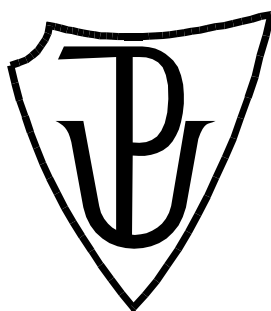


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium distribuce kovů v rostlinných orgánech pomocí ICP-MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Vincent Račuch
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Monika Rozehnalová, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Vincent Račuch

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucí mé práce Mgr. Monice Rozehnalové, Ph.D. za její trpělivost a odborné vedení. Dále můj dík patří doc. RNDr. Petru Tarkowskému a RNDr. Tomáši Pluháčkovi, Ph.D. za všechny konzultace a cenné rady při řešení dané problematiky.

Dále bych chtěl poděkovat institucím CRH, VÚRV a RCPTM za poskytnutý prostor a prostředky k vypracování diplomové práce. V neposlední řadě děkuji za veškerou podporu, kterou mi poskytla má rodina a nejbližší.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory projektu IGA UP č. IGA_PrF_2019_022.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Vincent Račuch
Název práce	Studium distribuce kovů v rostlinných orgánech pomocí ICP-MS
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Monika Rozehnalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Teoretická část je v první kapitole zaměřena na minerální výživu rostlin a na důležitost makrobiogenních a mikrobiogenních prvků. Následující kapitola shrnuje poznatky o nanočásticích a nanotechnologiích. Konkrétně se jedná o jejich definici a využití, osud v prostředí a ekotoxicitu, fytotoxicitu a detoxikační mechanismy rostlin. V této kapitole je kladen důraz především na nejvíce používaný materiál v nanotechnologii a tím je TiO₂. Poslední kapitola teoretické části je věnována hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), propojení ICP-MS s laserovou ablací (LA-ICP-MS) a plamenové fotometrii.

V experimentální části byly pěstovány ředkvičky (*Raphanus sativus*) v Hoaglandově roztoku o ¼ síle. Hoaglandův roztok byl obohacen nanočásticemi TiO₂ o různých koncentracích (0, 1, 10, 100 a 1000 ppm). Byla porovnávána čerstvá a suchá hmotnost jednotlivých orgánů rostliny po ošetření různými koncentracemi nanočástic. Byla stanovena aktivita antioxidantních enzymů (katalasy, askorbátperoxidasy a guajakolperoxidasy). Pomocí plamenové fotometrie a ICP-MS roztokové analýzy byla stanovena koncentrace 9 prvků: Mn, Fe, Cu, Zn, Na, Mg, K, Ca, Ti v rostlinných orgánech. Rychlý sken napříč osou celé rostliny kontroly a 1000 ppm laserovou ablací poskytl potvrzení hodnot z roztokové analýzy. Dále byla provedena vizualizace profilu vybraných kovů pomocí LA-ICP-MS, konkrétně byly vytvořeny mapy listů (kontroly a 1000 ppm) zobrazující distribuci prvků v listové ploše.

Klíčová slova	Minerální výživa, nanočástice, TiO ₂ , ICP-MS, LA-ICP-MS, <i>Raphanus sativus</i>
Počet stran	97
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Vincent Račuch
Title	Study of metal distribution in plant organs using ICP-MS
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Monika Rozehnalová, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

The theoretical part in the first chapter focuses on the mineral nutrition of plants and the importance of macrobiogenic and microbiogenic elements. The following chapter summarizes the knowledge about nanoparticles and nanotechnologies. Specifically, it summarizes their definition and use, designation in environment and ecotoxicity, phytotoxicity and detoxification mechanisms of plants. In this chapter, emphasis is placed on the most used material in nanotechnology, namely TiO₂. The last chapter of the theoretical part of the thesis deals with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), connection of ICP-MS with laser ablation (LA-ICP-MS) and flame photometry.

In the experimental part, radishes (*Raphanus sativus*) were grown in ¼ strength Hoagland solution. The Hoagland solution was enriched with TiO₂ nanoparticles of various concentrations (0, 1, 10, 100 and 1000 ppm). The fresh and dry weights of individual plant organs after treatment with different concentrations of nanoparticles were compared. Activity of antioxidant enzymes (catalase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase) was determined. The concentrations of 9 elements: Mn, Fe, Cu, Zn, Na, Mg, K, Ca, Ti in plant organs was determined by flame photometry and ICP-MS solution analysis. A rapid scan across the axis of the control plant and 1000 ppm by laser ablation gave confirmed the solution analysis values. Furthermore, the profile of selected metals was visualized using LA-ICP-MS, specifically map of sheets (controls and 1000 ppm) were created showing the distribution of elements in the leaf area.

Keywords	Mineral nutrition, nanoparticles, TiO ₂ , ICP-MS, LA-ICP-MS, <i>Raphanus sativus</i>
Number of pages	97
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Minerální výživa.....	3
2.1.1	Makroprvky	5
2.1.1.1	Draslík	5
2.1.1.1.1	Výskyt.....	5
2.1.1.1.2	Příjem a distribuce	5
2.1.1.1.3	Biologické funkce.....	6
2.1.1.2	Vápník	7
2.1.1.2.1	Výskyt.....	7
2.1.1.2.2	Příjem a distribuce	7
2.1.1.2.3	Biologické funkce.....	7
2.1.1.3	Hořčík.....	8
2.1.1.3.1	Výskyt.....	8
2.1.1.3.2	Příjem a distribuce	8
2.1.1.3.3	Biologické funkce.....	8
2.1.2	Mikroprvky	11
2.1.2.1	Měď	11
2.1.2.2	Železo	12
2.1.2.3	Mangan	13
2.1.2.4	Zinek.....	14
2.2	Nanočástice a Nanotechnologie	15
2.2.1	Definice a využití	15
2.2.2	Produkce a zdroje uvolňování NP.....	18
2.2.3	Osud nanočástic v prostředí.....	19
2.2.4	Ekotoxicita.....	20
2.2.5	Účinky nanočástic a jejich mechanismy toxicity	21
2.2.6	Nanočástice a rostliny	23
2.2.6.1	Příjem a distribuce v rostlině	24
2.2.6.2	Příjem a translokace v kulturních plodinách	26
2.2.6.3	Účinky na rostliny	28
2.2.6.4	Vliv nanotechnologií na obsah živin.....	28
2.2.6.5	Fytotoxicita	29
2.2.6.6	Vlastní mechanismus detoxikace rostlin vůči toxicitě MNP	30

2.2.7	Nanočástice titanu	32
2.2.7.1	Využití a syntéza.....	32
2.2.7.2	Ekotoxicita nano TiO ₂	33
2.2.7.3	Nano TiO ₂ a rostliny	35
2.3	Metody	36
2.3.1	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).....	36
2.3.1.1	Instrumentace a princip	36
2.3.1.2	Interference	38
2.3.1.3	LA-ICP-MS	39
2.3.1.3.1	Historie a využití	39
2.3.1.3.2	Instrumentace a experimentální uspořádání.....	40
2.3.1.3.3	Fracionace a parametry ovlivňující ablační děj.....	41
2.3.2	Plamenová fotometrie.....	42
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
3.1	Materiály a přístroje.....	43
3.1.1	Použité chemikálie	43
3.1.2	Přístroje a pomůcky.....	44
3.1.3	Biologický materiál.....	45
3.2	Metody	45
3.2.1	Kultivace rostlin.....	45
3.2.1.1	Příprava kultivačních roztoků.....	47
3.2.1.1.1	Hoaglandův kultivační roztok	47
3.2.1.1.2	Roztok obohacený o nanočástice titanu.....	48
3.2.1.1.3	Roztok Fe(EDTA)	48
3.2.1.2	Zpracování rostlinného materiálu	48
3.2.2	Spektrofotometrické stanovení enzymové aktivity.....	48
3.2.3	Analýza mikroprvků a titanu pomocí ICP-MS	49
3.2.4	Analýza makroprvků pomocí plamenové fotometrie.....	52
3.2.5	Distribuce prvků pomocí LA-ICP-MS	52
3.2.5.1	Sken a imaging rostlinných pletiv.....	52
4	VÝSLEDKY	54
4.1	Čerstvá a suchá biomasa	54
4.2	Spektrofotometrické stanovení enzymové aktivity	55
4.3	ICP-MS	57
4.4	Plamenová fotometrie	60

4.5	LA-ICP-MS	62
4.5.1	Sken napříč celou rostlinou	62
4.5.2	Imaging listu	66
5	DISKUZE	69
5.1	Biomasa.....	69
5.2	Enzymová aktivita	70
5.3	Příjem TiO ₂	72
5.4	Prvkové složení	73
5.5	LA-ICP-MS	75
6	ZÁVĚR.....	77
7	LITERATURA	80
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	96

CÍLE PRÁCE

V teoretické části bylo cílem vypracování literární rešerše, ve které bylo rozebráno několik okruhů. Mezi témata obsažená v rešerši patří: minerální výživa rostlin; nanočástice kovů ve složkách životního prostředí; hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS); spojení laserové ablace s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (LA-ICP-MS).

Praktická část měla za cíl stanovení enzymové aktivity antioxidantních enzymů, vývoj a optimalizaci metody stanovení vybraných kovů v rostlinných orgánech a provedení vizualizace profilu vybraných kovů pomocí LA-ICP-MS.

1 ÚVOD

Rostliny ke svému růstu nezbytně potřebují makrobiogenní a mikrobiogenní prvky. Menší nebo větší, než adekvátní zásobování některým z těchto základních prvků vede k metabolickým poruchám, včetně změn v činnosti enzymů a rychlosti metabolických reakcí. Kromě změn v metabolických vzorcích, vážné nedostatky jednotlivých základních prvků také produkují soubor charakteristických účinků na vnější vzhled kořenů, stonků, listů, květů a plodů (Sathiyavani *et al.*, 2017).

Nanočástice a nanomateriály slouží k různým průmyslovým a komerčním účelům, což se odráží v jejich stále rostoucím objemu výroby. Tento vývoj je pravděpodobně usnadněn jejich jedinečnými obecnými vlastnostmi (velikost částic, povrch, povrchová reaktivita, náboj a tvar). Jejich produkce, používání a likvidace nevyhnutelně vede k jejich úniku do ovzduší, vody a půdy (Antisari *et al.* 2015). NP („Nanoparticles“) mohou vstoupit do potravního řetězce půdou, ve které jsou plodiny pěstovány (Pidgeon *et al.* 2009) a zvyšovat riziko bioakumulace v potravním řetězci pro zvířata a člověka (Zhu *et al.* 2008). Rico *et al.* (2011) diskutovali o účincích adsorpce, translokace a akumulace NP v plodinách, přičemž zdůraznili, že tyto procesy závisí na rostlinných druzích, velikosti, typu, chemickém složení a stabilitě NP.

Řízení environmentálních dopadů umělých nanomateriálů (ENM, „Engineered nanomaterials“) vyžaduje pochopení jejich potenciálních rizik a přínosů v rostlinách. ENM mají jak příznivé, tak i škodlivé účinky na kulturní plodiny. Současné chápání interakcí ENM s jedlými rostlinami však poskytuje málo informací o dlouhodobých dopadech na fyziologii plodin a kvalitu potravin. Nanotechnologie má potenciál prospívat zemědělství několika způsoby, nicméně jako nejzjevnější se jeví optimalizace uvolňování živin (nanofertilizátory) a zlepšení ochrany rostlin dodáváním nanopesticidů a nanoherbicidů (Gogos *et al.*, 2012).

Během posledních let byl učiněn značný pokrok v pochopení zdrojů, osudů a účinků nanočástic. Předpovědi koncentrací nanočástic v životním prostředí založené na modelovacích přístupech lze potvrdit měřeními koncentracemi v terénu. Nicméně analytické techniky se stále vyvíjejí, aby efektivněji a spolehlivěji charakterizovaly a kvantifikovaly nanočástice, jakož i jejich detekci v komplexních environmentálních maticích. V současné době patří mezi nejvhodnější techniky pro kvantifikaci nanočástic v rostlinných pletivech hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

(ICP-MS) a pro studium prostorové distribuce ICP-MS ve spojení s laserovou ablací (Mahdi *et al.*, 2017; Wojcieszek *et al.*, 2019).

V této práci byla jako modelová rostlina použita ředkev setá (*Raphanus sativus* L.), protože je celosvětově konzumována z důvodu jejího nutričního obsahu a antioxidačních vlastností (Baenas *et al.*, 2015). Ředkvička je významná kořenová zelenina, neboť vitamin B3, který ředkvičky v hojném množství obsahují, snižuje hladinu cholesterolu v krvi a vysoký krevní tlak. Před více než dvěma desetiletími byla ředkvička navržena jako modelová rostlina pro studium environmentálních stresů, zejména atmosférických kontaminantů (Kostka-Rick a Manning, 1993). Tato rostlina je vzhledem ke svému krátkému vegetačnímu období považována za vhodný model pro studium interakce rostlin s půdními kontaminanty (Létondor *et al.*, 2015).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Minerální výživa

Výrazem biogenní označujeme všechny prvky, které vytvářejí živé organismy. V těle rostlin se vyskytuje zhruba 60 prvků, kdy některé z nich jsou esenciální čili nepostradatelné. Esenciálními jsou ty prvky, které splňují následující kritéria. Nelze jeden prvek nahradit jiným, neboli jeho deficit nelze kompenzovat jinými prvky a má specifickou funkci v metabolismu rostliny. Nezbytný obsah jednotlivých prvků v sušině rostliny udává, jestli je prvek označován jako makrobiogenní nebo mikrobiogenní. Makrobiogenní prvky jako uhlík, vodík, kyslík, dusík, draslík, vápník, hořčík, fosfor a síra, jsou v 1 kg sušiny obsaženy v množství větším než 1000 mg (1 g). Mikrobiogenní prvky, jako chlor, železo, bor, mangan, zinek, měď, kobalt, molybden, jsou v 1 kg sušiny zastoupeny v množství menším než 100 mg (0,1 g) (Procházka *et al.*, 1998). Makrobiogenní a mikrobiogenní prvky, chemická značka, atomová hmotnost, forma, ve které jsou obvykle přijímány, a procentuální obsah v sušině jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Pokud má rostlina nedostatečné množství esenciálních minerálních látek, dojde ke konkrétním změnám tvaru a barvy orgánů, mohou nastat poruchy vývoje, zasychání pletiv, zpomalení a až zastavení růstu. Znamky nedostatku jsou pro jednotlivé prvky charakteristické, pokud nemá rostlina přístup k některému z nezbytných prvků, její existence je tímto nedostatkem prvku omezována. Kromě prvků, které jsou nezbytné pro všechny rostliny, mohou být určité prvky esenciální pouze za určitých podmínek a jenom pro některé rostliny. Takové prvky se nazývají prospěšné nebo benefiční (Si, Na, Co a Se). Součástí rostlin mohou být i prvky, které pro jejich existenci nejsou nezbytné (např. Rb, Au, Cd, Pb, V, Al, Co apod.). Rostliny si opatřují minerální prvky z okolního prostředí a ve formě původní nebo asimilované je rozdělují na funkční místa v rostlině (Pavlová, 2006). Prvky lze dále dělit podle toho, jakou zaujímají biochemickou funkci v rostlině, např. části organických uhlíkatých sloučenin (N a S), důležité při ukládání energie nebo ve strukturální integritě (P, Si a B), přetrvávající v podobě vázaných či volných iontů (K, Ca, Mg, Cl, Mn a Na) a účastníci se přenosu elektronů (Fe, Zn, Cu, Ni a Mo) (Taiz a Zeiger, 2002). V teoretické části bude probrána úloha těch prvků, které byly v experimentální části stanovovány. Z makrobiogenních prvků to jsou draslík, vápník, hořčík a z mikrobiogenních prvků měď, železo, mangan a zinek.

Tab. 1 Makrobiogenní a mikrobiogenní prvky v minerální výživě rostlin

Prvky	Chemická značka	Atomová hmotnost	Forma, ve které je prvek absorbován	Suchá váha ve zdravých rostlinách
Makroživiny				
Vápník	Ca	40,08	Ca ²⁺	0,2 - 3,5 %
Uhlík	C	12,01	CO ₂	cca 44 %
Vodík	H	1,01	H ₂ O	cca 6 %
Hořčík	Mg	24,32	Mg ²⁺	0,1 - 0,8 %
Dusík	N	14,01	NO ₃ ⁻ a NH ₄ ⁺	1–4 %
Kyslík	O	16	H ₂ O a O ₂	cca 44 %
Fosfor	P	30,98	H ₂ PO ₄ ⁻ a HPO ₄ ⁻	0,1 - 0,8 %
Draslík	K	39,1	K ⁺	0,5 – 6 %
Síra	S	32,07	SO ₄ ²⁻	0,05 – 1 %
Mikroživiny				
Bor	B	10,82	BO ₃ ⁻ a B ₄ O ₇ ²⁻	5–75 ppm
Měď	Cu	63,54	Cu ²⁺	4–30 ppm
Chlor	Cl	35,46	Cl ⁻	100 – 10 000 ppm
Železo	Fe	55,85	Fe ²⁺ a Fe ³⁺	25–300 ppm
Mangan	Mn	54,94	Mn ²⁺	15–800 ppm
Molybden	Mo	95,95	MoO ₄ ²⁻	0,1 – 5 ppm
Zinek	Zn	65,38	Zn ²⁺	15–100 ppm

Převzato a upraveno z Taji *et al.*, 1993

2.1.1 Makroprvky

V následující části práce jsou rozebrány makrobiogenní prvky, jako jsou draslík, vápník a hořčík. Každá podkapitola je dále členěna na výskyt, příjem a distribuci a biologickou funkci daného prvku.

2.1.1.1 Draslík

Draslík (latinsky „*Kalium*“) je prvek I. A skupiny periodické tabulky prvků a je označován jako alkalický kov. Je to stříbrobílý velmi měkký kov dobře vedoucí elektřinu i teplo. Má také silné redukční schopnosti a je vysoce reaktivní. Charakteristická barva plamene draslíku je fialová (Toužín, 2001).

2.1.1.1.1 Výskyt

Zemská kůra obsahuje asi 2,6 % draslíku. V půdách je většina K^+ dehydratována a koordinována na atomy kyslíku, které nejsou dostupné pro rostliny. Typické koncentrace v půdním roztoku se pohybují mezi 0,1 a 1 mM K^+ . Je definován jako nejpočetnější kation v rostlinách. Nedostatek K^+ je vzácný, ale růst rostlin je obvykle stimulován dodatečným hnojením uhličitanem draselným (potaš), což je běžnou praxí v mnoha oblastech produkce plodin (Maathuis, 2009).

2.1.1.1.2 Příjem a distribuce

Rostlinou je přijímán jako K^+ a neváže se do stabilních struktur, váže se do komplexů s organickými kyselinami. V rostlině je velmi pohyblivý, z kořenů do prýtu je transportován xylémem a ze starších částí rostliny do mladších je transportován floémem (Pavlová, 2006). Kromě dodávání K^+ do zelené tkáně je zachován velký floémem zprostředkovaný K^+ tok z prýtů do kořenů. Předpokládá se, že výsledný cyklus K^+ je důležitý v homeostáze K^+ a poskytuje neustálý přísun kationtů doprovázejících anionty, jako je NO_3^- , na jejich cestě do prýtu (Maathuis, 2009). Stejně jako u NO_3^- , i příjem K^+ do kořenů rostlin má vysokoafinitní (protonmotorická síla) a nízkoafinitní (příjem kanály) složky (Maathuis a Sanders, 1994). Elektrofyziologické studie ukázaly, že pasivní transport přes iontové kanály s milimolárním K_m a aktivní transport přes H^+ -transportéry s mikromolárním K_m je základem nízkoafinitních a vysokoafinitních složek příjmu K^+ (Maathuis a Sanders 1994; Maathuis a Sanders 1995). Při nízké koncentraci draslíku v půdě je jeho příjem zajišťován vysoce afinitním mechanismem. Příjem je elektrogenní, využívá protonmotorickou sílu a uskutečňuje se symportem s H^+ v poměru 1:1. Má složku konstitutivní a indukovatelnou. Mechanismus nízkoafinitní tvoří přítokové rektifikační

kanály, které v buňkách přijímajících K^+ z půdního roztoku zůstávají dlouho otevřeny. Oba transportní mechanismy jsou tvořeny několika různými typy proteinů. Jak se ukazuje, jeden transportní protein může být funkční složkou obou mechanismů (Pavlová, 2006).

2.1.1.1.3 Biologické funkce

K^+ je zapotřebí pro metabolické reakce, protože má schopnost aktivovat velké množství enzymů. In vitro se aktivace enzymu vyskytuje v přítomnosti aktivity 50–80 mM K^+ , což je hodnota, která dobře odpovídá hodnotám pro cytoplazmatický K (Britto a Kronzucker, 2008; Maathuis a Sanders, 1993; Walker *et al.*, 1996). Specifické enzymy, u kterých bylo prokázáno, že jsou aktivovány K^+ , zahrnují izoformy vakuolární PPasy, které akumulují protony do vakuolárního lumenu a jsou přísně závislé na K^+ . Kromě toho mnoho enzymů podílejících se na metabolismu C, jako je pyruvátkinasa (EC 2.7.1.40), fosfofruktokinasa (EC 2.7.1.11) a ADP-glukosa-škrob glukosyltransferasa (EC 2.4.1.21) ukazují K^+ závislost (Marschner, 1995). Syntéza proteinů zprostředkovaná ribosomy je dalším klíčovým procesem, který vyžaduje vysoké koncentrace K^+ . Významný je také podíl K^+ na udržování elektroneutality buněk, regulaci osmotických poměrů a udržování turgoru. Změny koncentrace K^+ mohou vést k vratným změnám objemu buněk při pohybech orgánů a otvírání a zavírání průduchů. Koncentrace K^+ v kořenu je důležitá také pro příjem vody a vznik kořenového vztlaku. Má vliv na hydrataci, a proto i na konformaci proteinů a tím mění aktivitu enzymů. Obecně je K důležitý pro tvorbu jednoduchých cukrů a škrobu. Má vliv na dozrávání semen, plodů a na jejich chuť. Dále na buněčný růst, pohyby rostlin, regulaci otevřenosti průduchů a vyrovnání náboje v buňce. Významný je jeho vliv na odolnost rostlin vůči stresu. K hraje důležitou roli v růstu a vývoji rostlin, včetně kořenového systému. Je nutný pro fotosyntézu, transport fotosyntátu a syntézu proteinů. Plodiny, které produkují velké množství bílkovin na jednotku plochy půdy, vyžadují více K než ty, které produkují méně bílkovin (Blevins, 1994). Nedostatek K se projevuje žloutnutím listů, okrajovou nekrózou, poklesem syntézy proteinů a enzymatické aktivity. Kořeny mají nažloutlou barvu, je typická malá rozvětvenost a snadno zahnívají. Také se sníží odolnost vůči suchu, mrazu a houbovým patogenům. Akumulace redukcujících cukrů a vyčerpání organických kyselin a záporně nabitých aminokyselin byly také popsány jako přímé důsledky nedostatku K^+ (Amtmann *et al.*, 2008). Naopak nadbytek vede k poruchám příjmu Ca a Mg. Na listech se tvoří žlutohnědé skvrny, pletivo se rozpadá, listy usychají a opadají (Pavlová, 2006)

2.1.1.2 Vápník

Vápník (latinsky „*Calcium*“) je prvek II. A skupiny periodické tabulky prvků patřící mezi kovy alkalických zemin. Je to stříbrolesklý velmi měkký kov, který je lehce tavitelný. Charakteristická barva plamene vápníku je cihlově červená (Toužín, 2001).

2.1.1.2.1 Výskyt

Stejně jako K je Ca v litosféře velmi hojný. Silné zvětrávání a louhování půd může vést k nedostatku Ca, což je stav, který je urychlen nízkým pH půdy. Ca^{2+} adsorbovaný na koloidy může být vyměněn s půdním roztokem, kde většina „volného“ Ca^{2+} tvoří téměř nerozpustné sloučeniny s jinými prvky, jako je P, čímž je P méně dostupný. V rostlině se Ca vyskytuje vázaný nebo volný. Ca^{2+} je schopen tvořit poměrně stabilní, avšak reversibilní propojení makromolekul, tzv. vápníkové můstky.

2.1.1.2.2 Příjem a distribuce

Přijímán je jako dvoumocný kation Ca^{2+} . Do prýtu je transportován xylémem, jeho přerozdělení ze starších do mladších částí rostliny je velmi omezené a prakticky nevstupuje do floému (Pavlová, 2006). Volný a pohyblivý je v apoplastu. Transport z cytosolu do apoplastu zajišťují Ca^{2+} ATPasy. Vstup do cytosolu probíhá skrze specifické kanály. Difúze cytoplazmou je pomalá, a proto dochází k tvorbě gradientů. Ca vstupuje do kořene přes Ca^{2+} propustné kanály. Některé z nich jsou Ca^{2+} selektivní, jiné jsou „neselektivní“ iontové kanály (Demidchik a Maathuis, 2007). V rostlině je Ca^{2+} relativně imobilní, iont má tendenci být sekvestrován ve velké vakuole zralých buněk. Hladiny Ca^{2+} proto mohou klesnout pod kritickou úroveň v rychle rostoucích tkáních.

2.1.1.2.3 Biologické funkce

Schopnost vytvářet vápníkové můstky má podstatnou roli v buněčné stěně a střední lamele, kde má vliv na soudržnost lipidů v membránách. Tyto vazby zvyšují stabilitu buněčné stěny. Ca^{2+} je kvůli své roli strukturální složky buněčné stěny nutný pro zvětšování plochy buněčné stěny a má vliv na kompaktnost fosfolipidů v membránách a jejich schopnost vázat proteiny (Pavlová, 2006). V cytoplazmě tvoří komplex s kalmodulinem, tento komplex se váže na proteiny a dochází k modifikaci konformace. Vápenaté ionty u rostlin přímo aktivují proteiny jako například kinasy či fosfatasy. Kalmodulinová struktura na C-konci inhibuje kinasovou aktivitu N-konce. Vazba Ca^{2+} na C-konec inhibici zruší. Protože Ca^{2+} snadno tvoří nerozpustné soli se sulfáty a fosfáty, volná koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmě je udržována extrémně nízká kolem 100 nM. Díky tomu

je Ca^{2+} ideálním sekundárním mediátorem a bylo prokázáno, že široká škála podnětů vyvolává rychlé změny volného cytosolického Ca^{2+} u rostlin, které zahrnují reakce na biotický a abiotický stres, stomatální regulaci a fyzické poškození (Mahouachi *et al.*, 2006; McAinsh a Pittman, 2009). Nedostatek se projevuje poškozením meristémů a poruchami růstu vegetačních vrcholů. Kořeny jsou krátké, silně rozvětvené a nitkovité. Kořeny i výhonky rostlin hnědnou, červenají a následně umírají. Mladé listy žloutnou, dřevo špatně vyžívá, ovoce rychle hnije (Procházka *et al.*, 1998).

2.1.1.3 Hořčík

Název hořčík je odvozen z řeckého „*Magnesie*“, oblasti, kde se těžil mastek. V periodické tabulce prvků se nachází v II. A skupině a patří mezi kovy alkalických zemin. Je to stříbrolesklý, měkký, tažný a kujný kov. Hořčík je lehce ionizovatelný a má vysokou hydratační energii. Charakteristická barva plamene hořčíku je bílá (Toužín, 2001).

2.1.1.3.1 Výskyt

Půdní Mg se obecně pohybuje mezi 0,05 a 0,5 %. Adsorpce Mg^{2+} na půdní částice je díky hydratačnímu obalu relativně slabá, což má za následek vysoké rychlosti loužení a nedostatek Mg^{2+} je proto běžný (Deng *et al.*, 2006).

2.1.1.3.2 Příjem a distribuce

Z kořene do nadzemní části je transportován xylémem, ze starších částí rostlin do mladších je redistribuován floémem (Pavlová, 2006). V rostlinách se předpokládá, že volný cytoplazmatický Mg^{2+} je řádově 0,5 mM (Yazaki *et al.*, 1988), ale celkové hladiny Mg^{2+} se pohybují od 0,3 do 1,0 % (Deng *et al.*, 2006), a proto dochází k značnému vychytávání Mg^{2+} (Hammond *et al.*, 2003). Příjem Mg^{2+} na rozhraní kořen/půda pravděpodobně probíhá přes transportéry rodiny MGT, které jsou homologní s bakteriálními transportéry CorA Mg^{2+} . CorAs tvoří pentamerní Mg^{2+} selektivní iontové kanály, takže se vyskytuje i v rostlinách, příjem Mg^{2+} je pasivní (Berezin *et al.*, 2008). Většina tkáňového Mg^{2+} je ve vakuole, kde přispívá k tvorbě turgoru a vyrovnávání nábojů aniontů. Vakuolární depozice Mg^{2+} je pravděpodobně zprostředkována antiportery $\text{Mg}^{2+}:\text{H}^+$. Vzhledem k jeho primární roli v chloroplastech, nejvíce tkáňového Mg^{2+} je obvykle měřeno ve výhoncích.

2.1.1.3.3 Biologické funkce

Mg^{2+} je pravděpodobně nejlépe známý pro svou centrální polohu v molekule chlorofylu, kde koordinuje kovalentně se čtyřmi atomy dusíku z porfyrinového kruhu. Vložení Mg^{2+}

do protoporphyrinu se provádí enzymem Mg-chelatasou, který se skládá z několika podjednotek, které patří do nadrodiny AAA proteinů (ATPasy spojené s různými buněčnými aktivitami). Je zajímavé, že samotný protoporphyrin je důležitým signálním prvkem ve vývoji chloroplastů: akumuluje se v plastidech během stresu a negativně ovlivňuje transkripci fotosyntetických genů (Robinson *et al.*, 2000). Mg^{2+} má další klíčové role ve fotosyntéze, zejména v jeho schopnosti podporovat světelné reakce ve stromatu. Vnímání světla a následný transport elektronů vede k hromadění H^+ v lumenu tylakoidu. Výsledná separace nábojů je kompenzována proudem Mg^{2+} z lumenu tylakoidu do stromatu. Většina buněčného Mg^{2+} má úlohu enzymových kofaktorů a stabilizace nukleotidů a nukleových kyselin. Nejvýznamnější typ enzymových reakcí, kde Mg^{2+} je nezbytný, jsou ty, které jsou spojeny s přenosem energie a fosforylace/defosforylace. Velká část energie buňky je uložena ve vysokoenergetických esterových a pyrofosfátových vazbách fosfosacharidů a difosfátových a trifosfátových sloučenin, jako jsou ADP a ATP. Uvolnění této energie enzymy, jako jsou fosfotransferasy a ATPasy, vyžaduje přítomnost Mg^{2+} , který tvoří „můstek“ mezi atomy kyslíku dvou sousedních fosfátových skupin a atomu dusíku na katalytickém místě proteinu. Mg^{2+} se také snadno váže na nukleové kyseliny. V důsledku toho jsou teploty tání DNA podstatně vyšší v přítomnosti Mg^{2+} (Robinson *et al.*, 2000). V RNA má Mg^{2+} podobné role a pomáhá udržovat sekundární strukturu (Misra a Draper, 2000). Tudiž transkripce a translace genu zásadně závisí na adekvátních hladinách Mg^{2+} . V dynamických i stálých strukturách zajišťují hořčikové můstky správné funkční prostorové uspořádání. Aktivuje enzymy jako například Rubisco a RNA polymerasy, je složkou chlorofylů a je významný pro transport sacharidů. Dále zajišťuje soudržnosti podjednotek ribosomů. Nedostatek Mg se projevuje sníženým růstem, poklesem rychlosti fotosyntézy a chlorotickými skvrnami na listech. Naopak nadbytek Mg narušuje přijímání fosforu, listy jsou tmavé a kroutí se (Pavlová, 2006). Tyto vlivy dokazují, že Mg patří mezi makrobiogenní prvky (obr. 1).

1 H vodík																	2 He helium
3 Li lithium	4 Be beryllium											5 B bor	6 C uhlík	7 N dusík	8 O kyslík	9 F fluor	10 Ne neon
11 Na sodík	12 Mg hořčík											13 Al hliník	14 Si křemík	15 P fosfor	16 S síra	17 Cl chlor	18 Ar argon
19 K draslík	20 Ca vápník	21 Sc skandium	22 Ti titan	23 V vanád	24 Cr chrom	25 Mn mangan	26 Fe železo	27 Co kobalt	28 Ni nikl	29 Cu měď	30 Zn zinek	31 Ga gallium	32 Ge germanium	33 As arsen	34 Se selen	35 Br brom	36 Kr krypton
37 Rb rubidium	38 Sr stroncium	39 Y yttrium	40 Zr zirkonium	41 Nb niob	42 Mo molybden	43 Tc technetium	44 Ru ruthenium	45 Rh rhodium	46 Pd palladium	47 Ag stříbro	48 Cd kadmium	49 In indium	50 Sn cín	51 Sb antimon	52 Te tellur	53 I jod	54 Xe xenon
55 Cs cesium	56 Ba baryum	57 La* lanthan	72 Hf hafnium	73 Ta tantal	74 W wolfram	75 Re rhenium	76 Os osmium	77 Ir iridium	78 Pt platina	79 Au zlato	80 Hg rtuť	81 Tl thallium	82 Pb olovo	83 Bi bismut	84 Po polonium	85 At astat	86 Rn radon
87 Fr francium	88 Ra radium	89 Ac** aktinium	104 Rf rutherfordium	105 Db dubnium	106 Sg seaborgium	107 Bh bohrium	108 Hs hassium	109 Mt meitnerium	110 Ds darmstadtium	111 Rg roentgenium	112 Cn kopernicium	113 Uut ununtrium	114 Uuq ununquadium	115 Uup ununpentium	116 Uuh ununhexium	117 Uus ununseptium	118 Uuo ununoctium
* Lanthanoidy			58 Ce cer	59 Pr praseodym	60 Nd neodym	61 Pm promethium	62 Sm samarium	63 Eu europium	64 Gd gadolinium	65 Tb terbium	66 Dy dysprosium	67 Ho holmium	68 Er erbio	69 Tm thulium	70 Yb ytterbium	71 Lu lutecium	
** Aktinoidy			90 Th thorium	91 Pa protaktinium	92 U uran	93 Np neptunium	94 Pu plutonium	95 Am americium	96 Cm curium	97 Bk berkelium	98 Cf kalifornium	99 Es einsteinium	100 Fm fermium	101 Md mendelevium	102 No nobelium	103 Lr lawrencium	

Obr. 1 Periodická tabulka prvků s vyznačenými makroprvky (zeleně), mikroprvky (žlutě), benefičními prvky (modře) a těžkými kovy v životním prostředí (červeně). Kobalt jako benefiční prvek, nikl, měď a zinek jako mikroživiny, který mohou působit i jako jedovaté těžké kovy. Hliník působí typicky jako těžký kov, ale například u řepky při nižších koncentracích podporuje růst.

2.1.2 Mikroprvky

V této kapitole jsou popsány biologické funkce, vliv deficiencie a toxicity mikrobiogenních prvků (měď, železo, mangan a zinek).

2.1.2.1 Měď

Měď je nezbytná pro fotosyntézu a mitochondriální dýchání, pro metabolismus uhlíku a dusíku, pro ochranu před oxidačním stresem a je vyžadována pro syntézu buněčné stěny. Za fyziologických podmínek existuje Cu ve dvou oxidačních stavech Cu^{1+} a Cu^{2+} a může se mezi těmito formami vzájemně měnit (monovalentní měď je nestabilní). To umožňuje Cu fungovat jako redukční nebo oxidační činidlo v biochemických reakcích. Zároveň však tato vlastnost způsobuje, že Cu je také potenciálně toxická, protože ionty mědi mohou katalyzovat produkci volných radikálů, což vede k poškození proteinů, DNA a dalších biomolekul. Proto je ihned po absorpci velká většina iontů Cu vázána vychytáváním proteinů, jako jsou metalothioneiny, aby se zabránilo hromadění mědi v toxické formě. Část přijímané Cu však tento systém obchází a je zachycen malými vazebnými proteiny, tzv. Chaperony mědi (Huffman a O'Halloran, 2001), které šetří Cu z detoxikačních systémů a vedou ji k cílovým místům v buňce (Wintz a Vulpe, 2002). Cu má zvláště vysokou afinitu k molekulám dioxygenu, což vysvětluje, proč je katalytickým kovem v mnoha oxidasach. Nejvýznamnějším členem této skupiny je mitochondriální oxidasa cytochromu c (EC 1.9.3.1) jako hlavní katalyzátor terminální oxidace. Cu se také nachází v proteinových elektronových nosičích, jako je plastocyanin, který představuje asi 50 % plastidické mědi (Pilon, *et al.*, 2006). Více než polovina Cu v rostlinách se nachází v chloroplastech a podílí se na fotosyntetických reakcích. Je zajímavé, že metabolismus Cu úzce souvisí s metabolismem Fe. V závislosti na biologické dostupnosti Cu a Fe mají rostliny enzymy pro alternativní použití Cu versus Fe, což katalyzuje stejnou biochemickou reakci s úplně odlišnými apoproteiny (Merchant *et al.*, 2006). A konečně je Cu také součástí receptoru ethylenu (Rodriguez *et al.*, 1999) a podílí se na biosyntéze kofaktoru Mo (Kuper *et al.*, 2004). Obecně mezi funkce Cu patří fyziologické redoxní procesy, detoxikace superoxidových radikálů, lignifikace, rezistence na onemocnění a životaschopnost pylu (Welch, 1995).

