. 3. 3 Experimentální část – Vliv huminových kyselin na toxicitu ZnO-NPs v agarovém expozičním médiu

Huminové kyseliny jsou jedním ze tří druhů přírodní organické hmoty vznikající v důsledku rozkladu převážně rostlinných zbytků a významně ovlivňují biologickou dostupnost znečišťujících látek. Toxicita ENMs v přítomnosti HA již byla předmětem několika studií^{103;104}, v nichž autoři dospěli k závěru, že fyzikálně-chemické vlastnosti nanomateriálů a experimentální podmínky mohou vyvolat protichůdnou biologickou odpověď. Komplexní povaha půdy, komplikuje studium interakcí ENMs s HA. V této souvislosti je pro studium vlivu konkrétních půdních složek na osud ENMs výhodnější použití méně komplexního média. Kvůli výše uvedenému je tato část práce zaměřena na testování terestrické toxicity nanočástic v námi navrženém a optimalizovaném expozičním médiu na bázi agaru. V experimentech bylo agarové expoziční médium modifikováno dvěma zdroji huminových látek, a to humátem sodným a rašelinou. Byl studován vliv HA na vlastnosti a akutní toxicitu ZnO-NPs pro roupice *Enchytraeus crypticus*.

2. 3. 3. 1 Chemikálie, testovací organismus a experimentální design

Použité nanočástice, chemikálie a podmínky chovu testovacího organismu *E. crypticus* byly stejné jako v případě testů v čistém agaru (viz kapitola 2. 2. 1. 1 Chemikálie a testovací organismus). Agar pocházel od jiného prodejce (Dr. Hoffmann, Česká republika). V této studii byly navíc použity huminové kyseliny (humát sodný), pocházející ze zvětralého hnědého uhlí oxyhumolitu (Humatex, Česká republika) a rašelina zakoupená od firmy Agro CS (Česká republika), která byla před použitím proseta sítím o velikosti ok 2 mm a poté vysušena. K úpravě pH sloužil CaCO₃ (Lach-ner, Česká republika). Experimentální design odpovídal popisu designu testů provedených v modifikovaném agaru (kapitola 2. 3. 1. 1 Chemikálie, testovací organismus a experimentální design)

2. 3. 3. 2 Příprava expozičního média

Příprava expozičního média pro testy toxicity ZnCl₂ odpovídala postupu popsaném v kapitole 2. 3. 1. 2 Příprava expozičních médií. Toxicita rozpustné formy zinku byla testována ve třech modifikacích expozičního média na bázi agaru – v čistém agaru, v agaru modifikovaném humátem sodným (SH; 0,1 %) a v agaru modifikovaném rašelinou (1 %). Expoziční médium

bylo připraveno smísením práškového agaru (1,5 %) s půdními složkami a destilovanou vodou/roztokem ZnCl_2 . Hodnota pH směsi byla upravena pomocí CaCO_3 vždy na 7. Testované koncentrace zinku v čistém agaru byly 0, 1, 10, 20, 30 a 60 mg kg^{-1} agaru. Rozsah testovaných koncentrací v přítomnosti půdních složek byl: 0, 1, 25, 50, 100 a 250 mg kg^{-1} agaru.

Příprava expozičního média pro testy toxicity ZnO-NPs odpovídala postupu popsáném v kapitole 2. 3. 1. 2 Příprava expozičních médií. Testované koncentrace ZnO-NPs byly 0, 50, 100, 250, 500 a 1 000 mg kg^{-1} agaru (~ 0, 40, 80, 201, 402 a 804 mg Zn kg^{-1} agaru). I v případě ZnO-NPs byla toxicita testována v čistém agaru a v agaru modifikovaném přídatkem SH (0,1 %) a rašeliny (1 %).

2. 3. 3. 3 Charakterizace ZnO-NPs

Hydrodynamické průměry připravených koloidů (~ 50–1 000 $\text{mg ZnO-NPs kg}^{-1}$ agaru), byly měřeny metodou DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK). Homogenita rozptýlení částic v expozičním médiu byla ověřována pomocí metody ICP-OES (Integra XL, GBC, Austrálie). Vzorky na analýzu agaru byly odebírány z různých hloubek a míst (miska i víčko) z každé testované koncentrace. Vzorky agaru s 50 a 1 000 $\text{mg ZnO-NPs kg}^{-1}$ připravené ve všech třech modifikacích (čistý agar, s přídatkem SH, s přídatkem rašeliny) byly charakterizovány metodou SEM (JSM-5500LV, JEOL, Japonsko) s rentgenovým energiově-disperzním (EDX) mikroanalyzátozem IXRF Systems (detektor GRESHAM Sirius 10). Vzorky byly připraveny stejným postupem, který je popsán v kapitole 2. 2. 1. 5 Charakterizace ZnO-NPs v koloidech a v expozičním médiu.

2. 3. 4 Výsledková část – Vliv huminových kyselin na toxicitu ZnO-NPs v agarovém expozičním médiu

