

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biologie**

Optimalizace složení agarového kultivačního média  
pro testy ekotoxicity nanočástic na kroužkovci

*Enchytraeus crypticus*

Diplomová práce

Autor:	Bc. Dominika Nováková
Studijní program:	N1501 - Biologie
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce:	doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.
Odborný konzultant:	Ing. Kateřina Hrdá

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

## Zadání diplomové práce

- Autor: **Bc. Dominika Nováková**
- Studijní program: B1501 Biologie
- Studijní obor: Systematická biologie a ekologie
- Název práce: **Optimalizace složení agarového kultivačního média pro testy ekotoxicity nanočástic na kroužkovci *Enchytraeus crypticus***
- Název práce v AJ: Optimization of the agarose cultivation media composition for the ecotoxicity tests of nanoparticles in *Enchytraeus crypticus*
- Zásady pro vypracování:
1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na možnosti využití umělých kultivačních médií pro testy ekotoxicity nanočástic na půdních organismech. Zhodnoťte výhody a problémy spojené s využitím těchto médií. Zaměřte se zejména na problematiku vnášení nanočástic do médií a na možnosti jejich následné fyzikálně-chemické charakterizace. Diskutujte metrologické charakteristiky takto prováděných testů (citlivost, reprodukovatelnost) a dále otázky environmentální relevance daných testů.
  2. Navrhněte postup úpravy agarového kultivačního média pro test ekotoxicity nanočástic na půdním kroužkovci *Enchytraeus crypticus* tak, aby se co nejvíce zvýšila environmentální relevance prováděných testů při zachování jejich metrologických charakteristik. Zaměřte se zejména na možnosti přidavku modelových organických a anorganických plniv.
  3. Navržený postup úpravy kultivačního média prakticky vyzkoušejte při testu akutní a případně i chronické toxicity vybraných typů nanočástic na kroužkovci *Enchytraeus crypticus*. Zhodnoťte, zda je třeba úpravu média provádět i s ohledem na typ testované nanočástice či na mechanismus jejího ekotoxického účinku.

Garantující pracoviště: Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: **doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.**  
Ústav environmentálního a chemického inženýrství,  
Univerzita Pardubice

Odborný konzultant: Ing. Kateřina Hrdá

Oponent: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.

Datum zadání práce: 14. 10. 2016

Datum odevzdání práce: 20. 7. 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Miloslava Pouzara, Ph.D. a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne 20. 7. 2017

Dominika Nováková

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce doc. Ing. Miloslavu Pouzarovi, Ph.D. za projevenou pomoc, metodické vedení a cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Kateřině Hrdé za odborné konzultace a všem, kteří se mnou v průběhu tvorby mé diplomové práce spolupracovali a vycházeli mi vstříc. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

## **Anotace**

NOVÁKOVÁ, D. *Optimalizace složení agarového kultivačního média pro testy ekotoxicity nanočástic na kroužkovci *Enchytraeus crypticus**. Hradec Králové, 2017. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.

Práce je zaměřena na možnosti využití umělých kultivačních médií pro testy ekotoxicity nanočástic na půdních organismech. V teoretické části je pozornost věnována testům ekotoxicity nanočástic na půdních organismech v různých kultivačních médiích. Dále je zde navrhnout postup úpravy agarového kultivačního média pro test ekotoxicity nanočástic na půdním kroužkovci *Enchytraeus crypticus*. V experimentální části práce je tento navržený postup úpravy prakticky vyzkoušen při testu akutní případně i chronické toxicity vybraných typů nanočástic.

### **Klíčová slova**

půdní testy ekotoxicity, nanočástice, roupice (*Enchytraeus crypticus*), agar

## **Annotation**

NOVÁKOVÁ, D. *Optimization of the agarose cultivation media composition for the ecotoxicity tests of nanoparticles in Enchytraeus crypticus*. Hradec Králové, 2017. Diploma thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.

Diploma thesis is focused on the possibilities of artificial cultivation media for ecotoxicity tests of nanoparticles on soil organisms. In the theoretical section attention is devoted to nanoparticle ecotoxicity tests on soil organisms in different culture media. Furthermore there is a suggested procedure for editing agarose cultivation media for ecotoxicity test of nanoparticles on soil annelids *Enchytraeus crypticus*. In the experimental section is the proposed modification practically tested during the acute or even chronic toxicity of selected types of nanoparticles.

## **Keywords**

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

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	12
<b>2. Teoretická část</b> .....	13
2.1 Parametry ovlivňující osud nanočástic v půdách.....	13
2.1.1 Interakce s DOM.....	15
2.1.2 Rozpustnost a transformace.....	16
2.1.3 Agregace a aglomerace.....	17
2.1.4 Transport v půdě.....	17
2.1.5 Biodostupnost.....	18
2.1.6 Vliv podmínek testu.....	18
2.2 Testování ekotoxicity nanočástic v reálných půdách.....	19
2.3 Testování ekotoxicity nanočástic v umělých půdách.....	25
2.3.1 Nanočástice ve standardizovaných půdách.....	25
2.3.2 Nanočástice na agarovém kultivačním médiu.....	32
2.4 Testovací organismus.....	35
2.4.1 Obecná charakteristika roupic.....	35
2.4.2 Ekologie roupic.....	36
<b>3. Experimentální část</b> .....	39
3.1 ZnCl <sub>2</sub> a nanočástice oxidu zinečnatého.....	39
3.2 Chov testovacího organismu - roupice <i>Enchytraeus crypticus</i> .....	39
3.3 Ekotoxikologické testy.....	40
3.4 Testy toxicity Zn <sup>2+</sup> kationtů.....	41
3.5 Testy toxicity ZnO-NPs.....	42
3.5.1 Testy ZnO-NPs v upraveném agarovém médiu.....	42
3.5.2 Test toxicity supernatantu ZnO-NPs.....	44
<b>4. Výsledky a diskuze</b> .....	45
4.1 Testy toxicity Zn <sup>2+</sup> kationtů.....	45
4.2 Testy toxicity ZnO-NPs v čistém agaru.....	49
4.2.1 Charakterizace ZnO-NPs v čistém agaru.....	49
4.2.2 Toxicita ZnO-NPs v čistém agaru.....	51
4.3 Testy toxicity ZnO-NPs v agaru s přísávkem kaolinu.....	52
4.3.1 Charakterizace ZnO-NPs v agaru s přísávkem kaolinu.....	52
4.3.2 Toxicita ZnO-NPs v agaru s přísávkem kaolinu.....	54



4.4 Testy toxicity ZnO-NPs v agaru s přidavkem huminových kyselin .....	55
4.4.1 Charakterizace ZnO-NPs v agaru s přidavkem huminových kyselin .....	55
4.4.2 Toxicita ZnO-NPs v agaru s přidavkem huminových kyselin .....	57
4.5 Testy toxicity ZnO-NPs v agaru s přidavkem kaolinu a huminových kyselin .....	58
4.5.1 Charakterizace ZnO-NPs v agaru s přidavkem kaolinu a huminových kyselin	58
4.5.2 Toxicita ZnO-NPs v agaru s přidavkem kaolinu a huminových kyselin.....	60
4.6 Test toxicity supernatantu ZnO-NPs .....	61
4.7 Srovnání toxicity Zn <sup>2+</sup> a ZnO-NPs v jednotlivých typech agarových médií.....	62
<b>5. Závěr .....</b>	<b>66</b>
<b>6. Seznam použité literatury.....</b>	<b>67</b>