Deficiencie Cu se tedy poprvé projeví u mladých listů a reprodukčních orgánů, pozdějšími důsledky jsou zakrnělý růst celé rostliny a světle zelené listy, které snadno uschnou. Nedostatek Cu v plodinách je rozšířený a vyskytuje se po celém světě, zejména

na půdách s vysokým pH a vysokým obsahem organického uhlíku. Obiloviny obecně trpí nedostatkem Cu. Dokonce i při mírném deficitu Cu, např. ječmen a oves, nemusí vykazovat charakteristické příznaky, a přesto může utrpět vážnou ztrátu výnosu zrna. Toxicita Cu není obvyklá, i když je aplikováno velké množství. Během raných fází toxicity Cu je patrný snížený růst plodin. Kromě toho toxicita Cu způsobuje snížené větvení a neobvykle tmavé zbarvení kořenů rostlin (Graham a Nambiar, 1981).

2.1.2.2 Železo

Stejně jako Cu i Fe má pro život rostlin velký význam. Jako redoxně aktivní kov se podílí na fotosyntéze, mitochondriálním dýchání, asimilaci dusíku, biosyntéze hormonů (ethylen, kyselina gibberellová, kyselina jasmonová), produkci a deaktivaci reaktivních forem kyslíku, osmoprotekci a ochraně proti patogenům. Až 80 % buněčného železa se nachází v chloroplastech, což odpovídá jeho hlavní funkci ve fotosyntéze (Welch, 1995). V závislosti na typu železného ligandu lze definovat tři skupiny proteinů obsahujících železo: proteiny s klastry železa a síry (Fe-S), proteiny obsahující hem a jiné proteiny železa.

Proteiny s klastry Fe-S mají klíčové funkce při přenosu elektronů, tvoří součást vazebných míst substrátu v enzymech, podílejí se na regulaci transkripce nebo translace a na redukci disulfidů (např. thioredoxiny). Proteiny Fe-S tedy slouží jako enzymy, jako elektronové nosiče (např. Ferredoxin) a jako regulační proteiny (např. Akonitasa, EC 4.2.1.3) (Xu a Moller, 2008).

Známé hemoproteiny jsou fotosyntetické a respirační cytochromy, které se podílejí na přenosu elektronů, a globiny, které vážou kyslík. Mezi další příklady patří oxidační enzymy katalasa (EC 1.11.1.6), peroxidasa (EC 1.11.1.x) a NADPH oxidasa (EC 1.6.3.1), které se podílejí na produkci a/nebo zachycování volných radikálů, a velmi velká skupina enzymů cytochromu P450. V rostlinách a mikrobech katalyzují monooxygenační reakce v biosyntetických drahách, jako jsou steroly a mnoho sekundárních metabolitů, zatímco u zvířat je jejich hlavní role v detoxikaci xenobiotik. Dále globininy, jako je leghemoglobin, se podílejí na vázání a transportu kyslíku. Nitritreduktasa (E.C. 1.6.6.4) a sulfitreduktasa (EC 1.8.99.3) mají v enzymu jak sirohem, tak Fe-S klastr. V rostlinách jsou hemoproteiny distribuovány ve všech subcelulárních polohách, ale situace je složitější tím, že hem je syntetizován jak v mitochondriích, tak v chloroplastech (Cornah *et al.*, 2003), a není známo, které organely hem dodávají ostatním uživatelům v buňce.

Například cytochrom P450 se lokalizuje do endoplazmatického retikula, katalasy do peroxisomů a další enzymy do cytoplazmy.

Jiné železné proteiny (které jsou někdy také seskupeny jako nehemové proteiny) vážou ionty železa přímo, tj. ani jako hem, ani ve formě Fe-S. Mezi těmito proteiny jsou nejvýznamnější feritiny. Feritiny jsou plastidické zásobní proteiny železa a regulují interakci mezi homeostázou železa a oxidačním stresem u *Arabidopsis* (Ravet *et al.*, 2009). Feritiny se vyskytují převážně v nezralých plastidech, jako jsou etioplasty a amyloplasty, ale nikoli ve zralých chloroplastech (Briat a Lobreaux, 1998).

Nedostatek železa se projevuje chlorózou, žlutými a zelenými pruhy v trávách. Přímá toxicita Fe se při obecném používání Fe hnojiva v půdě neočekává z důvodu relativně rychlé přeměny rozpustného Fe na nerozpustné sloučeniny Fe v půdních systémech (Martens a Westermann, 1991). Toxicita železa může být problémem např. pro širok (*Sorghum bicolor*) vypěstovaný na některých kyselých půdách (Gupta, 2008).

2.1.2.3 Mangan

Mangan je nezbytný pro metabolismus a vývoj rostlin. Vyskytuje se v oxidačních stavech II, III a IV v přibližně 35 enzymech rostlinné buňky (Hebbern, *et al.*, 2009). Mezi hlavní funkce Mn patří enzymatická aktivace, biologické redoxní systémy (např. reakce přenosu elektronů ve fotosyntéze), detoxikace kyslíkových volných radikálů, sekundární syntéza rostlinných metabolitů, strukturální složka ribosomů a odolnost vůči chorobám (Welch, 1995). Mn může v bílkovinách plnit dvě funkce: slouží jako katalyticky aktivní kov nebo má aktivační roli v enzymech. Příklady katalytické role jsou superoxidodismutasa (EC 1.15.1.1) obsahující mangan, která chrání buňku před škodlivými účinky volných radikálů, oxalát oxidasa (EC 1.2.3.4) a manganový systém rozštěpení vody ve fotosystému II (Barber, 2003). Příklady enzymů aktivovaných Mn jsou jablečný enzym, isocitrátdehydrogenasa (EC 1.1.1.41), PEP karboxykinasa (EC 4.1.1.32) a fenylalaninamoniaklyasa (EC 4.3.1.5). Mezi poměrně velkou skupinou enzymů aktivovaných Mn je role Mn méně specifická, protože v mnoha případech může být nahrazena Mg (Marschner, 1995). Proteiny patřící do této skupiny jsou zapojeny do dráhy kyseliny shikimové a následných cest vedoucích k tvorbě aromatických aminokyselin, ligninů, flavonoidů, a auxinů. Aktivace Mn byla pozorována v enzymech metabolismu dusíku, jako je např. glutaminsyntetasa (EC 6.3.1.2) a arginasa (EC 3.5.3.1), biosyntézy

kyseliny gibberellové, aktivace RNA polymerasy a biosyntézy mastných kyselin (Hänsch a Mendel, 2009).

Mezi symptomy deficiencie patří světle zelené listy se zelenými hlavními žilami, listy blednou a snadno padají. Deficit Mn obecně nastává u půdy s vysokým pH. Toxicita Mn se vyskytuje u plodin pěstovaných na silně kyselých půdách s vysokou hladinou Mn (Moraghan, 1979). Toxicita Mn v čiroku se projevuje tmavě zelenými staršími listy s velkým počtem malých tmavě načervenalých fialových skvrn po celém listu (Clark, 1993).

2.1.2.4 Zinek

Zinek je důležitý jako součást enzymů pro syntézu proteinů a produkci energie a udržuje strukturální integritu biomembrán. Mezi další funkce zinku se řadí enzymatická aktivace, exprese a regulace genů, metabolismus uhlohydrátů, anaerobní dýchání kořenů, strukturální integrita ribosomů, detoxikace superoxidových radikálů, fytohormonová aktivita (např. IAA a kyselina gibberelová), genová struktura („Zinkový prst“), odolnost vůči chorobám. Aktivní při tvorbě chlorofylu a hraje roli při tvorbě chloroplastů a škrobu (Welch, 1995).

Předpokládá se, že více než 1200 proteinů obsahuje, váže nebo transportuje Zn^{2+} , mimo jiné včetně velkého počtu proteinů obsahujících „zinkový prst“ a transkripčních faktorů, oxidoreduktas a hydrolytických enzymů, jako jsou metaloproteasy (Kramer a Clemens, 2005). Většina zinkových enzymů se podílí na regulaci transkripce DNA, zpracování RNA a translace. Až 4 % predikovaných proteinů v *Arabidopsis* obsahuje motiv „zinkový prst“ (Kawagashira *et al.*, 2001), který je dobře znám v transkripčních faktorech a je důležitý pro interakce protein-protein. Kromě transkripčních faktorů je několik enzymů podílejících se na syntéze a udržování DNA nebo RNA závislé na zinku: všechny typy DNA-polymeras a RNA-polymeras, histonové deacetylasy, sestřihové faktory a enzymy podílející se na úpravách RNA v mitochondriích a chloroplastech (Kramer a Clemens, 2005). Kromě toho byl Zn nalezen v řadě tRNA syntetas a v translačním iniciačním faktoru eIF-5 z kukuřice (*Zea mays*), který je nezbytný pro vytvoření funkčního 80S iniciačního komplexu (Lopez Ribera a Puigdomenech, 1999). Nedostatek zinku také snižuje čistou fotosyntézu v rostlinách narušením aktivity karboanhydrasy (EC 4.2.1.1), která je limitujícím enzymem pro fixaci CO_2 v rostlinách C4. Dále Cu-Zn superoxidodismutasy (EC 1.15.1.1) a D-ribulosa-5-fosfát-3-epimerasy

(EC 5.1.3.1), enzymu Kalvinova cyklu a oxidativní pentosafosfátové dráhy (Jelakovic *et al.*, 2003). Kromě chloroplastů a mitochondrií jsou také cytoplazma, lysozom a apoplastický prostor kompartmenty s hydrolytickými aktivitami závislými na zinku: různé nukleasy a aminopeptidasy, peptidové deformylasy (Serero *et al.*, 2001), 26S-proteazom (Sullivan *et al.*, 2003), α -mannosidasy (EC 3.2.1.24) (Snaith a Levvy, 1968) a matricové metaloproteinasy spojené s extracelulární maticí (Maidment *et al.*, 1999).

Zn hraje také důležitou roli ve vývoji semen a rostliny s nedostatkem zinku vykazují opožděnou zralost. Při nedostatku zinku je patrná chloróza, strakaté nebo bronzové listy a abnormální kořeny. Nedostatky zinku jsou častější u plodin pěstovaných na půdách s vysokým pH, organických a písčitých půdách než na těžších půdách. Většina plodin je vysoce tolerantní k nadbytku Zn (Gupta a Kalra, 2006).

2.2 Nanočástice a Nanotechnologie

2.2.1 Definice a využití

Koncept nanotechnologie, který zahrnuje manipulaci s hmotou na nanoúrovni, byl poprvé představen v roce 1959 Dr. Richardem Feynmanem a poprvé jej jako termín použil profesor Norio Taniguchi v roce 1974 (Taniguchi, 1974). Aplikace uměle připravených nanomateriálů (ENM, „Engineered nanomaterials“), která je kritickou podoblastí nanotechnologií, v poslední době přitahovala velkou pozornost. ENM jsou definovány jako umělé materiály s nejméně jedním vnějším rozměrem v rozsahu velikostí 1 - 100 nanometrů. ENM se všemi třemi vnějšími rozměry v nanoměřítku se nazývají umělé nanočástice (ENP, „Engineered nanoparticles“). Nanočástice nejsou pro životní prostředí nové a vyskytují se přirozeně ve formě minerálů, jílu a produktů bakterií. Používají se od starověku jako barvivo pro kovy, ale systematické navrhování a konstrukce nanočástic pro různá použití začalo až v posledních několika desetiletích (Maurer-Jones *et al.*, 2013). NP mohou vznikat z přirozených (sopečných erupcí), náhodných (spalování rostlin) nebo plánovaných činností (motorová vozidla) (Chichiriccò a Poma, 2015). V této práci budou řešeny NP vyráběné v laboratoři člověkem pro jejich potenciální využití.

Nanotechnologie je nově se rozvíjející oblastí vědy, která má široké uplatnění v terapii rakoviny, cílené distribuci léků, biomedicíně, čištění odpadních vod, kosmetickém průmyslu, elektronice či biosenzorech. Na základě chemického složení jsou ENM obvykle klasifikovány do tří kategorií: uhlíkaté ENM (především uhlíkové nanotrubičky a fullerény), polymerní ENM (submikronové koloidní materiály sestávající z polymeru

nebo kopolymeru) a kovové ENM (včetně ENM elementárních i metalických ENM) (Peralta-Videa *et al.*, 2011).

Uhlíkové ENM jsou jedním z klíčových materiálů v nanotechnologii a široce se používají v oblasti procesů čištění odpadních vod, solárních článků, mikroelektroniky, ukládání energie a tvorbě povlaků, a to z důvodu jejich velké povrchové plochy, elektrické vodivosti, tepelné vodivosti a tahové síly. Většina uhlíkatých ENM je začleněna do trvanlivých produktů ve třech různých formách (nanotrubice, nanovlákná a nanočástice) a očekává se, že budou vázány v matici během životního cyklu těchto produktů. Z těchto tří forem jsou nejčastěji používané uhlíkové nanotrubice (De Volder *et al.*, 2013).

V posledních dvou desetiletích se v průmyslu široce používají polymerní ENM, které mají vlastnosti jak nanomateriálů, tak konvenčních polymerních kompozitů, zejména v leteckém nebo automobilovém inženýrství, obnovitelné energii a biomimetických sensorových polích. Významné mechanické a tepelné vlastnosti polymerních ENM zahrnují nepropustnost pro plyny, rozměrovou stabilitu a nehořlavost. Ve srovnání s uhlíkovými a polymerními ENM mají kovové ENM, které fascinují vědce a inženýry více než století, nejdelší historii a nyní se intenzivně využívají v oblasti nanotechnologií. V současné době lze kovové ENM syntetizovat v požadované velikosti a tvaru a modifikovat různými chemickými funkčními skupinami na povrchu částic, což jim umožňuje nést léčiva, proteiny, enzymy, protilátky a nukleotidy. Kovové ENM tedy mohou být potenciálně použity v biomedicínské technologii, cílené dodávce léčiva a při diagnostickém zobrazování (Mody *et al.*, 2010).

Celkově lze říci, že jedinečné optické, elektrické a chemické vlastnosti ENM jsou převážně způsobeny jejich velmi velkou specifickou povrchovou plochou a kvantovou povahou energetického stavu v nanometrovém měřítku. Tyto nové vlastnosti vedou k možnosti četných aplikací těchto ENM ve spotřebitelských, průmyslových, zemědělských a biomedicínských produktech. Aplikace několika nejběžnějších ENM jsou shrnuty v tabulce 2.

Tab. 2 Aplikace některých nejběžnějších ENM

ENM	Produkt nebo aplikace	Zdroj
Uhlíkové nanotrubičky	Kompozitní vlákna v materiálech ke zlepšení jejich mechanických, tepelných a elektrických vlastností	Ajayan a Zhou, 2001
	Mikroskopie atomárních sil	Nishijima <i>et al.</i> , 1999
	Lešení pro růst kostí	Zanello <i>et al.</i> , 2006
Nanočástice oxidu titaničitého	Fotokatalýza	Puddu <i>et al.</i> , 2010
	Sanace kontaminované vody	Balasubramanian <i>et al.</i> , 2004
	Bělení potravin	Weir <i>et al.</i> , 2012
	Kosmetická přísada pro blokování ultrafialového záření	Popov <i>et al.</i> , 2005
Nanočástice oxidu ceru	Aditivum do paliva	Cassee <i>et al.</i> , 2011
	Brusné a leštící materiály	Dahle a Arai, 2015
	Terapeutický materiál a nanomedicína	Das <i>et al.</i> , 2013
Nanočástice oxidu zlata	Nanomedicína pro diagnostické účely, dodávání léčiv a terapeutické účely	Boisselier a Astruc, 2009
	Zjišťování znečištění v zemědělství	Zeng <i>et al.</i> , 2011
Nanočástice stříbra	Antibakteriální složka v lécích a textilu odolávající patogenům	Sondi a Salopek-Sondi, 2004
	Antimikrobiální složka v pesticidech	Bergeson, 2010
Nanočástice oxidu zinečnatého	Absorbéry UV v textiliích	Becheri <i>et al.</i> , 2008
	Přísada do keramiky, skla, cementu, gumy, barev, opalovacích krémů a kosmetických přípravků	Sabir <i>et al.</i> , 2014
	Barvy chemických senzorů a solárních článků	Cheng <i>et al.</i> , 2008
	Nano-hnojivo a nano-pesticidy	Prasad <i>et al.</i> , 2012

Tab. 2 Aplikace některých nejběžnějších ENM (*pokračování*)

ENM	Produkt nebo aplikace	Zdroj
Nanočástice oxidu mědi	Antimikrobiální agent	Ren <i>et al.</i> , 2009
Nanočástice oxidu železitého	Nano-hnojiva Biomedicína	Rui <i>et al.</i> , 2016 Pankhurst <i>et al.</i> , 2003

2.2.2 Produkce a zdroje uvolňování NP

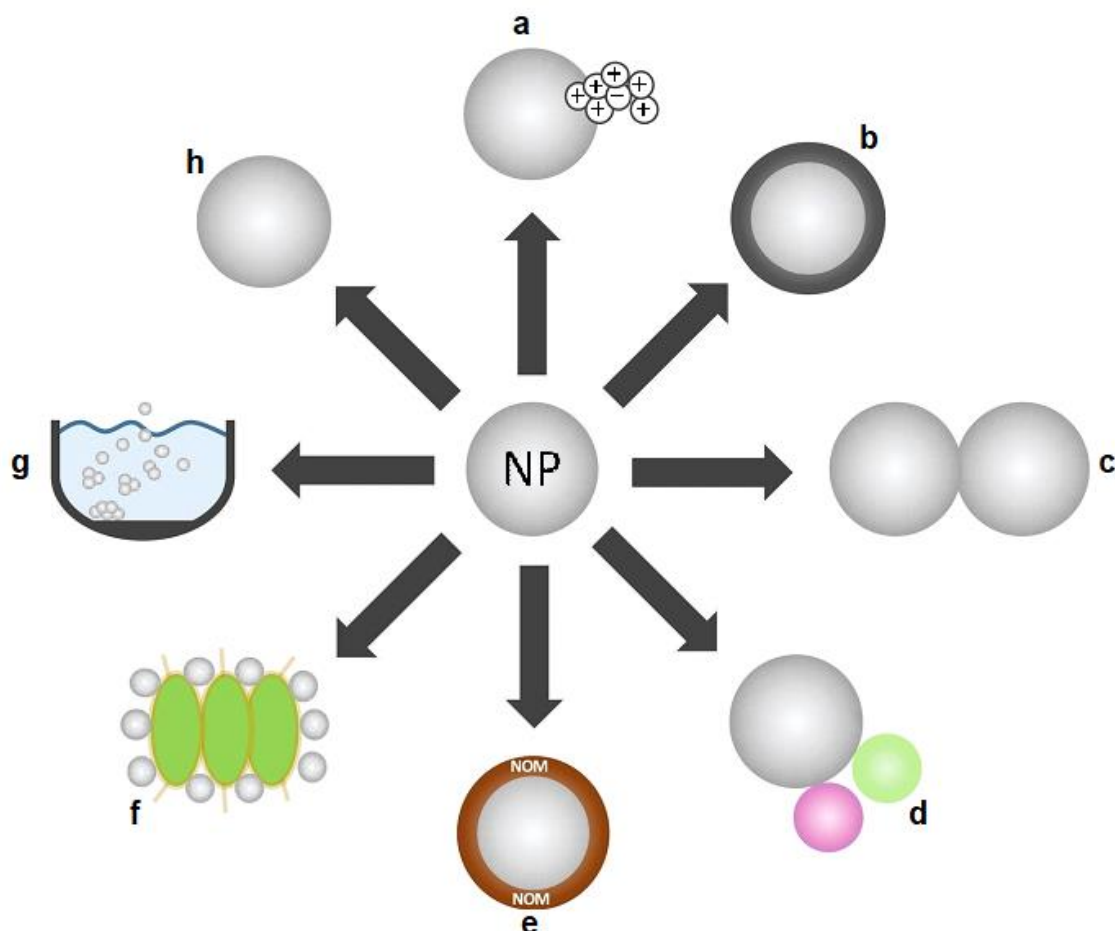
Za posledních 30 let nanotechnologie vytvořila mnoho struktur rozdílného složení, v roce 2006 bylo vytvořeno 212 typů, ale v roce 2012 již 1750 (Peyrot *et al.*, 2014). Tržní potenciál ENP se zdvojnásobuje každé tři roky, například trh AgNP činil v roce 2014 téměř 0,8 miliardy a do roku 2022 dosáhne 2,5 miliardy USD. Roční produkce TiO₂ se pohybuje kolem 6 milionů tun, což je již miliardový trh s cenou cca 2000 USD za tunu (Pachapur *et al.*, 2016). Mezi nejprodukovanější ENM na světě patří TiO₂NP, SiO₂NP, FeO_xNP, AlO_xNP, ZnONP, CNT, AgNP a CeO₂NP. TiO₂NP jako ENM s nejvyšší produkcí, se vyrábějí až do 10 000 tun ročně. FeO_xNP, AlO_xNP, ZnONP, CNT, AgNP a CeO₂NP se vyrábějí mezi 100 a 1000 tun ročně (Piccinno *et al.*, 2012).

Tak velká výroba ENM pochopitelně vede k jejich hromadění v životním prostředí během jejich výroby, použití a likvidace. Mnoho předchozích studií uvádí, že se v odpadech do životního prostředí objevují kovové ENM (Zheng *et al.*, 2011). Například CeO₂NP se mohou v životním prostředí hromadit odtokem silnic, které jsou znečištěny výfukovými katalyzátory CeO₂NP (Ward, 1990). Bylo popsáno, že TiO₂NP jsou uvolňovány do životního prostředí prostřednictvím průmyslových a městských odpadních vod (Kaegi *et al.*, 2008). 75-100 µg·l⁻¹ AgNP bylo detekováno v odpadních vodách z pračky po praní textilií obsahujících AgNP (Geranio *et al.*, 2009). Vyrobené nanočástice (MNP, „Manufactured nanoparticles“) se během manipulace dostanou do různých částí prostředí, jako je čerstvá voda, vzduch, půda atd. Nebo náhodně z míst jako jsou skládky, splaškové a odpadní vody během jejich syntézy (Gottschalk *et al.* 2009; Cornelis *et al.*, 2014; Prasad *et al.*, 2016). Odhaduje se, že 63-91 % ENP skončí na skládkách po celém světě, z kterých se následně mohou uvolňovat do půdy, vody a atmosféry (Keller *et al.*, 2013). Cornelis *et al.* (2014) prokázal, že půdy jsou hlavním

místem znečištění MNP. Nanočástice mohou také vstoupit do půdy prostřednictvím úmyslného použití agrochemikálií na bázi NP a jejich uvolnění z průmyslu (Dutschk *et al.*, 2014). Tyto MNP mohou být toxické pro půdní organismy i pro rostliny. Po nasazení v rostlinách jsou nanočástice transportovány do různých částí a způsobují jejich vážné poškození. Vstup NP do půd a vody by tedy mohl být velkým problémem kvůli kontaminaci potravního řetězce zemědělskými plodinami pěstovanými v těchto kontaminovaných půdách a zavlažovanými kontaminovanou vodou. Druhým hlavním zdrojem kontaminantu MNP je vzduch (Rizwan *et al.*, 2017).

2.2.3 Osud nanočástic v prostředí

NP v životním prostředí prochází procesy stárnutí, jako je chemická přeměna, agregace a desagregace. Souhra mezi těmito procesy a transportem NP určuje osud, a nakonec ekotoxikologický potenciál NP (Dale *et al.*, 2015). Vzhledem k tomu, že vlastnosti částic a podmínky prostředí řídí tyto procesy stárnutí a transportu je přímý přenos dat do i mírně odlišných podmínek obtížný, a dokonce může být zavádějící (Wagner *et al.*, 2014). Změny chemické specifikace, rozpouštění, degradace, stejně jako změna povrchových vlastností srážením a adsorpcí nebo desorpce jsou důležité chemické transformační procesy NP, které byly často zkoumány jak ve vodním, tak v půdním ekosystému. Funkcionalizace povrchů NP, která činí vlastnosti částic výhodnější pro průmyslové účely, silně řídí transformační procesy v prostředí (Li *et al.*, 2013). Důkladná charakterizace povrchové chemie NP se časem jeví jako povinnost pro porozumění jejich osudu (Barton *et al.*, 2014). Mezi nejdůležitější procesy patří v polních podmínkách rozpuštění, pasivace, agregace, adsorpce, sedimentace a depozice (obr. 2) (Bundschuh *et al.*, 2018).



Obr. 2 Interakce a osud NP v životním prostředí s ohledem na (a) rozpouštění, (b) sulfidaci, (c) homoagregaci, (d) heteroagregaci, (e) potahování NOM (organická hmota), (f) adsorpci NP na biologických površích, (g) sedimentace/depozice a h) perzistence (Převzato a upraveno z Bundschuh *et al.*, 2018).

2.2.4 Ekotoxicita

ENP byly zkoumány z hlediska jejich potenciální toxicity, souvisejícího environmentálního rizika a následně považovány za nové znečišťující látky (Throbäck *et al.*, 2007; Cañas *et al.*, 2011). Nanotoxikologie označuje zkoumání interakcí nanostruktur s biologickými systémy, vysvětluje vztah mezi fyzikálními a chemickými vlastnostmi, tzn. chemií povrchu, složením, velikostí, tvarem a agregací s indukcí toxické biologické odezvy. Někdy může být toxicita způsobena toxicitou prekurzorů, které byly použity pro jejich přípravu. Nanočástice se tedy mohou lišit svými toxikologickými účinky, které závisí na rozmanitosti a velikosti částic, druhu testovaného organismu a testovacích metodách.

Postupné zvyšování ENM v přírodním prostředí může být spojeno s potenciálními riziky, ale chápání zdravotních a bezpečnostních aspektů ENM je stále v počátečním stadiu (Yokel a McPhail, 2011). Toxicita ENM vůči organismům může pramenit jak

z přímé toxicity, tak z toxicity nepřímé. Pokud jde o přímou toxicitu ENM, jsou toxické účinky na organismy způsobeny jejich vysokou povrchovou reaktivitou, protože velká plocha ENM může zvýšit jejich reaktivitu a způsobit katalýzu redoxních reakcí s organickými molekulami. Nepřímé účinky ENM na organismy mohou být důsledkem uvolnění jejich toxických iontů nebo jiných toxických znečišťujících látek přenášených ENM (Navarro *et al.*, 2008). Ačkoli nanočástice mohou primárně zacílit na dýchací orgány, mohou se také dostat do gastrointestinálního traktu mnoha způsoby, například nepřímo přes mukociliární pohyb nebo přímo orálním příjmem drog, vody a potravin (Meng *et al.*, 2007).

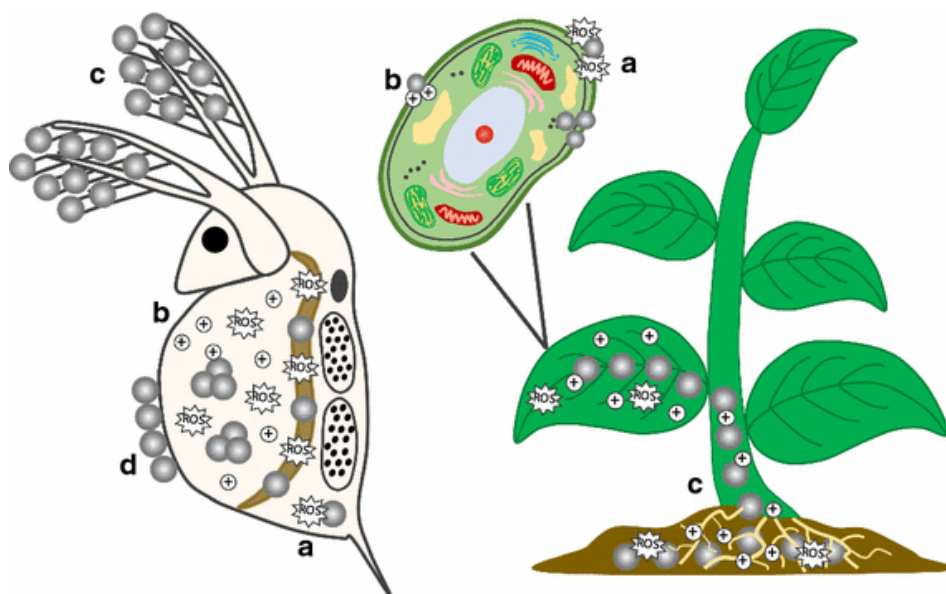
Studie pro posouzení nebezpečnosti ENP na různých organismech na úrovni potravního řetězce, jako jsou bakterie, řasy, ryby, korýši a hlístice, ukázaly, že ENP kovů (jako Ag, TiO₂, ZnO a Cu) jsou toxické při koncentracích souvisejících s životním prostředím (Holden *et al.*, 2014). ENP se často používají pro své silné antimikrobiální a antivirové vlastnosti a mají nepříznivé účinky na funkce přežití, reprodukce a mobility půdních organismů, a to v závislosti na dávce, velikosti, tvaru a reakci ENP v půdním prostředí. Chování ENP v půdním prostředí se také liší v závislosti na různých formách ENP, což má za následek biologickou dostupnost, chemické změny a možné transformace v půdním prostředí (Cornelis *et al.*, 2013).

2.2.5 Účinky nanočástic a jejich mechanismy toxicity

Zhruba před patnácti lety při zahájení výzkumného oboru "nano-ekotoxikologie", Moore (2006) a Hund-Rinke a Simon (2006) navrhli, že NP mají potenciál působit škodlivě v biotě vznikem reaktivních druhů kyslíku (ROS), které by mohly ovlivnit biologické struktury (obr. 3). Moore (2006) také poukázal na potenciál NP fungovat jako nosiče pro jiné znečišťující látky. Poslední desetiletí výzkumu ukázalo, že NP má schopnost jednat prostřednictvím několika cest, indukce oxidativního stresu je jedna z nich. Žádný mechanismus toxicity nemůže být považován za obecný pro všechny NP, oxidační stres je však často hlášený jev (Mwaanga *et al.*, 2014).

Byly popsány další relevantní mechanismy a fyziologické důsledky, které mohou vést až k selhání reprodukce modifikací hormonů (Muller *et al.*, 2015). Tyto účinky naznačují důsledky v populačním vývoji a naznačují potenciál pro transgenerační následky (Jacobasch *et al.*, 2014). Kromě toho byly řasy (Zou *et al.*, 2016) a vodní rostliny (Jiang *et al.*, 2017) změněny ve své fotosyntetické pigmentové kompozici a vykazovaly změny

ve fotosystému II. Podobně několik nedávných článků pokrývá akumulaci NP v suchozemských rostlinách, které mohou způsobit biochemické a fyziologické změny (Du *et al.*, 2017; Tripathi *et al.*, 2017). Cao *et al.* (2017) například popsali dopady na fixaci uhlíku a účinnost využití vody během fotosyntézy v reakci na expozici CeO₂NP. Ty mohou mít nepřímé účinky na půdní organismy prostřednictvím důsledků na půdní vlhkost. Kromě této masivní rozmanitosti, co se týče mechanismů toxicity mezi NP, druhy a ekosystémy, přitahovaly pozornost vědců i některé obecnější otázky, například význam iontů uvolňovaných z NP.



Obr. 3 Potenciální ekotoxicita NP ve vodních a suchozemských režimech, ilustrující lokálně působící mechanismy jako tvorba ROS (a), uvolňování iontů (b), internalizace (c) a biologické povrchové úpravy (d) (Převzato a upraveno z Bundschuh *et al.*, 2018).

2.2.6 Nanočástice a rostliny

Jako primární výrobci (schopnost fotosyntézy) jsou rostliny klíčové pro fungování každé komunity, protože jsou zodpovědné za přeměnu sluneční energie na organickou hmotu, kterou mohou využívat jiné trofické skupiny (McKee a Filser, 2016). Rostliny slouží jako potenciální cesta pro přepravu NP. Organismy v ekosystému by mohly trpět oxidačním stresem vyvolaným NP (Hong *et al.*, 2014). V posledních letech se výzkum v této oblasti zaměřil na interakci mezi rostlinami a NP a na účinky NP na ekologii, potravní řetězec a lidské zdraví, hodnocení kladů a záporů NP vyžaduje interdisciplinární znalosti (Tolaymat *et al.*, 2015).

Přenos nanočástic je možný také díky konzumaci rostlin živočichy. Existuje riziko, že by se nanočástice mohly dostat do potravního řetězce a stát se nebezpečnými pro člověka (poslední článek v potravním řetězci). Nadměrné používání nanočástic vede k jejich hojnému výskytu v životním prostředí a v důsledku toho se rostliny i zvířata mohou stát zdrojem nanočástic pro člověka (Unrine *et al.*, 2012; Hawthorne *et al.*, 2014).

Přestože jsou rostliny výrobci a hrají v ekosystému hlavní roli, dopad nanočástic na ně není dostatečně prozkoumán (Zuverza-Mena *et al.*, 2017). Absence správných metod detekce nanočástic v prostředí studium nanočástic poměrně komplikuje. Mezi možné techniky patří hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), je to jedna z nejspolehlivějších technik pro detekci nanočástic (Navratilova *et al.*, 2015; Mahdi *et al.*, 2017). Výzkum provedený na různých rostlinách ukázal, že nanočástice mohou mít pozitivní i negativní dopad na rostliny v závislosti na velikosti, koncentraci, chemickém složení, zeta potenciálu, stabilitě a tvaru nanočástic (Nhan *et al.*, 2015; Tripathi *et al.*, 2015, 2017; Wang *et al.*, 2016a). Několik studií zachycuje negativní dopad nanočástic na rostliny ve formě poklesu růstu rostlin, produktivity a pigmentů (Landa *et al.*, 2016; Tripathi *et al.*, 2017). Na druhé straně, inteligentně navržené nanočástice se také používají ke zlepšení zemědělské produkce plodin, jako stimulátorů růstu, nanopesticidů, nanomateriálů, látky zlepšující kvalitu půdy nebo senzory, které monitorují různé zemědělské parametry (Fraceto *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016a).

Hodnocením literatury se ukazuje, že v posledních letech většina těchto studií měřila dopady ENM na fotosyntetické procesy, oxidační stres, antioxidační enzymatickou aktivitu, schopnost zachytávat radikály, genovou expresi a makromolekulární modifikace (DNA, protein, uhlohydráty, mastné kyseliny, lignin) v jedlých rostlinách. Většina těchto

studií však byla prováděna ve fázi klíčení nebo ve stádiích raného růstu a za krátkých expozičních časů. Chybí tedy pochopení dlouhodobých rizik a přínosů ENM pro rostliny a rostlinné systémy. Navzdory rostoucí literatuře o ENM zůstává mnoho otázek ohledně způsobů absorpce ENM rostlinami a základních mechanismů pro akumulaci a transformaci ENM v rostlinných pletivech (Gardea-Torresdey *et al.*, 2014).

2.2.6.1 Příjem a distribuce v rostlině

Nanočástice mohou do rostlinných pletiv vstoupit buď prostřednictvím kořenových, nebo nadzemních částí rostliny. NP i živiny z půdy jsou přijímány absorpčními povrchy kořenů. Po příjmu NP kořeny a penetraci epidermálními buňkami se NP translokují do xylému a dostávají se do dalších segmentů rostliny (Zhang *et al.*, 2015a). Když nanočástice interagují s rostlinou, buněčná stěna je první bariérou, kterou musí překročit. Pro překonání intaktní buněčné membrány se NP pohybují póry v buněčné membráně, což naznačuje, že vychytávání nanomateriálu je specifické na velikost (obr. 4) (Ma *et al.*, 2010a). Rostlinné buněčné stěny jsou strukturou, která umožňuje vstup malých částic a omezuje větší, proto menší nanočástice mohou touto vrstvou procházet poměrně snadným způsobem ve srovnání s nanočásticemi většími. Limit propustnosti buněčné stěny u rostlin je mezi 5 a 20 nm (Dietz a Herth, 2011). Bylo popsáno, že některé z nanočástic indukují tvorbu větších pórů v buněčné stěně, což dále usnadňuje vstup velkých nanočástic (Kurepa *et al.*, 2010).