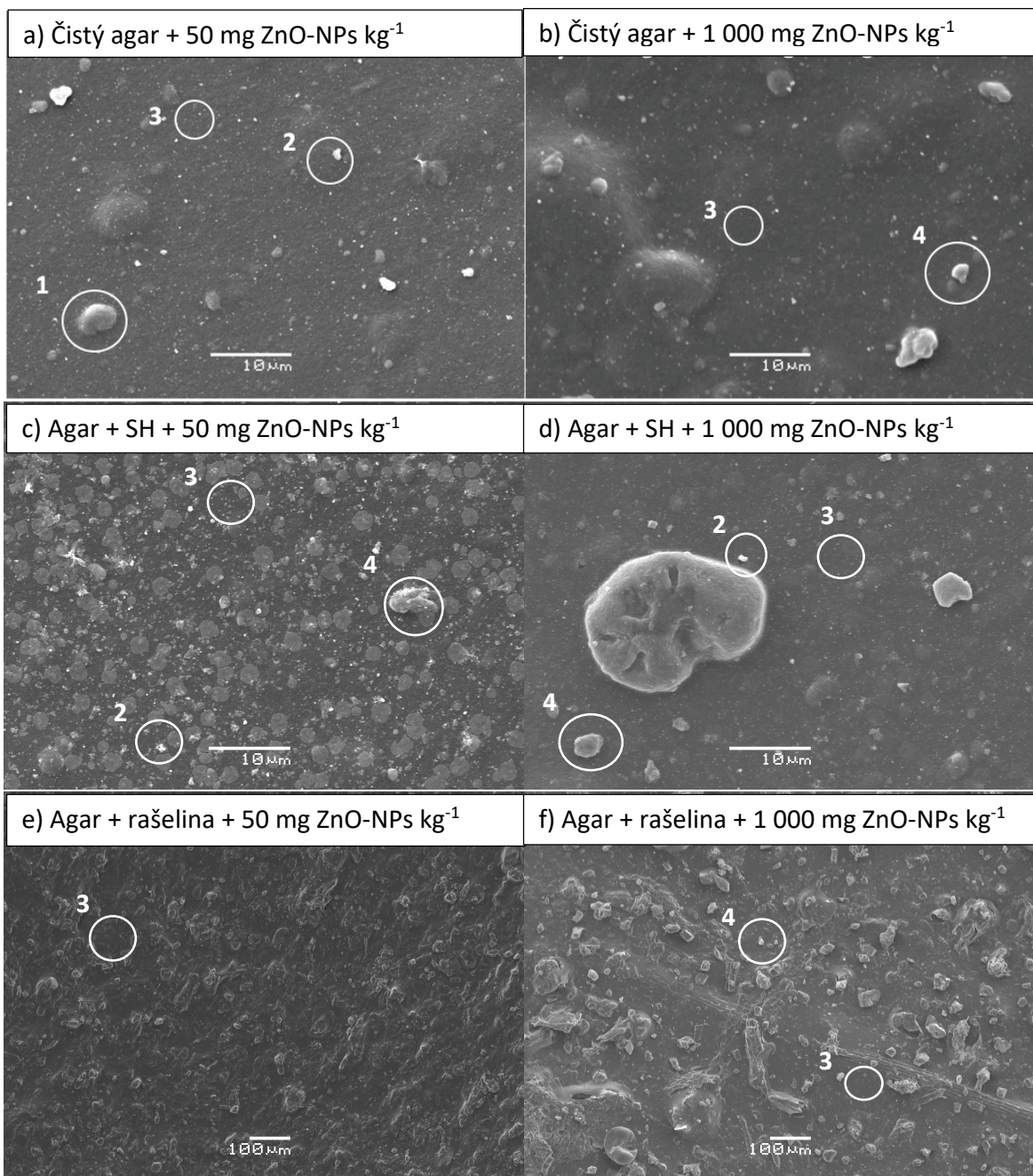
2. 3. 4. 1 Charakterizace ZnO-NPs

Průměrné hodnoty D_H koloidů zjištěné metodou DLS se pohybovaly v rozmezí 226–310 nm. SEM snímky agarů s 50 (levý sloupec) a 1 000 $\text{mg ZnO-NPs kg}^{-1}$ (pravý sloupec) jsou uvedeny na Obrázku 16. Ve vzorcích čistého agaru byly jako obvykle pozorovány tzv. „bubliny“ agaru (označeny jako „1“), které neobsahovaly detekovatelný zinek. U vzorků s 50 mg ZnO-NP kg^{-1} byly nalezeny malé aglomeráty (velikost < 1 μm označené jako „2“) a

ve vzorcích s 1 000 mg ZnO-NP kg⁻¹ byly nalezeny i mikrometrické aglomeráty (laterální velikost > 1 μm, označeny jako „4“). Analýza plochy vzorků potvrdila, že ZnO byl dispergován v celém objemu agaru v obou vzorcích (příklad místa analyzovaného v ploše vzorku je označen jako „3“).

V přítomnosti 0,1 % SH byly ve vzorcích také pozorovány větší aglomeráty ZnO-NPs (>1 μm, označené jako "4"), avšak počet nalezených aglomerátů ve stejné oblasti byl menší než v čistém agaru. I v tomto případě byl zinek detekován v celém objemu agaru. Poměr intenzity Zn/C v ploše vzorku bez aglomerátů (označený jako „3“) byl vyšší než v případě čistého agaru, což ukazuje, že v agaru bylo dispergováno větší množství zinku než v čistém agaru.

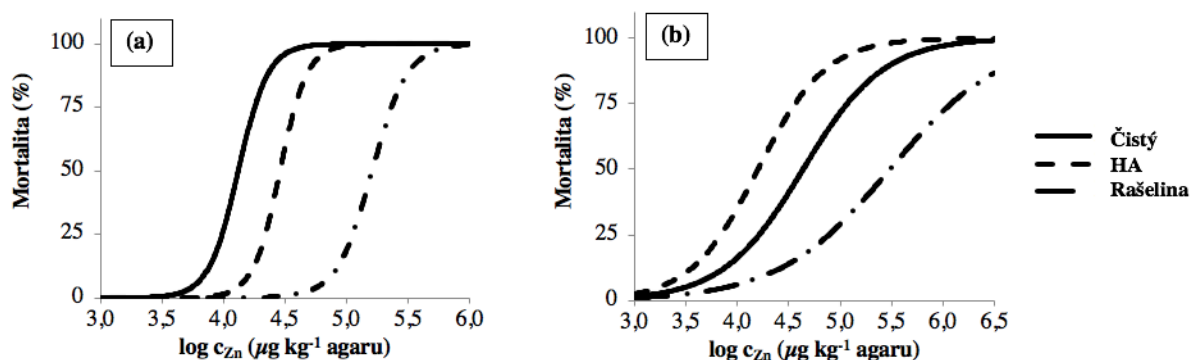
V agaru s přísávkem 1 % rašeliny byl zinek velmi dobře dispergován v celém objemu vzorků. Pouze ve vzorcích s 1 000 mg ZnO-NPs kg⁻¹ agaru bylo možno nalézt velmi malé množství větších aglomerátů ZnO-NPs (< 1 μm). Na Obrázku 16 (e,f) je možno pozorovat také částice rašeliny či částice CaCO₃, který byl použit pro úpravu pH agarů.



Obrázek 16 SEM snímky vzorků agarů s 50 mg ZnO-NPs kg⁻¹ (vlevo) a 1 000 mg ZnO-NPs kg⁻¹ (vpravo) ve třech modifikacích expozičního média na bázi agaru. Příklady pozorovaných objektů analyzovaných pomocí EDX: (1) bublina agaru (2) malý aglomerát (3) plocha vzorku (4) velký aglomerát

2.3.4.1 Testy toxicity

Křivky dávka-účinek, které popisují akutní toxicitu zinku pocházejícího z ZnCl_2 (a) a ZnO-NPs (b) pro rouspice *E. crypticus* ve třech různých médiích na bázi agaru, jsou uvedeny na Obrázku 17. Vypočítané hodnoty 96h LC_{50} (s odpovídajícím 95% intervalem spolehlivosti) jsou uvedeny v Tabulce 3.



Obrázek 17 Křivky dávka-účinek popisující akutní toxicitu zinku pocházejícího z ZnCl_2 (a) a z ZnO-NPs (b) pro rouspice *E. crypticus* exponovaných 96 h ve třech různých médiích na bázi agaru

Tabulka 3 Hodnoty 96h LC_{50} obou forem zinku pro rouspice *E. crypticus* zjištěné ve třech různých médiích na bázi agaru

Expoziční médium	96h LC_{50} (mg Zn kg ⁻¹ agaru)	
	ZnCl_2	ZnO-NPs
Čistý agar	13,2 (12,1–14,3)	43,5 (23,8–60,1)
Agar s SH	28,8 (27,7–30,0)	15,8 (3,3–36,9)
Agar s rašelinou	161 (140–287)	304 (260–357)