## Seznam zkratek

NPs	NanoParticles – Nanočástice
ENPs	Engineered Nanomaterials – Průmyslově vyráběné nanočástice
ČOV	Čistírna odpadních vod
DOM	Dissolved Organic Matter – Rozpuštěná organická hmota
SOM	Solid Organic Matter – Pevná organická hmota
IS	Ionic Strength – Iontová síla
SEM	Scanning Electron Microscopy – Skenovací/Rastrovací elektronová mikroskopie
EDS/EDX	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy – Energiově disperzní rentgenfluorescenční spektrometrie
FFFF	Focusing Field-Flow Fractionation – Fokusační frakcionace tokem v poli
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry - Hmotnostní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu
LC-MS/MS	Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry – Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
NOM	Natural Organic Matter – Přírodní organické látky
HS	Humic Substances – Huminové látky
HA	Humic Acids – Huminové kyseliny
FA	Fulvic Acids – Fulvinové kyseliny
TEM	Transmission Electron Microscopy – Transmisní elektronová mikroskopie
ASTM	American Society for Testing and Materials – Americká společnost pro testování a materiály
DLS	Dynamic Light Scattering – Dynamický rozptyl světla
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development – Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj
CAT	Catalase - Kataláza
GPx	Glutathione Peroxidase – Glutathion peroxidáza
GST	Glutathione S-transferase - Glutathion S-transferáza

GR	Glutathione Reductase - Glutathion reduktáza
TG	Total Glutathione - Celkový glutathion
MT	Metallothionein
LPO	Lipid Peroxidation – Peroxidace lipidů
CEC	Cation Exchange Capacity – Kationtová výměnná kapacita
DW	Deionized Water - Deionizovaná voda
RW	Reconstituted Water - Rekonstituovaná voda
SOD	Superoxide Dismutase - Superoxid dismutáza
POD	Peroxidase - Peroxidáza
MDA	Malondialdehyd
CEMNAT	Centrum materiálů a nanotechnologií Univerzity Pardubice
UEChI	Ústav environmentálního a chemického inženýrství Univerzity Pardubice
RECETOX	Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí na Masarykově univerzitě v Brně
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry - Optická emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu
LC <sub>50</sub>	Medium Lethal Concentration – Střední letální koncentrace – koncentrace dané látky, při které uhynie 50 % testovacích organismů

# 1. Úvod

Cílem mé práce bylo optimalizovat složení agarového kultivačního média pro testy ekotoxicity nanočástic na kroužkovci *Enchytraeus crypticus*. Agar, jakožto kultivační médium byl zvolen, z důvodu lepšího rozptýlení nanočástic a snížení jejich agregace. Půda představuje komplexní systém minerálů, vody, organického materiálu a žijících organismů. Všechny tyto půdní složky mohou interagovat s nanočásticemi a ovlivňovat tak jejich biologickou dostupnost. Jelikož je agar čisté kultivační médium a neobsahuje půdní složky, bylo navrženo přidání těchto komponent (kaolin, huminové kyseliny) do tohoto média z důvodu zjištění, jak tyto složky ovlivňují výslednou toxicitu nanočástic. Přidáním půdních komponent došlo také ke zvýšení environmentální relevance získaných výsledků.

V teoretické části se nejprve zaměřuji na parametry, které mohou ovlivnit osud nanočástic v půdách. Dále se zaměřuji na testování ekotoxicity nanočástic na půdních kroužkovcích v reálných půdách, umělých standardizovaných půdách a také v agarovém kultivačním médiu. Svou pozornost věnuji především fyzikálně-chemickým vlastnostem testovaných půd, typu použitých nanočástic a podmínkám jednotlivých experimentů a charakterizaci daných nanočástic v expozičním médiu. V neposlední řadě se věnuji testovacímu organismu *Enchytraeus crypticus* a jeho obecné charakteristice, ekologii a využití jako modelového organismu při ekotoxikologických testech.

V experimentální části jsou uvedeny výsledky jednotlivých ekotoxikologických testů. U nanočástic oxidů kovů může být toxický účinek způsoben uvolněnými ionty. Z toho důvodu byla nejdříve v agarovém médiu zjišťována toxicita zinečnatých kationtů. Pro posouzení vlivu půdních složek na toxicitu nanočástic pro *E. crypticus*, byly navrženy tři úpravy agarového kultivačního média. Tyto úpravy spočívaly v přidání kaolinu, huminových kyselin a kombinace obou komponent do agaru.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Parametry ovlivňující osud nanočástic v půdách

Půda je nedílnou součástí suchozemského ekosystému a má esenciální význam pro člověka i jiné organismy (Kobetičová 2012). Je charakterizována jako komplexní systém minerálů, organického materiálu, vody, plynů a žijících organismů (Cui et al. 2014). Půda představuje významný rezervoár průmyslově vyráběných nanočástic (ENPs) a dalších polutantů uvolňovaných do životního prostředí (Dinesh et al. 2012), které se v případě, že nejsou biologicky rozložitelné, mohou v přírodě vyskytovat prakticky neomezeně dlouhou dobu (Kobetičová 2012).

Nanomateriály jsou definovány jako přirozené, náhodné nebo vyráběné materiály obsahující částice, v nevázaném stavu nebo jako agregát či aglomerát, kde má  $\geq 50$  % částic jeden nebo více rozměrů v rozmezí 1 – 100 nm (Cornelis et al. 2014). V rámci této skupiny materiálů jsou nanočástice (NPs) definovány jako materiály mající všechny tři rozměry mezi 1 a 100 nm (Klaine et al. 2008).

Nanočástice můžeme dělit dle jejich původu na přírodní a antropogenní (Nowack et Bucheli 2007). Přírodní NPs existují v životním prostředí již od počátku historie Země a jejich zdroje jsou například ve vulkanickém prachu, většině přírodních vod, půdách a sedimentech (Handy et al. 2008). Antropogenní NPs mohou být děleny např. podle typu materiálu, z něhož jsou složeny. Velmi používané jsou částice na bázi uhlíku, jako jsou fullereny a uhlíkové nanotrubičky. Široké technologické uplatnění nacházejí také anorganické nanočástice na bázi oxidů kovů (oxid zinečnatý, oxid železitý, oxid titaničitý a oxid ceru atd.) a kovů (zlato, stříbro a železo) (Ju-Nam et Lead 2008).

S příchodem průmyslové revoluce a s tím souvisejícím objevem spalovacích motorů, elektráren a rozsáhlým spalováním fosilních paliv se množství nanočástic v životním prostředí významně zvýšilo. Tím se staly potenciálním rizikem pro životní prostředí. Nanočástice mohou být vyrobeny buď záměrně jako průmyslově vyrobené nanočástice (ENPs), nebo neúmyslně vyrobené, které zahrnují i přírodní zdroje. Zdroji antropogenně neúmyslně vyrobenými NPs jsou např. elektrárny, vozidla, spalování uhlí, smažení a svařování a zahrnují nanočástice jako např. saze, černý nebo elementární uhlík. ENPs používané v opalovacích krémech, detergentech, barvách, inkoustech do tiskáren nebo pneumatik se také mohou dostat do životního prostředí. Nejčastěji se tak děje prostřednictvím náhodného rozlití během jejich výroby a přepravy, opotřebení a konečné likvidace ENPs-obsahujících produktů. Ve vodních systémech NPs zahrnují nanoshluky sulfidu kovů vycházejících z hydrotermálních systémů. NPs z neúmyslných zdrojů jsou většinou polydisperzní/heterogenní, obsahující sulfid, síran, dusičnan,

amoniak, organický uhlík, elementární uhlík a stopové kovy a mají nepravidelné tvary (Navarro et al. 2008).