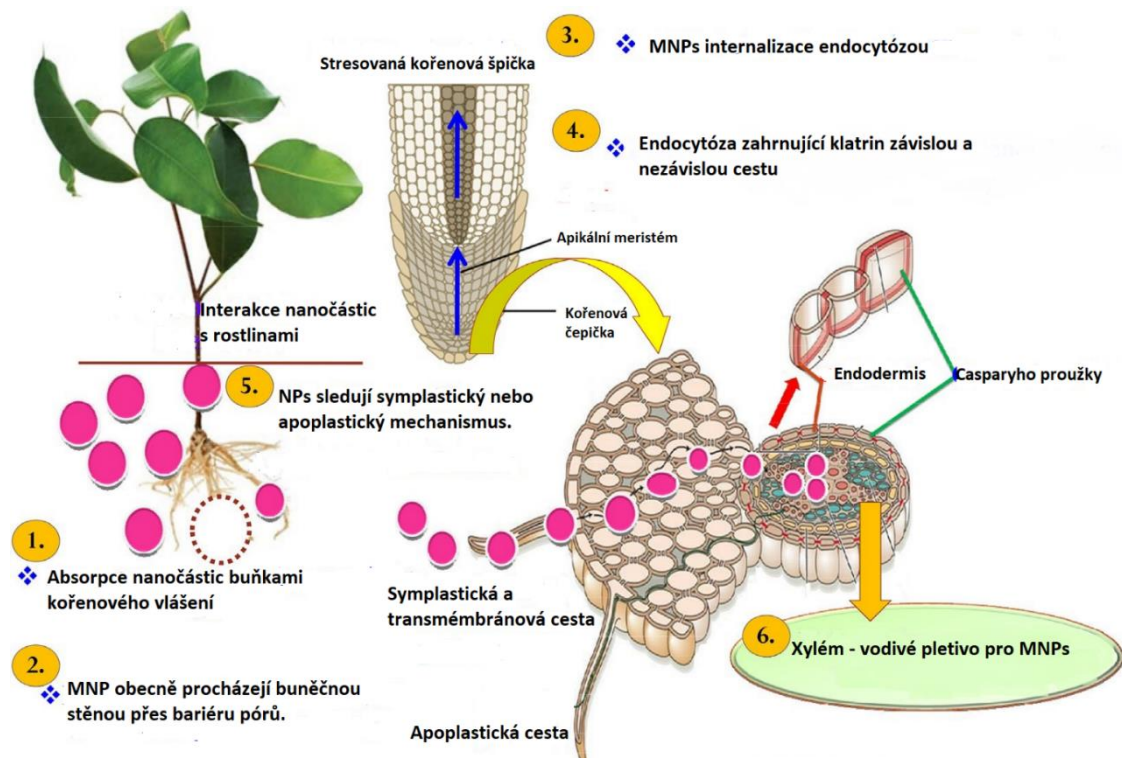
Xylém slouží jako nejdůležitější prostředek v distribuci a translokaci nanočástic (obr. 4). Wang *et al.* (2012a) demonstrovali xylémem a floémem zprostředkované vychytávání, translokaci a distribuci CuONP (20-40 nm) z kořene do výhonku přes xylém a jeho reverzní transport do kořene skrze floém (*Zea mays* L.). Do xylému se NP mohou dostat apoplastem nebo symplastem. Skrz apoplast (buněčné stěny a mezibuněčné prostory) se lehce dostávají roztoky málo regulovanou difúzí. Překážkou pro průnik do xylému je endodermis, konkrétně Casparyho proužky. Endodermis usměrňuje příjem živin, vody a tvoří ochranu proti penetraci toxických kovů a patogenů. Jak se dostávají NP přes C. proužky není zatím zcela vysvětleno. Další možnosti, jak se dostat do xylému je symplastem neboli vnitrobuněčným transportem plazmatickými membránami prostřednictvím plazmodezmat (kanály propojující sousední buňky) (Tilney *et al.*, 1991).

Mechanismus absorpce NP je obecně považován za mechanismus aktivního transportu, který zahrnuje několik dalších buněčných procesů, jako je signalizace,

recyklace a regulace plazmatické membrány (Etcheberria *et al.*, 2009). Na rozdíl od rostlin, endocytické dráhy jsou vysoce charakterizovány pro příjem NP u zvířat (Iversen *et al.*, 2011). Endocytický proces zahrnuje klatrin-závislé a klatrin-nezávislé cesty (obr. 4) (Miralles *et al.*, 2012). Klatrin-závislé cesty zahrnují tvorbu složených nebo opláštěných struktur na plazmové membráně, z kterých později vznikají vezikulární struktury pokryté klatrinem (Kam *et al.*, 2005). Klatrin-nezávislé cesty se vyskytují ve třech formách (fagocytóza, kalveoly zprostředkovaná endocytóza a endocytóza v tekuté fázi) (Murphy *et al.*, 2005). Některé *in vitro* studie izolovaných protoplastů odhalily, že rostlinné buňky také sledují endocytické dráhy, a to pro vychytávání konstruovaných NP (obr. 4) (Iversen *et al.*, 2011). Onelli *et al.* (2008) pozorovali obě cesty (nezávislé na klatrinu i závislé na klatrinu) v tabáku (*Nicotiana tabaccum*), pro internalizaci AuNP.

V případě pohybu nanočástic shora dolů mohou vstoupit do listů rostlin dvěma cestami, a to kutikulárními anebo stomatálními cestami (Buick *et al.*, 1993). Listy jsou chráněny vrstvou kutikuly a průnik skrz ni probíhá polární nebo lipofilní cestou. Polární póly vyplněné vodou využívají živiny v podobě iontů. Rychlejší transport přes voskovou vrstvu využívají látky lipofilní. Po překlenutí kutikuly se látky dostávají do volného prostoru, kde se nachází prostory buněčných stěn a mezibuněčné prostory. Odtud pronikají do hlubších vrstev mezofylu, přičemž zde dochází buď k akumulaci, nebo se dostávají do floémového toku a následně do ostatních rostlinných orgánů (Zhang *et al.*, 2015a). V obou případech je nutný vstup látek do buňky přes cytoplazmatickou membránu. Eichert a Goldbach (2008) ukázali, že hydrofilní částice se přenášejí přes póry stomat, když velikost částic činí <40 nm. Kromě toho, když jsou listy vystaveny konstruovaným NP, hromadí se v stomatech namísto cévního svazku, a nakonec se přemísťují na různé části prostřednictvím floému. Několik fyzikálně-chemických rozdílů mezi druhy rostlin, jako rozdíl v hydraulické vodivosti, velikost pórů buněčné stěny atd., mohou ovlivnit transport a hromadění nanočástic (Judy a Bertsch, 2014).

Výzkumy v poslední době ukazují, že existují rostliny, které NP akumulují a transportují do vzdálených rostlinných orgánů, ale jsou i druhy které průniku NP brání a hromadí je v místě příjmu. Výsledek interakce mezi rostlinou a NP velmi záleží na podmínkách experimentu, typu NP a na rostlinném druhu (Cyrusová, 2015).



Obr. 4 Navrhovaný model získávání a translokace nanočástic pravděpodobnými cestami (Převzato a upraveno z Tripathi *et al.*, 2017).

2.2.6.2 Příjem a translokace v kulturních plodinách

Internalizace kovů a oxidů kovů NP do jedlých a reprodukčních částí plodin je obzvláště znepokojivá, neboť většina NP je toxická pro živé organismy. Několik studií uvádí, že rostliny mohou absorbovat NP a oxidy kovů NP buď prostřednictvím půdy nebo kontaktem s listy (Shi *et al.*, 2014). Nanočástice mohou procházet rostlinami tím, že ulpívají na kořenových površích a vstupují do epidermis a kůry apoplastickou cestou (Du *et al.*, 2011).

Příjem a translokace NP v rostlinách se však může lišit podle druhů rostlin, kultivarů a růstových podmínek (Slomberg a Schoenfisch, 2012; Zhao *et al.*, 2012a,b). Kulturní plodiny exponované NP a kovovým oxidům akumulovaly NP ve svých kořenech a přemísťovaly je do nadzemních částí v množství, které záviselo na rostlinách, koncentraci expozice, velikosti, typu a aglomeraci NP (Larue *et al.*, 2012a; Song *et al.*, 2013a). Cifuentes *et al.* (2010) uvedli, že magnetické NP pokryté uhlíkem pronikly kořeny ve čtyřech plodinách včetně hrachu (*Pisum sativum* L.), slunečnice (*Helianthus annuus* L.), rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) a pšenice (*Triticum aestivum*) pohybovaly se směrem k vaskulárnímu válci a transpirací cévami xylému dosáhli i nadzemních částí. Podobné výsledky byly zaznamenány u rýže (*Oryza sativa*) s AgNP (Thuesombat *et al.*, 2014). Hong *et al.* (2014) a Larue *et al.* (2014) pozorovali internalizaci do listů foliárně

aplikovaných CeO₂ a TiO₂ v listech okurky (*Cucumis sativus* L.) a hlávkového salátu (*Lactuca sativa* L.) a oba typy nanočástic byly pozorovány v různých částech plodin. Antisari *et al.* (2015) studovali absorpci nanočástic oxidů kovů (CeO₂, Fe₃O₄, SnO₂ a TiO₂) a kovových nanočástic (Ag, Co a Ni) v rajčatech. Autoři uváděli, že kovy z NP se hromadí hlavně v kořenech rajčat a rostliny ošetřené nanočásticemi Ag, Co a Ni vykazují vyšší koncentraci prvků jak ve výhoncích, tak v kořenech ve srovnání s kontrolou. Podobné výsledky byly zaznamenány u sazenic rajčat vystavených CeO₂NP (Wang *et al.*, 2012b).

Na druhé straně kořeny akumulovaly kovy z NP, ale kovy nebyly v mnoha rostlinách přemístěny do nadzemních částí. Například Rico *et al.* (2013a) uvedli, že akumulace ceru se zvýšila v kořenech pšenice se zvyšující se koncentrací CeO₂NP v půdě, ale neměnila se napříč ošetřeními v listech a zrnech, což naznačuje nedostatek translokace Ce do nadzemních částí pšenice. Podobně (Wang *et al.* 2011) uvedli, že Fe₃O₄NP nebyly translokovány do výhonků v dýni (*Cucurbita maxima* L.).

Transformace je kritický faktor, který ovlivňuje osud a toxicitu NP v živých organismech. Po absorpci kořeny mohou rostliny transformovat NP do jiných forem (Hernandez-Viezcas *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2014). Du *et al.* (2011) odhalili, že většina TiO₂NP byla nalezena adherující na buněčnou stěnu kořenové špičky pšeničných kořenů peridermních buněk, zatímco kořeny ošetřené NP z oxidu zinečnatého byly bez částic. Bylo publikováno, že kořeny řepky (*Brassica napus*) a pšenice akumulovaly vyšší koncentraci TiO₂NP o velikosti 14 nm než stejné NP o velikosti 25 nm. Translokace z kořene do výhonků se zvyšovala se snižováním velikosti NP a řepka nahromadila více Ti než pšenice (Larue *et al.*, 2012b). Autoři tvrdí, že tento rozdíl by mohl být způsoben stavem aglomerace NP během expozice rostlin. Larue *et al.* (2012b) uvedli, že TiO₂NP s průměrem větším než 140 nm nebyly akumulovány v kořenech pšenice a NP s průměrem větším než 36 nm akumulovány v kořenech pšenice byly, ale nebyly translokovány do výhonků.

V souhrnu je ovlivněn příjem živin a růst hlavních zemědělských plodin vystavených NP. Současné poznatky ukazují, že NP jsou přijímány rostlinami buď prostřednictvím kořenové nebo listové expozice, v závislosti na typu a velikosti NP, expozičním médiu a rostlinných druzích. NP jsou přemístěny do různých částí plodin a tato akumulace NP do důležitých potravinářských plodin má význam pro potravní řetězec. Mechanismy

interakce rostlin a NP jsou však stále málo pochopeny a pro jejich prozkoumání, zejména na molekulární úrovni, jsou nutné podrobnější studie (Rizwan *et al.*, 2017).

2.2.6.3 Účinky na rostliny

Většina nanočástic způsobuje toxicitu v některých koncentracích ovlivňujících produktivitu plodin tím, že mění jejich morfomanotomické, fyziologické, biochemické a genetické konstituce (Rico *et al.*, 2015a, Tripathi *et al.*, 2016). Mnoho studií prokázalo fytotoxicitu MNP způsobenou produkcí reaktivních druhů kyslíku (ROS), která následně vede k oxidativnímu stresu, peroxidaci lipidů, proteinům a poškození DNA u rostlin (Ma *et al.*, 2015). Vzhledem k tomu, že rostliny přijímají nanočástice různých velikostí, přemísťují je do výhonku a hromadí je v různých nadzemních částech, zvyšuje se možnost jejich cyklování v ekosystému na různých trofických úrovních (Monica a Cremonini, 2009). Po akumulaci začnou degradovat kvalitu plodin, což snižuje klíčivost semen, snižuje čerstvou a suchou biomasu a délku kořenů a výhonů, mění proces fotosyntézy, zvyšuje kondenzaci chromatinu, zvyšuje poškození DNA, zvyšuje lipidovou peroxidaci a nakonec vede k apoptóze (Hossain *et al.*, 2016). Nicméně, rostliny mají některé obranné strategie k překonání toxicity způsobené stresovými podmínkami včetně nanočástic. Rostliny mohou aktivovat různé enzymatické a neenzymatické obranné systémy proti stresu (viz kapitola 2.2.6.6).

2.2.6.4 Vliv nanotechnologií na obsah živin

Nanotechnologie má potenciál hrát klíčovou roli v celosvětové produkci potravin. Aplikace nanotechnologií v zemědělství zahrnují hnojiva ke zvýšení výnosu, pesticidy pro ochranu před škůdci a chorobami a senzory pro sledování kvality půdy a zdraví rostlin. Během posledního desetiletí bylo vyvinuto množství patentů a produktů, které začleňují nanomateriály do zemědělských postupů. Společným cílem všech těchto přístupů je zvýšit účinnost a udržitelnost zemědělských postupů vyžadováním méně vstupů a méně odpadu než konvenčními produkty. Tento zvýšený výtěžek může být spojen nejen se sníženou přítomností patogenních organismů, ale také s potenciální výživnou hodnotou samotných nanočástic, zejména u mikroživin nezbytných pro obranu hostitele (Servin *et al.*, 2015).

Dopad ENM na obsah živin v rostlinách přímo konzumovaných lidmi dosud nebyl plně prozkoumán. Studie krátkodobých expozic ukázaly, že nanočástice TiO₂, Ag, SiO₂ a ZnO modulovaly hladiny proteinů ve fazoli (*Phaseolus vulgaris*), špenátu (*Spinacia*

oleracea) a kukuřici (Suriyaprabha *et al.*, 2012a; Gao *et al.*, 2013). AgNP a MWCNT („Multi-walled carbon nanotube“) změnily obsah uhlohydrátů ve fazoli, kukuřici, rýži, hořčici (*Sinapis alba*) a v bakopě (*Bacopa monnieri*) (Krishnaraj *et al.*, 2012). CeO₂NP modifikoval profil mastných kyselin a obsah ligninu v rýži (Rico *et al.*, 2013b), MnNP změnilo obsah aminokyselin a cukru ve vigně zlaté (*Vigna radiata*) (Pradhan *et al.*, 2013), a AgNP, MnNP a MWCNT změnilo produkci fenolu v kukuřici, ve vigně zlaté a ve skoččci obecném (*Ricinus communis*) (Yasur a Rani, 2013; Tiwari *et al.*, 2014). Je tedy velmi pravděpodobné, že ENM by mohly změnit nutriční profil kulturních plodin. Nanočástice Ag nezměnily množství fenolových a taninových sloučenin v léčivých rostlinách brutnáku (*Borago officinalis*), ale zvýšily celkový rozpustný obsah pevných látek (míra obsahu cukru) v plodech okurky při vyšších koncentracích (2500 až 3000 ppm) (Sahandi *et al.*, 2011). Ošetření 10 ppm AuNP zvýšilo celkový obsah cukru v listech brukve (*Brassica juncea*) o 43 %, což mělo za následek odpovídající zvýšení obsahu oleje o 3–4 %. Avšak při 100 ppm došlo k paralelnímu poklesu obsahu cukru i oleje (Arora *et al.*, 2012). Servin *et al.* (2012) uvádějí zvýšený obsah fosforu a draslíku (34 a 35% vzestup v porovnání s kontrolou) v plodech okurek sklizených z rostlin ošetřených 500 ppm TiO₂NP. Podobně FTIR detekoval rozdíly ve spektrech okurkových plodů ošetřených TiO₂NP, výhonků koriandru (*Coriandrum sativum*) a zrn rýže ošetřených CeO₂NP, což naznačuje změny v obsahu cukru, lipidů a bílkovin vyvolané ENM (Morales *et al.*, 2013). Rico *et al.* (2013b) zjistili, že CeO₂NP způsobil značné snížení Fe, S, prolaminu, glutelinu, kyseliny laurové a valerové a obsah škrobu v zrnech rýže. V související studii fullerol významně zlepšil obsah protirakovinového (kukurbitacin-B a lykopen) a antidiabetického charantinu a inzulinu v hořkém melounu (*Momordica charantia*) (Kole *et al.*, 2013). Tato zjištění společně naznačují, že ENM by se mohly podílet na nutričních modifikacích potravinářských plodin, které mohou ovlivnit lidskou stravu (Gardea-Torresdey, 2014).

2.2.6.5 Fytotoxicita

Rostliny jsou díky své statické povaze a interakci s půdou a vzduchem vystaveny NP, které se uvolňují do životního prostředí. Přímé vystavení rostlin kovům a oxidům kovů NP by tak nemělo být ignorováno. V posledních několika letech byly hlášeny prospěšné i negativní účinky NP na růst plodin. Tyto účinky závisely na typu, zdroji a velikosti NP, rostlinných druzích a době expozice NP plodinám (Bandyopadhyay *et al.*, 2015; Lalau *et al.*, 2015). Například AgNP zvýšily hladinu askorbátu a chlorofylu v listech chřestu

(*Asparagus officinalis* L.) a FeNP zvýšily biomasu sóji (*Glycine max* L.) (Roghayyeh *et al.*, 2010). Podobně aplikace nanočástic křemíku zvýšila klíčivost semen, délku kořenů a výhonků, fotosyntézu a suchou hmotnost sazenic kukuřice pěstovaných v polních podmínkách (Suriyaprabha *et al.*, 2012b). Navíc TiO₂NP snížily koncentraci H₂O₂, malondialdehydu (MDA) a únik elektrolytů v cizrně (*Cicer arietinum* L.) ve srovnání s kontrolními rostlinami (Mohammadi *et al.*, 2014). Na druhou stranu několik zpráv naznačilo, že kovové NP negativně ovlivňovaly růst a fyziologii důležitých plodin, jako je pšenice, rýže, kukuřice a sója (Dimkpa *et al.*, 2012; Mahmoodzadeh *et al.*, 2013; Nair a Chung, 2014; Shaw *et al.*, 2014). Kromě toho byly nanočástice kovů a oxidů kovů pro plodiny toxičtější než objemné kovové částice (Wang *et al.*, 2011). Bylo prokázáno, že plodiny vystavené NP mohou vychytávat a přemisťovat NP do různých částí plodin (Du *et al.*, 2011; Rico *et al.*, 2015b). NP snížily klíčivost semen mnoha plodin (Thiruvengadam *et al.*, 2014; Xiang *et al.*, 2015). Toxické účinky NP u mnoha druhů rostlin lze pozorovat snížením růstu rostlin, biomasy a výnosu ovoce/obilí (Rico *et al.*, 2015b; Servin *et al.*, 2012). Nadbytek NP způsobil fyziologické poruchy v plodinách (snížení fotosyntézy a atributů výměny plynů), oxidační stres a snížení aktivity antioxidantních enzymů (cytotoxicita a genotoxicita) (Cui *et al.*, 2014). Několik studií uvádí, že NP snižovaly mitotický index a zhoršovaly stádia buněčných dělení v kořenových špičkách mnoha rostlin a změnilly expresi genů souvisejících s růstem kořenů (Vannini *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015a). Nanočástice jsou nejen přímo toxické pro rostliny, ale také způsobují nepřímou toxicitu změnou růstového média, poškozováním kořenů, změnou bakteriálních komunit v půdě a způsobením absorpce kontaminantů rostlinami (Ge *et al.*, 2014). NP tedy mohou zvýšit nebo snížit růst a výnos plodin a mohou být přeneseny do potravního řetězce s neznámými důsledky pro lidi a zvířata (Xiang *et al.*, 2015).

2.2.6.6 Vlastní mechanismus detoxikace rostlin vůči toxicitě MNP

Vystavení rostlin různým kovovým nanočásticím ukazuje důkazy o produkci buněčných ROS, ale jak tyto nanomateriály interagují s buněčnými částmi na vyvolání generování ROS a následných antioxidantních mechanismů je záležitostí domněnky (Rico *et al.*, 2015a, Tripathi *et al.*, 2015, 2016). Generované radikály ROS působí jako signální molekuly, čímž aktivují mechanismus obrany antioxidantů rostlin, aby omezili toxicitu vyvolanou volnými radikály. Antioxidantní obranný mechanismus rostlin používá enzymatická činidla, jako je superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), katalasa (CAT, EC

1.11.1.6), askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11), guajakolperoxidasa (GPX, EC 1.11.1.7), dehydroaskorbátreduktasa (DHAR, EC 1.8.5.1) a glutathionreduktasy (EC 1.6.4.2) jako je askorbát, glutathion, thioly, fenoly, atd. (Tripathi *et al.*, 2016). Mezi nimi jsou nejdůležitější antioxidanty s nízkou molekulovou hmotností jako thioly (GSSG nebo GSH) a askorbát. Jak CAT, tak GPX hrají významnou roli při zhášení jak ROS tak peroxy radikálů, zatímco SOD katalyzuje proces dismutace superoxidového aniontu na peroxid vodíku (Rico *et al.*, 2015a). Enzymy jako APX, DHAR a GR se používají v komplexní redoxní homeostáze v cyklu askorbát-glutathion (cyklus AsA-GSH), který řídí nadprodukcí ROS nebo oxidační stav rostlin. U generace ROS vyvolané nanomateriály způsobuje APX redukci H_2O_2 syntetizovaného pomocí SOD na molekulu H_2O . Regenerovaný askorbát pomocí DHAR je opět využíván APX pro snížení hladiny H_2O_2 (Rico *et al.*, 2015a). Redukovaný glutathion je generován GR, který využívá DHAR k regeneraci askorbátu. Wei a Wang (2013) také popsali antioxidační potenciál proti oxidačnímu stresu vyvolanému nanočásticemi v rostlinách. Autoři popsali, že antioxidační enzymy mohou být aktivovány množstvím nanomateriálů, jako jsou CeO_2NP , Fe_3O_4NP a Co_3O_4NP , vyvolávají CAT. CeO_2NP , Fe_3O_4NP , Co_3O_4NP , MnO_2NP , $CuONP$ a $AuNP$ indukují GPX a CeO_2NP , nano Pt a fulleren indukují SOD. Bohužel je obtížné rozeznat tato mimetická chování v experimentech využívajících vystavení nanočástic jednotlivým rostlinám. Existuje řada studií, které ukazují přímý vliv NP na enzymatické aktivity antioxidantů (Mohammadi *et al.*, 2014, Tripathi *et al.*, 2016), stále však neexistuje žádný důkaz, který by mohl korelovat jejich vztahy s chemickými vlastnostmi NP. Studie ve skutečnosti naznačují nerovnoměrné a nepravidelné účinky nanočástic na enzymatické činnosti obranných mechanismů. Například Lei *et al.* (2008) ukázali, že TiO_2NP zlepšil aktivity SOD, CAT, APX a GPX na špenátu. Podobně Song *et al.* (2013b) uvádějí zvýšené aktivity GPX, SOD a CAT v okřešku (*Lemma minor*). Na rozdíl od toho Foltête *et al.* (2011) naznačuje snížené aktivity GR a APX v bobu (*Vicia faba*). Proto je obtížné prokázat pozitivní nebo negativní účinky NP na různých enzymech. Předchozí studie ukazují, že typy, vlastnosti, koncentrace a expoziční prostředí NP jsou hlavními faktory, které ovlivňují reakce antioxidačního obranného systému v rostlinách. Majumdar *et al.* (2014) zaznamenali účinek CeO_2NP na fazolích a ukázali tak, že CeO_2NP by mohly vyvolat toxicitu v rostlinách narušením obranných mechanismů antioxidantů. Vztah mezi toxicitou NP a zobrazením antioxidačního enzymatického systému v rostlinách proto ještě není jasný a téma potřebuje další průzkum. Chen *et al.* (2015) prokázali úlohu oxidu dusnatého (NO) v toxicitě indukované

NP u semen rýže. Podobně Amooaghaie *et al.* (2015), při práci na brukvi (*Brassica nigra*) uvedli, že hematin a nitroprusid sodný hrají významnou roli v regulaci rychlosti klíčení semen při působení stresu nano stříbrem a nitroprusidem stříbra. Pro poskytnutí kvalitnějších údajů jsou potřebné další studie.

2.2.7 Nanočástice titanu

2.2.7.1 Využití a syntéza

Hlavními zdroji průmyslové těžby TiO_2 jsou ložiska nerostů a rud. Většina pigmentu TiO_2 používaného ve spotřebních produktech se extrahuje z ilmenitové rudy (FeTiO_3). Za přírodních podmínek se TiO_2 nachází převážně ve „vázaném stavu“ a není snadno k dispozici pro interakci s biotou (Jovanović, 2015). Od roku 1916 do roku 2011 bylo celosvětově vyrobeno odhadem celkem 165 milionů metrických tun oxidu titaničitého (TiO_2). V roce 2012 bylo na celém světě spotřebováno téměř 6 milionů metrických tun TiO_2 jako pigmentu. Není známo, jaké procento tohoto množství lze připsat nano- TiO_2 , ale Robichaud *et al.* (2009) odhaduje, že do roku 2012 bylo téměř 5 % veškeré produkce připisováno nanoformám. Stejná zpráva naznačovala, že do roku 2023 by mohlo být až 50 % TiO_2 vyrobeno v nanoformách, toto číslo však může být nadhodnoceno, protože nejžádanější velikost částic je 200 nm (Robichaud *et al.*, 2009).

TiO_2 existuje ve třech minerálních formách: anatas, rutil a brookit (Puma *et al.*, 2008). Rutilní TiO_2 je nejstabilnější forma, zatímco anatas a brookit jsou metastabilní a mohou být transformovány do rutilní fáze, když jsou zahřívány při vysoké teplotě (~ 750 °C) (Liao *et al.*, 2012). Anatasový a rutilní TiO_2 se nejčastěji uvádějí jako fotokatalyzátory pod UV zářením a některé výsledky výzkumu ukázaly, že smíšená forma rutilu a anatasu vykazuje zlepšenou fotokatalytickou schopnost (Kho *et al.*, 2010). Typ anatasu TiO_2 má krystalickou strukturu, která odpovídá tetragonálnímu systému, rutilní typ TiO_2 má také tetragonální krystalovou strukturu a brookit strukturu ortorombickou (Byranvand *et al.*, 2013). Rutil je známý jako bílý pigment poskytující neprůhlednost barev, papírů, inkoustů a spotřebního zboží, jako je zubní pasta. V kosmetických prostředcích se rutilní fáze používá jako pigment a zahušťovadlo, dále se používá v plastech a dalších aplikacích kvůli své vlastnosti absorbovat ultrafialové záření. Anatas a brookit se používají jako elektrody v solárních článcích (Jiang *et al.*, 2002)

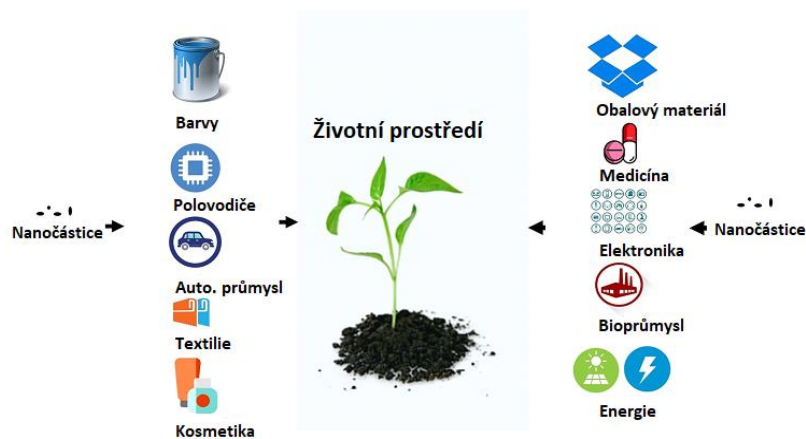
TiO_2 je všestranný materiál a mezi jeho další uplatnění patří krémy na opalování, elektrochemické elektrody, kondenzátory, a dokonce je využíván jako potravinářské

barvivo (Meacock *et al.*, 1997). TiO₂NP se používají v zubní pastě, potravinářských barvivech a v doplňcích výživy. Podle nedávné studie obsahují bonbóny, sladkosti a žvýkačky vyšší množství nanočástic TiO₂ (<100 nm) (Weir *et al.*, 2012). Skutečný průměr velikosti částic TiO₂ (E171) v potravě je 110 nm, přičemž nejméně 36 % částic má průměr menší než 100 nm a rozmezí velikostí částic je 30 až 400 nm (Weir *et al.*, 2012). TiO₂NP patří k nejpoužívanějším nanočásticím, které se používají v kosmetických prostředcích a produktech pro péči o pleť, v antibakteriálních, čisticích prostředcích pro vzduch, pro rozklad organických látek v odpadních vodách a v dodávce léčiv (Grande a Tucci, 2016). V budoucnu se předpokládá využití těchto NP k posílení a zmírnění účinků chemoterapie, aby byla léčba rakoviny cílenější a efektivnější (Wang *et al.*, 2015b; You *et al.*, 2016). Obecně je TiO₂ preferován v anatasové formě, protože má vysokou fotokatalytickou aktivitu, je netoxický, fotochemicky stabilní a relativně levný (Byranvand *et al.*, 2013).

Morfologie TiO₂ zahrnuje hlavně nanostruktury, jako jsou nanotrubičky (Varghese *et al.*, 2003), nanowire (Wen *et al.*, 2005), nanorody (Wu *et al.*, 2007) a mezoporézní struktury (Yi *et al.*, 2001). V posledních letech existuje řada různých metod syntézy, jako hydrotermální metoda (Andersson *et al.*, 2002), solvotermální metoda (Wahi *et al.*, 2006), sol-gel metoda (Bazargan *et al.*, 2012), metoda přímé oxidace (Ryu *et al.*, 2008), chemická depozice par (Shinde a Bhosale, 2008), elektrolytická depozice (Tan *et al.*, 2009), sonochemická metoda (Arami *et al.*, 2007), a mikrovlnná metoda (Corradi *et al.*, 2005), která byla použita pro přípravu nanostrukturovaného TiO₂.

2.2.7.2 Ekotoxicita nano TiO₂

Z hlediska ekotoxicity jsou TiO₂NP zdaleka nejrozsáhleji studovanými nanočásticemi oxidu kovu. Jedním z důvodů pro velké množství údajů o toxicitě nano TiO₂ je přijetí tohoto nanomateriálu různými průmyslovými odvětvími (obr. 5). Nano TiO₂ byl mezi prvními nanomateriály, které byly snadno komerčně dostupné pro širokou škálu činností. Odhadovaná výroba do roku 2025 je přibližně 2,5 milionu metrických tun (Robichaud *et al.*, 2009). Takové rozšířené použití nano TiO₂ může vést k významnému uvolnění do životního prostředí.



Obr. 5 Využití nanočástic v různých průmyslových odvětvích a jejich únik do životního prostředí (Převzato a upraveno z Rastogi *et al.*, 2017).

Bylo zjištěno že TiO_2NP se mohou vyluhovat z vnějších fasádních barev a následně se dostat do povrchových vod. Koncentrace kovového Ti nalezeného v povrchovém odtoku bylo až $600 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Kaegi *et al.*, 2008). Kiser *et al.* (2009) změřili úroveň odstraňování a uvolňování nanomateriálů titanu z čistíren odpadních vod. Zjistili, že surová odpadní voda obsahuje $100\text{-}3000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ti. Koncentrace Ti v odpadních vodách z čistíren odpadních vod se pohybovala od 5 do $15 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Gottschalk *et al.*, 2009).

Nano TiO_2 může vyvolat ekotoxicitu v důsledku průmyslových procesů a spotřebního zboží, jako je použití potravinářského nano TiO_2 a dezinfekčního prostředku pro odpadní vody (Yang *et al.*, 2014). Poté, co se NM rozšířily do vod, nano TiO_2 vykázal nepříznivé účinky na vodní živočichy, včetně vysoké úmrtnosti *Oryzias latipes* (Ma *et al.*, 2012), změn v genové expresi u *Danio rerio* (Griffitt *et al.*, 2008), těžké retardace růstu, mortality a reprodukčních defektů u *Daphnia magna* (Zhu *et al.*, 2010) a vývojové neurotoxicity u *Danio rerio* prostřednictvím fototoxicity po UV záření (Wang *et al.*, 2014). V případě hydrofytů ovlivnil nano TiO_2 funkce genů souvisejících s fotosyntézou a zvýšenou hladinu ROS prostřednictvím UV záření (Simon *et al.*, 2013).

Kromě toho nano TiO_2 může interagovat s jinými kovy (např. Pb) a modifikovat jejich biologickou dostupnost a toxicitu ve vodním prostředí. Nano TiO_2 vykazoval synergické účinky s ionty těžkých kovů (např. Zn^{2+}) ke zvýšení fytotoxicity na fotosyntetickou kapacitu a míru přežití řas (Tang *et al.*, 2013). Ve srovnání s ošetřením samotným Pb byla biokoncentrace a toxicita Pb významně zvýšena při kombinaci s nano TiO_2 ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) u larev *Danio rerio*, což vedlo k narušení štítné žlázy a neuronálního systému (Sun *et al.*, 2014).

Nano TiO₂ přítomný v půdě také ovlivňuje bakterie a suchozemské rostliny. U půdních bakteriálních komunit byla mikrobiální biomasa a diverzita snížena po expozici nano TiO₂, což může změnit složení a funkci bakteriální komunity v ekosystémech (Binh *et al.*, 2014). Nano TiO₂ může být absorbován z půdy pozemskými rostlinami, když rostou, hromadí se ve stoncích, listech a plodech prostřednictvím rostlinných metabolických systémů a ovlivňuje klíčení, prodloužení kořenů semen a sazenic (Song *et al.*, 2013a,b). Aby se zabránilo vlivům vlastností půdy a různých složek v ní, byla hydroponní kultura použita při hodnocení nanotoxicity rostlin, přičemž výsledky naznačují, že toxičtější je ve vodě než v půdě (Joško a Oleszczuk, 2014).

2.2.7.3 Nano TiO₂ a rostliny

Bylo provedeno několik studií, které naznačují, že TiO₂NP může ovlivňovat rostliny pozitivně i negativně. Vzhledem k fotokatalytickým vlastnostem titanových nanočástic prokázala většina studií, kde byl TiO₂NP použit na foliární úrovni, pozitivní dopad na rostlinu (Jaberzadeh *et al.*, 2013; Raliya *et al.*, 2015). Bylo pozorováno, že špenát dosáhl více než 60 % nárůstu čerstvé hmotnosti a suché hmotnosti pod vlivem TiO₂NP (Gao *et al.*, 2013). Gao *et al.* (2013) také pozorovali nárůst množství a aktivity rubiscoaktivasy ve fotosyntéze. Listové ošetření TiO₂NP také ukázalo lepší růst rostliny, zvýšení výnosu ovoce a koncentraci chlorofylu v rajčatech (Raliya *et al.*, 2015). Jaberzadeh *et al.* (2013) uvedli, že TiO₂NP působí proti vodnímu stresu v pšenici zlepšením agronomických vlastností. Rovněž bylo pozorováno, že menší TiO₂NP je transportován kořeny a bylo zjištěno, že nad průměrem 140 nm se již TiO₂NP v kořenech nehromadí. Bylo pozorováno, že TiO₂NP s průměrem nad 36 nm se hromadí v parenchymu kořene pšenice, ale nedostane se do stéle (centrálního válce), a proto se nedostane do výhonků (Larue *et al.*, 2012a). Reakce rostliny na hydroponickou expozici TiO₂NP se může lišit od reakce na půdní expozici TiO₂NP. Bylo pozorováno, že koloidní suspenze nanočástic inhibují růst a transpiraci listů fyzikálními účinky na transportní systém kořen-voda (Asli a Neumann, 2009). Při vysoké koncentraci bylo pozorováno, že TiO₂NP je toxický pro rostliny, a to i v půdním systému (Rafique *et al.*, 2014). Bylo zjištěno, že fytotoxická odpověď je podobná jako AgNP nebo CuONP, se snížením růstu rostlin, mitotickým indexem a zvýšením ROS, antioxidační aktivity a genotoxicity. Studie ukazuje, že vliv TiO₂NP na různé rostliny závisí na koncentraci, způsobech ošetření a velikosti NP. Studie také ukázala, že dostupnost TiO₂NP pro rostlinu je odlišná, pokud je poskytována ošetřením listů než prostřednictvím půdy nebo vodního roztoku.