Toxicita zinku pocházejícího z ZnCl_2 byla nejvyšší v čistém agaru ($\text{LC}_{50} = 13,2 \text{ mg kg}^{-1}$), v přítomnosti SH se toxicita snížila ($\text{LC}_{50} = 28,8 \text{ mg kg}^{-1}$), a v přítomnosti rašeliny došlo až k řádovému snížení toxicity zinku ($\text{LC}_{50} = 161 \text{ mg kg}^{-1}$). Z výsledků je zřejmé, že přidavek rozpustných HA nesnížil biologickou dostupnost zinku stejně, jako rašelina obsahující i pevný podíl. Rozdílné chemické složení a struktura huminových látek pocházející z různých zdrojů vedou k odlišným vlastnostem HA a interakcím s NPs. Pro srovnání, Koukal a kol.¹⁰⁵ studovali vliv přítomnosti NOM na toxicitu zinku pro sladkovodní řasy *Pseudokirchneriella*

subcapitata. Byly použity tři zdroje huminových látek, a to půdní HA, HA pocházející z rašeliny a standardní huminové látky (Suwannee River Fulvic Acids). Huminové látky byly přidány ve dvou koncentracích: 1 a 5 mg l⁻¹. Bylo zjištěno, že HA výrazně snížily biologickou dostupnost zinku a toxicitu pro *P. subcapitata*, zejména při koncentraci 5 mg l⁻¹, zatímco FA v obou koncentracích neměly významný vliv. Autoři vysvětlili tento rozdíl tak, že komplexy FA-kov jsou mnohem labilnější a může snadno dojít k jejich disociaci. Kovy disociované z labilních komplexů jsou potenciálně dostupnější, reaktivnější a toxičtější. Na druhou stranu Kungolos a kol.¹⁰⁶ uvádí, že přítomnost HA významně neovlivnila toxicitu zinku pro bakterii *Vibrio fischeri* (Microtox test). V této studii byla zjištěna nízká míra komplexace zinečnatého kationtu s HA.

V případě ZnO-NPs byla nejvyšší toxicita zinku zjištěna v agaru obsahujícím SH (LC₅₀ = 15,8 mg kg⁻¹), nižší toxicita byla pozorována v čistém agaru (LC₅₀ = 43,5 mg kg⁻¹) a nejnižší toxicita byla pozorována v agaru s rašelinou (LC₅₀ = 304 mg kg⁻¹). Stejně jako v případě ZnCl₂, odlišné složení HA a pevná fáze rašeliny snížily toxicitu zinku o jeden řád ve srovnání s čistým agarem. Je zajímavé, že v přítomnosti SH došlo ve srovnání s čistým agarem dokonce ke zvýšení toxicity nanočástic. SEM analýza potvrdila, že v přítomnosti SH bylo více zinku dispergováno v objemu agaru. Přítomnost HA zjevně potlačila aglomeraci a v expozičním médiu se tedy vyskytovalo více dobře dispergovaných nanočástic a komplexů HA-Zn. Schopnost HA zvýšit míru disociace zinku a jiných kovů byla prokázána i v jiných studiích (viz kapitola 2. 3. 2. 2 Testy toxicity). Obdobné chování ZnO-NPs v přítomnosti NOM (půdní extrakty) bylo pozorováno ve studii autorů Li a kol.¹⁰⁴, ve které byla zjišťována akutní toxicita nanočástic pro žížaly *Eisenia fetida* za využití kontaktního testu na filtračním papíře. Bylo zjištěno, že přítomnost HA zvýšila disociaci ZnO-NPs. Snímky pořízené na transmisním elektronovém mikroskopu odhalily menší aglomeráty v přítomnosti HA. V případě této studie však bylo pozorováno mírné snížení toxicity ZnO-NPs v přítomnosti HA. V našich experimentech však kromě dermální expozice dochází také k expozici prostřednictvím ingesce, jelikož roupice agar během experimentu také pojídají. Akhil a Sudheer Khan¹⁰³ studovali vliv HA na toxicitu nestabilizovaných a stabilizovaných nanočástic ZnO (polyvinylpyrrolidon – PVP, polyvinylalkohol a ethylenglykol) pro bakterie, řasy a korýše. Obdobně jako v našich experimentech, v této práci bylo zjištěno, že adsorpce HA snížila hydrodynamický průměr a zvýšila stabilitu nestabilizovaných NPs a NPs stabilizovaných PVP. Přítomnosti HA zvýšila toxicitu pro všechny testovací organismy. Naproti tomu Ouyang a kol.¹⁰⁷ zkoumali vliv HA na interakce mezi ZnO-NPs a biofilmem

bakterie *Pseudomonas putida* KT2440 v různých stupních jeho zralosti. Rozpuštěné ionty zinku významně přispěly k celkové toxicitě a přítomnost HA dramaticky snížila toxicitu NP v důsledku komplexace disociovaných zinečnatých kationtů.

Výsledky prezentované v této části práce se staly součástí publikace:

Hrda K, Konopacova E, Vrzackova I a Pouzar M: Influence of humic acids on zinc oxide nanoparticles and zinc chloride toxicity to *Enchytraeus crypticus* studied in agar based exposure media. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A, Faculty of Chemical Technology* 2018, (24):187-196.

Můj podíl na tvorbě publikace byl 60 %, účastnila jsem se plánování designu studie, provedla jsem část experimentální práce, vyhodnocení dat a účastnila jsem se na tvorbě manuscriptu.

3 ZÁVĚR

Předložená disertační práce je zaměřena na problematiku testování ekotoxicity průmyslově vyráběných nanomateriálů, konkrétně na vývoj metod testování ekotoxicity, které eliminují faktory ovlivňující správnost a reprodukovatelnost výsledků laboratorních testů. Praktické řešení této problematiky bylo rozděleno do tří dílčích cílů. Řešení prvního dílčího cíle práce spočívalo ve studiu významných faktorů ovlivňujících reprodukovatelnost testů ekotoxicity nanomateriálů, a to zejména ve studiu aglomeračního chování NPs. Získané znalosti pak měly být využity pro úpravu metody testování toxicity NPs ve vodném prostředí za účelem potlačení vlivu aglomerace na výsledky testů.

Způsob řešení této problematiky spočíval v modifikaci existující metodiky OECD 212 (Zkouška krátkodobé toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku) pro testování toxicity stříbrných nanočástic na plůdku kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Modifikace metody byla založena na přístupu, kde je maximální velikost aglomerátů, jimž je testovaný organismus během testu vystaven, řízena koncentračně závislou proměnlivou frekvencí výměny média během testu. K tomuto účelu byl použit matematický model, popisující závislost velikosti aglomerátů na čase v kapalném médiu daných vlastností (koncentrace částic, iontová síla média). Pomocí tohoto modelu byla navržena frekvence výměny média tak, aby byl experimentální organismus vystaven vždy pouze aglomerátům, jejichž velikost nepřesahovala zvolenou hraniční hodnotu (200 a 400 nm). Tato modifikovaná metoda testování akvatické toxicity NPs byla publikována v časopise *Environmental Science and Pollution Research* (IF – 2,914). Počet citací tohoto článku je v současnosti 5. Výsledky ekotoxikologických experimentů byly citovány například v článku, který shrnuje současné poznatky týkající se studia osudu anorganických nanomateriálů ve vodních systémech¹⁰⁸ nebo ve studii, ve které byla hodnocena toxicita stříbrných nanočástic pro embrya medaky japonské. Pravděpodobnost využití námi navrhované metody pro praktické hodnocení ekotoxicity nanomateriálů pro vodní organismy je spíše malá, jelikož provedení experimentu bez průtočného systému či automatizace výměny koloidu, je časově i personálně velice náročné.