Produkce průmyslově vyráběných nanomateriálů (ENMs) se trvale zvyšuje díky novým, technologicky využitelným vlastnostem těchto materiálů. Díky zvýšení této produkce se očekává také zvýšení emisí ENMs do životního prostředí (Cornelis et al. 2014). Distribuce částic v jednotlivých složkách životního prostředí a jejich osud závisí na způsobu jejich výroby (přípravy), použití a na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech (Gottschalk et al. 2009). Například během průmyslové výroby a dopravy může dojít k náhodnému úniku (Navarro et al. 2008). Další možností je úmyslné zavedení nanočástic (NPs) do životního prostředí, ke kterému může dojít v důsledku použití NPs v sanačních technologiích a zemědělství (např. hnojiva nebo nanopesticidy) (Barnes et al. 2010). V současné době jsou však hlavním zdrojem depozice NPs do půdy kaly z čistíren odpadních vod, kde se nanočástice, které jsou do těchto vod uvolňovány ze spotřebního zboží, mohou usadit do kalu během procesu čištění vody (Mueller et Nowack 2008). Například Ag-NPs mohou být uvolněny během praní textilních produktů v množstvích, která se liší v závislosti na použitých pracích prostředcích a na tom, jak byly nanočástice inkorporovány do textilie (Benn et Westerhoff 2008). Oxid titaničitý používaný jako bílý pigment může být uvolněn z barev (Kaegi et al. 2008). Interakce nanočástic se složkami prostředí v čistírně odpadních vod (ČOV) může ovlivnit fyzikálně-chemické vlastnosti ENMs, protože například Ag nebo ZnO-ENMs mohou reagovat se sulfidem nebo fosfátem, které jsou v ČOV všudypřítomné, za vzniku těžko rozpustných  $Ag_2$ , ZnS nebo  $Zn_3(PO_4)_2$  nanočástic (Doolette et al. 2013).

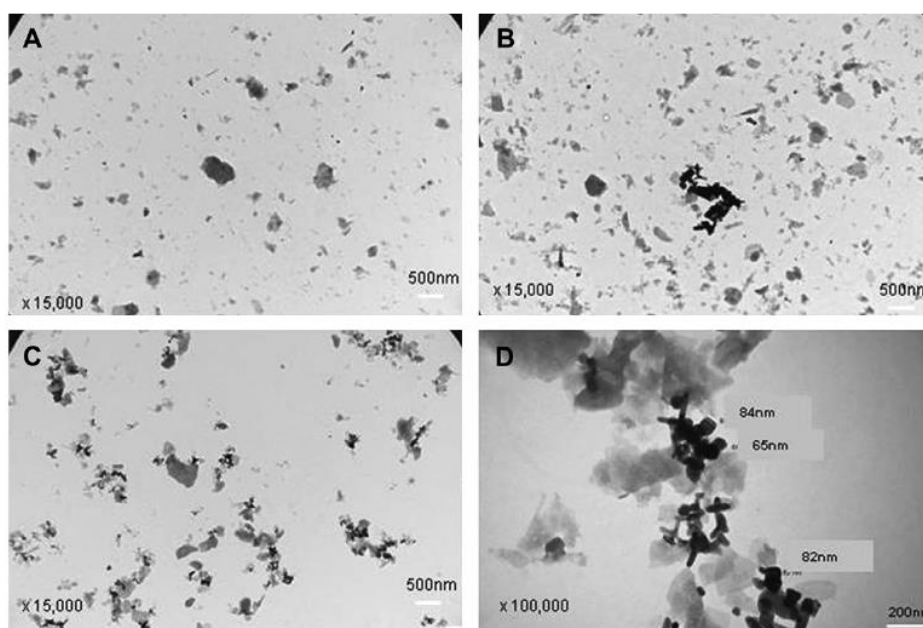
Počet technických aplikací nanočástic (NPs) na bázi oxidů má v posledních letech strmě stoupající tendenci. Díky jejich potenciální introdukci do půdy a vody, je nezbytné zahrnout do procesu charakterizace rizik těchto nanočástic i vhodné sady testů ekotoxicity (Li et al. 2011). S využitím testů bylo již ukázáno, že specifické vlastnosti některých ENMs mohou způsobovat jejich zvýšenou toxicitu (Cornelis et al. 2014). Studium interakcí nanočástic v půdě je však složitější. Výsledný účinek je ovlivněn nejen interakcemi se samotným organismem, ale také fyzikálně-chemickými vlastnostmi půdy, které ovlivňují interakci nanočástic s jednotlivými složkami půdy (organická hmota, množství jílu atd.) (Kobetičová 2012). Při studiu interakce nanočástic s komplexními přírodními médii se potýkáme s nedostatkem vhodných metod pro detekci, charakterizaci a kvantifikaci ENMs (Gottschalk et al. 2013). Stone et al. (2010) definují hlavní fyzikálně-chemické vlastnosti NPs, které by měly být hodnoceny v ekotoxikologických studiích za účelem popsání expozice. Jedná se o rozpustnost, aglomeraci/agregaci, rychlost rozpouštění, velikost, plochu a náboj a také povrchové složení nanočástic. Tyto vlastnosti mohou být klíčem k regulaci stability NPs a následně i k jejich transportu skrze životní prostředí a dostupnost pro organismy.

Některé studie ukázaly, že ENMs mohou být toxické pro půdní organismy (Tourinho et al. 2012). Při studiu účinků nanočástic na půdní organismy bylo zatím nejvíce pozornosti věnováno TiO<sub>2</sub>, ZnO a uhlíkovým nanočásticím. Za tímto účelem bylo provedeno několik studií na žížalách, chvostokocích, roupicích, hlísticích, korýších a na mikroorganismech (Kobetičová 2012). Další publikace naznačují, že fulereny a jejich deriváty jsou méně toxické, zatímco nanočástice kovů a oxidů kovů s malou velikostí jsou škodlivé pro půdní mikrobiální společenstva (Dinesh et al. 2012).

### 2.1.1 Interakce s DOM

Půdní organickou hmotu lze rozdělit na rozpuštěnou organickou hmotu (DOM) a na pevnou organickou hmotu (SOM). Účinky půdní DOM na mobilitu ENMs se mění s koncentrací a typem DOM, iontovou silou (IS) nebo koncentrací dvojmocných kationtů a pH. Půdní DOM často zvyšuje detekovanou ekotoxicitu/akumulaci (a tím i biologickou dostupnost) zvýšením mobility ENMs (Cornelis et al. 2014). Adsorpce DOM na povrch ENMs významně mění jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a následně pak jejich chování v životním prostředí. Důležité DOM v půdách jsou huminové kyseliny, které se uvolňují při procesech degradace biomasy. Dalšími látkami, které mohou ovlivňovat ENMs jsou průběžné produkty degradace nebo exsudáty z půdních organismů jako jsou kyseliny nebo biopolymery (proteiny, polysacharidy). Antropogenními zdroji makromolekul jsou pak organická hnojiva nebo kaly z ČOV (Chen et al. 2007).

Adsorpce DOM na povrch částice nejčastěji činí povrchový potenciál ENMs negativnější, což může vést ke snížení agregace a rychlosti depozice. Když je povrchový náboj původně kladně nabitý ENMs změněn na negativní náboj, je potlačena heteroagregace nebo depozice na převážně negativně nabitý půdní minerály. Adsorpce aniontů způsobí podobné účinky a soutěží s DOM o aktivní centra pro adsorpci, přičemž vápenaté kationty mohou mít opačný účinek na záporně nabitý ENMs (Cornelis et al. 2014). Adsorpce DOM také může vést ke sterické stabilizaci. To platí zejména pro huminové kyseliny, které jsou relativně tuhými molekulami, protože obsahují vysoký podíl aromatických uhlovodíků (Saleh et al. 2010). Uhlíkové ENMs jsou zvláště stabilizovány rozpuštěnou organickou hmotou, protože je jejich hydrofilnost zvyšována kyselými funkčními skupinami DOM (Cornelis et al. 2014). Kool et al. (2011) prezentovali snímky z transmisní elektronové mikroskopie (**Obr. 1**) ukazující ZnO-NPs vázané na pevnou fázi organické hmoty v půdě s pH 5.5, což naznačuje, že za vhodných podmínek může organická hmota vést k destabilizaci disperze částic. Celkový efekt sorpce huminových látek na stabilitu a biologickou dostupnost částic závisí na celé řadě faktorů, zejména pH půdy a vnitřní hydrofobicitě huminových látek (Tourinho et al. 2012).