Pozitivní vliv TiO₂NP byl v korelaci s fotokatalytickou aktivitou Ti, ale mechanismus této interakce není dosud pochopen (Rastogi *et al.*, 2017).

2.3 Metody

V této kapitole jsou popsány metody, které budou použity v experimentální části práce.

2.3.1 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)

ICP-MS („Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy“) se řadí mezi nejrychleji se rozvíjející analytické metody, které jsou schopny stanovovat i stopové koncentrace kovů, polokovů a nekovů vzhledem k nízkým mezím detekce ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ až $\text{pg}\cdot\text{l}^{-1}$). K dalším výhodám této metody patří zejména možnost multielementárního stanovení, široký lineární dynamický rozsah (9 – 10 řádů), vysoká selektivita, možnost zjištění izotopového složení a taktéž její rychlost. ICP-MS se běžně používá v různých výzkumných oborech, jako je životní prostředí, humanitní a forenzní vědy, v potravinářském, materiálovém, chemickém, polovodičovém a jaderném průmyslu (Ammann, 2007).

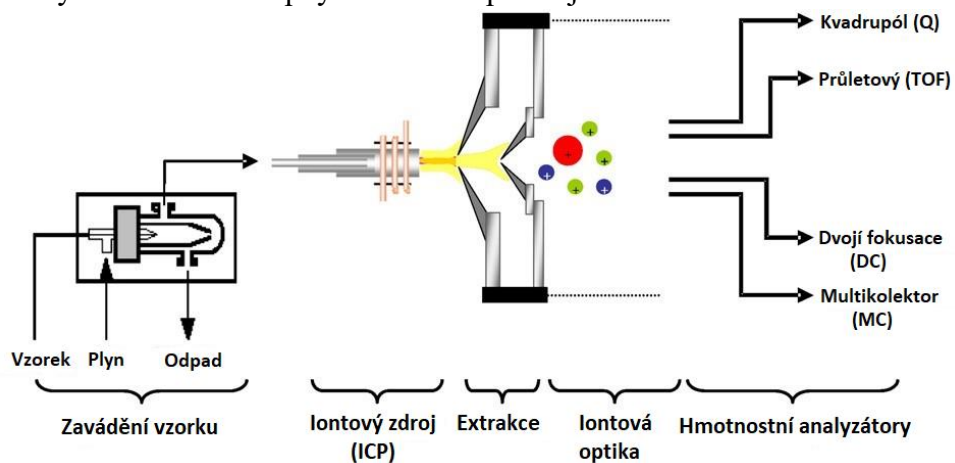
ICP-MS může být využito k analýze pevných, kapalných a plyných vzorků. Pevné vzorky jsou zavedeny do indukčně vázaného plazmatu (ICP) pomocí laserové ablace, výbojové abraze nebo elektrotermického vypařování, kdežto zavádění kapalného vzorku do ICP-MS je zajištěno systémem vnášení vzorku zahrnujícím peristaltické čerpadlo, zmlžovač a mlžnou komoru. Speciální technikou pro analýzu plyných vzorků je pak generování těkavých hydridů HG-ICP-MS (Díaz-Somoano *et al.*, 2004).

Použití vysokoteplotního plazmového výboje k vytváření pozitivně nabitých iontů bylo zkoumáno v průběhu let a dosud nejúspěšnější kombinací bylo spojení ICP s hmotnostní spektrometrií. Ve skutečnosti se ICP-MS od svého prvního vývoje na počátku 80. let (Houk *et al.*, 1980) stalo jednou z nejdůležitějších technik pro stanovení více než 70 % prvků periodické tabulky, ale i k zjištění zastoupení jednotlivých izotopů daného prvku ve vzorku (Becker *et al.*, 2007).

2.3.1.1 Instrumentace a princip

ICP-MS se skládá ze tří základních složek. Iontového zdroje (indukčně vázané plazma), který přeměňuje analyt na ionty plynné fáze; hmotnostního analyzátoru, který separuje ionty analyzovaných prvků podle poměru hmotnost/náboj (m/z) a detektoru, který převádí proud dopadajících iontů na měřitelný elektrický signál. Přístroje jsou vybaveny

četnými přídatnými zařízeními usnadňujícími a urychlujícími vlastní měření, umožňujícími měření vzorků pevných, silně viskózních, či vzorků s vysokým obsahem solí bez předchozí složité úpravy (Horlick, 1994). Obr. 6 schematicky popisuje hlavní komponenty komerčně dostupných ICP-MS přístrojů.



Obr. 6 Schematické nastavení ICP s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (Převzato a upraveno z Bettmer *et al.*, 2009).

Prvotním krokem je vnášení analytického vzorku do plazmové hlavice. Prostřednictvím peristaltického čerpadla je kapalný vzorek přiváděn do zmlžovače, který generuje aerosol. Aerosol následně vstupuje do mlžné komory, která zabraňuje velký kapkám o průměru větším než 10 μm , aby vstoupily do ICP (nedošlo by k jejich úplnému vypaření) a kompenzuje pulsy vytvářené peristaltickým čerpadlem. V plazmové hlavici je ve vysokofrekvenčním elektromagnetickém poli udržováno argonové plazma o teplotě 6 000 – 10 000 K. Plazma je kvazineutrální plyn skládající se z nabitých a neutrálních částic, který vykazuje kolektivní chování. Indukčně vázané plazma je vhodným zdrojem iontů, protože teplota až 10 000 K je schopna ionizovat většinu prvků. V analytickém kanálu plazmatu je tedy aerosol vzorku vysušen, vypařen, účinně atomizován a ionizován. Díky vlastnostem ICP dochází přednostně k ionizaci do prvního stupně. Spojení mezi ICP a spektrometrem je tvořeno interfacem (rozhraním), který je tvořen nejčastěji dvojicí kónusů (*sampler a skimmer*) z niklu či platiny, jsou chlazeny vodou a ve středu se nacházejí malé otvory. Interface zajišťuje přechod iontů z atmosferické části přístroje do vakua hmotnostního spektrometru (Mihaljevič *et al.*, 2004). Fokusaný svazek iontů z iontové optiky vstupuje do analyzátoru, kde dojde k jejich separaci podle poměru m/z v čase (průletové analyzátory, TOF) nebo v prostoru (sektorové analyzátory), případně vyfiltruje z iontového svazku pouze ionty o konkrétním poměru m/z (kvadrupólové filtry). Poté co projdou ionty analyzátozem, dopadají na detektor a tento proud rozseparovaných iontů je převeden na měřitelný elektrický signál.

2.3.1.2 Interference

ICP-MS je limitována interferencemi, které je nezbytné eliminovat. Základní dělení těchto interferencí je na spektrální a nespektrální (Durrant, 1992). Spektrální interference jsou zapříčiněny atomovými nebo molekulovými ionty, jejichž hmotnost je stejná jako hmotnost analytu. Spektrální interference lze rozdělit na izobarické a polyatomické. Tento typ interferencí je možné odstranit měřením zároveň signálu jiného izotopu, který není ovlivněn interferencí nebo aplikací kolizně-reakční cely, která zbaví iontový paprsek polyatomických interferencí (do cely je vháněn kolizní plyn, který rozbíjí vzniklé polyatomické adukty) (Tanner *et al.*, 2002). Nespektrální interference zapříčiňují zvýšení nebo snížení signálu. Tyto interference mohou ovlivňovat zmlžování a transport vzorku, ionizaci v plazmatu nebo prostorový náboj. Nespektrální interference je možné odstranit metodou vnitřního standardu (Furuta a Horlick, 1982).

Interference lze obecně minimalizovat vhodným výběrem měřeného izotopu, pečlivou přípravou vzorků, kdy používáme nejčistší kyseliny, chemikálie a vodu co nejvyšší čistoty, aby se zabránilo kontaminaci vzorku (Morita *et al.*, 1994). Ředění vzorků se uzpůsobuje předpokládanému obsahu analytu, a hlavně možnostem přístroje ICP-MS, protože vysoké obsahy matrice ve stanovovaném vzorku mohou zanášet nebo i ucpat zmlžovač a kónusy (Dressler *et al.*, 1998).

2.3.1.3 LA-ICP-MS

Laserová ablace (LA, Laser Ablation) ve spojení s ICP-MS je významná metoda pro přímou analýzu pevných vzorků v analytické chemii. Je to proces, při kterém je dodána intenzivní energie krátkému laserovému pulzu, který je použit k odpaření části materiálu. Mezi největší přednosti této techniky patří možnost přímé stopové analýzy pevných vzorků, jejich lokální mikroanalýza, charakterizace materiálu jak hloubkově, tak i prostorově (mapování) a zjištění izotopových poměrů (Russo *et al.*, 2002).

2.3.1.3.1 Historie a využití

LA-ICP-MS se používá více než 30 let ke stanovení elementárního složení přírodních a syntetizovaných objektů. Zaostrěný laserový paprsek odstraňuje malý objem cílového materiálu a vytvořený aerosol je přenášen v proudu plynu do ICP-MS pro elementární a/nebo izotopovou analýzu. Díky rostoucímu používání hlubokých ultrafialových laserů a ultracitlivých hmotnostních spektrometrů se tato technika vyvinula směrem k vyššímu rozlišení vzorků a ke generování 2-D (a 3-D) map prostorové distribuce prvků.

Alan Gray z University of Surrey prokázal, že systém laserové ablace (LA) může být připojen k indukčně vázanému plazmovému hmotnostnímu spektrometru pro *in situ* chemickou analýzu (Gray, 1985). Dnes je LA-ICP-MS široce používána pro prostorově rozlišené měření elementárních a izotopických složení nebo stárí cílených domén pevných materiálů, buď *in situ* v jejich hostitelských maticích, nebo jako mechanicky oddělené objekty (Wagner *et al.*, 2016). Všestrannost, snadnost použití, rychlost, nízké detekční limity a průměrné náklady LA-ICP-MS ve srovnání s konkurenčními technikami vedly k jeho rozsáhlému uplatnění. Bioimaging pomocí LA-ICP-MS nabízí schopnost kvantifikovat stopové prvky a izotopy uvnitř tkáňových řezů s prostorovým rozlišením v rozmezí asi 10-100 μm . Vyššího prostorového rozlišení ($<1 \mu\text{m}$) je dosaženo použitím femtosekundového (fs) laseru, s nízkým vychytáváním vzorku na výstřel (fg až pg), díky čemuž je LA-ICP-MS kvazi nedestruktivní technikou (Pozebon *et al.*, 2014).

Distribuční analýza přispívá k objasnění základních otázek biomedicínského výzkumu a umožňuje studie bioakumulace a biologické dostupnosti pro hodnocení ekologického a toxikologického rizika u lidí, zvířat a rostlin. Hlavní oblasti použití zobrazování pomocí hmotnostní spektrometrie a metalomiky byly ve výzkumu mozku a rakoviny, validaci zvířecích modelů, vývoji léčiv a rostlinných věd (Becker *et al.*, 2014). LA-ICP-MS má uplatnění také pro povrchovou analýzu pevných látek v materiálových vědách a jejích oborech v inženýrství, geologii, archeologii, analýze fosilií atd.

2.3.1.3.2 Instrumentace a experimentální uspořádání

Typicky se laserová ablace se skládá z několika částí. První je laser, který generuje jednosměrný paprsek fotonů o vysoké energii, dále z ablačního systému, jehož funkcí je změna energie laseru, tvaru a průměru paprsku a vede jej na povrch vzorku. Třetí částí je mechanicky posuvná ablační cela, kde dochází k interakci laserového paprsku, který vstupuje skrze křemenné okénko, s povrchem vzorku a tím ke vzniku aerosolu. Nakonec z transportního systému pro přenos ablatovaného aerosolu do ICP-MS. Povrch vzorku bývá snímán CCD kamerou, detekčním systémem je často ICP-MS nebo ICP-OES. Argon nebo jiný inertní plyn je typický nosný plyn, používaný k transportu ablatovaného vzorku (aerosolu) z ablační komory do ICP (Russo *et al.*, 2002).

Při analýze LA-ICP-MS se rovný povrch vzorku ablatuje pulzním (obvykle nanosekundovým) laserem v plynotěsné komoře, čímž vzniká proud malých částic (aerosol), který je transportován v nosiči do indukčně vázaného argonového plazmatu (ICP), který odpařuje a převádí částice na ionty. Ionty jsou separovány na základě jejich poměrů hmotnost/náboj hmotnostním spektrometrem a kvantifikovaný detektorem. Intenzity iontového signálu jsou převedeny na koncentrace prvku s odkazem na externí kalibrační standard, nebo na izotopové poměry (Sylvester a Jackson, 2016).

Pro zobrazování tkání LA-ICP-MS se používají většinou kvadrupólové hmotnostní spektrometry. Kvadrupólové hmotnostní spektrometry pracují velmi robustně a stabilně po mnoho hodin, což je důležitý předpoklad pro zobrazovací studie biologických tkání. Zobrazovací hmotnostní spektrometrická měření pomocí LA-ICP-MS se provádějí ablací tenkých tkání (linie na linii) pomocí zaostřeného laserového paprsku. Průměr laserového kráteru se pro měření hmotnostní spektrometrií obvykle nastavuje mezi 5 a 200 μm . Doba měření pro jeden vzorek tkáně nebo gelu zobrazováním LA-ICP-MS (až několik hodin) závisí na velikosti analyzované oblasti, použité rychlosti laserového skenování (mění se mezi 20 a 60 $\mu\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}$) a na vzdálenosti mezi čarami (0 - 100 μm). Pro získání obrázků

s vysokým rozlišením jsou optimalizována velikost bodu a rychlost laserového skenování (Becker *et al.*, 2010).

Zlepšení v LA-ICP-MS bylo dosaženo díky rychlému vývoji laserové technologie. Vlnová délka laserového záření ovlivňuje absorpci záření a tvorbu aerosolu. Lasery s vlnovými délkami od infračerveného (IR) k ultrafialovému (UV) byly zkoumány na ablaci a dělení vzorků pomocí ICP-MS. Je patrný trend změny z viditelných (694 nm a 532 nm) a IR (1064 nm) na UV vlnové délky 266, 213 a 193 nm, protože lasery s kratší vlnovou délkou prokázaly lepší ablační vlastnosti pro zavedení vzorku v ICP-MS. Obecně platí, že kratší vlnová délka poskytne vyšší energii fotonů pro ionizaci z pevného vzorku (Russo *et al.*, 2002). Ablace může v závislosti na vlnové délce zahrnovat tepelné a netepelné mechanismy. Při tepelném zpracování jsou elektrony přímo absorbovány laserovým světlem, převedením energie do atomové mřížky a dochází k tání a vypařování z materiálu. Na druhou stranu při netepelném zpracování, pokud je energie fotonu vyšší než energie vazby mezi sousedními atomy, elektromagnetické laserové záření přímo prolomí atomovou mřížku indukujících iontů a atom je vymrštěn (Mao *et al.*, 2000).

2.3.1.3.3 Frakcionace a parametry ovlivňující ablační děj

Elementární frakcionace (součet všech nestechiometrických účinků během procesu ablace, transportu aerosolu a ionizace ve zdroji ICP) je jednou z hlavních obtíží při získávání kvantitativních výsledků v LA-ICP-MS. K frakcionaci, která znesnadňuje kalibraci dat, může docházet v průběhu procesu laserové ablace, během transportu ablatovaného vzorku do ICP nebo přímo v ICP. Jejím důsledkem je odlišné složení uvolněných částic oproti průměrnému složení vzorku (Günther *et al.*, 2000). Frakcionace je závislá hlavně na složení vzorku. Mezi další podněty ovlivňující frakcionaci patří: vlastnosti laseru (plošná hustota výkonu, délka pulsu, vlnová délka) (Borisov *et al.*, 1999), kráter (velikost a tvar), velikost rozdělení částic (Figg *et al.*, 1998) a matriční efekty (Mank a Mason, 1999). Proces frakcionace je při ablaci velmi nežádoucí a lze jej potlačit vhodnou volbou hustoty zářivého výkonu, vlnovou délkou laserového paprsku, délkou pulzu a energetickým profilem laserového paprsku. Důležitou roli hraje i teplota tání a teplota varu prvků. Většina studií o frakcionaci byla provedena s geologickými vzorky (jako jsou minerály, oxidy a křemičitany) a kovy nebo slitinami kovů, u nichž je elementární frakcionace výraznější. Na základě těchto pozorování Fryer *et al.* (1995) a Longerich *et al.* (1996) vypočítali relativní frakcionační index, který umožňuje klasifikace chemických prvků do skupin zvážením podobných chování ablací a ionizací.

Ablační proces je ovlivněn řadou parametrů, mezi ně patří vlastnosti laseru (vlnová délka, energie, délka pulzu, frekvence, zaostření a energetický profil laserového paprsku), použitý nosný plyn (druh plynu, tlak a rychlost průtoku) a vlastnosti samotné matrice (morfologie, homogenita, absorpční vlastnosti).

Pro konkrétní prvek je nezbytné při kvantitativní analýze zvolit přesný kalibrační standard. Neexistuje univerzální kalibrační metoda pro všechny typy pevných vzorku. Mezi tři základní skupiny kalibrace patří ablace pevných vzorku s přizpůsobenou maticí, dvojí vzorkování a přímá ablace kapalin (Russo *et al.*, 2002).

2.3.2 Plamenová fotometrie

Plamenová fotometrie patří mezi nejstarší fyzikálně-chemické analytické metody. Je založena na principu emisní spektrometrické metody. Základní části optického emisního spektrometru jsou budící zdroj, monochromátor a detektor. Vzorek ve formě roztoku se rozprašuje přímo do plamene, aby se vzorek odpařil, atomizoval a excitoval. Při excitaci plamenem jsou vnější elektrony atomů převedeny do energeticky bohatších stavů, načež se samovolně opět vracejí do stavu energeticky chudšího. Při návratu na nižší energetické hladiny je emitováno světlo o charakteristických vlnových délkách. Světlo požadované vlnové délky je odděleno od zbytku vyzařovaného záření a měří se jeho intenzita. Analytickým výstupem je emisní čárové spektrum, ve kterém poloha čáry charakterizuje kvalitativní složení vzorku a intenzita čáry charakterizuje kvantitativní složení vzorku. Toto měření intenzity může souviset přímo s koncentrací sledovaného prvku, obvykle porovnáním s měřenými intenzitami standardu nebo řady standardů. Plamenová fotometrie se používá ke stanovení obsahu prvků 1. a 2. skupiny periodické tabulky, neboť energie potřebná k excitaci jejich valenčních elektronů není tak vysoká, jako u jiných prvků a postačuje tedy teplota plamene (Isaac a Kerber, 1971).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a přístroje

3.1.1 Použité chemikálie

- Certifikovaný referenční materiál vodný roztok fortifikovaný stopovými prvky TM 64.2 (Environment Canada, Kanada)
- Certifikovaný referenční materiál vodný roztok fortifikovaný stopovými prvky TM 15.2 (Environment Canada, Kanada)
- CRM vodného kalibračního roztoku, $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ca v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)
- CRM vodného kalibračního roztoku, $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Cu v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)
- CRM vodného kalibračního roztoku, $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)
- CRM vodného kalibračního roztoku, $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ge v 5% HNO_3 a 1% HF (v/v), (Analytika, Česká republika)
- CRM vodného kalibračního roztoku, $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ K v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)
- CRM vodného kalibračního roztoku, $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Mg v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)
- CRM vodného kalibračního roztoku, $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Mn v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)
- CRM vodného kalibračního roztoku, $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Na v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)
- CRM vodného kalibračního roztoku, $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ti v 5% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)
- CRM vodného kalibračního roztoku, $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Zn v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dusičnan amonný (Lach-Ner, Česká republika)
- Dusičnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Fluorid amonný (Lach-Ner, Česká republika)

- Guajakol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Heptahydrát síranu zinečnatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Hexahydrát chloridu kobaltnatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydroxid draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Kalibrační roztok interního standardu pro ICP-MS INT MIX1 o koncentraci $10 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Y, In, Bi, Tb v 5 % HNO_3 (v/v)) Analytika spol. s.r.o., Praha
- Kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, Čína)
- Kyselina boritá (Penta, Česká republika)
- Kyselina dusičná 67 %, Analpure (Analytika, Česká republika)
- Kyselina fluorovodíková 48 %, Analpure (Analytika, Česká republika)
- MES hydrát (Sigma-Aldrich, Německo)
- Nanočástice oxidu titaničitého 20 nm (Sigma-Aldrich, Německo)
- NCS certifikovaný referenční materiál kukuřice (National Analysis Center for Iron and Steel, Čína)
- NIST SRM 610 (National Institute of Standards and Technology, Washington, USA)
- Pefabloc (Sigma-Aldrich, Německo)
- Pentahydrát síranu měďnatého (Penta, Česká republika)
- Peroxid vodíku (Lach-Ner, Česká republika)
- Polyvinylpyrrolidon (Sigma-Aldrich, Německo)
- SAVO (Unilever, Česká republika)
- Tetrahydrát dusičnanu vápenatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Tetrahydrát chloridu manganatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Tetrahydrát molybdenanu amonného (Lach-Ner, Česká republika)
- Tetrasodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Sigma-Aldrich, Německo)
- Tuning Solution pro ICP-MS (Agilent Technologies, Japonsko)

3.1.2 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Adventurer™ Pro (OHAUS, USA)
- Analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Polsko)

- Autokláv (Tuttnauer, Slovensko)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Autosampler ASX-520 (Agilent technologies, USA)
- Centrifuge CL31R (Thermo Jouan, Francie)
- Digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo)
- Elektromagnetická míchačka (IKA, Německo)
- Excimerový laserový ablační systém Analyte G2, (Photon Machines Inc., USA)
- ICP-MS spektrometr (Agilent Technologies, Japonsko)
- Lyofilizátor BETA 1-8 LD plus (CHRIST, Německo)
- Mikrodestičkový spektrofotometr Synergy H1 (BioTek Instruments, USA)
- Mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko)
- Mikrovlnný mineralizátor MLS 1200 mega (Milestone, Itálie)
- Plamenový fotometr BWB-XP (BWB Technologies, Anglie)
- Sada na lisování tablet
- Systém pro přípravu ultračisté vody Milli-Q (Direct-Q, Francie)
- Teflonové kelímky na mikrovlnný rozklad
- Třecí miska s tloučkem
- Ultrazvuková lázeň D-78224 (Elma, Německo)
- Váhy Denver Summit (Biolink)
- Vortex (Stuart, UK)

3.1.3 Biologický materiál

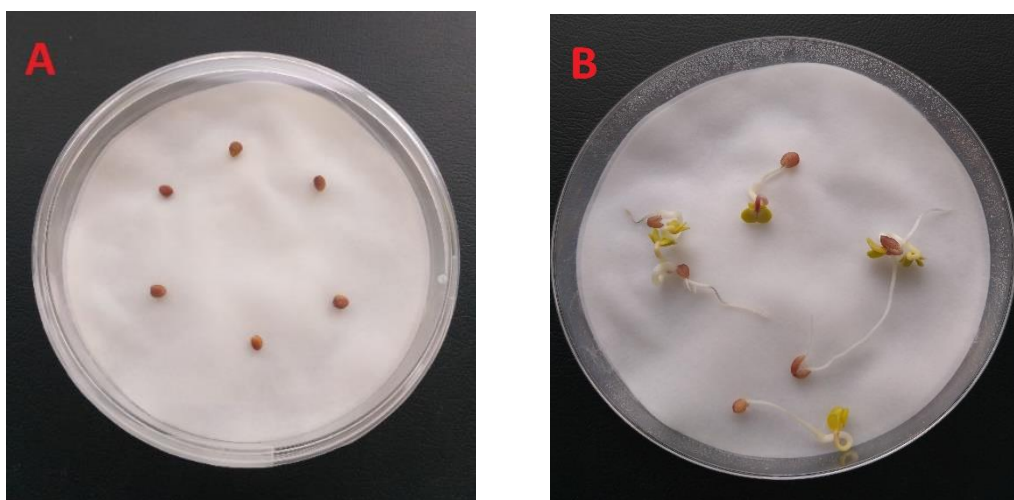
- Ředkev setá letní (*Raphanus sativus var. sativus*; zdroj Výzkumný ústav rostlinné výroby)

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace rostlin

Bylo provedeno pěstování kulturních plodin konkrétně ředkviček a jejich ošetření TiO₂NP (20 nm). Semena ředkviček byla sterilizována v 2% roztoku NaClO po dobu 10 minut, následovalo 5x opláchnutí deionizovanou vodou, aby se zajistila povrchová sterilita. Kvůli sterilitě byly tyto úkony prováděny ve flowboxu. Semena byla uspořádána v Petriho miskách v počtu 3-6 semen na vlhké filtrační papíry, pod kterými byla vlhčená sterilní vata (viz obr. 7A-B). Takto nachystané Petriho misky byly umístěny do tmy

při 25 °C. Zde byly ponechány po 4 dny. Následně byly vybrány vhodné semenáčky a umístěny na pěnové plováky, které byly přeneseny do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml, tyto zkumavky obsahovaly 40 ml modifikovaného Hoaglandova roztoku o ¼ síle (viz obr. 8A-B). Kořeny rostlin byly konstantně v kontaktu s roztokem. Po 7 dnech byly rostliny přeneseny do kádinek o objemu 100 ml obsahujících 75 ml živného roztoku (kontrola; viz obr. 9A) nebo živného roztoku obohaceného o TiO₂NP (1-1000 ppm; viz obr. 9B). Centrifugační zkumavky i kádinky byly zabaleny alobalem, aby nedošlo k osvětlení kořenů (viz obr. 9C). Objem roztoku byl 2x týdně doplňován. Sazenice byly umístěny do růstové komory s teplotou 28 °C, 70% vlhkostí a 16hodinovou fotoperiodou. Takto byly rostliny ponechány v růstové komoře dalších 24 dní.



Obr. 7A Semena ředkviček rozmístěná na filtračním papíru, pod kterým se nachází vlhčená sterilní vata. Obr. 7B Klíčky ředkviček po 4denní inkubaci ve tmě při 25 °C.



Obr. 8A Semenáčky ředkviček přesazené na pěnové plováky v centrifugačních zkumavkách. Obr. 8B Rostliny po týdenním pěstování v centrifugačních zkumavkách před přesazením do kádinek.



Obr. 9A Rostlina umístěná v kádince na plováku s čistým Hoaglandovým roztokem o $\frac{1}{4}$ síle. Obr. 9B Rostlina umístěná v kádince na plováku s Hoaglandovým roztokem o $\frac{1}{4}$ síle obohaceným o TiO_2NP ($1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Obr. 9C Rostlina umístěná v kádince na plováku s čistým Hoaglandovým roztokem o $\frac{1}{4}$ síle obalená alobalem kvůli zamezení osvětlení kořenů.

3.2.1.1 Příprava kultivačních roztoků

3.2.1.1.1 Hoaglandův kultivační roztok

Smícháním zásobních roztoků v adekvátním poměru byl připraven Hoaglandův roztok o objemu 1 l. Roztoky byly předem sterilizovány autoklávem a uloženy v lednici. Na objem 1 l výsledného roztoku o $\frac{1}{4}$ síle bylo přidáno 0,5 g MES pufru a pH bylo upraveno na 6,00 pomocí hydroxidu draselného. Složení jednotlivých zásobních roztoků včetně molární koncentrace a navážky pro přípravu 1 l roztoku jsou uvedeny v tabulce č. 3. Roztoky byly sterilizovány autoklávováním (15 minut při $121 \text{ }^\circ\text{C}$) a byly skladovány při $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tab. 3 Příprava zásobních roztoků

Roztok č.	Složka	Molární koncentrace ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Navážka (g)
I	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	1	236,2
II	KNO_3	1	101,1
III	NH_4NO_3	0,5	40,0
IV	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25	61,6
V	KH_2PO_4	0,25	34,0
VI	KCl	0,25	18,6
	H_3BO_3	0,05	3,092
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,004	0,792
VII	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,004	1,15
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,001	0,25
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,0003	0,072
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,00015	0,186

3.2.1.1.2 Roztok obohacený o nanočástice titanu

Jako kontrola sloužil čistý Hoaglandův roztok o ¼ síle, ošetřující roztoky byly vytvořeny přidavkem TiO₂NP. Výsledná koncentrační řada vypadala následovně: kontrola, 1 mg·dm⁻³, 10 mg·dm⁻³, 100 mg·dm⁻³ a 1000 mg·dm⁻³.

3.2.1.1.3 Roztok Fe(EDTA)

Zásobní roztok Fe(EDTA) o celkovém objemu 500 ml byl vytvořen smícháním dvou roztoků. První roztok byl vytvořen rozpuštěním 12,45 g FeSO₄ · 7H₂O v roztoku HCl. Roztok HCl byl vytvořen napipetováním 177 µl 35% HCl do 150 ml destilované vody. Druhý roztok byl vytvořen rozpuštěním 16,65 g EDTA a 2,008 g NaOH v 250 ml destilované vody. Po smíchání byl roztok doplněn do objemu 500 ml destilovanou vodou, autoklávován (15 min při teplotě 121 °C) a skladován při 4 °C. Objem 0,2 ml roztoku Fe(EDTA) byl následně napipetován do výsledného Hoaglandova roztoku o ¼ síle a o objemu 1 l.

3.2.1.2 Zpracování rostlinného materiálu

Po 35 dnech od počátku klíčení byly rostliny sklizeny. V den odběru vzorků byly kořeny rostlin důkladně opláchnuty deionizovanou vodou a fluoridem amonným kvůli odstranění povrchově usazených nanočástic titanu a skalpelem rozděleny na 3 části, které byly dále využívány (kořeny, bulva a listy). Po rozříznutí byly jednotlivé orgány zváženy, vysušeny do konstantní hmotnosti a opět zváženy. Následně lyofilizovány lyofilizátorem a uloženy k pozdějšímu měření plamenovou fotometrií a ICP-MS nebo zmrazeny a využity ke stanovení enzymové aktivity. Pro laserovou ablaci byly vzorky nakrájeny na tenké plátky. Vloženy mezi dva filtrační papíry a dvě mikroskopická sklička, obtažena lepicí páskou, následně lyofilizovány a analyzovány. Jednotlivé vzorky byly systematicky skenovány zaostřeným laserovým paprskem.

3.2.2 Spektrofotometrické stanovení enzymové aktivity

Součástí diplomové práce je stanovení aktivity katalasy, guajakolperoxidasy a askorbátperoxidasy. Nejprve byl připraven rostlinný extrakt. Byly odváženy zhruba 2 g rostlinného materiálu ve třecí misce, která byla uložena v ledové lázni. Smícháním 5,44 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 10,4 g hydrogenfosforečnanu draselného a 0,74 g sodné soli EDTA v 1 l deionizované vody byl připraven zásobní pufr pro extrakci a měření aktivity. Extrakční pufr byl připraven navážením 100 mg

polyvinylpolypyrrolidonu, 3,1 mg dithiothreitolu a 0,11 mg pefablocu na 10 ml zásobního pufru. Rostlinný materiál byl rozetřen spolu s extrakčním pufrům v poměru 1:4 (w/v) a s mořským pískem. Homogenát byl přelit do 2ml eppendorfky a centrifugován 10 minut při 15 000 xg a teplotě 4 °C. Supernatant byl odpipetován do čisté eppendorfky a použit k měření. Vzorky byly skladovány na ledové lázni.

Pro stanovení aktivity askorbátperoxidasy bylo do jamky na mikrodestičce napipetováno: 125 µl 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,0), 72 µl 3,5 mM roztoku askorbátu a 15 µl extraktu. U blanku byl použit místo extraktu extrakční pufr. Reakce byla startována přidáním 38 µl 0,7 mM čerstvě připraveného roztoku peroxidu vodíku. Byl sledován pokles absorbance při 290 nm v intervalech 10 s po dobu 1 minuty (Nakano a Asada, 1981).

Pro stanovení aktivity guajakolperoxidasy bylo do jamky na mikrodestičce napipetováno: 125 µl 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,0), 72 µl 3,5 mM roztoku guajakolu a 15 µl extraktu. U blanku byl použit místo extraktu extrakční pufr. Reakce byla startována přidáním 38 µl 0,7 mM čerstvě připraveného roztoku peroxidu vodíku. Byl sledován nárůst absorbance při 436 nm v intervalech 10 s po dobu 1 minuty (Criquet *et al.*, 2001).

Pro stanovení aktivity katalasy bylo do jamky na mikrodestičce napipetováno: 290 µl 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,0) a 10 µl extraktu tvořilo blank. 240 µl 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,0), 10 µl extraktu a 50 µl 60 mM peroxidu vodíku tvořilo vzorek. Byla sledována změna absorbance při 240 nm v intervalech 30 s po dobu 5 minut (Chandlee a Scandalios, 1984).

3.2.3 Analýza mikroprvků a titanu pomocí ICP-MS

Ke spektrometru byl připojen autosampler ASX-520 (Agilent technologies, USA). Dalšími částmi byly peristaltická pumpa, mikrokoncentrický zmlžovač, chlazená Scottova mlžná komora, dvojice niklových kónusů, oktapólová reakčně-kolizní cela, kvadrupólový analyzátor a jako detektor elektronový násobič s oddělenými dynodami. K analýzám byl použit argon o čistotě 4,6 a pro potlačení spektrálních interferencí byla využita oktapólová reakčně-kolizní cela s heliem o čistotě 5,5 jako kolizním plynem.

Před vlastní mineralizací vzorků byl proveden čistící krok, který zahrnoval rozklad směsi obsahující 1,5 ml 67% kyseliny dusičné a 1,5 ml 48% kyseliny fluorovodíkové, aby bylo dosaženo čistoty teflonových kelímků. Vzorky (cca 100 mg) byly naváženy do mineralizačních teflonových kelímků. Dále byla napipetována rozkladná směs

obsahující 1,5 ml 67% kyseliny dusičné, 1,5 ml 30% peroxidu vodíku a 50 µl 48% kyseliny fluorovodíkové. Vzorky byly rozkládány mikrovlnným mineralizátorem (program viz tabulka č. 4). V každém mineralizačním cyklu byl použit slepý vzorek nebo referenční materiál (kukuřice) pro kontrolu správnosti zpracování. Slepý vzorek byl tvořen pouze rozkladnou směsí v teflonovém kelímku. Po rozkladu byly vzorky kvantitativně převedeny do plastových zkumavek, které byly uzavřeny parafilmem a uchovávány v lednici. Mezi nezbytné kroky před měřením patří promytí a interní kalibrace zařízení. K promytí byl použit 3% roztok kyseliny dusičné a pro interní kalibraci Tuning Solution dodávaný výrobcem. Během měření je spotřebováván interní standard, který obsahoval skandium, germanium, indium a bismut, a je tak kontrolována činnost zařízení. Zařízení provádí automatické korekce na interní standard (koncentrace během měření: $100 \pm 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$).

Tab. 4 Program mikrovlnného mineralizátoru pro rozklad rostlinných vzorků

Čas (min)	Výkon (W)
2	250
2	0
5	400
2	0
2	500
2	0
6	600
5	ventilace

Pro ICP-MS analýzu byly sestaveny kalibrační řady měřených mikroprvků, hořčíku a titanu. Koncentrace jednotlivých bodů řady byly $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a $0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Základní roztok byl připraven pipetováním 250 μl vodného roztoku CRM (Ti, Cu, Fe, Mn, Zn, Mg) do odměrné baňky s 1 ml HNO_3 a doplněním milli-Q vodou do objemu 25 ml, zbylé body kalibrační řady byly připraveny postupným ředěním koncentrovanějšího roztoku do odměrné baňky o objemu 25 ml. Parametry pro ICP-MS jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tab. 5 Parametry ICP-MS

Parametr	Roztoková analýza
Příkon generátoru (W)	1550
Vnější plazmový plyn ($\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)	15
Střední plazmový plyn ($\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,9
Pomocný plyn/nosný Ar ($\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)	1,1
Monitorované izotopy	^{24}Mg , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{47}Ti
He v kolizní cele ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)	5

3.2.4 Analýza makroprvků pomocí plamenové fotometrie

Plamenovým fotometrem BWB-XP byla stanovena koncentrace makroprvků vápníku, draslíku a benefičního prvku sodíku. Vzorky byly rozkládány a skladovány stejným způsobem jako pro měření na ICP-MS. Nejprve byla provedena kalibrace přístroje, kalibrační křivka měla 9 bodů (0 mg·l⁻¹, 1 mg·l⁻¹, 5 mg·l⁻¹, 10 mg·l⁻¹, 25 mg·l⁻¹, 50 mg·l⁻¹, 100 mg·l⁻¹, 150 mg·l⁻¹, 200 mg·l⁻¹). Vzorky byly nasávány hadičkou a po ustálení signálu byla odečtena hodnota signálu emise u měřeného kovu. Vyhodnocení koncentrace vápníku, draslíku a sodíku bylo provedeno z kalibračních grafů.