V rámci plnění prvního dílčího cíle byla provedena také studie, která se zabývala popisem aglomerace stříbrných nanočástic na základě podobnosti s elektrosorpčními procesy. Znalost průběhu aglomeračního chování v expozičních médiích, tedy počáteční stav a následné časově závislé změny velikosti jsou pro hodnocení ekotoxicity NPs velice důležité, protože bylo opakovaně prokázáno, že aglomerace nejvýznamněji ovlivňuje osud NPs. Jelikož

experimentální sledování parametrů kinetiky aglomerace bývá poměrně náročné, popis kinetiky na základě využití podobností s jinými procesy (adsorpce, elektrosorpce) umožňuje teoreticky určit nebo odhadnout určité parametry kinetiky aglomerace (výchozí velikost částic, maximální velikost aglomerátů) bez nutnosti je experimentálně ověřovat pomocí analytických technik. Tento alternativní přístup popisu kinetiky aglomerace byl publikován v recenzovaném časopisu Waste forum.

Druhým dílčím cílem předložené disertační práce byl vývoj metody testování ekotoxicity NPs na půdních organismech. Plnění cíle spočívalo zejména v optimalizaci přípravy a charakterizace expozičního média. Vlastnosti expozičního média měly umožnit potlačit dynamické procesy ovlivňující reprodukovatelnost testů, které probíhají po přidavku tetovaných NPs a během samotného experimentu. Navržený postup měl též umožnit homogennější dispergaci částic v médiu a jednodušší charakterizaci dispergovaných částic. V této studii bylo ověřeno využití agaru jako expozičního média v testech na roupicích *E. crypticus*. Metoda testování akutní terestrické toxicity zahrnovala také dva postupy vnášení ZnO-NPs do expozičního média a postup přípravy vzorků expozičního média pro účely sekundární charakterizace NPs. Tento přístup testování toxicity splnil požadavky, které byly kladeny na plnění dílčího cíle. Druhý postup vnášení ZnO-NPs (mokrou cestou) umožnil homogenní disperzi částic v expozičním médiu. Povaha agaru zajišťuje, že po přípravě expozičního média nedochází po dobu trvání testu k fyzikálně-chemickým změnám NPs. Po optimalizaci přípravy vzorků expozičních médií na sekundární charakterizaci NPs a volbě vhodné techniky, byl navržen velmi jednoduchý a nenáročný postup přípravy. Tato modifikovaná metoda testování terestrické toxicity byla publikována v časopise Chemical Papers (IF – 1,246). Počet citací tohoto článku je v současnosti 6. Výsledky ekotoxikologických experimentů jsou citovány například ve studii, ve které byl zjišťován vliv mikročástic plastů na střevní mikrobiom roupic *E. crypticus*¹¹⁰. Dále například v publikaci, jež shrnuje současné poznatky o účincích nanočástic na rostliny a půdní organismy¹¹¹ anebo ve studii, ve které byl zkoumán toxický účinek nanočástic oxidu zinečnatého pro sladkovodní společenstvo tvořené hrotnatkou *Daphnia magna* a rostlinou *Lemna minor*¹¹².

Jelikož je v rámci ekotoxikologických studií důležité také hodnocení příjmu polutantů organismem, v návaznosti na předchozí studii bylo zapotřebí vytvořit metodu pro kvantitativní analýzu prvků obsažených ve vzorcích tkání roupic a agarového expozičního média. V této studii byl vyvinut rychlý a poměrně jednoduchý postup přípravy vzorků biomasy *E. crypticus* a agarů z ekotoxikologických testů. Jako analytická koncovka byla

zvolena metoda ICP-OES, která se jeví jako spolehlivá, s uspokojivým limitem detekce a přijatelnou opakovatelností. Navrhovaná metoda je snadno proveditelná, nevyžadující speciální obsluhu, čas ani chemikálie. Metoda byla publikována v časopise *Chemical Papers* (IF – 1,246). Tato publikace zatím nebyla citována.

Třetí část předložené disertační práce si kladla za cíl otestovat toxicitu nanočástic na rouspici kultivované v agarovém expozičním médiu se zvýšenou environmentální relevancí. Agar byl modifikován přidavkem modelových půdních složek za účelem studia vlivu interakcí s půdními složkami na chování nanočástic v expozičním médiu. Plnění cíle opět probíhalo v rámci dvou studií, které se lišily použitými půdními složkami. Výsledky získané ve studii zabývající se vlivem kaolinu, HA a jejich kombinací byly publikovány v časopise *Environmental Science and Pollution Research* (IF – 2,914). Publikace byla citována zatím v jedné studii, ve které byly zkoumány možné účinky směsí oxidu zinečnatého, nanočástic ZnO a fungicidu propikonazolu na rouspici *Enchytraeus albidus*¹¹³. Výsledky získané ve studii, kde byl porovnáván vliv odlišných zdrojů HA na toxicitu ZnO-NPs byly publikovány v recenzovaném časopisu *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A, Faculty of Chemical Technology*. Vysoce umělejší povaha navrhovaného testovacího systému na bázi agarového expozičního média, která je spojena se sníženým stupněm environmentální relevance, zřejmě brání použití této metody jako náhrady za testy prováděné v reálné půdní matrici. Na druhé straně, tato levná a jednoduchá metoda by mohla najít uplatnění jako nástroj v prvním stupni hodnocení environmentálních rizik nanomateriálů nebo ve studiích zabývajících se vlivem fyzikálně-chemických podmínek na toxicitu nanočástic.

Kromě výše uvedených výsledků, byla metoda pro testování akutní toxicity v expozičním médiu na bázi agaru využita také v rámci diplomových prací, jejichž výsledky nebyly publikovány. Například bylo provedeno testování toxicity stříbrných nanočástic a nanočástic stříbra se sulfidizovaným povrchem (Ag-Ag₂S). V této práci nebylo možno s využitím v laboratoři připravených Ag-NPs dosáhnout v agarech koncentrací (více než 100 mg Ag kg⁻¹ agaru), které by vyvolaly odezvu organismu umožňující výpočet hodnoty parametru LC₅₀¹¹⁴. V jiné diplomové práci byl agar modifikován přidavkem písku, v jeho přítomnosti však nebyl v porovnání s ostatními půdními složkami pozorován statisticky významný efekt na toxicitu ZnO-NPs¹¹⁵.

Metoda testování v agaru byla upravena pro testy sub-akutní toxicity, v nichž byla expozice prodloužena z 96 hodin na 10 dní a pro testy chronické toxicity (3 týdny). Na našem pracovišti byly za tímto účelem zavedeny biochemické testy pro detekci oxidativního stresu (malondialdehyd, celkový glutathion). Kromě nanočástic byla v agaru testována toxicita gadolinia, kontrastních látek na bázi gadolinia a mikročástic polystyrenu. Publikace jsou zatím v přípravné fázi. Pro budoucí experimenty je plánováno rozšíření baterie testů využívajících agaru pro testy na půdních mikroorganismech, rostlinách, žížalách a vícedruhové testy.