**Obrázek 1:** TEM snímky půdního roztoku Lufa 2.2 půdy bez ZnO (A), se ZnO (B) a se ZnO-NPs (C a D) (cca 1000 mg Zn/l), ukazující vazbu NP na organické materiály (Kool et al. 2011)

### 2.1.2 Rozpustnost a transformace

V případě nanočástic je často diskutován vliv velikosti částic na jejich rozpustnost. Teoreticky platí, že se rozpustnost částic zvyšuje s jejich snižující se velikostí. Tato skutečnost byla experimentálně ověřena pro Ag a ZnO ENMs. Ionty uvolněné z povrchu ENMs v průběhu rozpouštění jsou často absorbovány půdními částicemi nebo komplexy s chelatačními činidly, které mohou urychlit rozpouštění nebo transformaci ENMs (Cornelis et al. 2012). Rozpustnost Au-NPs v půdní vodě spojená s uvolněním Au iontů se během 28-denního experimentu pohybovala mezi 3,4 a 8% pro částice o průměru 55 a 20 nm (Unrine et al. 2010). Přibližně 10 – 17 % Ag-NPs (30-50 nm) bylo transformováno na Ag(I) po 28 dnech, což naznačovalo oxidativní rozpouštění iontů (Shoults-Wilson et al. 2011). Také byla prokázána velmi nízká rozpustnost CeO<sub>2</sub>-NPs v různých typech půdy (Tourinho et al. 2012).

V řadě prostředí jsou relativně vysoce rozpustné ENMs často transformovány na termodynamicky stabilní sloučeniny (Cornelis et al. 2014). Lombi et al. (2012) například zjistili, že během stárnutí ZnO nebo ZnS obsažených v čistírenských kalech, se většina Zn asociuje s železnými oxidy, což je proces, ke kterému může také dojít v půdách. Biodegradace nanomateriálů na bázi uhlíku v půdě je také možná. Tato oblast je však



málo prostudována a poločas rozpadu se pravděpodobně liší v závislosti na enzimech dostupných v půdních pórech (Petersen et al. 2011).

### 2.1.3 Agregace a aglomerace

Agregace je definována jako seskupování primárních částic pomocí silné vazby, zatímco aglomerace může být popsána jako tvorba shluků částic, které drží pohromadě Van der Waalsovými silami (Jiang et al. 2009). Na aglomeraci a agregaci mají vliv fyzikální síly (např. Brownův pohyb, gravitace a pohyb tekutin) a fyzikálně-chemické parametry NPs (povrchové vlastnosti nebo velikost částic) (Farré et al. 2009). Velikost agregátů nanočástic v koloidním roztoku závisí na vlastnostech jako je například počáteční velikost částic a koncentrace (Tourinho et al. 2012). Jak částice aglomerují a agregují, zvyšují se gravitační síly a tím se zvyšuje pravděpodobnost pro interakci částic s povrchy půdních částic (Dunphy Guzman et al. 2006). Phenrat et al. (2006) zjistili, že vyšší koncentrace nanočástic železa (60 mg/L) měla za následek vyšší míru agregace a stability agregátů ve srovnání s nižšími koncentracemi (2 mg/L). Nanočástice oxidu zinečnatého dispergované ve vodném roztoku tvoří agregáty se širokou distribucí velikostí částic, přičemž mohou vznikat i agregáty až s 10-krát větším průměrem, než měly primární NPs. Distribuce velikostí agregátů se může lišit mezi jednotlivými typy částic. Například  $\text{TiO}_2$ -NPs vykazují rovnoměrnou distribuci a aglomeraci zatímco ZnO-NPs vykazují větší distribuční velikost a agregaci. Rychlost agregace  $\text{TiO}_2$  v půdních suspenzích negativně koreluje s parametry jako je obsah rozpuštěné organické hmoty a naopak pozitivně koreluje s iontovou silou, zeta potenciálem a pH (Tourinho et al. 2012). Ghosh et al. (2008) prokázali, že při nízkých hodnotách pH, způsobily huminové kyseliny agregaci  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs.

### 2.1.4 Transport v půdě

Interakce mezi částicemi a pevnými povrchy řídí transport nanočástic v půdách. Tyto interakce mohou být ovlivněny jak podmínkami prostředí, tak i fyzikálně-chemickými vlastnostmi částic. Obecně platí, že faktory, které ovlivňují stabilitu NPs, rovněž ovlivňují transportní mechanismy (Tourinho et al. 2012). Fang et al. (2009) poukazují na to, že vysoká iontová síla snižuje transport negativně nabitých  $\text{TiO}_2$ -NPs v půdních sloupcích. Darlington et al. (2009) uvádí, že se mobilita NPs v půdě obecně snižuje s rostoucí velikostí částic. Zatímco menší částice jsou mobilnější a mají větší šanci proniknout až do hloubek podzemních vod, kde dochází k akumulaci podzemních vod, větší agregáty mají tendenci hromadit se v horních vrstvách půdy. Dále autoři

testovali pohyb částic v písčitém sloupci, kde mobilita  $\text{Al}_2\text{O}_3$  byla větší než v půdě, což poukazuje na důležitost konstituce půdní hmoty při transportu NPs.

### 2.1.5 Biodostupnost

Působením organismů mohou být ENMs dále transformovány, protože půdní organismy často ovlivňují místní fyzikálně-chemické podmínky a produkují enzymy a chelatační činidla (např. ve střevech bezobratlých nebo v půdní rhizosféře v blízkosti kořenů rostlin). Tyto podmínky mohou mít vliv na transformaci a (lokální) biologickou dostupnost ENMs. Prostředí rhizosféry má odlišné pH v porovnání se zbylým objemem půdy a obsahuje mnoho organických sloučenin s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou organické kyseliny (např. kyselina mléčná), aminokyseliny, cukry a mastné kyseliny, které rostliny vylučují, aby zvýšily dostupnost živin. Tyto sloučeniny se adsorbují na ENMs, což může urychlit rozpouštění ENMs v případě relativně rozpustných ENMs. Příkladem může být rozpouštění  $\text{ZnO}$  za vzniku  $\text{Zn}^{2+}$ , který je pak mnohem snadněji přijímán organismy než  $\text{ZnO-ENMs}$  (Cornelis et al. 2014).

V případě rozpustných ENMs jako je  $\text{Ag}$ ,  $\text{ZnO}$  a některé kvantové tečky existuje mnoho náznaků, že biologická dostupnost a tudíž ekotoxicita koreluje s množstvím iontů uvolněných z ENMs. Na biologickou dostupnost může mít vliv i pH. Relativně vysoké pH vede nejčastěji k vyšší mobilitě ENMs, protože povrchy ENMs jsou obecně záporně nabitě. ENMs mají komerční povlaky nebo jsou potaženy DOM, fosfátem nebo jinými aniontovými látkami v půdách. Většinou však neexistuje jasná korelace mezi mobilitou a pH. Heteroagregace ENMs s mobilními jíly může zvýšit velikost agregátů ENMs, což je ve výsledku dělá méně dostupnými pro organismy (Cornelis et al. 2014). Shoults-Wilson et al. (2011) uvádí, že biologická dostupnost ENMs je tedy pravděpodobně nižší v jemnějších půdách.

### 2.1.6 Vliv podmínek testu

Agregace a tudíž biologická dostupnost může být ovlivněna způsobem aplikace nanočástic do půdy (Waalewijn-Kool et al. 2012). V experimentech s různými testovacími organismy byl sledován vliv různé formy vnášených nanočástic  $\text{TiO}_2$ . Vnášení pomocí suspenze (mokrý vnášení – suspenze ve výluhu půdy nebo suspenze ve vodě) mělo za následek silnější účinky než suchý prášek (suché vnášení), ale biologická dostupnost částic se zdála být omezená v případě, kdy ke vnášení nanočástic byla použita vysoce koncentrovaná suspenze. Vliv způsobu vnášení na biologickou dostupnost je různý pro různé typy ENMs ( $\text{ZnO}$  – ionty uvolňující NP,  $\text{TiO}_2$  - stabilní NP)

i pro různé velikosti agregátů určitého typu ENMs (Cornelis et al. 2014). Waalewijn-Kool et al. (2012) však ve své studii pozorovali opačné výsledky. Nebyl patrný žádný rozdíl v toxicitě u *Folsomia candida* mezi půdou, do které byly nanočástice ZnO vpraveny pomocí suchého prášku a půdou, do které byla přidána suspenze ZnO v půdním extraktu.