3.2.5 Distribuce prvků pomocí LA-ICP-MS

Nejprve byl připraven kalibrační standard ve formě tabletky z CRM (kukuřice). Referenční materiál byl rozetřen v třecí misce a dále lisován pomocí hydraulického lisu do formy tabletky o tloušťce zhruba 2 mm. Tato tabletky představující kalibrační standard byla upevněna oboustrannou lepicí páskou na mikroskopické sklíčko. Standard byl následně pomocí LA-ICP-MS analyzován a výsledky byly využity ke kvantifikaci makrobiogenních, mikrobiogenních prvků a titanu v rostlinných orgánech. K optimalizaci parametrů LA-ICP-MS byl využit skleněný NIST SRM 610, pomocí kterého byly podmínky nastavení přístroje optimalizovány.

3.2.5.1 Sken a imaging rostlinných pletiv

Orgány rostliny upevněné na mikroskopickém sklíčku byly připravené dle výše uvedeného postupu a analyzovány pomocí LA-ICP-MS. Nejprve byl proveden sken napříč celou rostlinou kontroly a následně sken napříč celou rostlinou ošetřenou 1000 ppm TiO₂NP.

Dále byl proveden imaging listu kontroly a 1000 ppm TiO₂NP, kdy bylo velké množství linií spojeno v jednu celistvou prvkovou mapu. Měřena byla prostorová distribuce celkem 9 izotopů a to: ²³Na, ²⁴Mg, ³⁹K, ⁴⁴Ca, ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu, ⁶⁶Zn a ⁴⁷Ti. Pro kvantifikaci byla použita kalibrace tablety vylišované z CRM kukuřice. Výsledná data byla normalizovaná na uhlík (¹²C) a mapa prostorové distribuce byla vytvořena v programu ImageLab (Epina, GmbH, Pressbaum, Rakousko). Shrnutí všech parametrů laserové ablace je uvedeno v tabulce č. 6.

Tab. 6 Parametry laserové ablace

Parametr	LA-ICP-MS
Hustota zářivé energie ($\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$)	2,12
Režim ablace	Linie bodů
Frekvence (Hz)	20
Průměr laserového paprsku (μm)	110
Rychlost pohybu vzorku ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	110
Vzdálenost mezi liniemi (μm)	140
Nosný plyn He ($\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,65
Příkon generátoru (W)	1200
Vnější plazmový plyn ($\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)	15
Střední plazmový plyn ($\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,9
Pomocný plyn/nosný Ar ($\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,75
Monitorované izotopy	^{12}C , ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{39}K , ^{44}Ca , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{47}Ti
He v kolizní cele ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)	2

4 VÝSLEDKY

4.1 Čerstvá a suchá biomasa

V tabulce č. 7 je uvedena čerstvá hmotnost orgánů a v tabulce č. 8 je uvedena suchá hmotnost orgánů při jednotlivých koncentracích TiO₂NP. Výsledky jsou uvedeny v mg ± SD. Nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl, pouze u suché váhy v listech při 1000 ppm TiO₂NP je patrná nižší hmotnost ve srovnání s kontrolou.

Tab. 7 Čerstvá váha jednotlivých orgánů. Hmotnost je uváděna v mg ± SD.

	Hmotnost kořene (mg ± SD)	Hmotnost stonku (mg ± SD)	Hmotnost listu (mg ± SD)
Kontrola	509,9±98,5	321,1±91,5	1074±108
1 ppm TiO ₂	379,9±84,8	336,2±284,4	1034,5±148,9
10 ppm TiO ₂	459,5±85,3	430,8±236,2	1203,1±186,3
100 ppm TiO ₂	364,4±94,3	504,8±292,8	1083,1±225,1
1000 ppm TiO ₂	438,1±180,9	281,2±110,5	926,5±159

Tab. 8 Suchá váha jednotlivých orgánů. Hmotnost je uváděna v mg ± SD.

	Hmotnost kořene (mg ± SD)	Hmotnost stonku (mg ± SD)	Hmotnost listu (mg ± SD)
Kontrola	49,3±5,7	53,1±11,9	162,5±8,9
1 ppm TiO ₂	33,8±4,3	47,5±32,6	151,1±26,6
10 ppm TiO ₂	43,8±8,2	62,9±25,2	190,5±26,8
100 ppm TiO ₂	42,9±10,2	71,2±30,9	161,2±25,7
1000 ppm TiO ₂	47,6±15	41,9±14,9	114,7±13,2

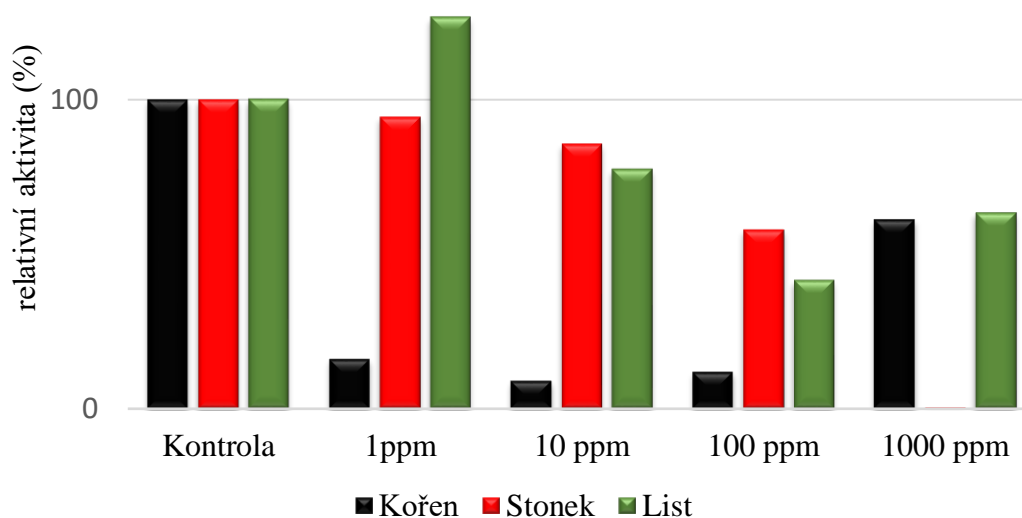
4.2 Spektrofotometrické stanovení enzymové aktivity

Při stanovení enzymové aktivity katalasy byla pozorována nižší aktivita v porovnání s kontrolou u všech koncentrací. Pouze u listu při nejnižší koncentraci TiO₂NP byla aktivita oproti kontrole vyšší (obr. 10).

Podobné výsledky jako u katalasy jsou viditelné i u askorbátperoxidasy, kdy u kořene byla pozorována nižší aktivita při všech koncentracích TiO₂NP, protože kořen byl v přímém kontaktu s roztokem nanočástic. Naopak ve stonku a v listech, s výjimkou stonku 1000 ppm TiO₂NP, je specifická aktivita v porovnání s kontrolou vyšší (obr. 11).

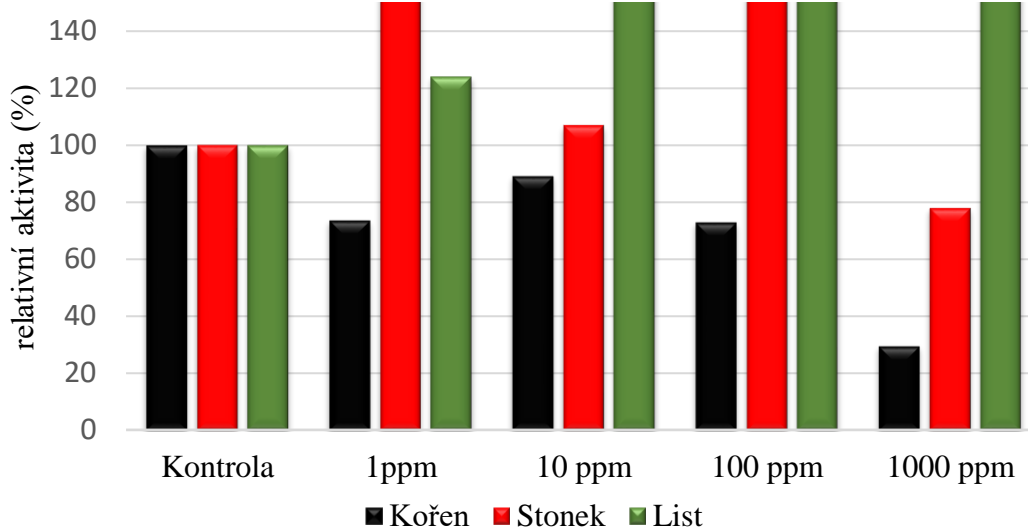
U guajakolperoxidasy je trend jiný, výrazně vyšší aktivita byla stanovena u kořene při koncentracích 1 a 1000 ppm TiO₂NP. U stonku byla pozorována vyšší aktivita v porovnání s kontrolou všude, ale markantní pouze u 100 a 1000 ppm TiO₂NP. V listu byla nejvyšší aktivita stanovena také při ošetření 100 a 1000 ppm TiO₂NP (obr. 12).

Katalasa



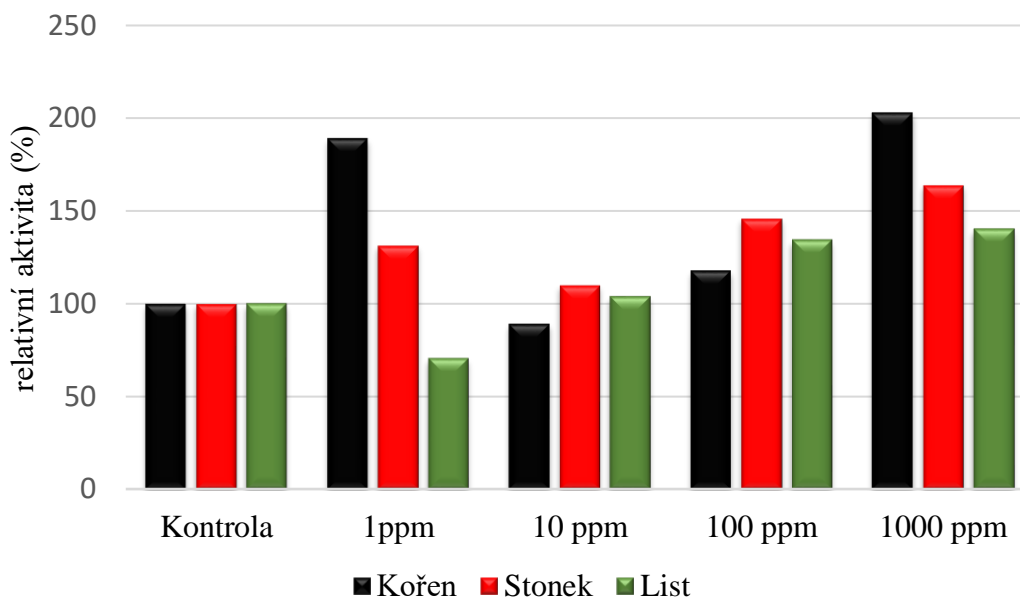
Obr. 10 Relativní aktivita katalasy v orgánech ředkvičky po ošetření různými koncentracemi TiO₂NP. 100 % aktivity je u kořene 368,7 nkat·mg⁻¹, u stonku je 100 % aktivity 531,1 nkat·mg⁻¹ a u listu je 100 % aktivity 399 nkat·mg⁻¹.

Askorbátperoxidasa



Obr. 11 Relativní aktivita askorbátperoxidasy v orgánech ředkvičky po ošetření různými koncentracemi TiO₂NP. 100 % aktivity je u kořene 70,6 nkat·mg⁻¹, u stonku je 100 % aktivity 55,1 nkat·mg⁻¹ a u listu je 100 % aktivity 18 nkat·mg⁻¹.

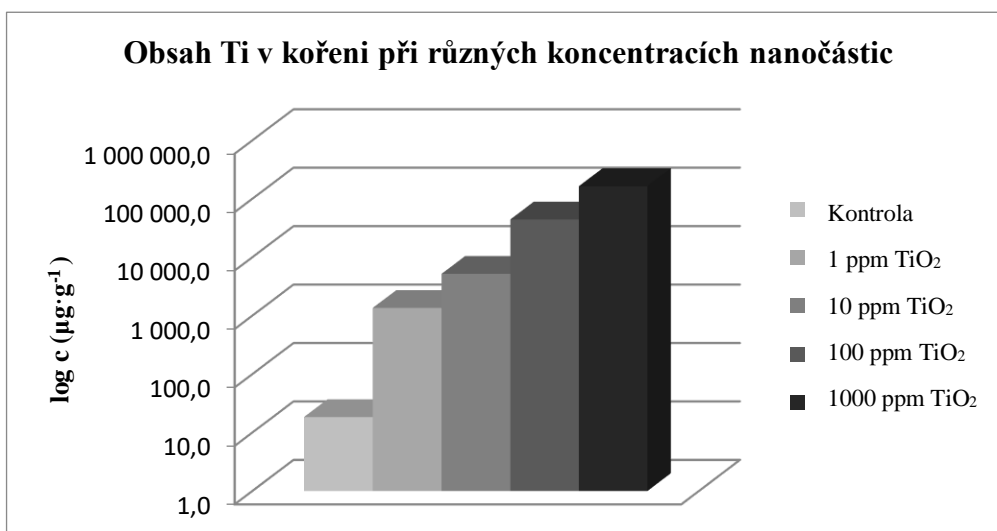
Guajakolperoxidasa



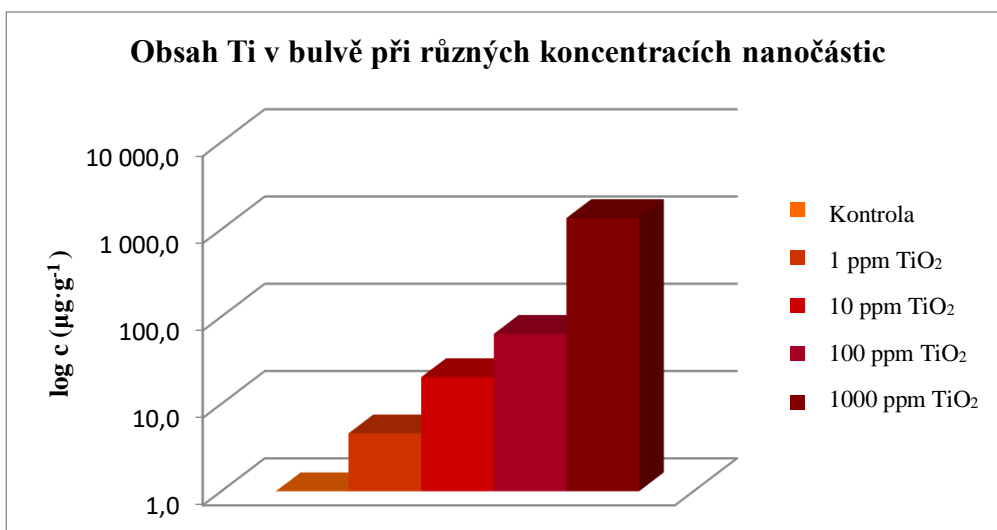
Obr. 12 Relativní aktivita guajakolperoxidasy v orgánech ředkvičky po ošetření různými koncentracemi TiO₂NP. 100 % aktivity je u kořene 936,9 nkat·mg⁻¹, u stonku je 100 % aktivity 584 nkat·mg⁻¹ a u listu je 100 % aktivity 71,5 nkat·mg⁻¹.

4.3 ICP-MS

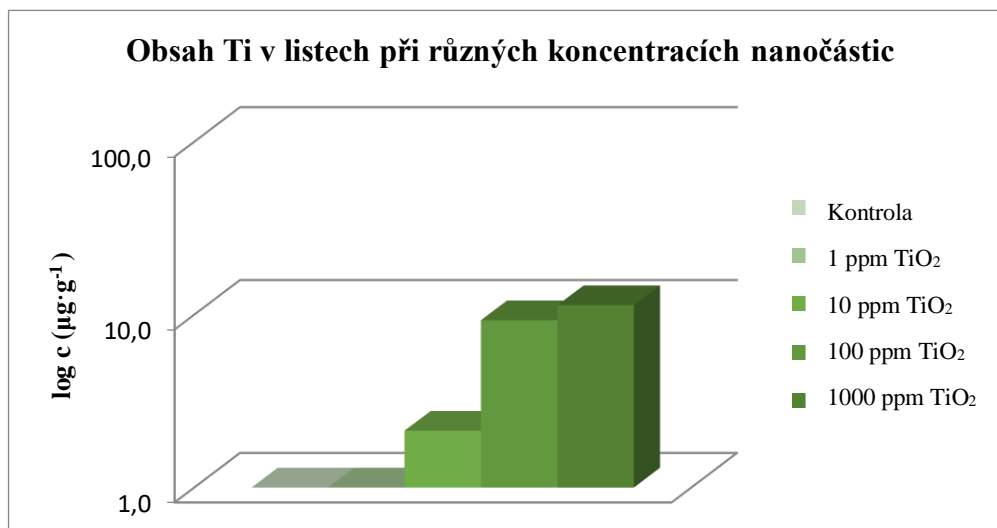
Pomocí ICP-MS byl kvantifikován titan, mikroprvky a hořčík. Z obr. 13-15 můžeme vypočítat, že koncentrace titanu rostla ve všech orgánech s rostoucí koncentrací v roztoku. Kořen byl v kontaktu s nanočásticemi, takže zde se hromadilo největší množství titanu. Směrem k listům se koncentrace významně snižovala.



Obr. 13 Koncentrace titanu v kořeni při jednotlivých ošetřeních TiO₂NP



Obr. 14 Koncentrace titanu v bulvě při jednotlivých ošetřeních TiO₂NP



Obr. 15 Koncentrace titanu v listech při jednotlivých ošetřeních TiO₂NP

V tabulkách č. 9-12 jsou uvedeny měřené mikroprvky, v tabulce č. 13 jsou uvedeny hodnoty pro hořčík, koncentrace jsou uváděny v mikrogramech na gram \pm SD. Nižší koncentrace manganu byla stanovena ve všech orgánech při nejvyšší koncentraci TiO₂NP v roztoku (tabulka 9). Nižší obsah železa ve srovnání s kontrolou byl pozorován při 10, 100 a 1000 ppm TiO₂NP v kořenech a při 1000 ppm TiO₂NP v listech (tabulka 10). U mědi byl nižší obsah stanoven u 100 a 1000 ppm TiO₂NP v kořenech (tabulka 11). Koncentrace zinku byla vyšší u kořene při 1000 ppm TiO₂NP (tabulka 12). Obsah hořčíku byl oproti kontrole nižší při 10, 100 a 1000 ppm TiO₂NP v kořeni a 1000 ppm TiO₂NP ve stonku (tabulka 13).

Tab. 9 Koncentrace manganu v orgánech při jednotlivých ošetřeních TiO₂NP. Koncentrace je uváděna v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ppm) \pm SD.

Koncentrace manganu v rostlinných orgánech ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{SD}$)			
	Kořen	Stonek	List
Kontrola	21,3 \pm 3,6	25,2 \pm 5,7	68,8 \pm 6,6
1 ppm TiO ₂	18,9 \pm 5,4	25,9 \pm 4,7	62,9 \pm 14,1
10 ppm TiO ₂	12,9 \pm 1	19,4 \pm 3,2	60,1 \pm 8,2
100 ppm TiO ₂	18,7 \pm 3,9	22,3 \pm 6,9	63,5 \pm 6
1000 ppm TiO ₂	10,5\pm1,9	14,9\pm2,8	41,8\pm9,2

Tab. 10 Koncentrace železa v orgánech při jednotlivých ošetřeních TiO₂NP. Koncentrace je uváděna v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ppm) \pm SD.

	Koncentrace železa v rostlinných orgánech ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{SD}$)		
	Kořen	Stonek	List
Kontrola	2030,6 \pm 497,4	133,5 \pm 128,6	80,8 \pm 6,2
1 ppm TiO ₂	1829,4 \pm 791,4	169,8 \pm 54,5	94,5 \pm 36,4
10 ppm TiO ₂	572,1\pm139,9	135,1 \pm 44	74,3 \pm 14
100 ppm TiO ₂	521,9\pm156	141 \pm 108,7	77,3 \pm 4,8
1000 ppm TiO ₂	193,5\pm3,1	72,1 \pm 28,8	56,9\pm8,4

Tab. 11 Koncentrace mědi v orgánech při jednotlivých ošetřeních TiO₂NP. Koncentrace je uváděna v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ppm) \pm SD.

	Koncentrace mědi v rostlinných orgánech ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{SD}$)		
	Kořen	Stonek	List
Kontrola	57,8 \pm 38	3,6 \pm 0,8	2,3 \pm 0,2
1 ppm TiO ₂	44,3 \pm 8,9	5,7 \pm 2,1	2,2 \pm 0,5
10 ppm TiO ₂	26,2 \pm 2,7	5,1 \pm 1,7	2,2 \pm 0,7
100 ppm TiO ₂	17,8\pm9,7	4,1 \pm 1,2	2,2 \pm 0,3
1000 ppm TiO ₂	12,6\pm0,5	4,2 \pm 1,2	2,3 \pm 0,6

Tab. 12 Koncentrace zinku v orgánech při jednotlivých ošetřeních TiO₂NP. Koncentrace je uváděna v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ppm) \pm SD.

	Koncentrace zinku v rostlinných orgánech ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{SD}$)		
	Kořen	Stonek	List
Kontrola	68,2 \pm 28,1	63,3 \pm 6,5	44,8 \pm 1,4
1 ppm TiO ₂	51,3 \pm 13,3	59,1 \pm 23,5	48,4 \pm 13,6
10 ppm TiO ₂	37,2 \pm 5,8	54,3 \pm 8,3	39,9 \pm 13,8
100 ppm TiO ₂	67,1 \pm 52,4	54,2 \pm 6,1	45,8 \pm 3,8
1000 ppm TiO ₂	299,6\pm2	69,1 \pm 15,4	45,7 \pm 11,86

Tab. 13 Koncentrace hořčíku v orgánech při jednotlivých ošetřeních TiO₂NP. Koncentrace je uváděna v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ppm) \pm SD.

	Koncentrace hořčíku v rostlinných orgánech ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{SD}$)		
	Kořen	Stonek	List
Kontrola	3475 \pm 752	2673 \pm 488	4405 \pm 472
1 ppm TiO ₂	3149 \pm 1100	2950 \pm 625	4270 \pm 925
10 ppm TiO ₂	1741\pm488	2183 \pm 603	3936 \pm 659
100 ppm TiO ₂	2064\pm435	2117 \pm 454	4097 \pm 497
1000 ppm TiO ₂	2175\pm273	1864\pm73	3835 \pm 455

4.4 Plamenová fotometrie

Plamenovou fotometrií byly kvůli vysoké koncentraci stanovovány makroprvky jako vápník, draslík a benefiční prvek sodík. Nižší koncentrace vápníku ve srovnání s kontrolou byla pozorována v kořeni při 1, 10 a 100 ppm TiO₂NP, ale v listech při nejvyšších koncentracích TiO₂NP byl obsah vyšší (tabulka 14). U draslíku byla naměřena nižší koncentrace v kořeni při všech ošetřeních (tabulka 15) a koncentrace sodíku jako benefičního prvku byla vyšší v listech při 100 a 1000 ppm a nižší v kořeni při 1000 ppm TiO₂NP (tabulka 16).

Tab. 14 Koncentrace vápníku v orgánech při jednotlivých ošetřeních TiO₂NP. Koncentrace je uváděna v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ppm) \pm SD.

	Koncentrace vápníku v rostlinných orgánech ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{SD}$)		
	Kořen	Stonek	List
Kontrola	4303 \pm 203	4793 \pm 748	7602 \pm 698
1 ppm TiO ₂	1749\pm736	5215 \pm 727	8260 \pm 1409
10 ppm TiO ₂	1761\pm789	4683 \pm 594	8549 \pm 1525
100 ppm TiO ₂	1210\pm152	5270 \pm 1182	9480\pm964
1000 ppm TiO ₂	2930 \pm 1353	5646 \pm 740	9978\pm550

Tab. 15 Koncentrace draslíku v orgánech při jednotlivých ošetřeních TiO₂NP. Koncentrace je uváděna v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ppm) \pm SD.

	Koncentrace draslíku v rostlinných orgánech ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{SD}$)		
	Kořen	Stonek	List
Kontrola	37937 \pm 2119	20951 \pm 8668	13585 \pm 2919
1 ppm TiO ₂	11944\pm1500	21021 \pm 6430	16210 \pm 2225
10 ppm TiO ₂	12808\pm3076	18374 \pm 2625	12836 \pm 1970
100 ppm TiO ₂	13882\pm4616	19078 \pm 4507	14223 \pm 3361
1000 ppm TiO ₂	13114\pm1162	26139 \pm 4893	16450 \pm 997

Tab. 16 Koncentrace sodíku v orgánech při jednotlivých ošetřeních TiO₂NP. Koncentrace je uváděna v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ppm) \pm SD.

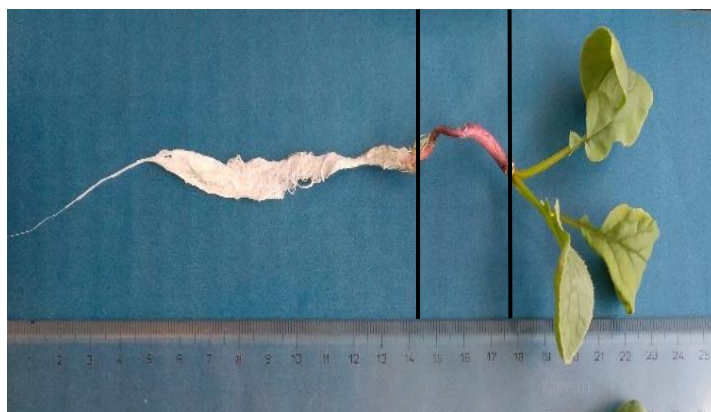
	Koncentrace sodíku v rostlinných orgánech ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{SD}$)		
	Kořen	Stonek	List
Kontrola	4655 \pm 905	7327 \pm 2245	3364 \pm 160
1 ppm TiO ₂	3767 \pm 1151	8942 \pm 1798	3797 \pm 477
10 ppm TiO ₂	4174 \pm 997	8680 \pm 1307	4288 \pm 1001
100 ppm TiO ₂	3806 \pm 1038	9895 \pm 3081	4916\pm1324
1000 ppm TiO ₂	2061\pm333	8278 \pm 917	4859\pm267

4.5LA-ICP-MS

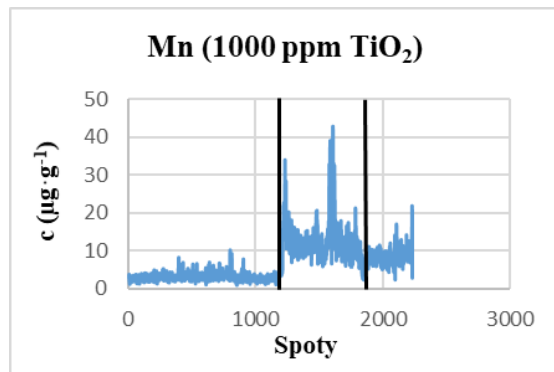
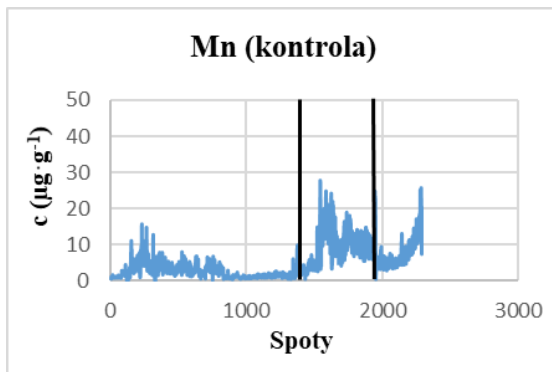
4.5.1 Sken napříč celou rostlinou

V následujících grafech je uvedena distribuce prvků podél osy rostliny a srovnání kontrolní rostliny s rostlinou vystavenou expozici TiO₂NP (1000 ppm). Každý graf je rozdělen na 3 části (kořen, stonk a list) znázorňující změnu koncentrace jednotlivých prvků napříč celou rostlinou. Na ose x jsou uvedeny spoty o velikosti 110 μm a na ose y koncentrace prvku v μg·g⁻¹. Obr. 16 ilustruje rozdělení rostliny na jednotlivé orgány.

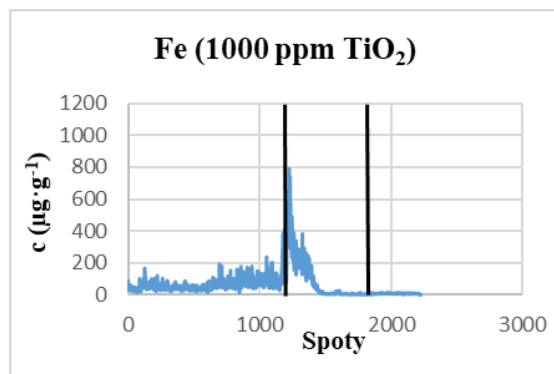
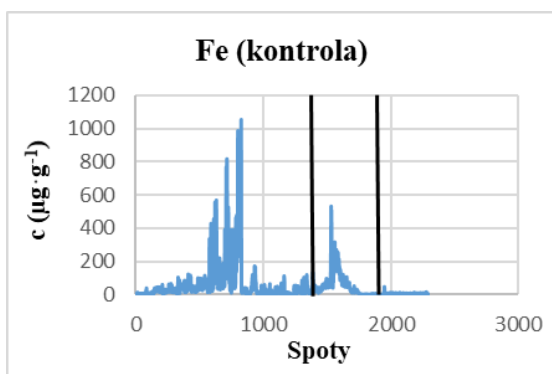
Nejvyšší koncentrace Mn byla kvantifikována ve stonku a v listech, průměrná koncentrace v kořeni byla vyšší u kontroly (Obr. 17 a 18). V případě Fe je viditelná vyšší koncentrace na pomezí kořen/stonk v případě kontroly i 1000 ppm. U kontroly byly pozorovány vyšší koncentrace v kořeni (Obr. 19 a 20). Koncentrace Cu byla nejvyšší v kořeni, mezi kontrolou a 1000 ppm nebyl pozorován významný rozdíl (Obr. 21 a 22). Největší množství Zn bylo naměřeno v kořeni a ve stonku, vyšší koncentrace byla naměřena po ošetření TiO₂ (Obr. 23 a 24). V kontrolní rostlině bylo kvantifikováno více Na, konkrétně v kořenech a stoncích (Obr. 25 a 26). Co se týče Mg tak vyšší koncentrace byly naměřeny v kořeni a stonku u kontrolní rostliny (Obr. 27 a 28). V případě kontroly byla též kvantifikována významně vyšší koncentrace K a to konkrétně v kořeni (Obr. 29 a 30). Koncentrace Ca byla vyšší u kontrolní rostliny v kořeni podobně jako v případě K (Obr. 31 a 32). U titanu je významně vyšší koncentrace pozorována u rostliny ošetřované TiO₂NP, a to hlavně v kořeni (až o 2 řády), ve stonku a v listech je také pozorována vyšší koncentrace, ale ne tak markantní (Obr. 33 a 34). Všechny tyto výsledky jsou v souladu s měřením v roztoku.



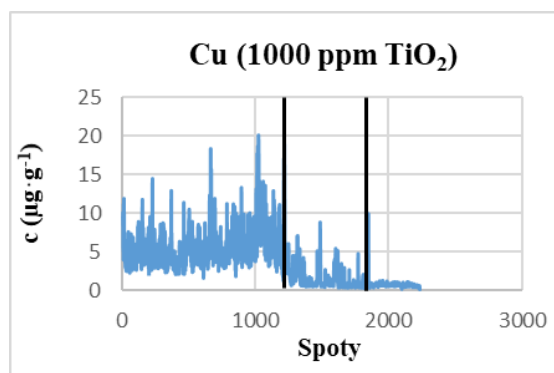
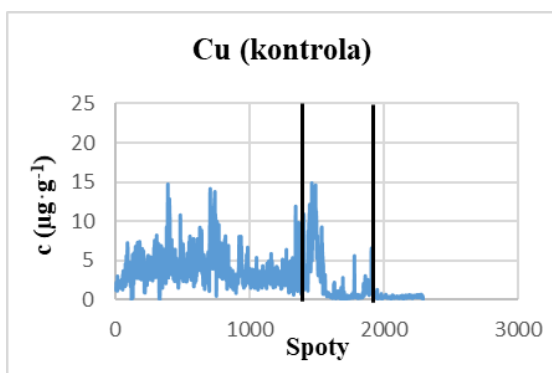
Obr. 16 Rostlina ředkvičky rozdělená na kořen, stonk a list



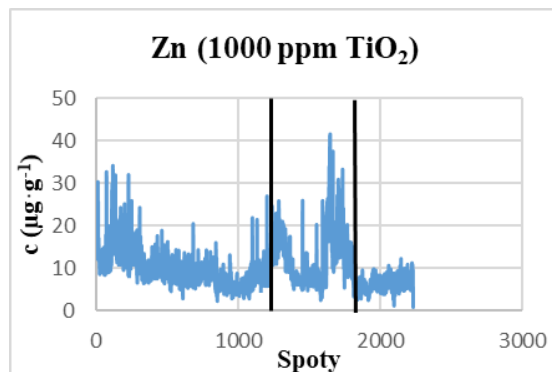
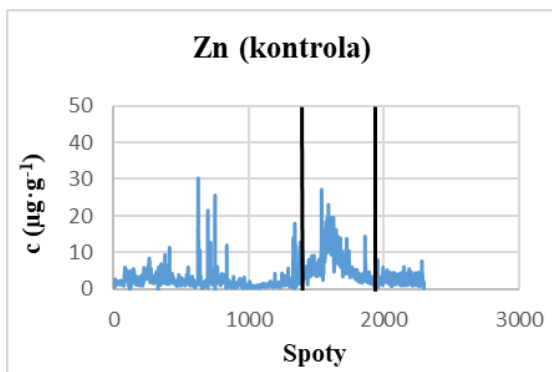
Obr. 17 a 18 Grafy znázorňující změnu koncentrace Mn napříč celou rostlinou (vlevo kontrola, vpravo ošetření 1000 ppm).



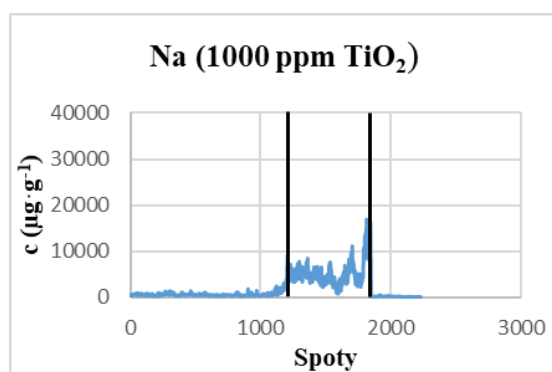
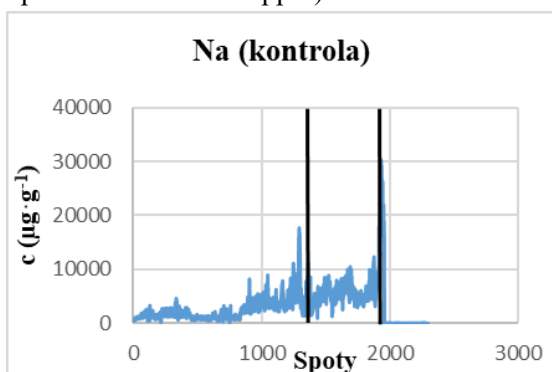
Obr. 19 a 20 Grafy znázorňující změnu koncentrace Fe napříč celou rostlinou (vlevo kontrola, vpravo ošetření 1000 ppm).