4 POUŽITÁ LITERATURA

1. do Amaral DF, Guerra V, Motta AGC, de Melo E Silva D a Rocha TL: Ecotoxicity of nanomaterials in amphibians: A critical review. *Sci Total Environ* 2019, 686:332-344.
2. Oomen AG, Steinhauser KG, Bleeker EAJ, van Broekhuizen F, Sips A, Dekkers S, Wijnhoven SWP a Sayre PG: Risk assessment frameworks for nanomaterials: Scope, link to regulations, applicability, and outline for future directions in view of needed increase in efficiency. *NanoImpact* 2018, 9:1-13
3. Rajput VD, Minkina TM, Behal A, Sushkova SN, Mandzhieva S, Singh R, Gorovtsov A, Tsitsuashvili VS, Purvis WO, Ghazaryan KA a Movsesyan HS: Effects of Zinc-oxide Nanoparticles on Soil, Plants, Animals and Soil Organisms: A Review. *Environ Nanotechnol Monit Manage* 2018 9:76-84.
4. Giese B, Klaessig F, Park B, Kaegi R, Steinfeldt M, Wigger H, von Gleich A a Gottschalk F: Risks, Release and Concentrations of Engineered Nanomaterial in the Environment. *Sci Rep* 2018 8(1):1565.
5. Gottschalk F, Sun TY a Nowack B: Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environ Pollut* 2013, 181:287-300.
6. Gatoo MA, Naseem S, Arfat MY, Mahmood Dar A, Qasim K a Zubair S: Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations. *BioMed Res Int* 2014, 2014:1-8.
7. Gurr JR, Wang ASS, Chen CH a Jan KY: Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 2005, 213(1-2):66-73.
8. Georgieva JV, Kalicharan D, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Hoekstra D a Zuhorn IS: Surface characteristics of nanoparticles determine their intracellular fate in and processing by human blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *Mol Ther* 2011, 19(2):318-325.
9. Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T a Rotello VM: Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chem* 2004, 15(4):897-900.
10. Sayes CM, Fortner JD, Guo W, Lyon D, Boyd AM, Ausman KD, Tao YJ, Sitharam B, Wilson LJ, Hughes JB, West JL a Colvin VL: The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Lett* 2004, 4(10):1881-1887.
11. Kirchner C, Liedl T, Kudera S, Pelegrino T, Javier AM, Gaub HE, Stolzle S, Fertig N a Parak WJ: Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett* 2005, 5(2):331-338.
12. Guo G, Liu W, Liang J, He Z, Xu H Yang X: Probing the cytotoxicity of CdSe quantum dots with surface modification. *Mater Lett* 2007, 61(8-9):1641-1644.
13. Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ a Lead JR: Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem* 2008, 27(9):1825-1851.
14. Jiang J, Oberdorster G a Biswas P: Characterization of size, surface charge and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res* 2009, 11(1):77-89.
15. Batley GE, Kirby JK a McLaughlin MJ: Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments. *Acc Chem Res* 2012, 46:854-862.
16. Baalousha M: Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Sci Total Environ* 2009, 407:2093-2101.

17. Town RM a van Leeuwen HP: Metal ion-humic acid nanoparticle interactions: role of both complexation and condensation mechanisms. *Phys Chem Chem Phys* 2016, 27:18024-18032.
18. Wang Z, Zhang L, Zhao J, Xing B: Environmental processes and toxicity of metallic nanoparticles in aquatic systems as affected by natural organic matter. *Environ Sci Nano* 2016, 3:240-255
19. Bae E, Park HJ, Yoon J, Kim Y, Choi K a Yi J: Bacterial uptake of silver nanoparticles in the presence of humic acid and AgNO₃. *Korean J Chem Eng* 2011, 28:267-271.
20. Lowry GV, Gregory KB, Apte SC a Lead JR: Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environ Sci Technol* 2012, 46:6893-6899.
21. Liu J a Hurt RH: Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environ Sci Technol* 2010, 44:2169-2175.
22. Baun A, Sayre P, Steinhauser KG a Rose J: Regulatory relevant and reliable methods and data for determining the environmental fate of manufactured nanomaterials. *NanoImpact* 2017, 8:1-10.
23. Thalmann B, Voegelin A, von Gunten U, Behra R, Morgenroth E a Kaegi R: Effect of ozone treatment on Nano-sized silver sulfide in wastewater effluent. *Environ Sci Technol* 2015, 49(18):10911-10919.
24. Park CM, Chu KH, Heo J, Her N, Jang M, Son A a Yoon Y: Environmental behavior of engineered nanomaterials in porous media: a review. *J Hazard Mater* 2016, 309:133-150.
25. Peralta-Videa JR, Zhao L, Lopez-Moreno ML, De La Rosa G, Hong J, Gardea-Torresdey JL: Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008-2010. *J Hazard Mater* 2011, 186(1):1-15.
26. Cornelis VG, Doolette CTM, McLaughlin MJ, Kirby JK, Beak DG a Chittleborough D: Retention and dissolution of engineered silver nanoparticles in natural soils. *Soil Sci Soc Am J* 2012, 76(3):891-902.
27. Fang J, Shan X, Wen B, Lin J a Owens G: Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns. *Environ Pollut* 2009, 157(4):1101-1109.
28. Darlington T, Neigh AM, Spencer MT, Nguyen OT a Oldenburg SJ: Nanoparticle characteristics affecting environmental fate and transport through soil. *Environ Toxicol Chem* 2009, 28(6):1191-1199.
29. Chen KL, Mylon SE a Elimelech M: Enhanced aggregation of alginate-coated iron oxide (Hematite) nanoparticles in the presence of calcium, strontium and barium cations. *Langmuir* 2007, 23:5920-5928.
30. Cornelis G, Pang L, Doolette C, Kirby JK a McLaughlin MJ: Transport of silver nanoparticles in saturated columns of natural soils. *Sci Total Environ* 2013, 463:120-130.
31. Liang Y, Bradford SA, Simunek J, Vereecken H a Klumpp E: Sensitivity of the transport and retention of stabilized silver nanoparticles to physicochemical factors, *Water Res* 2013, 47:2572-2582.
32. Lu Y, Yang K a Lin D: Transport of surfactant-facilitated multiwalled carbonnanotube suspensions in columns packed with sized soil particles. *Environ Pollut* 2014, 192:36-43.
33. Cornelis VG, Hund-Rike K, Kuhlbusch T, van den Brink N a Nickel C: Fate and bioavailability of engineered nanoparticles in soils: A review. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2014, 44(24):2720-2764.