## 2.2 Testování ekotoxicity nanočástic v reálných půdách

Pochopení fyzikálně-chemických transformačních procesů, jimž podléhají nanočástice (NPs) v reálných půdách, a popis jejich interakcí s anorganickými a organickými složkami půd tvoří důležitou součást studia ekotoxických účinků nanočástic pro půdní organismy. Tyto procesy určují dostupnost ENPs v porézním médiu, transport do vodních systémů a příjem rostlinami (Rodrigues et al. 2016). Bylo prokázáno, že chování, transport a mobilita NPs jsou silně závislé na podmínkách prostředí. Zatím je však jen málo známo o možných účincích nanočástic na chemické, fyzikální a biologické vlastnosti půdy (Ben-Moshe et al. 2013). Ve většině studií jsou částice charakterizovány v práškové formě nebo ve formě primárního koloidu před jejich přidáním do půdy. V rámci jednotlivých studií byly testovány různé způsoby přidávání NPs do půdy. Jedná se například o smíchání prášku NPs přímo s půdou, přidání zásobní disperze připravené v destilované vodě do půdy nebo příprava zásobní disperze v půdním výluhu, který je pak smíchán s půdou (Tourinho et al. 2012).

Ben-Moshe et al. (2013) ve své studii sledovali interakce mezi nanočásticemi o velikosti < 50 nm (CuO a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) a přírodní půdou a jejich možný dopad na její vlastnosti. Za tímto účelem byly nanočástice smíchány se dvěma typy izraelských půd. Fyzikálně-chemické parametry použitých půd jsou uvedeny v **Tab. 1**.

**Tabulka 1:** Fyzikálně-chemické parametry testovaných půd (Ben-Moshe et al. 2013)

vlastnost	půda I	půda II
obsah písku (%)	77,5	48,3
obsah humusu (%)	6,3	14,8
obsah jílu (%)	16,2	36,9
pH	7,7	7,5

Nanočástice byly přidány o koncentracích 1% a 5% do suché půdy. Vzorky byly následně charakterizovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) a energiově dispersní rentgenfluorescenční spektroskopie (EDS/EDX). Autoři uvádějí, že nanočástice

měly vliv na mikroskopické vlastnosti půd. Dále nepozorovali změnu celkového množství organické hmoty. Také zmiňují ovlivnění složení bakteriální komunity, kdy komunity žijící v půdě I byly poměrně citlivé na přítomnost nanočástic. Na rozdíl od půdy II, kde mikrobiální komunita vykazovala relativní odolnost vůči nanočásticím. Ve výsledku byly oba typy půd méně ovlivněny  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  než  $\text{CuO}$ , což naznačuje nižší toxicitu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  pro půdní bakteriální komunity.

García-Gómez et al. (2014) sledovali příjem a toxicitu nanočástic  $\text{ZnO}$  <100 nm ( $\text{ZnO}$ -NPs),  $\text{ZnO}$  mikročástic ( $\mu\text{ZnO}$ ) a soli  $\text{ZnCl}_2$  (všechny tři varianty o koncentraci 1000 mg/kg půdy) pro půdního červa *Eisenia fetida*. Experimenty probíhaly v zemědělské půdě, která byla sebrána z vrchní vrstvy pole nedaleko Madridu. Hlavní fyzikálně-chemické vlastnosti půdy jsou uvedeny v **Tab. 2**.  $\text{ZnO}$ -NPs a  $\mu\text{ZnO}$  byly přidány do vysušené půdy a ručně smíchány, sůl  $\text{ZnCl}_2$  byla přidána v podobě vodného roztoku. V této studii nebyla v průběhu 28 denního testu zjištěna žádná mortalita. Tento výsledek byl očekáván na základě výsledků z předchozích studií, kde byli dospělci *Eisenia* sp. vystaveni Zn ( $\text{ZnO}$ -NPs,  $\mu\text{ZnO}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ) v rozmezí koncentrací 250 – 10 000 mg/kg bez letálních účinků. Byly však pozorovány účinky na reprodukci, kdy plodnost červů byla snížena v případě všech tří forem Zn. Nejvyšší toxicitu vykazovala sůl  $\text{ZnCl}_2$ , kde inhibice produkce kokonů byla 98% ve srovnání s kontrolní skupinou. Produkce kokonů u skupin oxidů ( $\text{ZnO}$ -NPs,  $\mu\text{ZnO}$ ) byla statisticky podobná. U těchto látek nebyla pozorovaná inhibice tak markantní jako v případě soli. U  $\text{ZnO}$ -NPs byla inhibice 59% a u  $\mu\text{ZnO}$  byla 43%.

**Tabulka 2:** Hlavní fyzikálně-chemické vlastnosti půdy (García-Gómez et al. 2014)

vlastnost	testovaná půda
obsah písku (%)	73,4
obsah humusu (%)	18,8
obsah jílu (%)	7,8
obsah organické hmoty (%)	1,9
pH	6,8

Ze studií se stopovými prvky, je známo, že půdní pH, ovlivňuje biologickou dostupnost a toxicitu kovů v půdních systémech. Také v případě Zn je oprávněný předpoklad, že půdní pH bude ovlivňovat rozdělení daného kovu mezi pevnou fázi a pórovou vodu. Heggelund et al. (2014) sledovali toxicitu  $\text{ZnO}$ -NPs (30 nm),  $\mu\text{ZnO}$  a  $\text{ZnCl}_2$  pro *Eisenia fetida* v přírodní půdě se třemi rozdílnými hodnotami pH: 4,8; 5,9 a 7,2. Testovaná půda byla odebrána z otevřeného vřesoviště v lese Wareham ve Spojeném Království. Fyzikálně-chemické parametry původní půdy (bez upraveného

pH) jsou uvedeny v **Tab. 3**. Částice byly dávkovány do půdy jako suspenze připravené z jednotlivých půd. Pro ZnCl<sub>2</sub> a ZnO-NPs byly testovány koncentrace 238; 381; 610; 976; 1520 a 2500 mg Zn/kg půdy. V rámci testování μZnO pak 381; 976 a 2500 mg Zn/kg půdy. Autoři uvádějí, že přežívání žížal *E. fetida* bylo nejvíce redukováno při nejvyšší koncentraci ZnCl<sub>2</sub> u všech tří hladin pH. μZnO ovlivnilo přežívání při nízkém a středním pH. V případě ZnO-NPs byla redukce přežívání pozorována pouze u vzorku s nejvyšším pH při koncentraci 610 mg/kg. Dále také byly pozorovány účinky NPs na produkci kokonů a juvenilních stádií žížal. Produkce kokonů byla ovlivněna ve všech případech, což naznačuje, že se jedná o více sensitivní “end-point“ než je přežívání. Produkce juvenilních stádií pak vykazovala stejný trend jako u kokonů. Toxicita ZnCl<sub>2</sub> byla přibližně 2,5-krát vyšší než u částicových forem. Porovnání mezi ZnO-NPs a μZnO naznačovalo, že tyto dvě formy měly srovnatelnou toxicitu. Vliv pH byl pro všechny formy Zn stejný, kdy nejvyšší toxicita byla pozorována při nejnižší hodnotě pH a s nárůstem pH klesala.