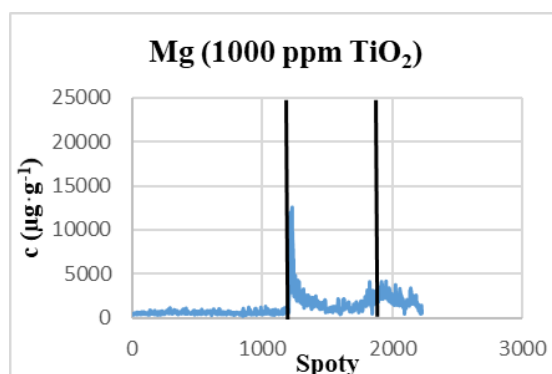
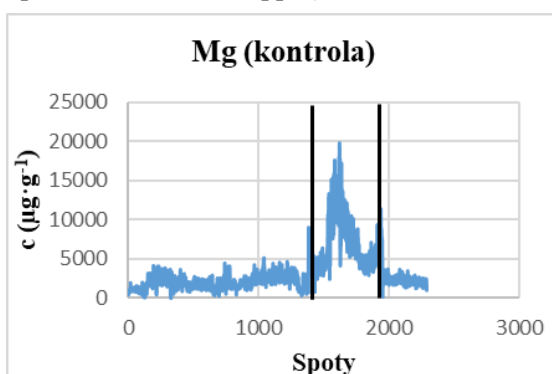
Obr. 21 a 22 Grafy znázorňující změnu koncentrace Cu napříč celou rostlinou (vlevo kontrola, vpravo ošetření 1000 ppm).



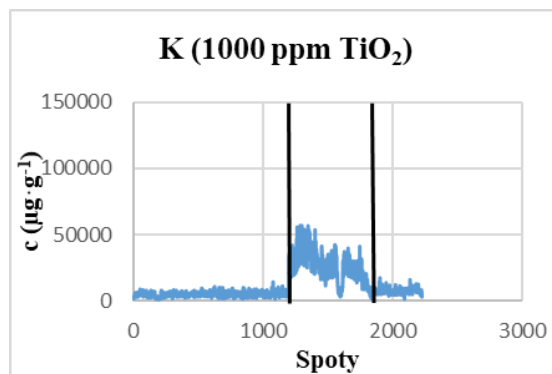
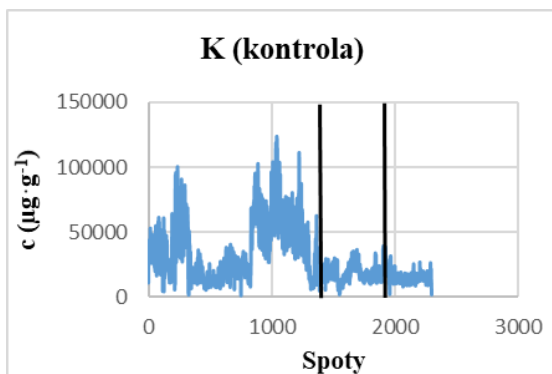
Obr. 23 a 24 Grafy znázorňující změnu koncentrace Zn napříč celou rostlinou (vlevo kontrola, vpravo ošetření 1000 ppm).



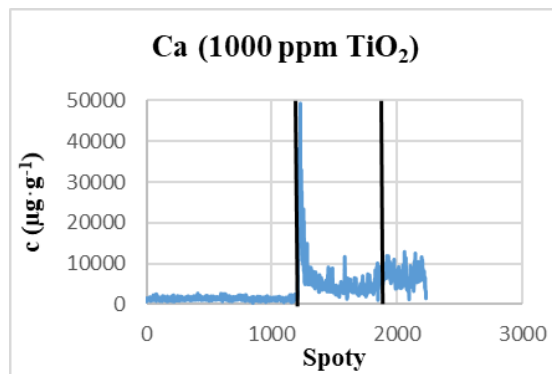
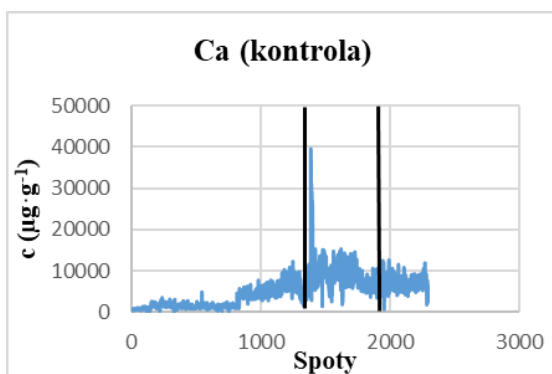
Obr. 25 a 26 Grafy znázorňující změnu koncentrace Na napříč celou rostlinou (vlevo kontrola, vpravo ošetření 1000 ppm).



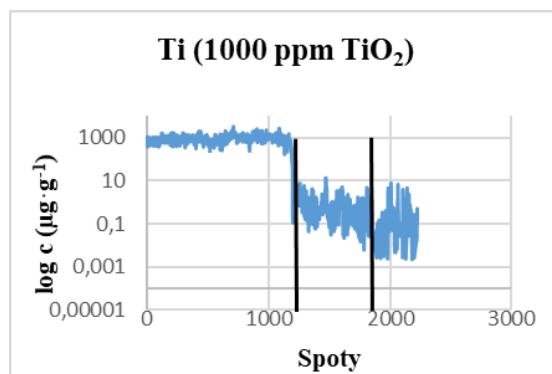
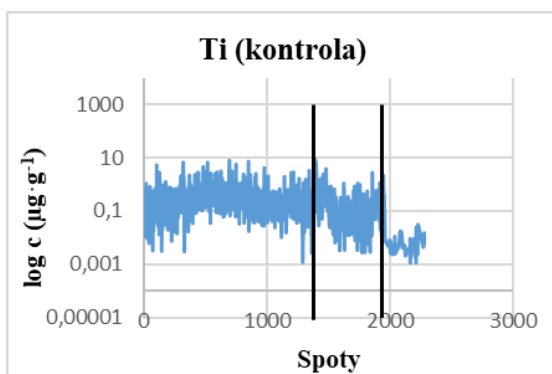
Obr. 27 a 28 Grafy znázorňující změnu koncentrace Mg napříč celou rostlinou (vlevo kontrola, vpravo ošetření 1000 ppm).



Obr. 29 a 30 Grafy znázorňující změnu koncentrace K napříč celou rostlinou (vlevo kontrola, vpravo ošetření 1000 ppm).



Obr. 31 a 32 Grafy znázorňující změnu koncentrace Ca napříč celou rostlinou (vlevo kontrola, vpravo ošetření 1000 ppm).

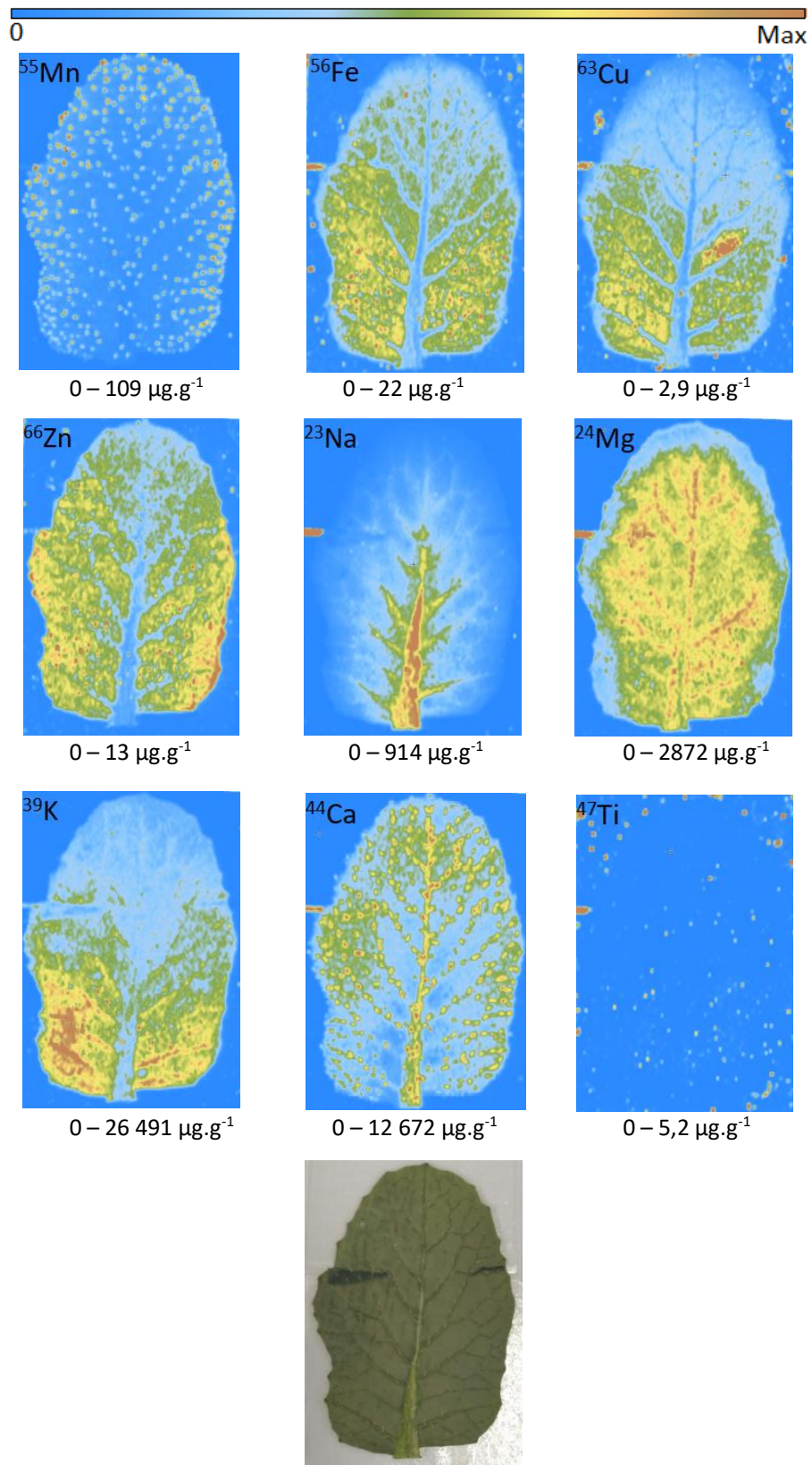


Obr. 33 a 34 Grafy znázorňující změnu koncentrace Ti napříč celou rostlinou (vlevo kontrola, vpravo ošetření 1000 ppm).

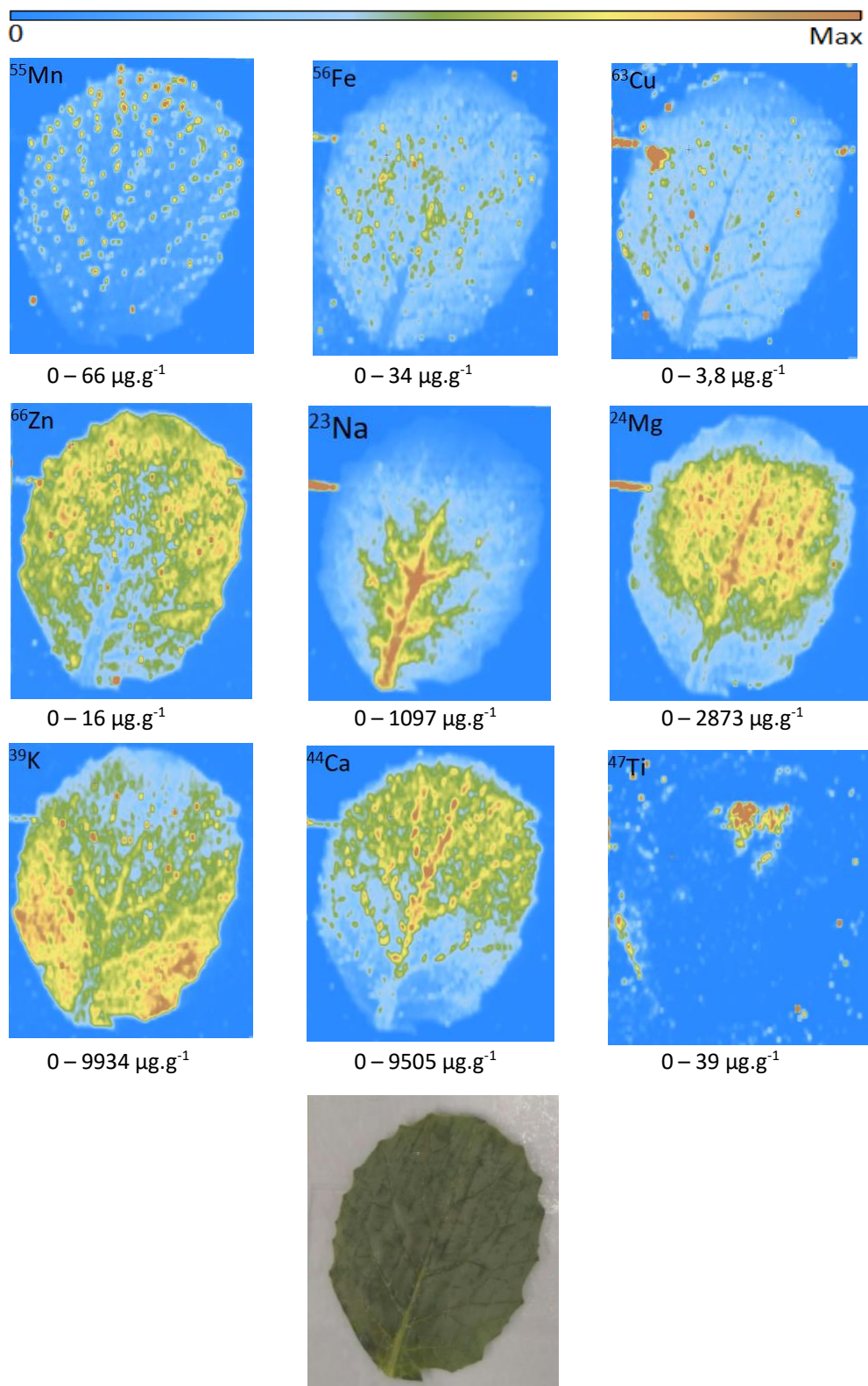
4.5.2 Imaging listu

V této kapitole jsou uvedeny koncentrační 2D mapy pro izotopy ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{39}K , ^{44}Ca , ^{47}Ti v kontrolním listu ředkvičky (Obr. 35) a v listu ředkvičky ošetřovaném TiO_2NP o koncentraci 1000 ppm (Obr. 36), pod každou mapou je uveden koncentrační rozsah v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Těsně při levém okraji ve 2/3 mapy mimo list, je u většiny map patrná zvýšená koncentrace prvků, protože zde chyběla oboustranná páska pro přichycení a bylo zde ablatováno mikroskopické sklíčko.

U první 2D mapy náležející Mn je zřejmé, že kopíruje rozložení žilnatiny. Je zde také patrný koncentrační pokles v případě ošetřené rostliny. Fe tvoří převážně čepel listu a byl pozorován velký úbytek koncentrace Fe u rostliny ošetřené TiO_2NP , což potvrzuje výsledky z roztokového měření. Cu je pravidelně rozložen v dolní polovině listu, u 1000 ppm je vidět pouze pár oblastí, a tedy ovlivnění jeho koncentrace po ošetření. Zn má velmi podobné rozložení jako Fe, mezi kontrolou a 1000 ppm není viditelný rozdíl. U sodíku jsou patrné vysoké koncentrace v oblasti konce řapíku a hlavní žíly, mezi kontrolou a listem nebyl pozorován významný rozdíl. Rozložení (celý list bez okrajových částí) i koncentrace Mg jsou v případě kontroly i 1000 ppm téměř totožné. Co se týče K, tak je z imagingu patrný téměř 3násobný pokles maximální koncentrace po ošetření 1000 ppm TiO_2 ve srovnání s kontrolou. Na druhou stranu v horní části listu byla naměřena nižší koncentrace K u kontroly, proto při měření plamenovou fotometrií, kdy se měří průměrná koncentrace celého listu, nebyl pozorován statisticky významný rozdíl. Ca byl stanoven v horní části čepele a v oblasti žilnatiny, koncentrační rozdíl mezi kontrolou a 1000 ppm není patrný. Titan byl u kontroly stanoven pouze v okrajových částech listu a v pozadí. U 1000 ppm byl také stanoven v okrajových oblastech, ale nejvyšší koncentrace Ti byla změřena v horní části listu ke konci hlavní žíly (cévy).



Obr. 35 Prostorová distribuce izotopů ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu, ⁶⁶Zn, ²³Na, ²⁴Mg, ³⁹K, ⁴⁴Ca, ⁴⁷Ti v kontrolním listu ředkvičky včetně koncentračního rozsahu.



Obr. 36 Prostorová distribuce izotopů ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{39}K , ^{44}Ca , ^{47}Ti v listu ředkvičky (1000 ppm TiO_2NP) včetně koncentračního rozsahu.

5 DISKUZE

5.1 Biomasa

V této diplomové práci neměly TiO₂NP na změnu biomasy významný vliv, jenom při nejvyšší koncentraci došlo ke snížení suché biomasy listů. Tento výsledek koresponduje s výsledky i jiných autorů. Výzkum Ma *et al.* (2010b) ukázal, že CeO₂NP neměly žádný vliv na růst ředkviček ani při ošetření 2 000 mg·l⁻¹. Zhang *et al.* (2015b) uvádějí, že koncentrace 10 mg·l⁻¹ CeO₂NP neměla významný vliv na ředkvičkovou biomasu pěstovanou v ¼ Hoaglandově roztoku. Seeger *et al.* (2009), nezjistili žádné významné rozdíly v růstu vrb (*Salix alba*) při ošetření 1-100 mg·l⁻¹ TiO₂NP. Larue *et al.* (2012a) uvádějí, že dochází k akumulaci TiO₂NP o velikosti menší než 140 nm v kořenech pšenice, ale tato akumulace neovlivňuje klíčení semen, biomasu ani transpiraci.

V publikacích, které zmiňují pozitivní účinek na rostliny, bylo pozorováno, že TiO₂NP podporuje růst špenátu zvýšením rychlosti fotosyntézy a metabolismu dusíku (Hong *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Podle Zahra *et al.* (2015) byla zvýšena celková biomasa *Lactuca sativa* až na 1,4násobek kontroly při nejvyšší koncentraci (250 mg·kg⁻¹). Podle Gui *et al.* (2017) čerstvá biomasa kořenů a listů ředkviček významně vzrostla po ošetření 50 a 100 mg·kg⁻¹ CeO₂NP a čerstvá biomasa stonku (bulvy) byla významně zvýšena ve všech třech různých koncentracích CeO₂NP, tj. 10, 50 a 100 mg·kg⁻¹ CeO₂NP. Suchá biomasa kořene, stonku a listů byla mírně zvýšena při ošetření 10, 50 a 100 mg·kg⁻¹ CeO₂NP a stonku při 100 mg·kg⁻¹ CeO₂NP byla významně vyšší ve srovnání s kontrolním ošetřením.

Oproti tomu existují práce, kde byl pozorován jak pozitivní, tak i negativní vliv nanočástic na tvorbu biomasu, a to podle použité koncentrace a způsobu ošetření. Výsledky Mahmoodzadeh *et al.* (2013) ukázaly, že po postřiku TiO₂NP není významně ovlivněna ani délka kořenů ani délka výhonků pšenice, avšak pozorovali, že TiO₂NP má škodlivé účinky na biomasu kořene a výhonků. Čerstvá hmotnost výhonků byla silně ovlivněna koncentracemi TiO₂NP, ale vliv na suchou hmotnost výhonků nebyl nijak výrazný. Nejvyšší hodnota čerstvé a suché hmotnosti pšeničných kořenů byla zaznamenána při 100 mg·l⁻¹ TiO₂NP, ale ošetření vyšší než 100 mg·l⁻¹ vykazovaly inhibiční účinky na čerstvou i suchou hmotnost kořenů. Raliya *et al.* (2015) ošetřovali rajčata nanočásticemi ZnO a TiO₂. Nejvyšší zvýšení výtěžku biomasy bylo při ošetření

250 mg·kg⁻¹ TiO₂ po aerosolové expozici, což vedlo ke zvýšení o 69,6 % oproti kontrole. Na druhou stranu foliární aplikace TiO₂NP v koncentraci 1000 mg·kg⁻¹ snížila biomasu o 6,8 %. Bylo zjištěno, že ošetření TiO₂NP o koncentraci 1000 mg·kg⁻¹ vedlo ke zvýšení obsahu chlorofylu, ale ke snížení celkové biomasy. Předpokládá se, že nanočástice podporovaly růst rostlin v kritickém období růstu, ale jejich následná akumulace způsobila toxicitu vyvolanou kovem.

Je zřejmé, že působení nanočástic na biomasu je buď negativní, neutrální nebo pozitivní. V této práci nemělo ošetření na biomasu významný vliv, pouze u listů při nejvyšší koncentraci (1000 ppm) došlo ke snížení hmotnosti suché biomasy, a to lze vysvětlit toxicitou kovu.

5.2 Enzymová aktivita

Na základě předchozích experimentů mohou nanomateriály po vstupu do buněk produkovat reaktivní druhy kyslíku (ROS) a vyvolat oxidační stres (Jiang *et al.*, 2014). Rostliny mohou používat několik obranných mechanismů proti oxidačnímu stresu a škodlivým účinkům ROS. ROS jsou vlastně chemické markery, které předpovídají toxicitu nanočástic, když dojde k narušení rovnováhy mezi obranou ROS a antioxidantem, dojde k oxidačnímu stresu (Lee *et al.*, 2013). Příkladem mechanismů ochrany rostlin je aktivace antioxidantních enzymů, jako je peroxidasa, katalasa a superoxidodismutasa, a také produkce molekul s nízkou molekulovou hmotností. Aktivita antioxidantních enzymů se může měnit v závislosti na koncentraci a typu nanočástic (Castiglione *et al.*, 2014).

Nedostatek enzymatické aktivity katalasy, který vysvětlujeme toxicitou titanu, stejně jako v této diplomové práci byl pozorován například u pšenice ošetřené nanočásticemi oxidu mědi a oxidu zinečnatého (Castiglione *et al.*, 2014). Na druhé straně byly v některých studiích pozorovány odlišné výsledky, například působení nanočástice CdS na přeslenici (*Hydrilla verticillata*) nebo CuO a ZnO na okurky vykazalo zvýšení aktivity CAT (Kim *et al.*, 2012). Cílem studie Doğaroğlu *et al.*, bylo zhodnotit fyto toxické účinky nanočástic ZnO a TiO₂ (30 nm) na klíčení semen a rané stádium růstu ječmene (*Hordeum vulgare*). Byla hodnocena klíčivost semen, prodloužení kořenů, obsah chlorofylu a antioxidanty (SOD, CAT, APX, glutathion a prolin). V této studii se aktivita CAT významně zvýšila po expozici nanočástic TiO₂ a ZnO ve všech koncentracích. Servin *et al.* (2013) uvádí, že expozice TiO₂NP způsobila zvýšení aktivity CAT v listech okurek.

Dle Hong *et al.* (2014) tam, kde byly hydroponicky pěstovány rostliny okurky a byly ošetřovány foliárně aplikovanými nanočásticemi oxidu ceričitého ve formě prášku nebo jako suspenze, došlo celkově ke zvýšení aktivity CAT a aktivita APX se v ošetřených vzorcích snížila ve srovnání s kontrolou. Zvýšení aktivity CAT ve všech rostlinách ošetřených buď práškem, nebo suspenzí při nízkých koncentracích naznačuje, že nanočástice CeO₂ ve styku s listy mohou tuto enzymatickou aktivitu v rostlinách okurek modifikovat. Na druhé straně, pokles CAT u stonků a kořenů rostlin ošetřených 320 mg·l⁻¹ naznačuje, že při této koncentraci nanočástice způsobovaly toxicitu. Morales *et al.* (2013) uvedli, že v koriandru při ošetření 62,5 a 125 mg·kg⁻¹ nanočástic došlo ke zvýšení aktivity CAT, ale při 250 a 500 mg·kg⁻¹ způsobily snížení aktivity CAT.

V této práci lze výrazný pokles aktivity APX v kořeni při ošetření 1000 ppm vysvětlit toxicitou titanu, při tak vysoké koncentraci se větší množství dostalo i do stonku, a proto i zde můžeme pozorovat markantní pokles aktivity APX. V listech a při nižších koncentracích nanočástic také ve stonku, kde nebyl pozorován tak výrazný koncentrační nárůst titanu, byl pozorován nárůst aktivity APX. Obdobný výsledek byl pozorován v práci Zhao *et al.* (2012b), kde zjistili, že v 10denních rostlinách kukuřice byla aktivita APX po ošetření CeO₂NP vyšší při 400 mg·kg⁻¹, ale nižší při 800 mg·kg⁻¹.

Uvedená zjištění jsou v souladu se studiemi, kde byla použita závitka (*Spirodela polyrhiza*) nebo cizrna, které byly následně ošetřeny nanočásticemi oxidu zinečnatého. Tyto studie uváděly pokles aktivity peroxidasy v důsledku poškození systému ochrany rostlin způsobeného nadměrnou produkcí ROS (Burman *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2013). Snížená aktivita peroxidasy může být způsobena změnou molekulární struktury enzymu (Van der Oost *et al.*, 2003). To tedy znamená že, sníženou aktivitu peroxidasy lze vysvětlit buď přímým účinkem těchto částic na molekulární strukturu enzymu, nebo poškozením systému ochrany rostlin v důsledku reaktivních druhů kyslíku. V práci Gui *et al.* (2017) byly stejně jako v této práci pěstovány ředkvičky, ale ošetřovány nanočásticemi oxidu ceričitého. V tomto případě byla měřena aktivita superoxiddismutasy a peroxidasy v kořenech a listech. U superoxiddismutasy bylo pozorováno zvýšení enzymové aktivity v kořeni i v listech při všech koncentracích. U peroxidasy byl sledován signifikantní nárůst pouze v listech, což koresponduje s výsledky této diplomové práce.

V případě GPX byla pozorována významně vyšší aktivita ve srovnání s kontrolou ve všech orgánech při nejvyšších koncentracích, ale například podle Foltête *et al.* (2011), kde byl bob ošetřován TiO₂NP koncentracemi 5, 25 a 50 mg·l⁻¹, nedošlo ke statisticky významné změně v aktivitě GPX. Tyto výsledky potvrzují to, že různé účinky nanočástic na rostliny nezávisí pouze na fyzických a chemických vlastnostech nanočástic, ale také na rostlinných druzích.

5.3 Příjem TiO₂

Výsledkem experimentu diplomové práce bylo zjištění, že nanočástice titanu o velikosti 20 nm se skrz kořeny distribuují do celé rostliny ředkvičky. To je způsobené velikostí nanočástic (20 nm), protože limit propustnosti buněčné stěny u rostlin je mezi 5 a 20 nm. Data jsou ve shodě s výsledky jiných studií (Larue *et al.* 2011; Larue *et al.* 2012a,b). Larue *et al.* (2011) navrhli studii o třech druzích rostlin, konkrétně pšenici, řepce olejné (*Brassica napus*) a huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*). Tyto rostliny byly pěstovány hydroponicky a ošetřovány TiO₂NP s průměry v rozmezí 12 až 140 nm. Nanočástice o velikosti 12 nm byly zachyceny kořeny rostlin a lokalizovány v parenchymální oblasti a centrálním válci. Tyto výsledky prokazují, že TiO₂NP lze v případě náhodného úniku do životního prostředí přenést do rostlin skrz kořeny a v důsledku toho se mohou dostat do potravního řetězce.

Larue *et al.* (2012a) porovnávali akumulaci TiO₂NP v kořenech a translokaci z kořenů do výhonku v pšenici s průměry v rozmezí od 14 nm do 655 nm. Výsledky této studie poskytují důkaz, že nejmenší TiO₂NP se hromadí v kořenech a distribuují se skrz celou rostlinu bez rozpuštění nebo modifikace krystalové fáze. Navrhli práh průměru 140 nm, nad nímž se NP již nehromadí v kořenech pšenice, a také práh průměru 36 nm, nad kterým se NP akumulují v parenchymu kořenů pšenice, ale nedosahují stéle (centrální válec) a následně se nepřemístí do výhonku. Tato akumulace neovlivňuje klíčení semen pšenice, biomasu a transpiraci. Nevyvolává žádné změny fotosyntézy ani nevyvolává oxidační stres. Expozice rostlin pšenice nejmenšími nanočásticemi během prvních fází vývoje však způsobuje protažení kořenů. Souhrnně tato data naznačují, že v rostlinách pšenice se mohou akumulovat pouze nejmenší TiO₂NP, i když v omezeném množství a jejich dopad je mírný.

Larue *et al.* (2012b) vystavili rostliny pšenice a řepky působení TiO₂NP o velikosti 14 nm nebo 25 nm v hydroponických podmínkách, a to buď expozicí kořeny nebo listy.

Výsledky ukazují, že TiO₂NP se hromadí v těchto rostlinkách při expozici kořeny i listy, a že obsah Ti je vyšší u řepky než pšenice. U obou druhů rostlin se NP s menšími průměry akumulovaly ve větší míře než ty větší. Z této studie vyplývá, že řepka jako dvouděložná rostlina z čeledi brukvovitých je schopna vyšší akumulace nanočástic než jednoděložná pšenice. Obecně úroveň akumulace závisí na rostlinných druzích a fyzikálně-chemických parametrech NP (velikost, tvar, potenciál zeta, stav aglomerace, chemické složení). Z toho vyplývá, že ředkvička jako dvouděložná rostlina je schopna akumulace nanočástic, a to převážně v kořenech.

Tato diplomová práce podává podobné výsledky ohledně akumulace titanu jako stávající literatura. Publikace Servin *et al.* (2012) a Raliya *et al.* (2015) potvrzují, že menší nanočástice se distribuuji do všech rostlinných orgánů. Ve studii Servin *et al.* (2012) byly okurky ošetřeny TiO₂NP v koncentracích pohybujících se od 0 do 4000 mg·l⁻¹ a o velikosti 27±4 nm. Bylo zjištěno, že Ti bylo transportováno z kořenů až do listových trichomů, což naznačuje, že trichomy jsou možným vylučovacím systémem pro Ti. Cílem studie Raliya *et al.* (2015) bylo porovnat vliv nanočástic TiO₂ a ZnO podobné velikosti (25±3,5 nm) v rozmezí koncentrací (0 až 1000 mg·kg⁻¹) na translokaci a akumulaci nanočástic. Bylo zjištěno, že pro absorpci nanočástic u rostlin je aplikace zprostředkovaná aerosolem účinnější než aplikace zprostředkovaná půdou. Distribuce nanočástic v rostlinách, včetně jejich jedlých částí, je problémem z hlediska bezpečnosti potravin. Data z ICP-MS ukázala přítomnost Ti a Zn v kořenech, stoncích, listech, a dokonce i plodech rajčat.

5.4 Prvkové složení

Bohužel v současné době neexistuje mnoho studií, které by se zabývaly změnou nutričního složení plodin v závislosti na koncentraci a typu nanočástic v půdě. Práce, které byly doposud publikovány, obsahují různorodé výsledky. V některých publikacích byl vliv nanočástic na změnu prvkového složení posouzen jako možný pozitivní (Servin *et al.*, 2013; Rico *et al.*, 2015b). Servin *et al.* (2013) pěstovali okurky 150 dní v písčitohlinité půdě ošetřené 0 až 750 mg·kg⁻¹ TiO₂NP. Koncentrace makro a mikroživin (Ca, Mg, K, P, Fe, Mn, Na, Cu, Zn, B a Ni) v plodech okurek byly stanoveny pomocí ICP-OES. Rostliny ošetřené 500 mg·kg⁻¹ měly o 35 % více draslíku a 34 % více fosforu ve srovnání s kontrolou. Bohužel nebyli schopni vysvětlit, proč byl zvýšen pouze příjem těchto dvou prvků. Předchozí studie ukázaly, že TiO₂NP mají podobné účinky jako některé rostlinné hormony, jako jsou cytokininy a gibberelliny (Armstrong a Quigley,

1999) a bylo zjištěno, že cytokininy ovlivňují absorpci P a K (Wu *et al.*, 2003). Předchozí studie ukázaly, že u papriky (*Capsicum annuum* L.) došlo ke zvýšení absorpce P v souvislosti s přítomností Ti. Autoři také uváděli zvýšení fotosyntetické aktivity spojené s Ti (Lopez-Moreno *et al.*, 1995). Změny v obsahu živin mohou mít vliv na nutriční kvalitu a chuť plodiny (Amtmann a Armengaud, 2009).

Ve studii Rico *et al.* (2015b) byl zkoumán dopad nanočástic oxidu ceričitého na fyziologii, produktivitu a makromolekulární složení ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Rostliny vystavené nejvyššímu ošetření (500 mg·kg⁻¹) nanočástic oxidu ceričitého nevytvořily zrna. Po ošetření 125 mg·kg⁻¹ se zvýšila akumulace Ce v zrnech až o 294 % ve srovnání s kontrolou, což bylo doprovázeno pozoruhodným zvýšením P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Cu a Al. Podobně 250 mg·kg⁻¹ zvýšil obsah methioninu, kyseliny asparagové, threoninu, tyrosinu, argininu a kyseliny linolenové v zrnech o 617, 31, 58, 141, 378 a 2,47 %. Tato data naznačují, že CeO₂NP moduloval složité procesy regulující ukládání kovu v zrnech, a to chelataci a membránový transport (Graham a Stangoulis 2003). Zjištění ilustrují prospěšné a škodlivé účinky CeO₂NP u ječmene. Bohužel v současné literatuře chybí pochopení toho, jak ENM modifikují elementární absorpci v rostlinách. Nakládání s kovem je totiž obecně považováno za překážku zvyšování obsahu prvků v rostlinách (Palmgren *et al.* 2008).

Výsledky jiných studií dokládají neutrální vliv na nutriční složení rostlin (Zhao *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Zhao *et al.* (2014) zkoumali účinky CeO₂NP na kvalitu okurek a zjistili, že koncentrace 800 mg·kg⁻¹ CeO₂NP nezpůsobila žádné významné změny v koncentraci makro a mikroživin. Podle Zhang *et al.* (2016) nebyly u ředkviček pozorovány žádné významné změny ve stavu výživy rostlin mezi kontrolou, čerstvou a starší půdou při ošetření 1000 mg·kg⁻¹ CeO₂NP.

Negativní vliv nanočástic na prvkové složení rostlin popsali Zuverza Mena *et al.* (2016), jejich výsledek koresponduje s našimi závěry. Zuverza-Mena *et al.* (2016) sledovali dopady nano stříbra na fyziologii a výživovou kvalitu klíčků ředkviček. Semena byla klíčena a pěstována po dobu 5 dnů v AgNP suspenzích při 0, 125, 250 a 500 mg·l⁻¹. Příjem Ag a živin byl kvantifikován ICP-OES. Sazenice vystavené 500 mg·l⁻¹ měly výrazně méně Ca, Mg, B, Cu, Mn a Zn ve srovnání s kontrolou. Tyto výsledky naznačují, že AgNP by mohly významně ovlivnit růst, obsah živin a konformaci makromolekul

v klíčcích ředkviček, což má pro lidské zdraví neznámé důsledky. Je možné, že AgNP fyzicky blokuje difúzní cestu nebo kanály pro aktivní absorpci.

V této práci docházelo k modifikaci makro a mikroprvkového složení především u kořenů, protože byly v kontaktu s roztokem obsahujícím nanočástice. Při vyšších koncentracích došlo v kořeni k poklesu Mn, Fe, Cu, Mg, Ca, K i Na a nárůst byl v kořeni pozorován pouze u Zn. Ve stonku došlo ke snížení koncentrace Mn a Mg při ošetření 1000 ppm. V listech byl při nejvyšších ošetřeních pozorován pokles koncentrace Mn a Fe a nárůst koncentrace Ca a Na. Z toho lze vyvodit závěr, že nanočástice TiO₂ o velikosti 20 nm ovlivňují absorpci některých prvků v rostlinách ředkviček pěstovaných v hydroponii, a to převážně negativním způsobem.

5.5 LA-ICP-MS

Mezi důležité publikace, v nichž byla využita metoda LA-ICP-MS patří Koelmel *et al.* (2013) a Kötschau *et al.* (2013). Koelmel *et al.* (2013) zkoumali pomocí LA-ICP-MS příjem na úrovni pletiv a prostorové rozložení zlatých nanočástic (AuNP) v kořenech a výhoncích rýže za hydroponických podmínek. Rostliny byly hydroponicky vystaveny pozitivně, neutrálně a negativně nabitým AuNP s průměrem 2 nm. Tato studie prokázala schopnost detekovat AuNP absorbovaný pletivy rostlin rýže pomocí LA-ICP-MS.