34. Saleh NB, Pfefferle LD a Elimelech M: Influence of biomacromolecules and humic acid on the aggregation kinetics of single-walled carbon nanotubes. *Environ Sci Technol* 2010, 44:2412-2418.
35. Zhang W, Schwab AP, White JC a Ma X: Impact of nanoparticle surface properties on the attachment of cerium oxide nanoparticles to sand and kaolin. *J Environ Qual* 2018, 47:129-138.
36. Tang Z a Cheng T: Stability and aggregation of nanoscale titanium dioxide particle (nTiO₂): effect of cation valence, humic acid, and clay colloids. *Chemosphere* 2018, 192:51-58.
37. Adrian YF, Schneidewind U, Bradford SA, Simunek J, Fernandez-Steegeer TM a Azzam R: Transport and retention of surfactant and polymer-stabilized engineered silver nanoparticles in silicate-dominated aquifer material. *Environ Pollut* 2018, 236:195-207.
38. Braun A, Klumpp E, Azzam R a Neukum C: Transport and deposition of stabilized engineered silver nanoparticles in water saturated loamy sand and silty loam. *Sci Total Environ* 2015, 535:102-112.
39. Han B, Liu W, Zhao X, Cai Z a Zhao D: Transport of multi-walled carbon nanotubes stabilized by carboxymethyl cellulose and starch in saturated porous media: influences of electrolyte, clay and humic acid. *Sci Total Environ* 2017, 599:188-197.
40. Lu T, Xia T, Qi Y, Zhang C a Chen W: Effects of clay minerals on transport of graphene oxide in saturated porous media. *Environ Toxicol Chem* 2017, 36:655-660.
41. Sun P, Zhang K, Fang J, Lin D, Wang M a Han J: Transport of TiO₂ nanoparticles in soil in the presence of surfactants. *Sci Total Environ* 2015, 527:420-428.
42. Bayat AE, Junin R, Derahman MN a Samad AA: TiO₂ nanoparticle transport and retention through saturated limestone porous media under various ionic strength conditions. *Chemosphere* 2015, 134:7-15.
43. Fujita Y a Kobayashi M: Transport of colloidal silica in unsaturated sand: effect of charging properties of sand and silica particles. *Chemosphere* 2016, 154:179-186.
44. Rawat S, Pullagurala VLR, Adisa IO, Wang Y, Peralta-Videa JR a Gardea-Torresdey JL: Factors affecting fate and transport of engineered nanomaterials in terrestrial environments. *Curr Opin Environ Sci Health* 2018, 6:47-53.
45. Wang Y, Li Y a Pennell KD: Influence of electrolyte species and concentration on the aggregation and transport of fullerene nanoparticles in quartz sands. *Environ Toxicol Chem* 2008, 27:1860-1867.
46. Han B, Liu W, Zhao X, Cai Z a Zhao D: Transport of multi-walled carbon nanotubes stabilized by carboxymethyl cellulose and starch in saturated porous media: influences of electrolyte, clay and humic acid. *Sci Total Environ* 2017, 599:188-197.
47. Zhang M, Bradford SA, Simunek J, Vereecken H a Klumpp E: Roles of cation valence and exchange on the retention and colloid-facilitated transport of functionalized multi-walled carbon nanotubes in a natural soil. *Water Res* 2017, 109:358-366.
48. Predelus D, Coutinho AP, Lassabatere L, Bien LB, Winiarski T a Angulo-Jaramillo R: Combined effect of capillary barrier and layered slope on water, solute and nanoparticle transfer in an unsaturated soil at lysimeter scale. *J Contam Hydrol* 2015, 181:69-81.
49. Conway JR a Keller AA: Gravity-driven transport of three engineered nanomaterials in unsaturated soils and their effects on soil pH and nutrient release. *Water Res* 2016, 98:250-260.
50. Liu L, Gao B, Wu L, Morales VL, Yang L, Zhou Z a Wang H: Deposition and transport of graphene oxide in saturated and unsaturated porous media. *Chem Eng J* 2013, 229:444-449.

51. Tian Y, Gao B, Morales VL, Wang Y a Wu L: Effect of surface modification on single-walled carbon nanotube retention and transport in saturated and unsaturated porous media. *J Hazard Mater* 2012, 239:333-339.
52. Zhang L, Hou L, Wang L, Kan AT, Chen W a Tomson MB: Transport of fullerene nanoparticles (nC₆₀) in saturated sand and sandy soil: controlling factors and modeling. *Environ Sci Technol* 2012, 46:7230-7238.
53. Sasidharan S, Torkzaban S, Bradford SA, Cook PG a Gupta VVSR: Temperature dependency of virus and nanoparticle transport and retention in saturated porous media. *J Contam Hydrol* 2017, 196:10-20.
54. Wang M, Gao B, Tang D, Sun H, Yin X a Yu C: Effects of temperature on graphene oxide deposition and transport in saturated porous media. *J Hazard Mater* 2017, 331:28-35.
55. McNew CP a LeBoeuf EJ: The role of attached phase soil and sediment organic matter physicochemical properties on fullerene (nC₆₀) attachment. *Chemosphere* 2015, 139:609-616.
56. Joo SH a Zhao D: Environmental dynamics of metal oxide nanoparticles in heterogeneous systems: a review. *J Hazard Mater* 2017, 322:29-47.
57. Dwivedi AD, Dubey SP, Sillanpaa M, Kwon Y, Lee C a Varma RS: Fate of engineered nanoparticles: implications in the environment. *Coord Chem Rev* 2015, 287:64-78.
58. Klitzke S, Metreveli G, Peters A, Schaumann GE a Lang F: The fate of silver nanoparticles in soil solution — sorption of solutes and aggregation. *Sci Total Environ* 2015, 535:54-60.
59. Gao X, Spielman-Sun E, Rodrigues S, Casman EA a Lowry GV: Time and nanoparticle concentration affect the extractability of Cu from CuO NP-amended soil. *Environ Sci Technol* 2017, 51:2226-2234.
60. Huang Y, Zhao L a Keller AA: Interactions, transformations, and bioavailability of nano-copper exposed to root exudates. *Environ Sci Technol* 2017, 51:9774-9783.
61. Mudunkotuwa IA, Pettibone JM a Grassian VH: Environmental implications of nanoparticle aging in the processing and fate of copper-based nanomaterials. *Environ Sci Technol* 2012, 46:7001-7010.
62. Handy RD, Cornelis G, Fernandes T, Tsyusko O, Decho A, Sabo-Attwood T, Metcalfe C, Steevens JA, Klaine SJ, Koelmans AA a Horne N: Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: Practical experiences and recommendations from the bench. *Environ Toxicol Chem* 2012, 31(1):15-31.
63. Rasmussen K, Rauscher H, Kearns P, Gonzalez M a Riego Sintes J: Developing OECD test guidelines for regulatory testing of nanomaterials to ensure mutual acceptance of test data. *Regul Toxicol Pharm* 2019, 104:74-83.
64. Crane M, Handy R, Garrod J a Owen R: Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* 2008, 17:421-437.
65. Amorim MJB, Rombke J a Soares AMVM: Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: Effects of Benomyl, Carbendazim, phenmedipham and different soil types. *Chemosphere* 2005, 59:501-510.
66. Garcia M, Rombke J, de Brito MT a Scheffczyk A: Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environ Pollut* 2007, 153(2):450-456.
67. Lock K a Janssen CR: Comparative toxicity of a zinc salt, zinc powder and zinc oxide to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Chemosphere* 2003, 53(8):851-856.