**Tabulka 3:** Fyzikálně-chemické parametry neupravené půdy (Heggelund et al. 2014)

Vlastnost	původní půda
obsah hrubého písku (%)	51,5
obsah jemného písku (%)	40,2
obsah kalu (%)	4,7
obsah jílu (%)	3,5
obsah organického uhlíku (%)	4

Yirsaw et al. (2016) se ve své studii zaměřili na vliv tří půdních typů na toxicitu komerčně dodávaných nanočástic nulmocného železa (nZVI). Sledovali obsah nZVI ve tkáních, buněčných komponentách a vliv na reprodukci u *Eisenia fetida*. Fyzikálně-chemické vlastnosti jednotlivých půd jsou uvedené v **Tab. 4**. Nanočástice byly do půdy přimíchány jako prášek, testovány byly koncentrace 0 - 3000 mg nZVI/kg půdy. Při koncentraci 3g nZVI/kg půdy nebyl ani v jedné z půd pozorován žádný vliv částic na přežívání jedinců. Autoři ve výsledcích uvádějí pouze proměnlivé účinky jako zvýšení obsahu železa ve tkáních, které bylo závislé na dávce, peroxidaci lipidů a poškození DNA. Při koncentraci 60 mg/kg půdy byl u žížal pozorován oxidativní stres. Při této koncentraci nZVI byla redukována reprodukce, zatímco líhnutí ovlivněno nebylo. Vysoké koncentrace železa v půdních suspenzích byly pozorovány u půdy I a II při koncentraci nZVI 1500 mg/kg půdy. Jílové minerály jsou hlavní komponentou půdy, která obvykle váže kovové ionty. Avšak v daném případě byl vyšší obsah Fe (III) zjištěn v půdním typu I s obsahem jílu 10,6% než v půdním typu III, kde byl obsah jílu 5,4%. Nižší obsah Fe

(III) v půdě III mohl být důsledkem vyšší hodnoty pH, která vedla ke zpomalenému uvolňování Fe (II). Na pomalejší uvolňování Fe (II) mohly mít rovněž vliv organické složky půdy.

**Tabulka 4:** Fyzikálně-chemické parametry půd (Yirsaw et al. 2016)

vlastnost	půda I	půda II	půda III
jíl (%)	10,6	7,9	5,4
humus (%)	7,9	7,9	5,4
písek (%)	89,1	84,1	81,5
organický uhlík (%)	2,8	2,4	1,54
CEC (cmol kg <sup>-1</sup> )	0,14	0,33	0,34
pH	4,96	7,39	8,67
WHC	50,4	53,6	47,6

Účinky nanočástic stříbra (NM-300K; 20 nm) na půdního červa *Lumbricus rubellus* sledovali van der Ploeg et al. (2014). Ve své studii vystavili dospělé jedince *L. rubellus* po dobu čtyř týdnů působení Ag-NPs o koncentraci 1,5; 15,4; 154 mg Ag/kg písčité půdy. Fyzikálně-chemické parametry půdy použité jako expoziční médium jsou uvedeny v **Tab. 5**. Nanočástice byly přidány do půdy spolu s půdním extraktem. Průměrná velikost částic zjištěná pomocí analýzy SEM/EDX byla 20 nm. Dále byly detekovány i větší aglomeráty (50-250 nm) sestávající se pouze z Ag nebo Ag v kombinaci s chloridem a sulfidem. Autoři sledovali účinky Ag-NPs na přežívání, růst a reprodukci testovaného organismu. Všechny dospělé žížaly 4-týdenní expozici Ag-NPs přežily, po expozici 154 mg Ag-NPs/kg půdy byla však zaznamenána redukce růstu až na 44% v porovnání s kontrolní skupinou a velmi nízká reprodukce. V dlouhodobém experimentu s potomky jedinců, kteří byli vystaveni 4-týdenní expozici Ag-NPs, byl sledován růst a přežívání. Vysoká koncentrace Ag-NPs (154 mg/kg) ovlivnila líhnutí potomků a střední koncentrace (15,4 mg/kg) vyvolala výrazně nižší přežívání juvenilních jedinců. Z těchto výsledků vyplývá, že juvenilní jedinci mohou být více citliví k chronické expozici Ag-NPs než dospělci.

**Tabulka 5:** Fyzikálně-chemické parametry testované půdy (van der Ploeg et al. 2014)

vlastnost	testovaná půda
obsah jílu (%)	1,6
obsah organické hmoty (%)	4,3
pH	6

Carbone et al. (2016) se věnovali studiu biologické dostupnosti CeO<sub>2</sub> (sférický tvar, 50-105 nm) a SnO<sub>2</sub> (60 nm) nanočástic pro *Eisenia fetida* v rámci dvoutýdenní expozice. Během testů byly použity dva vzorky půd, jejichž fyzikálně-chemické parametry jsou uvedeny v **Tab. 6**. Všechny půdní vzorky byly odebrány na experimentálním poli Norwegian University of Life Sciences v jižním Norsku. Během testu byly žížaly jednou týdně krmeny koňským hnojem s přídatkem nanočástic v množství 0,5 g/žížalu. Průměrné koncentrace CeO<sub>2</sub>-NPs byly 26,1 ± 2,9 mg/kg a SnO<sub>2</sub>-NPs 346,6 ± 18,2 mg/kg suché potravy. Autoři v závěru uvádějí, že CeO<sub>2</sub>-NPs ani SnO<sub>2</sub>-NPs neměly žádný vliv na růst žížal během experimentu a příjem Ce iontů byl větší než CeO<sub>2</sub>-NPs. Nanočástice CeO<sub>2</sub> vykazovaly zvyšující se biodostupnost v průběhu 28 dnů v organické půdě. To naznačovalo, že organická hmota měla veliký vliv na osud CeO<sub>2</sub>-NPs v půdě.

**Tabulka 6:** Fyzikálně-chemické parametry testovaných půd (Carbone et al. 2016)

vlastnost	organická půda	minerální půda
obsah organické hmoty (g)	14,2	1,49
pH	4,8	5,8
textura	jílovitá	jílovitá

Toxicitu vybraných anorganických nanočástic pro půdního červa *Eisenia fetida* sledovali Heckmann et al. (2011) během 28denního testu. Ve své studii konkrétně testovali Ag-, Cu-, Ni-, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-, SiO<sub>2</sub>-, TiO<sub>2</sub> a ZrO<sub>2</sub>-NPs a soli (Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) příslušných kovových iontů. Experimenty probíhaly v režimu limitního testu, tedy v koncentraci 1000 mg/kg. Charakteristiky testovaných nanočástic jsou uvedené v **Tab. 7**.

**Tabulka 7:** Charakteristika testovaných nanočástic (Heckmann et al. 2011)

nanočástice	nominální velikost částic (nm)	TEM velikost částic (nm)	DLS velikost částic (nm)	čistota (%)
Ag	30-50	81,8 ± 1,59	235 ± 3,73	99,9
Cu (CuO)	80	nepoužitelné	419 ± 1,46	99,5
Ni	20	40,4 ± 1,13	3867 ± 211	99,9
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	12-14	-	-	>98
SiO <sub>2</sub>	5-15	-	-	99,5
TiO <sub>2</sub>	21	30 ± 0,61	282 ± 1,15	>99,5
ZrO <sub>2</sub>	20-30	-	-	99,9

Expozičním médiem byla písčitohlinitá půda z experimentální stanice Askov na Aarhus Univerzity v Dánsku. Půda měla pH 5,8; obsah organické hmoty = 1,36%; obsah jílu = 11,6%; humusu = 21,4% a písku = 64,7%. Nanočástice byly přidány do 500 g suché půdy v podobě zásobního roztoku (100 ml) daných NPs. U solí kovů  $\text{AgNO}_3$  (2,5%),  $\text{CuCl}_2$  (17,5%) a  $\text{NiCl}_2$  (32,5%) byly pozorovány významné účinky na přežití jedinců. Kovové soli ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ) stejně jako tři druhy nanočástic (Ag-NPs, Cu-NPs,  $\text{TiO}_2$ -NPs) působily rovněž toxicky na reprodukci. Celkové 100% selhání reprodukce bylo zaznamenáno jak při experimentech s Ag-NPs, tak s  $\text{AgNO}_3$ . Ostatní NPs (Ni-,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -,  $\text{SiO}_2$ - a  $\text{ZrO}_2$ -) pozorovatelné toxické účinky na *E. fetida* nevykazovaly.