V práci Kötschau *et al.* (2013) byla testována metoda LA-ICP-MS pro stanovení prostorového rozložení a obsahu makro a mikro prvků (Ca, Cd, Ce, Cr, Cu, Fe, K, La, Mn, Ni, P, S a Zn) v listech slunečnice. Listy byly skenovány v liniích ortogonálních k listovým žilám. Prvky rozdělili do čtyř hlavních skupin podle jejich distribučního vzorce. První skupina zahrnuje prvky, které vykazují homogenní distribuci na ploše povrchu listu: Ca, Cr a P. Druhá skupina obsahující Fe a S, ukazuje obohacení v oblasti špičky listu. Třetí skupina čítá prvky Cd, Ce, Cu, La, Mn a Zn, které se zřejmě hromadí hlavně v žilách listu. Zdá se, že K a Ni ve čtvrté skupině se hromadí přednostně v mezofylu. Hlavní živiny Ca a P jsou rozptýleny po celém povrchu listu, se vzorem nevykazujícím ani preferovanou akumulaci v žilách ani v mesofylu. V této diplomové práci nebyly stanoveny shodné prvky, ale některé lze pro srovnání uvést. U Ca byla stejně jako v práci Kötschau *et al.* (2013) pozorována homogenní distribuce po celém listu. Ca je složkou pektinu v buněčné stěně, a proto se homogenní distribuce jeví jako rozumná. U Fe je rozdílná distribuce, v případě slunečnice byly vyšší koncentrace pozorovány ve špičce a ve zbytku listu homogenně, u ředkvičky byla pozorována

homogenní distribuce v celém listu. Tuto distribuci autoři vysvětlují obecným stresem. Cu, Mn a Zn se v listech slunečnice akumulují hlavně v žilách. U ředkviček je Cu homogenně distribuován v první polovině listu, Mn je distribuován stejně, a to pouze v žilách a Zn homogenně po celém povrchu listu kromě hlavní žíly. Draslík slouží jako přenosná osmotická látka a má regulační funkce. K je distribuován pouze homogenně v mesofyly a ukazuje nižší obsah v hlavní žíle. V listech ředkvičky byla distribuce K velmi podobná jako v listech slunečnice.

Ve studiu Wojcieszek *et al.* (2019), kde byly také využity jako modelové rostliny ředkvičky, byla sledována prostorová distribuce neporušených CeO₂NP v kořenech ředkviček, schopnost NP vstoupit a akumulovat se v rostlině. Po kultivaci zůstala většina ceru v kořenech, s nízkým transportem do listů a stonků. Analýza listů a stonků však ukázala přítomnost nanočástic s většími rozměry, což naznačuje, že nanočástice podléhají aglomeraci v koncovém bodě jejich transportu. Nakonec analýza LA-ICP-MS v ředkvičkových kořenech ukázala, že k akumulaci nanočástic dochází hlavně pod povrchem (epidermis), ale po akumulaci mají schopnost distribuovat se do celé rostliny.

Ko *et al.* (2019) studovali chování nanočástic oxidu křemičitého v bazalce pomocí LA-ICP-MS. Byl studován fyziologický vliv živného roztoku obohaceného o syntetizované SiNP a ko-znečišťující látku (iont Cs). SiNP se pohybovaly středem a nahromadily se na vrcholu a okraji. Na rozdíl od lokalizovaných SiNP byl pozorován široce distribuovaný vzorec pro Cs, což naznačuje, že ionty Cs byly mobilnější než SiNP. Je to pravděpodobně kvůli jejich velikosti a účinkům náboje, které omezují translokační cestu. Například nabité elementární ionty se mohou pohybovat nejen cévními svazky, ale také buněčnými membránami, ale nanočástice upřednostňují spíše specifické cesty než membránami kvůli jejich větší velikosti. Proto SiNP primárně používaly přístupné cesty, jako jsou hlavní žíla a postranní žilky. Částice dostatečně malé pro transport se nakonec se akumulovaly na okraji. Podobná akumulace byla pozorována u nanočástic oxidu ceričitého, což bylo vysvětleno slabou interakcí s cévními svazky v důsledku povrchového náboje (Zhang *et al.*, 2011). Naproti tomu elementární ionty mohou používat různé cesty, což vede k širší distribuci místo lokalizace. Tato práce obsahuje velmi podobné závěry, protože nanočástic titanu se pohybovaly hlavní žílou k okraji listu, a proto zde docházelo k jejich hromadění.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se v první kapitole teoretické části zabývá minerální výživou rostlin, výskytem, příjmem a biologickými funkcemi konkrétních makrobiogenních a mikrobiogenních prvků. Dále je rozebrána problematika nanotechnologií a nanočástic, a to od jejich využití, přes jejich osud v prostředí až po příjem, distribuci a vliv na rostliny. V poslední kapitole teoretické části je popsána hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, její spojení s laserovou ablací a plamenová fotometrie.

V experimentální části práce byl optimalizován postup pěstování ředkviček a jejich ošetřování nanočásticemi TiO₂. Po ukončení pěstování byla měřena změna biomasy ředkviček po ošetření různými koncentracemi TiO₂NP (0, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm a 1000 ppm) v Hoaglandově roztoku o ¼ síle. Změny v čerstvé biomase byly statisticky nevýznamné. U suché biomasy došlo k poklesu hmotnosti u listů při nejvyšší koncentraci TiO₂NP (1000 ppm).

Následně byla stanovena aktivita antioxidantních enzymů. V případě katalasy byla pozorována nižší aktivita v porovnání s kontrolou při všech koncentracích TiO₂NP, nárůst byl pozorován pouze v listech při nejnižší koncentraci TiO₂NP (1 ppm). Aktivita askorbátperoxidasy byla vyšší v porovnání s kontrolou ve stoncích při ošetření 1 ppm, 10 ppm a 100 ppm TiO₂NP. V listech byla aktivita askorbátperoxidasy vyšší při všech ošetřeních. Tyto výsledky lze vysvětlit toxicitou titanu, která při nejvyšších koncentracích a v přímém kontaktu s rostlinou v kořenech snižovala aktivitu katalasy a askorbátperoxidasy. U guajakolperoxidasy byl pozorována vyšší aktivita v kořeni při koncentracích 1 a 1000 ppm TiO₂NP. V nadzemní části byla aktivita tohoto enzymu výrazně vyšší oproti kontrole při nejvyšších koncentracích TiO₂NP (100 a 1000 ppm).

Pro stanovení vybraných kovů v rostlinných orgánech byla vyvinuta a optimalizována metoda. Koncentrace titanu, mikroprvků a hořčíku byly stanoveny roztokovou ICP-MS analýzou. Nejvyšší koncentrace titanu byla naměřena v kořenech, neboť kořeny byly přímo v kontaktu s roztokem nanočástic, ve stonku a v listech také rostla koncentrace titanu s rostoucí koncentrací nanočástic v roztoku. Uvedené znamená, že se nanočástice distribuují do jedlých částí rostliny a mohou negativně ovlivnit potravní řetězec. U manganu, železa a mědi byla naměřena nižší koncentrace v kořeni při vyšších koncentracích nanočástic v porovnání s kontrolou, pouze u zinku byl pozorován vyšší obsah při 1000 ppm TiO₂NP. Koncentrace hořčíku byla nižší v porovnání s kontrolou

v kořeni při ošetření 10, 100, 1000 ppm TiO₂NP a ve stonku při 1000 ppm TiO₂NP. Koncentrace vápníku, draslíku a sodíku byla stanovena pomocí plamenové fotometrie. U draslíku byla stanovena nižší koncentrace v kořeni při všech ošetřeních, u vápníku při 10 a 100 ppm TiO₂NP a v případě sodíku také u kořene při 1000 ppm TiO₂NP. Vyšší obsah sodíku a vápníku oproti kontrole byl pozorován při nejvyšších koncentracích TiO₂NP (100 a 1000 ppm) v listech. Nižší koncentrace většiny mikrobiogenních a makrobiogenních prvků v kořenech a stoncích ředkviček tedy znamená, že vyšší koncentrace nanočástic TiO₂ v roztoku měly negativní dopad na nutriční kvalitu této plodiny, proto je nezbytné omezovat, respektive kontrolovat uvolňování nanočástic titanu do životního prostředí.

Pomocí laserové ablace byl nejprve proveden sken napříč celou rostlinou kontroly a 1000 ppm TiO₂NP. Tento rychlý sken potvrdil prvkové složení rostlinných orgánů z roztokového měření, přičemž je z něj navíc patrná nižší koncentrace makro a mikroprvků ve srovnání s kontrolou jak v kořenech, tak i ve stonku. Laserová ablace může být použita k rychlému skenování celé rostliny, ale roztokové měření je lepší z hlediska přesnosti a spolehlivosti.

Po provedení rychlého skenu byly vytvořeny koncentrační 2D mapy listů kontroly a 1000 ppm TiO₂NP, které vyjadřují prostorovou distribuci makro a mikroprvků v listu. Z distribučních vzorců bylo patrné, že mangan byl pouze v žilnatině. Železo, měď a zinek se koncentrovaly po celém povrchu listu kromě hlavní žíly. Sodík byl stanoven téměř výhradně v hlavní žíle. Hořčík byl rovnoměrně rozložen po celém listu. Draslík se soustředil hlavně v dolní polovině čepele a vápník byl homogenně distribuován po celém listu, ale hlavně v oblasti žilnatiny. Nižší obsah ve srovnání s kontrolou byl pozorován nejvíce u mikroprvků (Mn, Fe, Cu a Zn). Nejvyšší koncentrace titanu po ošetření 1000 ppm TiO₂NP byla stanovena v horní části hlavní žíly a při okrajích listu. Bylo tedy potvrzeno, že se nanočástice pohybují v listu hlavní žilou a ukládají se tedy zde a na okrajích, kam se distribuují žilkami vedlejšími.

Na závěr je možné uvést, že diplomová práce splnila stanovené cíle, a to zejména v praktické části, kdy byla stanovena aktivita antioxidantních enzymů, byla vyvinuta a optimalizována metoda stanovení vybraných kovů v rostlinných orgánech a provedena vizualizace profilu vybraných kovů pomocí LA-ICP-MS. Za největší přínos považuji optimalizaci metody LA-ICP-MS pro popsání prostorové distribuce prvků v listech

rostliny a dále zjištění, že se nanočástice mohou distribuovat do celé rostliny a mohou mít v závislosti na mnoha faktorech negativní nebo pozitivní vliv na růst rostlin, což je velmi zajímavé téma i s ohledem na další zkoumání, neboť může přinést důležité výsledky v oblasti nanotechnologií a řízeného pěstování plodin.

7 LITERATURA

- Ajayan P.M. a Zhou O.Z. (2001): Applications of carbon nanotubes. In: *Carbon nanotubes*. Springer, Berlin, Germany, 425 stran
- Ammann A.A. (2007): Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *Journal of mass spektrometry* **42**, 419-427.
- Amooaghaie R., Tabatabaei F., Ahadi A.M. (2015): Role of hematin and sodium nitroprusside in regulating *Brassica nigra* seed germination under nanosilver and silver nitrate stresses. *Ecotoxicology and environmental safety* **113**, 259-270.
- Amtmann A. a Armengaud P. (2009): Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Current opinion in plant biology* **12**, 275-283.
- Amtmann A., Troufflard S., Armengaud P. (2008): The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Plant Physiology* **133**, 682-691.
- Andersson M., Österlund L., Ljungström S., Palmqvist A. (2002): Preparation of nanosize anatase and rutile TiO₂ by hydrothermal treatment of microemulsions and their activity for photocatalytic wet oxidation of phenol. *The Journal of Physical Chemistry B* **106**, 10674-10679.
- Antisari L.V., Carbone S., Gatti A., Vianello G., Nannipieri P. (2015): Uptake and translocation of metals and nutrients in tomato grown in soil polluted with metal oxide (CeO₂, Fe₃O₄, SnO₂, TiO₂) or metallic (Ag, Co, Ni) engineered nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 1841-1853.
- Arami H., Mazloumi M., Khalifehzadeh R., Sadrnezhaad S.K. (2007): Sonochemical preparation of TiO₂ nanoparticles. *Materials Letters* **61**, 4559-4561.
- Armstrong P.B. a Quigley J. P. (1999): α 2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Developmental & Comparative Immunology* **23**, 375-390.
- Arora S., Sharma P., Kumar S., Nayan R., Khanna P.K., Zaidi M.G.H. (2012): Gold-nanoparticle induced enhancement in growth and seed yield of *Brassica juncea*. *Plant growth regulation* **66**, 303-310.
- Asli S. a Neumann P.M. (2009): Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant, cell & environment* **32**, 577-584.
- Baenas N., Ferreres F., García-Viguera C., Moreno D.A. (2015): Radish sprouts—Characterization and elicitation of novel varieties rich in anthocyanins. *Food Research International* **69**, 305-312.
- Balasubramanian G., Dionysiou D.D., Suidan M.T., Baudin I., Laîné J.M. (2004): Evaluating the activities of immobilized TiO₂ powder films for the photocatalytic degradation of organic contaminants in water. *Applied Catalysis B: Environmental* **47**, 73-84.
- Bandyopadhyay S., Plascencia-Villa G., Mukherjee A., Rico C.M., José-Yacamán M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2015): Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with *Sinorhizobium meliloti* in soil. *Science of the Total Environment* **515**, 60-69.
- Barber J. (2003): Photosystem II: the engine of life. *Quarterly Reviews of Biophysics* **36**, 71-89.
- Barton L.E., Auffan M., Bertrand M., Barakat M., Santaella C., Masion A., Borschneck D., Olivi L., Roche N., Wiesner M.R., Bottero J.Y. (2014): Transformation of pristine and citrate-functionalized CeO₂ nanoparticles in a laboratory-scale activated sludge reactor. *Environmental Science & Technology* **48**, 7289–7296.
- Bazargan M.H., Byranvand M.M., Kharat A.N. (2012): Preparation and characterization of low temperature sintering nanocrystalline TiO₂ prepared via the sol-gel method using titanium (IV) butoxide applicable to flexible dye sensitized solar cells. *International Journal of Materials Research* **103**, 347-351.
- Becker J.S., Matusch A., Wu B. (2014): Bioimaging mass spectrometry of trace elements—recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review. *Analytica chimica acta* **835**, 1-18.
- Becker J.S., Zoriy M., Becker J.S., Dobrowolska J., Matusch A. (2007): Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) in elemental imaging of biological tissues and in proteomics. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **22**, 736-744.

- Becker J.S., Zoriy M., Matusch A., Wu B., Salber D., Palm C., Becker J.S. (2010): Bioimaging of metals by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Mass spectrometry reviews* **29**, 156-175.
- Becheri A., Dürr M., Nostro P.L.; Baglioni P. (2008): Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers. *Journal of Nanoparticle Research* **10**, 679-689.
- Berezin I., Mizrachy-Dagry T., Brook E., Mizrahi K., Elazar M., Zhuo S.P., Saul-Tcherkas V., Shaul O. (2008): Overexpression of AtMHX in tobacco causes increased sensitivity to Mg²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ ions, induction of V-ATPase expression, and a reduction in plant size. *Plant Cell Reports* **27**, 939-949.
- Bergeson L.L. (2010): Nanosilver: US EPA's pesticide office considers how best to proceed. *Environmental Quality Management* **19**, 79-85.
- Bettmer J., Bayón M.M., Encinar J.R., Sánchez M.L.F., Medel A.S. (2009): The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. *Journal of proteomics* **72**, 989-1005.
- Binh C.T.T., Tong T., Gaillard J.F., Gray K.A., Kelly J.J. (2014): Common freshwater bacteria vary in their responses to short-term exposure to nano-TiO₂. *Environmental toxicology and chemistry* **33**, 317-327.
- Blevins D.G. (1994): Uptake, translocation, and function of essential mineral elements in crop plants. In: *Physiology and Determination of Crop Yield*. (Peterson G.E. ed.), American Society., 259-275.
- Boisselier E. a Astruc D. (2009): Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society Reviews* **38**, 1759-1782.
- Borisov O.V., Mao X.L., Fernandez A., Caetano M., Russo R.E. (1999): Inductively coupled plasma mass spectrometric study of non-linear calibration behavior during laser ablation of binary Cu–Zn alloys. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **54**, 1351-1365.
- Briat J.F. a Lobreaux S. (1998): Iron storage and ferritin in plants. *Metal Ions in Biological Systems* **35**, 563-584.
- Britto D.T. a Kronzucker H.J. (2008): Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Plant Physiology* **33**, 637-650.
- Buick R.D., Buchan G.D., Field, R.J. (1993): The role of surface tension of spreading droplets in absorption of a herbicide formulation via leaf stomata. *Pesticide science* **38**, 227-235.
- Bundschuh M., Filser J., Lüderwald S., McKee M.S., Metreveli G., Schaumann G.E., Schulz R., Wagner S. (2018): Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? *Environmental Sciences Europe* **30**, 6.
- Burman U., Saini M., Kumar P. (2013): Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. *Toxicological & Environmental Chemistry* **95**, 605-612.
- Byranvand M., Kharat A., Fatholahi L., Beiranvand Z. (2013): A review on synthesis of nano-TiO₂ via different methods. *Journal of nanostructures* **3**, 1-9.
- Cañas J.E., Qi B., Li S., Maul J.D., Cox S.B., Das S. (2011): Acute and reproductive toxicity of nano-sized metal oxides (ZnO and TiO₂) to earthworms (*Eisenia fetida*). *Journal of Environmental Monitoring* **13**, 3351–3357.
- Cao Z.M., Stowers C., Rossi L., Zhang W.L., Lombardini L., Ma X.M. (2017): Physiological effects of cerium oxide nanoparticles on the photosynthesis and water use efficiency of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Environmental Science: Nano* **4**, 1086–1094.
- Cassee F.R., van Balen E.C., Singh C., Green D., Muijser H., Weinstein J., Dreher K. (2011): Exposure, health and ecological effects review of engineered nanoscale cerium and cerium oxide associated with its use as a fuel additive. *Critical Reviews in Toxicology* **41**, 213-229.
- Castiglione M.R., Giorgetti L., Cremonini R., Bottega S., Spanò C. (2014): Impact of TiO₂ nanoparticles on *Vicia narbonensis* L.: potential toxicity effects. *Protoplasma* **251**, 1471-1479.
- Cifuentes Z., Custardoy L., de la Fuente J.M., Marquina C., Ibarra M.R., Rubiales, D., Pérez-de-Luque, A. (2010): Absorption and translocation to the aerial part of magnetic carbon-coated nanoparticles through the root of different crop plants. *Journal of nanobiotechnology* **8**, 1-8.
- Clark R.B. (1993): Sorghum. In: *Nutrient Deficiencies and Toxicities in Crop Plants*. (Bennett W.F. ed.), St. Paul, MN: APS Press, The American Phytopathological Society, 21–26.

- Cornah J.E., Terry M.J., Smith A.G. (2003): Green or red: what stops the traffic in the tetrapyrrole pathway? *Trends in Plant Science* **8**, 224-230.
- Cornelis G., Hund-Rinke K., Kuhlbusch T., Van den Brink N., Nickel C. (2014): Fate and bioavailability of engineered nanoparticles in soils: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **44**, 2720-2764.
- Cornelis G., Pang L., Doolette C., Kirby J.K., McLaughlin M.J. (2013): Transport of silver nanoparticles in saturated columns of natural soils. *Science of the Total Environment* **463**, 120–130.
- Corradi A.B., Bondioli F., Focher B., Ferrari A.M., Grippo C., Mariani E., Villa C. (2005): Conventional and microwave-hydrothermal synthesis of TiO₂ nanopowders. *Journal of the American Ceramic Society* **88**, 2639-2641.
- Criquet S., Joner E.J., Leyval C. (2001): 2,7-diaminofluorene is a sensitive substrate for detection and characterization of plant root peroxidase activities. *Plant Science* **161**, 1063-1066.
- Cui D., Zhang P., Ma Y., He X., Li Y., Zhang J., Zhao Y., Zhang Z. (2014): Effect of cerium oxide nanoparticles on asparagus lettuce cultured in an agar medium. *Environmental Science: Nano* **1**, 459-465.
- Cyrusová T., Podlipná R., Vaněk T. (2015): Vliv nanočástic na rostliny. *Chemické listy* **109**, 276–280.
- Dahle J.T. a Arai Y. (2015): Environmental geochemistry of cerium: Applications and toxicology of cerium oxide nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**, 1253-1278.
- Dale A.L., Casman E.A., Lowry G.V., Lead J.R., Viparelli E., Baalousha M. (2015): Modeling nanomaterial environmental fate in aquatic systems. *Environmental Science & Technology* **49**, 2587–2593.
- Das S., Dowding J.M., Klump K.E., McGinnis J.F., Self W., Seal S. (2013): Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine. *Nanomedicine* **8**, 1483-1508.
- De Volder M.F., Tawfick S.H., Baughman R.H., Hart A.J. (2013): Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science* **339**, 535-539.
- Demidchik V. a Maathuis F.J.M. (2007): Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist* **175**, 387-404.
- Deng W., Luo K.M., Li D.M., Zheng X.L., Wei X.Y., Smith W., Thammina C., Lu L.T., Li Y., Pei Y. (2006): Overexpression of an *Arabidopsis* magnesium transport gene, AtMGT1, in *Nicotiana benthamiana* confers Al tolerance. *Journal of Experimental Botany* **57**, 4235-4243.
- Díaz-Somoano M., López-Antón M.A., Martínez-Tarazona M.R. (2004): Determination of selenium by ICP-MS and HG-ICP-MS in coal, fly ashes and sorbents used for flue gas cleaning. *Fuel* **83**, 231-235.
- Dietz K.J. a Herth S. (2011): Plant nanotoxicology. *Trends in plant science* **16**, 582-589.
- Dimkpa C.O., McLean J.E., Latta D.E., Manangón E., Britt D.W., Johnson W.P., Boyanov M.I., Anderson A.J. (2012): CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of Nanoparticle Research* **14**, 1-15.
- Doğaroğlu Z.G. a Köleli N. (2017): TiO₂ and ZnO nanoparticles toxicity in barley (*Hordeum vulgare* L.). *CLEAN–Soil, Air, Water* **45**, 1-8.
- Dressler V.L., Pozebon D., Curtius A.J. (1998): Determination of heavy metals by inductively coupled plasma mass spectrometry after on-line separation and preconcentration. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **53**, 1527-1539.
- Du W., Sun Y., Ji R., Zhu J., Wu J., Guo H. (2011): TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. *Journal of Environmental Monitoring*, **13**, 822-828.
- Du W.C., Tan W.J., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L., Ji R., Yin Y., Guo H.Y. (2017): Interaction of metal oxide nanoparticles with higher terrestrial plants: physiological and biochemical aspects. *Plant Physiology and Biochemistry* **110**, 210–225.
- Durrant S.F. (1992): Inductively coupled plasma-mass spectrometry for biological analysis. *TrAC. Trends in Analytical Chemistry* **11**, 68-73.

- Dutschk V., Karapantsios T., Liggieri L., McMillan N., Miller R., Starov V.M. (2014): Smart and green interfaces: from single bubbles/drops to industrial environmental and biomedical applications. *Advances in colloid and interface science* **209**, 109-126.
- Eichert T. a Goldbach H.E. (2008): Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces further evidence for a stomatal pathway. *Physiologia Plantarum* **132**, 491-502.
- Ettxeberria E., Gonzalez P., Pozueta J. (2009): Evidence for two endocytic transport pathways in plant cells. *Plant Science* **177**, 341-348.
- Figg D.J., Cross J.B., Brink C. (1998): More investigations into elemental fractionation resulting from laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry on glass samples. *Applied Surface Science* **127**, 287-291.
- Foltête A.S., Masfaraud J.F., Bigorgne E., Nahmani J., Chaurand P., Botta C., Labille J., Rose J., Férard J.F., Cotelle S. (2011): Environmental impact of sunscreen nanomaterials: ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO₂ nanocomposites on *Vicia faba*. *Environmental Pollution* **159**, 2515-2522.
- Fraceto L.F., Grillo R., de Medeiros G.A., Scognamiglio V., Rea G., Bartolucci C. (2016): Nanotechnology in agriculture: which Innovation potential does it have? *Frontiers in Environmental Science* **4**, 20.
- Fryer B.J., Jackson S.E., Longerich H.P. (1995): The design, operation and role of the laser-ablation microprobe coupled with an inductively coupled plasma-mass spectrometer (LAM-ICP-MS) in the earth sciences. *Canadian Mineralogist* **33**, 303-312.
- Furuta N. a Horlick G. (1982): Spatial characterization of analyte emission and excitation temperature in an inductively coupled plasma. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **37**, 53-64.
- Gao J., Xu G., Qian H., Liu P., Zhao P., Hu Y. (2013): Effects of nano-TiO₂ on photosynthetic characteristics of *Ulmus elongata* seedlings. *Environmental Pollution* **176**, 63-70.
- Gardea-Torresdey J.L., Rico C.M. White J.C. (2014): Trophic transfer, transformation, and impact of engineered nanomaterials in terrestrial environments. *Environmental science & technology* **48**, 2526-2540.
- Ge Y., Priester J.H., Van De Werfhorst L.C., Walker S.L., Nisbet R.M., An Y.J., Schimel J.P., Gardea-Torresdey J.L., Holden P.A. (2014): Soybean plants modify metal oxide nanoparticle effects on soil bacterial communities. *Environmental science & technology* **48**, 13489-13496.
- Geranio L., Heuberger M., Nowack B. (2009): The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environmental Science & Technology* **43**, 8113-8118.
- Gogos A., Knauer K., Bucheli T.D. (2012): Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of agricultural and food chemistry* **60**, 9781-9792.
- Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R.W., Nowack B. (2009): Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental Science and Technology* **43**, 9216-9222.
- Graham R. D. a Stangoulis J. C. (2003): Trace element uptake and distribution in plants. *The Journal of nutrition* **133**, 1502-1505.
- Graham R.D. a Nambiar E.K.S. (1981): Advances in research on copper deficiency in cereals. *Australian Journal of Agricultural Research* **32**, 1009-1037.
- Grande F. a Tucci P. (2016): Titanium dioxide nanoparticles: a risk for human health? *Mini reviews in medicinal chemistry* **16**, 762-769.
- Gray A.L. (1985): Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source mass spectrometry. *Analyst* **110**, 551-556.
- Griffitt R.J., Hyndman K., Denslow N.D., Barber D.S. (2008): Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicological Sciences* **107**, 404-415.
- Gui X., Rui M., Song Y., Ma Y., Rui Y., Zhang P., He X., Li Y., Zhang Z., Liu L. (2017): Phytotoxicity of CeO₂ nanoparticles on radish plant (*Raphanus sativus*). *Environmental Science and Pollution Research* **24**, 13775-13781.

- Günther D., Horn I., Hattendorf B. (2000): Recent trends and developments in laser ablation-ICP-mass spectrometry. *Fresenius' journal of analytical chemistry* **368**, 4-14.
- Gupta U.C. a Kalra Y.P. (2006): Residual effect of applied copper and zinc from fertilizers on plant concentration, phytotoxicity, and crop yield response. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **37**, 2505–2511.
- Gupta U.C., Kening W.U., Liang S. (2008): Micronutrients in soils, crops, and livestock. *Earth Science Frontiers* **15**, 110-125.
- Hammond J.P., Bennett M.J., Bowen H.C., Broadley M.R., Eastwood D.C., May S.T., Rahn C., Swarup R., Woolaway K.E., White P.J. (2003): Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiology* **132**, 578-596.
- Hänsch R. a Mendel R.R. (2009): Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current opinion in plant biology* **12**, 259-266.
- Hawthorne J., De la Torre Roche R., Xing B., Newman L. A., Ma X., Majumdar S. (2014): Particle-size dependent accumulation and trophic transfer of cerium oxide through a terrestrial food chain. *Environmental Science & Technology* **48**, 13102–13109.
- Hebbern C.A., Laursen K.H., Ladegaard A.H., Schmidt S.B., Pedas P., Bruhn D., Schjoerring J.K., Wulfsohn D., Husted S. (2009): Latent manganese deficiency increases transpiration in barely (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* **135**, 307-316.
- Hernandez-Viezas J.A., Castillo-Michel H., Andrews J.C., Cotte M., Rico C., Peralta-Videa J.R., Ge Y., Priester J.H., Holden P.A., Gardea-Torresdey J.L. (2013): In situ synchrotron X-ray fluorescence mapping and speciation of CeO₂ and ZnO nanoparticles in soil cultivated soybean (*Glycine max*). *ACS nano* **7**, 1415-1423.
- Holden P.A., Klaessig F., Turco R.F., Priester J.H., Rico C.M., Avila-Arias H. (2014): Evaluation of exposure concentrations used in assessing manufactured nanomaterial environmental hazards: are they relevant? *Environmental Science & Technology* **48**, 10541–10551.
- Hong F., Zhou J., Liu C., Yang F., Wu C., Zheng L., Yang P. (2005): Effect of nano-TiO₂ on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological trace element research* **105**, 269-279.
- Hong J., Peralta-Videa J.R., Rico C., Sahi S., Viveros M.N., Bartonjo J., Zhao L., Gardea-Torresdey J.L. (2014): Evidence of translocation and physiological impacts of foliar applied CeO₂ nanoparticles on cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Environmental Science & Technology* **48**, 4376–4385.
- Horlick G. (1994): Inductively coupled plasma mass spectrometry: has it matured already? *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **9**, 593-597.
- Hossain Z., Mustafa G., Sakata K., Komatsu S. (2016): Insights into the proteomic response of soybean towards Al₂O₃, ZnO, and Ag nanoparticles stress. *Journal of Hazardous Materials* **304**, 291-305.
- Houk R.S., Fassel V.A., Flesch G.D., Svec H.J., Gray A.L., Taylor C.E. (1980): Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Analytical Chemistry* **52**, 2283-2289.
- Hu C., Liu Y., Li X., Li M. (2013): Biochemical responses of duckweed (*Spirodela polyrhiza*) to zinc oxide nanoparticles. *Archives of environmental contamination and toxicology* **64**, 643-651.
- Huffman D.L. a O'Halloran T.V. (2001): Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 677-701.
- Hund-Rinke K. a Simon M. (2006): Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles TiO₂ on algae and daphnids. *Environmental Science and Pollution Research* **13**, 225–232.
- Chandlee J.M. a Scandalios J.G. (1984): Analysis of variants affecting the catalase developmental program in maize scutellum. *Theoretical and applied genetics* **69**, 71-77.
- Chen J., Liu X., Wang C., Yin S.S., Li X.L., Hu W.J., Simon M., Shen Z.J., Xiao Q., Chu C.C., Peng, X.X. (2015): Nitric oxide ameliorates zinc oxide nanoparticles-induced phytotoxicity in rice seedlings. *Journal of hazardous materials* **297**, 173-182.
- Cheng H.M., Chiu W.H., Lee C.H., Tsai S.Y., Hsieh W.F. (2008): Formation of branched ZnO nanowires from solvothermal method and dye-sensitized solar cells applications. *The Journal of Physical Chemistry C* **112**, 16359-16364.

- Chichiriccò G. a Poma. A. (2015): Penetration and toxicity of nanomaterials in higher plants. *Nanomaterials* **5**, 851-873.
- Isaac R.A. a Kerber J.D. (1971): Atomic absorption and flame photometry: Techniques and uses in soil, plant, and water analysis. In: *Instrumental methods for analysis of soils and plant tissue*. (Welsch L.M. ed.), Soil Science Society of America, Wisconsin, U.S.A., 17-37.
- Iversen T.G., Skotland T., Sandvig K. (2011): Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano Today* **6**, 176-185.
- Jaberzadeh A., Moaveni P., Moghadam H.R.T., Zahedi H. (2013): Influence of bulk and nanoparticles titanium foliar application on some agronomic traits, seed gluten and starch contents of wheat subjected to water deficit stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **41**, 201-207.
- Jacobasch C., Völker C., Giebner S., Völker J., Alsenz H., Potouridis T., Heidenreich H., Kayser G., Oehlmann J., Oetken M. (2014): Long-term effects of nanoscaled titanium dioxide on the cladoceran *Daphnia magna* over six generations. *Environmental Pollution* **186**, 180-186.
- Jelakovic S., Kopriva S., Suss K.H., Schulz G.E. (2003): Structure and catalytic mechanism of the cytosolic D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase from rice. *Journal of Molecular Biology* **326**, 127-135.
- Jiang H.S., Qiu X.N., Li G.B., Li W., Yin L.Y. (2014): Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environmental toxicology and chemistry* **33**, 1398-1405.
- Jiang H.S., Yin L.Y., Ren N.N., Zhao S.T., Li Z., Zhi Y.W., Shao H., Li W., Gontero B. (2017): Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology* **11**, 157-167.
- Jiang K.J., Kitamura T., Yin H., Ito S., Yanagida S. (2002): Dye-sensitized solar cells using brookite nanoparticle TiO₂ films as electrodes. *Chemistry letters* **31**, 872-873.
- Joško I. a Oleszczuk P. (2014): Phytotoxicity of nanoparticles—problems with bioassay choosing and sample preparation. *Environmental Science and Pollution Research* **21**, 10215-10224.
- Jovanović B. (2015): Critical review of public health regulations of titanium dioxide, a human food additive. *Integrated environmental assessment and management* **11**, 10-20.
- Judy, J.D. a Bertsch, P.M. (2014): Bioavailability, toxicity, and fate of manufactured nanomaterials in terrestrial ecosystems. *Advances in agronomy* **123**, 1-64.
- Kaegi R., Ulrich A., Sinnet B., Vonbank R., Wichser A., Zuleeg S., Simmler H., Brunner S., Vonmont H., Burkhardt M. (2008): Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution* **156**, 233-239.
- Kam N.W.S., O'Connell M., Wisdom J.A., Dai H. (2005): Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **102**, 11600-11605.
- Kawagashira N., Ohtomo Y., Murakami K., Matsubara K., Kawai J., Carninci R., Hayashizaki P., Kikuchi S., Higo K. (2001): Multiple zinc finger motifs with comparison of plant and insects. *International Conference on Genome Informatics* **12**, 368-369.
- Keller A.A., McFerran S., Lazareva A., Suh S. (2013): Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of nanoparticle research* **15**, 1692.
- Kho Y.K., Iwase A., Teoh W.Y., Mädler L., Kudo A., Amal R. (2010): Photocatalytic H₂ evolution over TiO₂ nanoparticles. The synergistic effect of anatase and rutile. *The Journal of Physical Chemistry C* **114**, 2821-2829.
- Kim S., Lee S., Lee I. (2012): Alteration of phytotoxicity and oxidant stress potential by metal oxide nanoparticles in *Cucumis sativus*. *Water, Air, & Soil Pollution* **223**, 2799-2806.
- Kiser M.A., Westerhoff P., Benn T., Wang Y., Perez-Rivera J., Hristovski K. (2009): Titanium nanomaterial removal and release from wastewater treatment plants. *Environmental science & technology* **43**, 6757-6763.
- Ko J.A., Furuta N., Lim H.B. (2019): New approach for mapping and physiological test of silica nanoparticles accumulated in sweet basil (*Ocimum basilicum*) by LA-ICP-MS. *Analytica chimica acta* **1069**, 28-35.