68. Novais SC, Gomes SIL, Gravato C, Guilhermino L, de Coen W, Soares AMVM a Amorim MJB: Reproduction and biochemical responses in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) to zinc or cadmium exposures. *Environ Pollut* 2011, 159(7):1836-1843.
69. Ben-Moshe T, Frenk S, Dror I, Minz D a Berkowitz B: Effects of metal oxide nanoparticles on soil properties. *Chemosphere* 2013, 90(2):640-646.
70. Garcia-Gomez C, Babin M, Obrador A, Alvarez JM a Fernandez MD: Toxicity of ZnO nanoparticles, ZnO bulk, and ZnCl₂ on earthworms in a spiked natural soil and toxicological effects on leachates on aquatic organisms. *Arch Environ Contam Toxicol* 2014, 67(4):465-473.
71. Heggelund LR, Diez-Ortiz M, Loftis S, Lahive E, Jurkschat K, Wojnarowicz J, Cedergreen N, Spurgeon D a Svendsen C: Soil pH effects on the comparative toxicity of dissolved zinc, non-nano and nano ZnO to the earthworm *Eisenia fetida*. *Nanotoxicology* 2014, 8(5):559-572.
72. Tourinho PS, van Gestel CAM, Loftis S, Svendsen C, Soares AMVM a Loureiro S: Metal-based nanoparticles in soil: fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environ Toxicol Chem* 2012, 31(8):1679-1692.
73. Pachapur VL, Larios AD, Cledon M, Brar SK, Verma M a Surampalli RY: Behavior and characterization of titanium dioxide and silver nanoparticles in soil. *Sci Total Environ* 2016, 563-564:933-943.
74. Li LZ, Zhou, DM, Peijnenburg WJGM, van Gestel CAM, Jin SY, Wang YJ a Wang P: Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. *Environ Int* 2011, 37(6):1098-1104.
75. Cui D, Zhang P, Ma Y, He X, Li Y, Zhang J, Zhaou Y a Zhang Z: Effect of cerium oxide nanoparticles on asparaagus lettuce cultured in an agar medium. *Environ Sci Nano* 2014, 1(5):459-465.
76. Lee WM, Kwak JIL a Youn-Joo AN: Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere* 2012, 86(5):491-499.
77. van der Ploeg MJC, Handy RD, Waalewijn-Kool PL, van den Berg JHJ, Rivera ZEH, Bovenschen J, Molleman B, Baveco JM, Tromp P, Peters RJB, Koopmans GF, Rietjens IMCM a van den Brink NW: Effects of silver nanoparticles (NM-300K) on *Lumbricus rubellus* earthworms and particle characterization in relevant test matrices including soil. *Environ Toxicol Chemistry* 2014, 33(4):743-752.
78. Canas JE, Qi B, Li S, Maul JD, Cox SB, Das S a Green MJ: Acute and reproductive toxicity of nano-sized metal oxides (ZnO and TiO₂) to earthworms (*Eisenia fetida*). *J Environ Monit* 2011, 13(12):3351-3357.
79. Hjorth R, Skjolding LM, Sorensen SN a Baun A: Regulatory adequacy of aquatic ecotoxicity testing of nanomaterials. *NanoImpact* 2017, 8:28-37.
80. Hartmann NB, Jensen KA, Baun A, Rasmussen K, Rauscher H, Tantra R, Cupi D, Gilliland D, Pianella F, Riego Sintes JM: Techniques and protocols for dispersing nanoparticle powders in aqueous media-is there a rationale for harmonization? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2015, 18:299-326.
81. Chen PJ, Wu WL a Wu KCW: The zerovalent iron nanoparticle causes higher developmental toxicity than its oxidation products in early life stages of medaka fish. *Water Res* 2013, 47:3899-3909.
82. Zhu X, Tian S a Cai Z: Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *PLoS ONE* 7 2012, e46286. doi:10.1371/journal.pone.0046286

83. Auffan M, Bertin D, Chaurand P, Pailles C, Dominici C, Rose J, Bottero JY a Thierry A: Role of molting on the biodistribution of CeO₂ nanoparticles within *Daphnia pulex*. *Water Res* 2013, 47:3921-3930.
84. Hartmann NB, Legros S, Von der Kammer F, Hofmann T a Baun A: The potential of TiO₂ nanoparticles as carriers for cadmium uptake in *Lumbriculus variegatus* and *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 2012, 118-119:1-8.
85. Campos B, Rivetti C, Rosenkranz P, Navas JM a Barata C: Effects of nanoparticles of TiO₂ on food depletion and life-history responses of *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 2013, 130-131:174-183.
86. Tejamaya M, Romer I, Merrifield RC a Lead JR: Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environ Sci Technol* 2012, 46: 7011-7017.
87. Roomer I, Gavin AJ, White TA, Merrifield RC, Chipman JK, Viant MR a Lead JR: The critical importance of defined media conditions in *Daphnia magna* nanotoxicity studies. *Toxicol Lett* 2013, 223:103-108.
88. Cupi D, Hartmann NB a Baun A: Influence of pH and media composition on suspension stability of silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles and immobilization of *Daphnia magna* under guideline testing conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 2016, 127:144-152.
89. ISO (2004). ISO 16387: Soil quality — effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) – determination of effects on reproduction and survival. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
90. OECD (2004). OECD 220: Guidelines for testing of chemicals – Enchytraeid reproduction test. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
91. Waalewijn-Kool PL, Dieez-Ortiz M a van Gestel CAM: Effect of different spiking procedures on the distribution and toxicity of ZnO nanoparticles in soil. *Ecotoxicology* 2012, 21:1797-1804.
92. Kool PL, Dieez-Ortiz M a van Gestel CAM: Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl₂ to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environ Pollut* 2011, 159:2713-2719.
93. Castro-Ferreira MP, Roelofs D, van Gestel CAM, Verweij RA, Soares A a Amorim MJB: *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. *Chemosphere* 2012, 87(11):1222-1227.
94. OECD (2010) Test No. 317: Bioaccumulation in Terrestrial Oligochaetes. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264090934-en>
95. Cedergreen N, Holm PE a Marcussen H: The use of elements as a substitute for biomass in toxicokinetic studies in small organisms. *Ecotoxicology* 2013, 22(10):1509-1515.
96. Maurer-Jones MA, Gunsolus IL, Murphy CJ a Haynes CL: Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Anal Chem* 2013, 85: 3036-3049.
97. Phipps GL, Mattson VR a Ankley GT: Relative sensitivity of three freshwater benthic macroinvertebrates to ten contaminants. *Arch Environ Contam Toxicol* 1995, 28:281-286.
98. Posthuma L, Baerselman R, Van Veen RP a Dirven-Van Breemen EM: Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotoxicol Environ Saf* 1997, 38:108-121.
99. Owojori OJ, Reinecke AJ a Rozanov AB: Role of clay content in partitioning, uptake and toxicity of zinc in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009, 72:99-107.