Složení půdy (zejména podíl anorganické a organické složky) zásadním způsobem ovlivňuje osud (transport, chemické změny a biologickou dostupnost) nanočástic v půdě a tím i jejich toxicitu pro půdní organismy. Pro detekci nanočástic v půdách a studium jejich chování se využívají zejména metody FFFF (fokusační frakcionace tokem v poli) a UV spektroskopie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s buzením v indukčně vázaném plazmatu (ICP-MS) a tandemovou hmotnostní spektrometrií (LCMS/MS). Každá z těchto metod vyžaduje úpravu vzorku obvykle spočívající v extrakci NPs z půdní matrix a následném zkoncentrování vzorků. Postupy přípravy vzorků jsou jedním z významných zdrojů variability dat. Díky nízké koncentraci NPs v půdách a nepoměrně vyšším hodnotám detekčních limitů analytických metod je obvykle třeba provádět velký počet extrakčních kroků, čímž se reprodukovatelnost výsledků dále zhoršuje. Dalším zdrojem nejistot je pak vliv složení půdy na efektivitu extrakčních kroků (Pachapur et al. 2016). Maurer-Jones et al. (2013) ve své publikaci zmiňují potřebu vylepšených analytických detekčních metod, které by mohly měřit vlastnosti nanomateriálů v půdě in-situ. Dále kladou důraz na větší normalizaci extrakčních postupů vhodných pro zakalené vzorky a vzorky s vysokou variabilitou iontové síly.

Chování ENPs ( $\text{TiO}_2$  a Ag) v půdách je řízeno jejich vzájemnými interakcemi. Potenciální akumulace ENPs v půdách je většinou studována v jednoduchých porézních médiích jako je např. křemenný písek či skleněné korálky. Nicméně v komplexu přírodních půd zvyšují organické látky agregaci a aglomeraci. Kromě toho tyto interakce, především s huminovými kyselinami, ovlivňují biologickou dostupnost a mobilitu ENPs. Toxicita ENPs se liší s typem půdy. Také jejich transport a biologická dostupnost se liší v závislosti na chemických a fyzikálních vlastnostech půdy (Pachapur et al. 2016).

Grillo et al. (2015) uvádí, že NOM (huminové látky (HS), huminové kyseliny (HA) a frakce fulvinových kyselin (FA)) snižuje agregaci NPs, což zvyšuje jejich stabilitu a za určitých okolností může zvýšit nebo snížit jejich toxicitu v závislosti na charakteru životního prostředí. Z výše zmíněných studií je patrné, že půdy s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které byly použity v jednotlivých experimentech, výrazným



způsobem ovlivnily výslednou toxicitu ENMs pro půdní organismy. Garner et Keller (2014) ve své publikaci zmiňují, že komplexní povaha půdních systémů omezuje naše porozumění procesům ovlivňujících osud ENMs v půdě (zejména v nenasycených půdách). To je způsobeno složitostí měření způsobu interakce ENMs s nenasycenými půdami na rozdíl od podzemních vod. Bour et al. (2015) poukazují na stálý nedostatek znalostí o environmentálním osudu a ekotoxicitě nanočástic. Studie v environmentálně relevantních podmínkách jsou nezbytné pro posouzení těchto parametrů, avšak takové studie jsou doposud poměrně vzácné.

## 2.3 Testování ekotoxicity nanočástic v umělých půdách

Testy ekotoxicity nanočástic prováděné v půdních maticích splňujících požadavek environmentální relevance poskytují velmi variabilní a obtížně srovnatelné výsledky. Základním zdrojem variability dat je jednak velmi proměnlivé složení půd a dále též nejednotnost postupů využívaných pro jejich charakterizaci. Řešení uvedených potíží by mohlo spočívat např. v použití umělé (artificiální) půdy jasně definovaného složení (Handy et al. 2012).

### 2.3.1 Nanočástice ve standardizovaných půdách

Unrine et al. (2010) ve své studii sledovali biodostupnost a ekotoxicitu Au nanočástic pro půdního červa *Eisenia fetida*. Jako expoziční médium byla použita umělá (artificiální) půda, jejíž fyzikálně-chemické parametry jsou uvedeny v **Tab. 8**.

**Tabulka 8:** Fyzikálně-chemické parametry umělé (artificiální) půdy (Unrine et al. 2010)

vlastnost	artificiální půda
obsah písku (%)	70
obsah kaolinu (%)	20
obsah rašeliny (%)	10
pH	7,6

Nanočástice byly přidány do suché půdy v podobě suspenze. Během studie byly testovány tyto koncentrace 2,5, 10 a 25 mg Au/kg půdy. Velikost a morfologie nanočástic použitých v testech byly vyhodnoceny pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM). Testované částice vykazovaly průměr  $20,5 \pm 0,7$  a  $54,9 \pm 0,7$  nm

a sférický tvar. V této studii nebyly pozorovány žádné statisticky významné účinky na tělesnou hmotnost testovaného organismu. Autoři pouze uvádějí sporadickou mortalitu v některých testech (20% u koncentrace 5 mg/kg Au-NPs o velikosti 20 nm a 14% u koncentrace 62 mg/kg Au-NPs o velikosti 55 nm). Výsledná mortalita nebyla závislá na dávce.

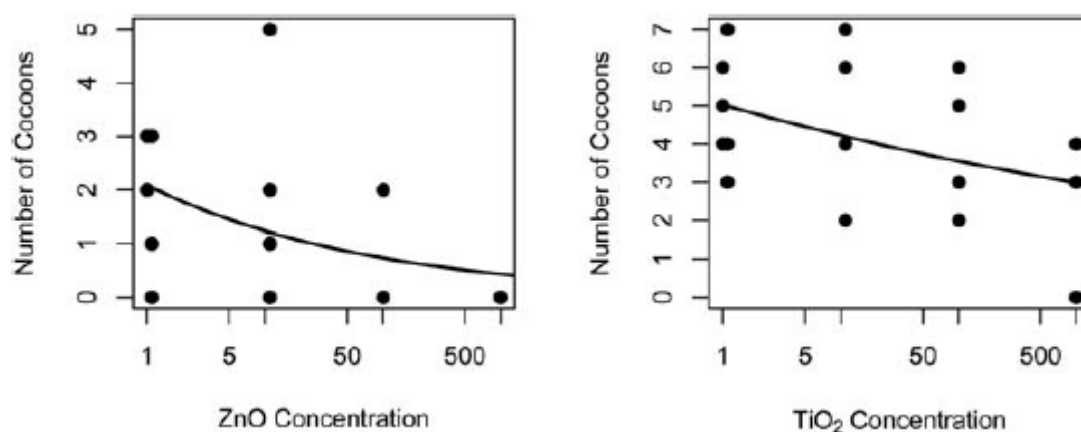
Canas et al. (2011) se ve své studii věnovali sledování akutní a reprodukční toxicity nanočástic oxidů kovů pro půdního červa *Eisenia fetida*. Konkrétně testovali účinky ZnO-NPs (40~100 nm) a TiO<sub>2</sub>-NPs (~32 nm) během testů akutní toxicity na filtračním papíře a v písčitém expozičním médiu. Účinky u reprodukčního testu pak byly sledovány v umělé půdě a v písčitém expozičním médiu. Umělá půda byla připravena podle standardního protokolu ASTM (Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida*) a obsahovala tyto složky: 10% rašeliny, 20% kaolinového jílu, 69% jemného písku a 1% kravského hnoje, který sloužil jako zdroj potravy pro testovaný organismus. Podmínky jednotlivých testů jsou uvedeny v **Tab. 9**.