- Koelmel J., Leland T., Wang H., Amarasiriwardena D., Xing B. (2013): Investigation of gold nanoparticles uptake and their tissue level distribution in rice plants by laser ablation-inductively coupled-mass spectrometry. *Environmental pollution* **174**, 222-228.
- Kole C., Kole P., Randunu K.M., Choudhary P., Podila R., Ke P.C., Rao A.M., Marcus R.K. (2013): Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytomedicine content in bitter melon (*Momordica charantia*). *Bmc Biotechnology* **13**, 37.
- Kostka-Rick R. a Manning W.J. (1993): Radish (*Raphanus sativus* L.): a model for studying plant responses to air pollutants and other environmental stresses. *Environmental pollution* **82**, 107-138.
- Kötschau A., Büchel G., Einax J.W., Fischer C., Von Tümping W., Merten D. (2013): Mapping of macro and micro elements in the leaves of sunflower (*Helianthus annuus*) by Laser Ablation–ICP–MS. *Microchemical Journal* **110**, 783-789.
- Kramer U. a Clemens S. (2005): Function and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. *Topics in Current Genetics* **14**, 215-271.
- Krishnaraj C., Jagan E.G., Ramachandran R., Abirami S.M., Mohan N., Kalaichelvan P.T. (2012): Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochemistry* **47**, 651-658.
- Kuper J., Llamas A., Hecht H.J., Mendel R.R., Schwarz G. (2004): Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* **430**, 803-806.
- Kurepa J., Paunesku T., Vogt S., Arora H., Rabatic B.M., Lu J. (2010): Uptake and distribution of ultrasmall anatase TiO₂ Alizarin red S nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. *Nano Letters* **10**, 2296–2302.
- Lalau C.M., De Almeida Mohedano R., Schmidt E.C. (2015): Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content, and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. *Protoplasma* **252**, 221-229.
- Landa P., Cyrusova T., Jerabkova J., Drabek O., Vanek T., Podlipna R. (2016): Effect of metal oxides on plant germination: phytotoxicity of nanoparticles, bulk materials, and metal ions. *Water Air Soil* **227**, 448.
- Larue C., Castillo-Michel H., Sobanska S., Trcera N., Sorieul S., Cécillon L., Ouerdane L., Legros S., Sarret G. (2014): Fate of pristine TiO₂ nanoparticles and aged paint-containing TiO₂ nanoparticles in lettuce crop after foliar exposure. *Journal of hazardous materials* **273**, 17-26.
- Larue C., Khodja H., Herlin-Boime N., Brisset F., Flank A.M., Fayard B., Chaillou S., Carrière M. (2011): Investigation of titanium dioxide nanoparticles toxicity and uptake by plants. *Journal of Physics: Conference Series* **304**, 1-8.
- Larue C., Laurette J., Herlin-Boime N., Khodja H., Fayard B., Flank A.M., Brisset F., Carriere M. (2012a): Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): influence of diameter and crystal phase. *Science of the total environment* **431**, 197-208.
- Larue C., Veronesi G., Flank A.M., Surble S., Herlin-Boime N., Carrière M. (2012b): Comparative uptake and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat and rapeseed. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **75**, 722-734.
- Lee S., Kim S., Kim S., Lee I. (2013): Assessment of phytotoxicity of ZnO NPs on a medicinal plant, *Fagopyrum esculentum*. *Environmental Science and Pollution Research* **20**, 848-854.
- Lei Z., Mingyu S., Xiao W., Chao L., Chunxiang Q., Liang C., Hao H., Xiaoqing L., Fashui H. (2008): Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. *Biological Trace Element Research* **121**, 69-79.
- Létondor C., Pascal-Lorber S., Laurent F. (2015): Uptake and distribution of chlordecone in radish: different contamination routes in edible roots. *Chemosphere* **118**, 20-28.
- Li Y., Zhang W., Niu J.F., Chen Y.S. (2013): Surface-coating-dependent dissolution, aggregation, and reactive oxygen species (ROS) generation of silver nanoparticles under different irradiation conditions. *Environmental Science & Technology* **47**, 10293–10301.
- Liao Y.L., Que W.X., Jia Q.Y., He Y.C., Zhang J., Zhong P. (2012): Controllable synthesis of brookite/anatase/rutile TiO₂ nano-composites and single-crystalline rutile nanorods array. *Journal of Materials Chemistry* **22**, 7937–7944.

- Longerich H.P., Günther D., Jackson S.E. (1996): Elemental fractionation in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius' journal of analytical chemistry* **355**, 538-542.
- Lopez Ribera I. a Puigdomenech P. (1999): Structure, organization and expression of the eukaryotic translation initiation factor 5, eIF-5, gene in *Zea mays*. *Gene* **240**, 355-359.
- Lopez-Moreno J.L., Giménez J.L., Moreno A., Fuentes J.L., Alcaraz C.F. (1995): Plant biomass and fruit yield induction by Ti (IV) in P-stressed pepper crops. *Fertilizer Research* **43**, 131-136.
- Ma C., White J.C., Dhankher O.P., Xing B. (2015): Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants. *Environmental Science & Technology* **49**, 7109-7122.
- Ma H., Brennan, A., Diamond S.A. (2012): Phototoxicity of TiO₂ nanoparticles under solar radiation to two aquatic species: *Daphnia magna* and Japanese medaka. *Environmental toxicology and chemistry* **31**, 1621-1629.
- Ma X., Geiser-Lee J., Deng Y., Kolmakov A. (2010a): Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the total environment* **408**, 3053-3061.
- Ma Y., Kuang L., He X., Bai W., Ding Y., Zhang Z., Zhao Y., Chai Z. (2010b): Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. *Chemosphere* **78**, 273-279.
- Maathuis F.J. (2009): Physiological functions of mineral macronutrients. *Current opinion in plant biology* **12**, 250-258.
- Maathuis F.J.M. a Sanders D. (1993): Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **191**, 302-307.
- Maathuis F.J.M. a Sanders D. (1994): Mechanism of high affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 9272-9276.
- Maathuis F.J.M. a Sanders D. (1995): Contrasting roles in ion transport of two K⁺Schannel types in root cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **197**, 456-464.
- Mahdi K.N.M., Petersc R.J.B., Klumpp E., Bohme S., Ploeg M.V.D., Ritsema C. (2017): Silver nanoparticles in soil: aqueous extraction combined with single-particle ICP-MS for detection and characterization. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management* **7**, 24-33.
- Mahmoodzadeh H., Aghili R., Nabavi M. (2013): Physiological effects of TiO₂ nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Engineering Science and Technology* **3**, 1365-1370.
- Mahouachi J., Socorro A.R., Talon M. (2006): Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant Soil* **281**, 137-146.
- Maidment J.M., Moore D., Murphy G.P., Murphy G., Clark I.M. (1999): Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and activity. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 34706-34710.
- Majumdar S., Peralta-Videa J.R., Bandyopadhyay S., Castillo-Michel H., Hernandez-Viezcás J.A., Sahi S., Gardea-Torresdey J.L. (2014): Exposure of cerium oxide nanoparticles to kidney bean shows disturbance in the plant defense mechanisms. *Journal of hazardous materials* **278**, 279-287.
- Mank A.J. a Mason P.R. (1999): A critical assessment of laser ablation ICP-MS as an analytical tool for depth analysis in silica-based glass samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **14**, 1143-1153.
- Mao S.S., Mao X., Greif R., Russo R.E. (2000): Simulation of a picosecond laser ablation plasma. *Applied Physics Letters* **76**, 3370-3372.
- Marschner H. (1995): *Mineral Nutrition in Higher Plants*. 2nd ed., Academic Press, London, England, 889 stran.
- Martens D.C. a Westermann D.T. (1991): Fertilizer applications for correcting micronutrient deficiencies. In: *Micronutrients in Agriculture* vol. 4, 2nd ed., (Mortvedt J.J., Cox F.R., Schuman L.M., et al., eds.), Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, U.S.A., 549-592.
- Maurer-Jones M.A., Gunsolus I.L., Murphy C.J., Haynes C.L. (2013): Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Analytical Chemistry* **85**, 3036-3049.
- McAinsh M.R. a Pittman J.K. (2009): Shaping the calcium signature. *New Phytologist* **181**, 275-294.
- McKee M.S. a Filser J. (2016): Impacts of metal-based engineered nanomaterials on soil communities. *Environmental Science: Nano* **3**, 506-533.

- Meacock G., Taylor K.A., Knowles M.J., Himonides A. (1997): The improved whitening of minced cod flesh using dispersed titanium dioxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **73**, 221-225.
- Meng H., Chen Z., Xing G., Yuan H., Chen C., Zhao F., Zhang C., Zhao Y. (2007): Ultrahigh Reactivity Provokes Nanotoxicity: Explanation of Oral Toxicity of Nano-Copper Particles. *Toxicology Letters* **175**, 102.
- Merchant S.S., Allen M.D., Kropat J., Moseley J.L., Long J.C., Tottey S., Terauchi A.M. (2006): Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**, 578-594.
- Mihaljevič M., Strnad L., Šebek O. (2004): Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. *Chemické listy* **98**, 123-130.
- Miralles P., Church T.L., Harris A.T. (2012): Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanoparticles in vascular plants. *Environmental science & technology* **46**, 9224-9239.
- Misra V.K. a Draper D.E. (2000): Mg²⁺ binding to tRNA revisited: the nonlinear Poisson-Boltzmann model. *Journal of Molecular Biology* **299**, 813-825.
- Mody V.V., Siwale R., Singh A., Mody H.R. (2010): Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* **2**, 282-289.
- Mohammadi R., Maali-Amiri R., Mantri N.L. (2014): Effect of TiO₂ nanoparticles on oxidative damage and antioxidant defense systems in chickpea seedlings during cold stress. *Russian journal of plant physiology* **61**, 768-775.
- Monica R.C. a Cremonini R. (2009): Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* **62**, 161-165.
- Moore M.N. (2006): Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International* **32**, 967-976.
- Moraghan J.T. (1979): Manganese toxicity in flax growing on certain calcareous soils low in available iron. *Soil Science Society of America Journal* **43**, 1177-1180.
- Morales M.I., Rico C.M., Hernandez-Viezcas J.A., Nunez J.E., Barrios A.C., Tafuya A., Flores-Marges J.P., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2013): Toxicity assessment of cerium oxide nanoparticles in cilantro (*Coriandrum sativum* L.) plants grown in organic soil. *Journal of agricultural and food chemistry* **61**, 6224-6230.
- Morita H., Kita T., Umeno M., Morita M., Yoshinaga J., Okamoto K. (1994): Analysis of serum elements and the contaminations from devices used for serum preparation by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Science of the total environment* **151**, 9-17.
- Muller E.B., Lin S.J., Nisbet R.M. (2015): Quantitative adverse outcome pathway analysis of hatching in zebrafish with CuO nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **49**, 11817-11824.
- Murphy A.S., Bandyopadhyay A., Holstein S.E., Peer W.A. (2005): Endocytotic cycling of PM proteins. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 221-251.
- Mwaanga P., Carraway E.R., van den Hurk P. (2014): The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. *Aquatic Toxicology* **150**, 201-209.
- Nair P.M.G. a Chung I.M. (2014): A mechanistic study on the toxic effect of copper oxide nanoparticles in soybean (*Glycine max* L.) root development and lignification of root cells. *Biological trace element research* **162**, 342-352.
- Nakano Y. a Asada K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology* **22**, 867-880.
- Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.B., Filser J., Miao A.J., Quigg A., Santschi P.H., Sigg L. (2008): Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* **17**, 372-386.
- Navratilova J., Praetorius A., Gondikas A., Fabienke W., von-der Kammer F., Hofmann T. (2015): Detection of engineered copper nanoparticles in soil using single particle ICP-MS. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**, 15756-15768.
- Nhan L.V., Ma C., Rui Y., Liu S., Li X., Xing B. (2015): Phytotoxic mechanism of nanoparticles: destruction of chloroplasts and vascular bundles and alteration of nutrient absorption. *Scientific reports* **5**, 11618.

- Nishijima H., Kamo S., Akita S., Nakayama Y., Hohmura K.I., Yoshimura S.H., Takeyasu K. (1999): Carbon-nanotube tips for scanning probe microscopy: Preparation by a controlled process and observation of deoxyribonucleic acid. *Applied Physics Letters* **74**, 4061-4063.
- Onelli E., Prescianotto-Baschong C., Caccianiga M., Moscatelli A., (2008): Clathrin-dependent and independent endocytic pathways in tobacco protoplasts revealed by labelling with charged nanogold. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3051-3068.
- Pachapur V.L., Larios A.D., Cledon M., Brar S.K., Verma M., Surampalli R.Y. (2016): Behavior and characterization of titanium dioxide and silver nanoparticles in soils. *Science of the Total Environment* **563**, 933-943.
- Palmgren M. G., Clemens S., Williams L. E., Krämer U., Borg S., Schjørring J. K., Sanders D. (2008): Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends in plant science* **13**, 464-473.
- Pankhurst Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J. (2003): Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* **36**, 167-181.
- Pavlová L., (2006): *Fyziologie rostlin*. Praha, Karolinum, 254 stran.
- Peralta-Videa J.R., Zhao L., Lopez-Moreno M.L., de la Rosa G., Hong J., Gardea-Torresdey J.L. (2011): Nanoparticles and the environment: a review for the biennium 2008-2010. *Journal of Hazardous Material* **186**, 1-15.
- Peyrot C., Wilkinson K.J., Desrosiers M., Sauvé S. (2014): Effects of silver nanoparticles on soil enzyme activities with and without added organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry* **33**, 115–125.
- Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B. (2012): Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research* **14**, 1-11.
- Pidgeon N., Harthorn B.H., Bryant K., Rogers-Hayden T. (2009): Deliberating the risks of nanotechnologies for energy and health applications in the United States and United Kingdom. *Nature Nanotechnology* **4**, 95.
- Pilon M., Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M., Gogolin K.A., Ye H. (2006): Copper cofactor delivery in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 256-263.
- Popov A.P., Kirillin M.Y., Priezzhev A.V., Lademann J., Hast J., Myllyla R. (2005): Optical sensing of titanium dioxide nanoparticles within horny layer of human skin and their protecting effect against solar UV radiation. *Optical Diagnostics and Sensing V* **5702**, 113-122.
- Pozebon D., Scheffler G.L., Dressler V.L., Nunes M.A. (2014): Review of the applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) to the analysis of biological samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **29**, 2204-2228.
- Pradhan S., Patra P., Das S., Chandra S., Mitra S., Dey K.K., Akbar S., Palit P., Goswami A. (2013): Photochemical modulation of biosafe manganese nanoparticles on *Vigna radiata*: a detailed molecular, biochemical, and biophysical study. *Environmental science & technology* **47**, 13122-13131.
- Prasad R., Pandey R., Barman I. (2016): Engineering tailored nanoparticles with microbes: quo vadis? *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **8**, 316-330.
- Prasad T., Sudhakar P., Sreenivasulu Y., Latha P., Munaswamy V., Reddy K.R., Sreeprasad T., Sajanlal P., Pradeep T. (2012): Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition* **35**, 905-927.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998): *Fyziologie rostlin*. Praha, Academia, 484 stran.
- Puddu V., Choi H., Dionysiou D.D., Puma G.L. (2010): TiO₂ photocatalyst for indoor air remediation: influence of crystallinity, crystal phase, and UV radiation intensity on trichloroethylene degradation. *Applied Catalysis B: Environmental* **94**, 211-218.
- Puma G. L., Bono A., Krishnaiah D., Collin J.G. (2008): Preparation of titanium dioxide photocatalyst loaded onto activated carbon support using chemical vapor deposition: a review paper. *Journal of hazardous Materials* **157**, 209-219.
- Rafique R., Arshad M., Khokhar M.F., Qazi I.A., Hamza A., Virk N. (2015): Growth response of wheat to titania nanoparticles application. *NUST Journal of Engineering Sciences* **7**, 42-46.

- Raliya R., Nair R., Chavalmane S., Wang W.N., Biswas P. (2015): Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum L.*) plant. *Metallomics* **7**, 1584-1594.
- Rastogi A., Zivcak M., Sytar O., Kalaji H.M., He X., Mbarki S., Brestic M. (2017): Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: a critical review. *Frontiers in chemistry* **5**, 78.
- Ravet K., Touraine B., Boucherez J., Briat J.F., Gaymard F., Cellier F. (2009): Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **57**, 400-412.
- Ren G., Hu D., Cheng E.W., Vargas-Reus M.A., Reip P., Allaker R.P. (2009): Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* **33**, 587-590.
- Rico C.M., Barrios A.C., Tan W., Rubenecia R., Lee S.C., Varela-Ramirez A., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2015b): Physiological and biochemical response of soil-grown barley (*Hordeum vulgare L.*) to cerium oxide nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 10551-10558.
- Rico C.M., Majumdar S., Duarte-Gardea M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2011): Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of agricultural and food chemistry* **59**, 3485-3498.
- Rico C.M., Morales M.I., Barrios A.C., McCreary R., Hong J., Lee W.Y., Nunez J., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2013a): Effect of cerium oxide nanoparticles on the quality of rice (*Oryza sativa L.*) grains. *Journal of agricultural and food chemistry* **61**, 11278-11285.
- Rico C.M., Morales M.I., McCreary R., Castillo-Michel H., Barrios A.C., Hong J., Tafoya A., Lee W.Y., Varela-Ramirez A., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2013b): Cerium oxide nanoparticles modify the antioxidative stress enzyme activities and macromolecule composition in rice seedlings. *Environmental science & technology* **47**, 14110-14118.
- Rico C.M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2015a): Chemistry, biochemistry of nanoparticles, and their role in antioxidant defense system in plants. In: *Nanotechnology and Plant Sciences*. (Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Firoz M., eds.), Springer International Publishing, New York, U.S.A., 1-17.
- Rizwan M., Ali S., Qayyum M.F., Ok Y.S., Adrees M., Ibrahim M., Zia-ur-Rehman M., Farid M., Abbas F. (2017): Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: a critical review. *Journal of hazardous materials* **322**, 2-16.
- Robichaud C.O., Uyar A.E., Darby M.R., Zucker L.G., Wiesner M.R. (2009): Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment. *Environmental Science & Technology* **43**, 4227-4233.
- Robinson H., Gao Y.G., Sanishvili R., Joachimiak A., Wang A.H.J. (2000): Hexahydrated magnesium ions bind in the deep major groove and at the outer mouth of A-form nucleic acid duplexes. *Nucleic Acids Research* **28**, 1760-1766.
- Rodriguez F.I., Esch J.J., Hall A.E., Binder B.M., Schaller G.E., Bleeker A.B. (1999): A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* **283**, 996-998.
- Roghayyeh S.M.S., Mehdi T.S., Rauf S.S. (2010): Effects of nano-iron oxide particles on agronomic traits of soybean. *Notulae Scientia Biologicae* **2**, 112-113.
- Rui M., Ma C., Hao Y., Guo J., Rui Y., Tang X., Zhao Q., Fan X., Zhang Z., Hou T. (2016): Iron Oxide Nanoparticles as a Potential Iron Fertilizer for Peanut (*Arachis hypogaea*). *Frontiers in Plant Science* **7**, 1-10.
- Russo R.E., Mao X., Liu H.C., Gonzalez J., Mao S.S. (2002): Laser ablation in analytical chemistry – a review, *Talanta* **57**, 425-451.
- Ryu W.H., Park C.J., Kwon H.S. (2008): Synthesis of highly ordered TiO₂ nanotube in malonic acid solution by anodization. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **8**, 5467-5470.
- Sabir S., Arshad M., Chaudhari S.K. (2014): Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: synthesis and applications. *The Scientific World Journal* **155**, 1-8.
- Sahandi S.M., Sorooshzadeh A., Rezazadeh H.S., Naghdibadi H.A. (2011): Effect of nanosilver and silver nitrate on seed yield of borage. *Journal of Medicinal Plants Research* **5**, 706-710.

- Sathiyavani E., Prabakaran N.K., Surendar K.K. (2017): Role of mineral nutrition on root growth of crop plants-A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6**, 2810-2837.
- Seeger E.M., Baun A., Kästner M., Trapp S. (2009): Insignificant acute toxicity of TiO₂ nanoparticles to willow trees. *Journal of Soils and Sediments* **9**, 46-53.
- Serero A., Giglione C., Meinnel T. (2001): Distinctive features of the two classes of eukaryotic peptide deformylases. *Journal of Molecular Biology* **314**, 695-708.
- Servin A., Elmer W., Mukherjee A., De la Torre-Roche R., Hamdi H., White J.C., Bindraban P., Dimkpa, C. (2015): A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *Journal of Nanoparticle Research* **17**, 92.
- Servin A.D., Castillo-Michel H., Hernandez-Viezcas J.A., Diaz B.C., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2012): Synchrotron micro-XRF and micro-XANES confirmation of the uptake and translocation of TiO₂ nanoparticles in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Environmental science & technology* **46**, 7637-7643.
- Servin A.D., Morales M.I., Castillo-Michel H., Hernandez-Viezcas J.A., Munoz B., Zhao L., Nunez J.E., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2013): Synchrotron verification of TiO₂ accumulation in cucumber fruit: a possible pathway of TiO₂ nanoparticle transfer from soil into the food chain. *Environmental Science & Technology* **47**, 11592-11598.
- Shaw A.K., Ghosh S., Kalaji H.M., Bosa K., Brestic M., Zivcak M., Hossain Z. (2014): Nano-CuO stress induced modulation of antioxidative defense and photosynthetic performance of Syrian barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental and Experimental Botany* **102**, 37-47.
- Shi J., Peng C., Yang Y., Yang J., Zhang H., Yuan X., Chen Y., Hu T. (2014): Phytotoxicity and accumulation of copper oxide nanoparticles to the Cu-tolerant plant *Elsholtzia splendens*. *Nanotoxicology* **8**, 179-188.
- Shinde P.S. a Bhosale C.H. (2008): Properties of chemical vapour deposited nanocrystalline TiO₂ thin films and their use in dye-sensitized solar cells. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **82**, 83-88.
- Simon D.F., Domingos R.F., Hauser C., Hutchins C.M., Zerges W., Wilkinson K.J. (2013): Transcriptome sequencing (RNA-seq) analysis of the effects of metal nanoparticle exposure on the transcriptome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 4774-4785.
- Slomberg D.L. a Schoenfisch M.H. (2012): Silica nanoparticle phytotoxicity to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental science & technology* **46**, 10247-10254.
- Snaith S.M., Levvy G.A. (1968): Alpha-mannosidase as a zinc-dependent enzyme. *Nature* **218**, 91-92.
- Sondi I. a Salopek-Sondi B. (2004): Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* **275**, 177-182.
- Song U., Jun H., Waldman B., Roh J., Kim Y., Yi J., Lee E.J. (2013a): Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology and environmental safety* **93**, 60-67.
- Song U., Shin M., Lee G., Roh J., Kim Y., Lee E.J. (2013b): Functional analysis of TiO₂ nanoparticle toxicity in three plant species. *Biological trace element research* **155**, 93-103.
- Sullivan J.A., Shirasu K., Deng X.W. (2003): The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nature Reviews Genetics* **4**, 948-958.
- Sun T.Y., Gottschalk F., Hungerbühler K., Nowack B. (2014): Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental pollution* **185**, 69-76.
- Suriyaprabha R., Karunakaran G., Yuvakkumar R., Prabu P., Rajendran V., Kannan N. (2012b): Growth and physiological responses of maize (*Zea mays* L.) to porous silica nanoparticles in soil. *Journal of Nanoparticle Research*, **14**, 1-14.
- Suriyaprabha R., Karunakaran G., Yuvakkumar R., Rajendran V., Kannan N. (2012a): Silica nanoparticles for increased silica availability in maize (*Zea mays*. L) seeds under hydroponic conditions. *Current Nanoscience* **8**, 902-908.

- Sylvester P.J. a Jackson S.E. (2016): A brief history of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA–ICP–MS). *Elements* **12**, 307-310.
- Taiz L. a Zeiger E. (2002): *Plant physiology*. 3rd ed., England, Sinauer Associates, 690 stran.
- Taji A. M., Dodd W. A., Williams R. R. (1993): *Plant tissue culture practice*. Armidale, University of New England, 258 stran.
- Tan W., Chen J., Zhou X., Zhang J., Lin Y., Li X., Xiao X. (2009): Preparation of nanocrystalline TiO₂ thin film at low temperature and its application in dye-sensitized solar cell. *Journal of Solid State Electrochemistry* **13**, 651-656.
- Tang Y., Li S., Qiao J., Wang H., Li L. (2013): Synergistic effects of nano-sized titanium dioxide and zinc on the photosynthetic capacity and survival of *Anabaena* sp. *International journal of molecular sciences* **14**, 14395-14407.
- Taniguchi N., Arakawa C., Kobayashi T. (1974): On the basic concept of nanotechnology. *Proceedings of the International Conference on Production Engineering*, **2**, 18-23.
- Tanner S.D., Baranov V.I., Bandura D.R. (2002): Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **57**, 1361-1452.
- Thiruvengadam M., Gurunathan S., Chung I.M. (2015): Physiological, metabolic, and transcriptional effects of biologically-synthesized silver nanoparticles in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa* L.). *Protoplasma* **252**, 1031-1046.
- Throbäck I.N., Johansson M., Rosenquist M., Pell M., Hansson M., Hallin S. (2007): Silver (Ag⁺) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. *FEMS Microbiology Letters* **270**, 189–194.
- Thuesombat P., Hannongbua S., Akasit S., Chadchawan S. (2014): Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **104**, 302-309.
- Tilney L.G., Cooke T.J., Connelly P.S., Tilney M.S. (1991): The structure of plasmodesmata as revealed by plasmolysis, detergent extraction, and protease digestion. *The Journal of cell biology* **112**, 739-747.
- Tiwari D.K., Dasgupta-Schubert N., Cendejas L.V., Villegas J., Montoya L.C., García S.B. (2014): Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. *Applied Nanoscience* **4**, 577-591.
- Tolaymat T., El Badawy A., Sequeira R., Genaidy A. (2015): A system-of-systems approach as a broad and integrated paradigm for sustainable engineered nanomaterials. *Science of the Total Environment* **511**, 595–607.
- Toužín J. (2001): *Stručný přehled chemie prvků*. 1st ed., Masarykova univerzita, Brno, Czech republic, 225 stran.
- Tripathi D.K., Shweta., Singh S., Pandey R., Singh V.P., Sharma N.C., Prasad S.M., Dubey N.K., Chauhan D.K. (2017): An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* **110**, 2–12.
- Tripathi D.K., Singh S., Singh V.P., Prasad S.M., Chauhan D.K., Dubey, N.K. (2016): Silicon nanoparticles more efficiently alleviate arsenate toxicity than silicon in maize cultivar and hybrid differing in arsenate tolerance. *Frontiers in Environmental Science* **4**, 46.
- Tripathi D.K., Singh V.P., Prasad S.M., Chauhan D.K., Dubey N.K. (2015): Silicon nanoparticles (SiNp) alleviate chromium (VI) phytotoxicity in *Pisum sativum* (L.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* **96**, 189–198.
- Unrine J.M., Shoultz-Wilson W.A., Zhurbich O., Bertsch P.M., Tsyusko O.V. (2012): Trophic transfer of Au nanoparticles from soil along a simulated terrestrial food chain. *Environmental Science & Technology* **46**, 9753–9760.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology* **13**, 57-149.
- Vannini C., Domingo G., Onelli E., De Mattia F., Bruni I., Marsoni M., Bracale M. (2014): Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. *Journal of plant physiology* **171**, 1142-1148.

- Varghese O.K., Gong D., Paulose M., Ong K.G., Dickey E.C., Grimes C.A. (2003): Extreme changes in the electrical resistance of titania nanotubes with hydrogen exposure. *Advanced Materials* **15**, 624-627.
- Wagner S., Gondikas A., Neubauer E., Hofmann T., von der Kammer F. (2014): Spot the difference: engineered and natural nanoparticles in the environment-release, behavior, and fate. *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 12398–12419.
- Wagner T., Fusswinkel T., Wälle M., Heinrich C.A. (2016): Microanalysis of fluid inclusions in crustal hydrothermal systems using laser ablation methods. *Elements* **12**, 323-328.
- Wahi R.K., Liu Y., Falkner J.C., Colvin V.L. (2006): Solvothermal synthesis and characterization of anatase TiO₂ nanocrystals with ultrahigh surface area. *Journal of colloid and interface science* **302**, 530-536.
- Walker D.J., Leigh R.A., Miller A.J. (1996): Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 10510-10514.
- Wang H., Kou X., Pei Z., Xiao J.Q., Shan X., Xing B. (2011): Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology* **5**, 30-42.
- Wang P., Lombi E., Zhao F. J., Kopittke P.M. (2016a): Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends in Plant Science* **21**, 699–712.
- Wang Q., Ma X., Zhang W., Pei H., Chen Y. (2012b): The impact of cerium oxide nanoparticles on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its implications for food safety. *Metallomics* **4**, 1105-1112.
- Wang S., Liu H., Zhang Y., Xin H. (2015a): The effect of CuO NPs on reactive oxygen species and cell cycle gene expression in roots of rice. *Environmental toxicology and chemistry* **34**, 554-561.
- Wang T., Jiang H., Wan L., Zhao Q., Jiang T., Wang B., Wang S. (2015b): Potential application of functional porous TiO₂ nanoparticles in light-controlled drug release and targeted drug delivery. *Acta biomaterialia* **13**, 354-363.
- Wang Y., He Y., Lai Q., Fan M. (2014): Review of the progress in preparing nano TiO₂: An important environmental engineering material. *Journal of environmental sciences* **26**, 2139-2177.
- Wang Z., Xie X., Zhao J., Liu X., Feng W., White J.C., Xing B. (2012a): Xylem-and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environmental science & technology* **46**, 4434-4441.
- Ward N.I. (1990): Multielement contamination of British motorway environments. *Science of the Total Environment* **93**, 393-401.
- Wei H. a Wang E. (2013): Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chemical Society Reviews* **42**, 6060-6093.
- Weir A., Westerhoff P., Fabricius L., Hristovski K., Von Goetz N. (2012): Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental Science & Technology* **46**, 2242-2250.
- Welch R.M. a Shuman L. (1995): Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in plant sciences* **14**, 49-82.
- Wen B., Liu C., Liu Y. (2005): Depositional characteristics of metal coating on single-crystal TiO₂ nanowires. *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 12372-12375.
- Wintz H. a Vulpe C. (2002): Plant copper chaperones. *Biochemical Society Transactions* **30**, 732-735.
- Wojcieszek J., Jiménez-Lamana J., Bierła K., Ruzik L., Asztemborska M., Jarosz M., Szpunar J. (2019): Uptake, translocation, size characterization and localization of cerium oxide nanoparticles in radish (*Raphanus sativus* L.). *Science of The Total Environment* **683**, 284-292.
- Wu J. C., Qiu H. M., Yang G. Q., Dong B., Gu H. (2003): Nutrient uptake of rice roots in response to infestation of *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Journal of economic entomology* **96**, 1798-1804.
- Wu J.M. a Qi B. (2007): Low-temperature growth of a nitrogen-doped titania nanoflower film and its ability to assist photodegradation of rhodamine B in water. *The Journal of Physical Chemistry C* **111**, 666-673.
- Xiang L., Zhao H.M., Li Y.W., Huang X.P., Wu X.L., Zhai T., Yuan Y., Cai Q.Y., Mo C.H. (2015): Effects of the size and morphology of zinc oxide nanoparticles on the germination of Chinese cabbage seeds. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 10452-10462.

- Xu X.M. a Moller S.G. (2008): Iron–sulfur cluster biogenesis systems and their crosstalk. *ChemBioChem* **9**, 2355-2362.
- Yang L. a Watts D.J. (2005): Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology letters* **158**, 122-132.
- Yang Y., Doudrick K., Bi X., Hristovski K., Herckes P., Westerhoff P., Kaegi R. (2014): Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles. *Environmental science & technology* **48**, 6391-6400.
- Yasur J. a Rani P.U. (2013): Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environmental Science and Pollution Research* **20**, 8636-8648.
- Yazaki Y., Asukagaw N., Ishika Y., Ohta E., Sakata M. (1988): Estimation of cytoplasmic free Mg²⁺ levels and phosphorylation potentials in mung bean root-tips by in vivo P-31 NMR-spectroscopy. *Plant and Cell Physiology* **29**, 919-924.
- Yi G.R., Moon J.H., Yang S.M. (2001): Ordered macroporous particles by colloidal templating. *Chemistry of materials* **13**, 2613-2618.
- Yokel R.A. a MacPhail R.C. (2011): Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* **6**, 6673-6676.
- You D.G., Deepagan V.G., Um W., Jeon S., Son S., Chang H., Yoon H.I., Cho Y.W., Swierczewska M., Lee S., Pomper M.G. (2016): ROS-generating TiO₂ nanoparticles for non-invasive sonodynamic therapy of cancer. *Scientific reports* **6**, 23200.
- Zahra Z., Arshad M., Rafique R., Mahmood A., Habib A., Qazi I.A., Khan S.A. (2015): Metallic nanoparticle (TiO₂ and Fe₃O₄) application modifies rhizosphere phosphorus availability and uptake by *Lactuca sativa*. *Journal of agricultural and food chemistry* **63**, 6876-6882.
- Zanello L.P., Zhao B., Hu H., Haddon R.C. (2006): Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Letters* **6**, 562-567.
- Zeng S., Yong K.T., Roy I., Dinh X.Q., Yu X., Luan F. (2011): A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications. *Plasmonics* **6**, 491-506.
- Zhang P., Ma Y., Zhang Z. (2015a): Interactions between engineered nanomaterials and plants: phytotoxicity, uptake, translocation, and biotransformation. In: *Nanotechnology and Plant Sciences*. (Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Firoz M., eds.), Springer International Publishing, New York, U.S.A., 77-99.
- Zhang W., Dan Y., Shi H., Ma X. (2016): Effects of aging on the fate and bioavailability of cerium oxide nanoparticles to radish (*Raphanus sativus* L.) in soil. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **4**, 5424-5431.
- Zhang W., Ebbs S.D., Musante C., White J.C., Gao C., Ma X. (2015b): Uptake and accumulation of bulk and nanosized cerium oxide particles and ionic cerium by radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* **63**, 382-390.
- Zhang Z., He X., Zhang H., Ma Y., Zhang P., Ding Y., Zhao Y. (2011): Uptake and distribution of ceria nanoparticles in cucumber plants. *Metallomics* **3**, 816-822.
- Zhao L., Hernandez-Viezcas J.A., Peralta-Videa J.R., Bandyopadhyay S., Peng B., Munoz B., Keller A.A., Gardea-Torresdey J.L. (2012a): ZnO nanoparticle fate in soil and zinc bioaccumulation in corn plants (*Zea mays*) influenced by alginate. *Environmental Science: Processes & Impacts* **15**, 260-266.
- Zhao L., Peralta-Videa J. R., Rico C. M., Hernandez-Viezcas J. A., Sun Y., Niu G., Gardea-Torresdey J. L. (2014): CeO₂ and ZnO nanoparticles change the nutritional qualities of cucumber (*Cucumis sativus*). *Journal of agricultural and food chemistry* **62**, 2752-2759.
- Zhao L., Peralta-Videa J.R., Ren M., Varela-Ramirez A., Li C., Hernandez-Viezcas J.A., Aguilera R.J., Gardea-Torresdey J.L. (2012b): Transport of Zn in a sandy loam soil treated with ZnO NPs and uptake by corn plants: Electron microprobe and confocal microscopy studies. *Chemical Engineering Journal* **184**, 1-8.
- Zheng X., Chen Y., Wu R. (2011): Long-term effects of titanium dioxide nanoparticles on nitrogen and phosphorus removal from wastewater and bacterial community shift in activated sludge. *Environmental Science & Technology* **45**, 7284-7290.
- Zhu H., Han J., Xiao J.Q., Jin Y. (2008): Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental monitoring* **10**, 713-717.

- Zhu X., Chang Y., Chen Y. (2010): Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere* **78**, 209-215.
- Zou X.Y., Li P.H., Huang Q., Zhang H.W. (2016): The different response mechanisms of *Wolffia globosa*: light-induced silver nanoparticle toxicity. *Aquatic Toxicology* **176**, 97–105.
- Zuverza-Mena N., Armendariz R., Peralta-Videa J. R., Gardea-Torresdey J. L. (2016): Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: root growth reduction and modifications in the nutritional value. *Frontiers in plant science* **7**, 90.
- Zuverza-Mena N., Martínez-Fernández D., Du W., Hernandez-Viezcas J.A., Bonilla-Bird N., López-Moreno M.L. (2017): Exposure of engineered nanomaterials to plants: insights into the physiological and biochemical responses-a review. *Plant Physiology and Biochemistry* **110**, 236–264.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AgNP – nanočástice stříbra
- AlO_xNP – nanočástice oxidu hliníku
- APX - askorbátperoxidasa
- AsA-GSH – glutathion-askorbátový cyklus
- AuNP – nanočástice zlata
- CAT - katalasa
- CCD kamera – „charge-coupled device“ kamera
- CeO₂NP – nanočástice oxidu ceričitého
- CNT – uhlíkové nanotrubičky
- Co₃O₄NP - nanočástice oxidu kobaltnato-kobalititého
- CRM – certifikovaný referenční materiál
- DHAR - dehydroaskorbátreduktasa
- EC – numerické klasifikační schéma pro enzymy
- EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
- ENM – uměle vyrobené nanomateriály
- ENP – uměle vyrobené nanočástice
- Fe₃O₄NP – nanočástice oxidu železnato-železitého
- FeO_xNP – nanočástice oxidu železa
- FTIR - infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
- GPX - gaujakolperoxidasa
- GSH - glutathion
- GSSG – glutathion disulfid
- HG-ICP-MS - generování těžkých hydridů ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem
- ICP - indukčně vázané plazma
- ICP-MS - hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
- ICP-OES - optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
- IR – infračervené záření
- LA – laserová ablace
- LA-ICP-MS – laserová ablace ve spojení hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem

- MDA - malondialdehyd
- MES - 2-(N-morfolin) ethansulfonová kyselina
- MnNP – nanočástice manganu
- MnO₂NP – nanočástice oxidu manganického
- MNP – vyrobené nanočástice
- MWCNT - vícečetné uhlíkové nanotrubky
- NM – nanomateriály
- NOM – organická hmota
- NP – nanočástice
- ROS – reaktivní formy kyslíku
- SD – směrodatná odchylka
- SiO₂NP – nanočástice oxidu křemičitého
- SOD - superoxiddismutasa
- TiO₂NP – nanočástice oxidu titaničitého
- TOF – analyzátor doby letu
- USD – americký dolar
- UV – ultrafialové záření