100. Shao-Wei B, Mudunkotuwa IA, Rupasinghe T a Grassian VH: Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. *Langmuir* 2011, 27:6059-6068.
101. Sanchez-Marin P, Lorenzo JI, Blust R a Beiras R: Humic acids increase dissolved lead bioavailability for marine invertebrates. *Environ Sci Technol* 2007, 41:5679-5684.
102. Khare P, Sonane M, Pandey R, Ali S, Gupta KC a Satish A: Adverse effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. *J Biomed Nanotechnol* 2011, 7:116-117.
103. Akhil K a Sudheer Khan S: Effect of humic acid on the toxicity of bare and capped ZnO nanoparticles on bacteria, algal and crustacean systems. *J Photochem Photobiol B* 2017, 167:136-149.
104. Li LZ, Zhou DM, Peijnenburg WJGM, van Gestel CAM, Jin SY, Wang YJ a Wang P: Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. *Environ Int* 2011, 37:1098-1104.
105. Koukal B, Gueguen C, Pardos M a Dominik J: Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere* 2003, 53:953-961.
106. Kungolos A, Samaras P, Tsiridis V, Petala M a Sakellaropoulos G: Bioavailability and toxicity of heavy metals in the presence of natural organic matter. *J Environ Sci Health A* 2006, 41:1509-1517.
107. Ouyang K, Yu XY, Zhu Y, Gao C, Huang Q a Cai P: Effects of humic acid on the interactions between zinc oxide nanoparticles and bacterial biofilms. *Environ Pollut* 2017, 231:1104-1111.
108. Laux, P, Riebeling C, Booth AM, et al.: Challenges in characterizing the environmental fate and effects of carbon nanotubes and inorganic nanomaterials in aquatic systems. *Environ Sci Nano* 2018, 5(1): 48-63.
109. Kataoka C, Kato Y, Ariyoshi T, Takasu M, Narazaki T, Nagasaka S, Tatsuta H a Kashiwada S: Comparative toxicities of silver nitrate, silver nanocolloids, and silver chloro-complexes to Japanese medaka embryos, and later effects on population growth rate. *Environ Pollut* 2018, 233:1155-1163.
110. Zhu BK, Fang YM, Zhu D, Christie P, Ke X a Zhu YG: Exposure to nanoplastics disturbs the gut microbiome in the soil oligochaete *Enchytraeus crypticus*. *Environ Pollut* 2018, 239:408-415.
111. Medina-Perez G, Fernandez-Luqueno F, Campos-Montiel RG, et al: Effects of Nanoparticles on Plants, Earthworms, and Microorganisms. *Agricultural Nanobiotechnology* 2018, 161-181.
112. Fikirdesici Ergen S a Ucuncu Tunca E: Nanotoxicity modelling and removal efficiencies of ZnONP. *Int J Phytorem* 2017, 20(1):16-26.
113. Hackenberger DK, Stjepanovic N, Loncaric Z a Hackenberger BK: Effects of single and combined exposure to nano and bulk zinc-oxide and propiconazole on *Enchytraeus albidus*. *Chemosphere* 2019, 224:572-579.
114. Link, Jakub. Testy ekotoxicity nanočástic Ag s modifikovaným povrchem v kultivačním médiu potlačujícím aglomeraci. 2017. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
115. Vrzáčková, Inka. Testy ekotoxicity nanočástic ZnO na roupicích *Enchytraeus crypticus* prováděné v agarových médiích se zvýšenou environmentální relevancí. 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.

5 SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

Publikace v zahraničních a mezinárodních recenzovaných časopisech

- **Hrda K**, Pouzar M a Knotek P: Study of zinc oxide nanoparticles and zinc chloride toxicity to annelid *Enchytraeus crypticus* in modified agar-based media. *Environ Sci Pollut Res* 2018, 25(23):22702-22709.

[IF 2018 = 2,914] (CIT = 1)

- Patocka J, Krejčova A, Stojarova K, **Hrda K** a Pouzar M: The ICP-OES method for determination of zinc in *Enchytraeus crypticus* and agarose gel from ecotoxicological tests. *Chem Pap* 2018, 73(1):159-164.

[IF 2018 = 1,246] (CIT = 0)

- **Hrda K**, Oprsal J, Pouzar M, Knotek P a Vlcek M: Toxicity of zinc oxide nanoparticles to the annelid *Enchytraeus crypticus* in agar-based exposure media. *Chem pap* 2016, 70(11):1512-1520.

[IF 2018 = 1,246] (CIT = 6)

- Oprsal J, Blaha L, Pouzar M, Knotek P, Vlcek M a **Hrda K**: Assessment of silver nanoparticle toxicity for common carp (*Cyprinus carpio*) fish embryos using a novel method controlling the agglomeration in the aquatic media. *Environ Sci Pollut Res* 2015, 22:19124-19132.

[IF 2018 = 2,914] (CIT = 5)

Publikace v ostatních vědeckých recenzovaných časopisech

- Novotny L, Kabutey A a **Hrda K**: Tentative assessment of the agglomeration kinetics of waste nanoparticles based on its partial similarity to the electrosorption processes. *Waste Forum* 2018, (2):124-131.
- **Hrda K**, Konopacova E, Vrzackova I a Pouzar M: Influence of humic acids on zinc oxide nanoparticles and zinc chloride toxicity to *Enchytraeus crypticus* studied in agar based exposure media. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A, Faculty of Chemical Technology* 2018, (24):187-196.

Přednášky na mezinárodních konferencích

- **Hrda K**, Pouzar M a Novakova D: Ecotoxicity of nanomaterials to soil organisms - ecotoxicity testing in agar-based media. In NanoOstrava 2017. 5th nanomaterials and nanotechnology meeting. Ostrava: VSB-Technical University of Ostrava 2017 s. 79, ISBN 978-80-248-4043-7.
- **Hrda K** a Pouzar M: Factors affecting ecotoxicity of nanomaterials (Fate in liquid and solid media), EAWAG Research Institut, Dubendorf – Zurich, Switzerland, 21. – 24. 11. 2016.

Postery na mezinárodních konferencích

- Pouzar M, **Hrda K** a Novakova D: Ecotoxicity of nanomaterials to soil organisms – optimization of agar-based exposure media composition. In NanoOstrava 2017. 5th nanomaterials and nanotechnology meeting. Ostrava: VSB-Technical University of Ostrava 2017 s. 85, ISBN 978-80-248-4043-7.
- **Hrda K**, Oprsal J, Knotek P, Pouzar M a Vlcek M: Ecotoxicity of Nanomaterials to the Annelid *Enchytraeus crypticus* Studied in Modified Agar-based Exposure Media, 8th International Conference on Nanomaterials - NANOCON, Brno, Czech Republic, 19. – 21. 10. 2016, NANOCON 2016 Proceedeings of Abstracts str. 125, ISBN: 978-80-87294-68- 0.
- **Hrda K**, Pouzar M a Oprsal J: Ecotoxicity test of zinc oxide nanoparticles performed in highly viscous environment, 7th International Conference on Nanomaterials - NANOCON, Brno, Czech Republic, 14. – 16. 10. 2015, NANOCON 2015 Proceedeings of Abstracts str. 114, ISBN: 978-80-87294-59- 8.

Přednášky na domácích konferencích

- **Hrda K**: Pokroky v testování ekotoxicity nanomateriálů, 43. Ročník Konference Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie 2016, Kouty nad Desnou, 9. – 12. 5. 2016, str. 32, ISBN: 978-80-7395-981-4.

Ostatní příspěvky ve sbornících konferencí

- Patocka J, Stojarova K, **Hrda K**, Krejcová A a Pouzar M: Analysis of zinc in the *Enchytraeus crypticus* organism, 69. Zjazd chemikov, Horny Smokovec – Slovensko, 11 – 15. 9. 2017, sborník (ChemZi 13/1 2017) str. 142, ISSN 1336-7242.

6 PŘÍLOHY

Příloha 1 Assessment of silver nanoparticle toxicity for common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) fish embryos using a novel method controlling the agglomeration in the aquatic media	91
Příloha 2 Tentative assessment of the agglomeration kinetics of waste nanoparticles based on its partial similarity to the electrosorption processes.	100
Příloha 3 Toxicity of zinc oxide nanoparticles to the annelid <i>Enchytraeus crypticus</i> in agar-based exposure media.....	108
Příloha 4 The ICP-OES method for determination of zinc in <i>Enchytraeus crypticus</i> and agarose gel from ecotoxicological tests.....	117
Příloha 5 Study of zinc oxide nanoparticles and zinc chloride toxicity to annelid <i>Enchytraeus crypticus</i> in modified agar-based media.....	123
Příloha 6 Influence of humic acids on zinc oxide nanoparticles and zinc chloride toxicity to <i>Enchytraeus crypticus</i> studied in agar based exposure media	135