**Tabulka 9:** Podmínky jednotlivých testů (Canas et al. 2011)

expoziční médium	testy akutní toxicity		reprodukční testy	
	filtrační papír	písčité médium	umělá půda	písčité médium
složení média	_____	4 g kravského hnoje, 20 g písku Ottawa, 4 ml destil. vody	0,4 kg umělé půdy, 8 g hnoje, 100 ml od každé koncentrace NPs	4 g kravského hnoje, 20 g písku Ottawa, 4 ml destil. vody
doba testu	14 dní	14 dní	4 týdny	3 týdny
testované koncentrace	0; 0,1; 1; 10; 100; 1000; 5000 a 10 000 mg/l		0; 0,1; 1; 10 a 1000 mg/kg	

Jednotlivé koncentrace byly připraveny ve 100 ml deionizované vody a sonikovány za účelem úplné dispergace. Doba sonikace se zvyšovala s rostoucí koncentrací nanočástic a pohybovala se v rozmezí 5 sekund až 1,5 minuty. Pomocí analýzy s využitím dynamického rozptylu světla (DLS) byla indikována agregace mezi 1 a 100 mg/L pro ZnO-NPs a 1 a 10 mg/L pro TiO<sub>2</sub>-NPs. Velikost agregátů se pohybovala v rozmezí 200-300 nm. Tyto výsledky byly ve shodě s daty získanými pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). ZnO-NPs na filtračním papíře vykazovaly akutní

toxicitu, kdy byla zaznamenána mortalita ve všech koncentracích. U  $\text{TiO}_2$ -NPs nebyly pozorovány statisticky významné toxické účinky. Během testu v písčitém expozičním médiu byla pozorována u ZnO-NPs 10% mortalita při koncentraci 10 a 100 mg/kg a 20% mortalita při koncentraci 10 000 mg/kg. U nanočástic  $\text{TiO}_2$  byla pozorována 100% mortalita u koncentrací 100 a 1000 mg/kg. Žádné výsledky testů akutní toxicity nebyly závislé na dávce. Při reprodukčním testu v umělé půdě byl pozorován vliv na reprodukci u obou druhů nanočástic. Největší vliv na produkci kokonů měla nejvyšší koncentrace (1000 mg/kg) ZnO-NPs. Produkce kokonů byla závislá na dávce ZnO-NPs. U nanočástic  $\text{TiO}_2$  byla produkce kokonů méně ovlivněna než v případě ZnO-NPs jak je znázorněno na **Obr. 2**. Během testu v písčitém médiu se produkce kokonů snižovala s rostoucí koncentrací oxidů kovů. Nicméně nebyly pozorovány žádné výrazné rozdíly v produkci kokonů u expozice ZnO a  $\text{TiO}_2$ . Autoři dále uvádí, že pozorovaná reprodukční toxicita obou nanočástic v umělé půdě, je podobná toxicitě dalších oxidů kovů (Ag, Au,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Ačkoli písek není zcela charakteristické prostředí, je to více relevantní expoziční médium než filtrační papír.



**Obrázek 2:** Produkce kokonů u *E. fetida* po 4týdenním testu v umělé půdě u ZnO-NPs a  $\text{TiO}_2$ -NPs (Canas et al. 2011)

Fajardo et al. (2014) sledovali vliv Ag a  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nanočástic na půdní organismy. Nanočástice použité během jejich studie měly velikost  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs <50 nm a Ag-NPs = 40 nm. Během testu byly použity dva druhy půd Lufa 2.2 a Lufa 2.4. Hlavní fyzikálně-chemické vlastnosti použitých půd jsou popsány v **Tab. 10**. Toxicitu výše uvedených nanočástic studovali autoři na půdním červu *Caenorhabditis elegans* během 7denního testu, kdy sledovali účinky na reprodukci, přežívání a růst testovaného organismu. Do půdních vzorků (50 g) přidali 250 mg  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs nebo 25  $\mu\text{g}$  Ag-NPs. Výsledky neprokázaly žádný vliv expozice NPs na sledované parametry (reprodukce, přežívání,

růst). V závěru této studie autoři konstatují, že půdy Lufa 2.2 a Lufa 2.4 tlumí toxické účinky Ag a Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočástic.

**Tabulka 10:** Hlavní fyzikálně-chemické vlastnosti půd Lufa 2.2 a Lufa 2.4 (Fajardo et al. 2014)

vlastnost	Lufa 2.2	Lufa 2.4
TOC (%)	1,77 ± 0,20	2,26 ± 0,5
N (%)	0,17 ± 0,02	0,20 ± 0,04
částice <0,02 mm (%)	15,4 ± 2,3	49,0 ± 2,8
pH (0,01 M CaCl <sub>2</sub> )	5,5 ± 0,2	7,2 ± 0,2
CEC (meq/100 g)	10,1 ± 0,5	31,4 ± 4,6
půdní typ (USDA)	hlinito-písčítá	jílovitá
WHC (g/100g)	41,8 ± 3,0	44,1 ± 1,2

TOC = celkový organický uhlík, CEC = kationtová výměnná kapacita, WHC = kapacita zadržky vody

Lahive et al. (2014) ve své studii sledovali toxické účinky nanočástic CeO<sub>2</sub> tří různých velikostí (5-20 nm; 10-50 nm; 10-80 nm) a jedné větší částice CeO<sub>2</sub> (100-300 nm) pro půdního červa *Eisenia fetida* v rozmezí koncentrací 41-10 000 mg Ce/kg. Byly sledovány účinky na přežívání (po 28 dnech), reprodukci (po 56 dnech) a také bioakumulaci a histopatologické účinky. Fyzikálně-chemické parametry standardní půdy Lufa 2.2, která byla použita v této studii, jsou uvedeny v **Tab. 11**. Ani u jednoho ze čtyř druhů nanočástic CeO<sub>2</sub> nebyl pozorován účinek na přežívání a reprodukci. Byly však pozorovány histopatologické změny po expozici částicovým formám CeO<sub>2</sub>. Konkrétně autoři zmiňují ztrátu kutikuly z tělní stěny a určitou ztrátu integrity střevního epitelu. Celková koncentrace ceria ve tkáních *E. fetida* se zvyšovala se zvyšující se dávkou. Autoři bohužel nijak nekomentují vliv použité půdy na toxicitu nanočástic.

**Tabulka 11:** Fyzikálně-chemické parametry půdy Lufa 2.2 (Lahive et al. 2014)

vlastnost	Lufa 2.2
pH	5,5 ± 0,2
obsah organického uhlíku (%)	1,76 ± 0,26
CEC (meq/100 g)	10,2 ± 0,5
WHC (%)	55

Schlich et al. (2013) sledovali vliv nanočástic stříbra (Ag-NPs) a AgNO<sub>3</sub> na *Eisenia andrei* během reprodukčního testu v půdním médiu RefeSol 01A. Fyzikálně-chemické parametry této půdy jsou uvedeny v **Tab. 12**.

**Tabulka 12:** Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy RefeSol 01A (Schlich et al. 2013)

vlastnost	RefeSol 01A
pH	5,67
obsah organického uhlíku (%)	0,93
obsah písku (%)	71
obsah humusu (%)	24
obsah jílu (%)	5
popis	jílovitý, středně kyselý a lehce huminový písek

Během studie byly použity Ag-NPs NM-300K od Sponzorského Programu OECD, kde velikost částic byla přibližně 15 nm. Pomocí TEM byl v menším množství (1%) identifikován výskyt menších částic o velikosti 5 nm. Toxické účinky Ag-NPs a AgNO<sub>3</sub> byly sledovány v koncentracích 15; 30; 60; 120 a 200 mg/kg půdy. Autoři pozorovali během testu únikové chování *E. andrei* avšak nepozorovali žádnou významnou mortalitu u Ag-NPs ani u AgNO<sub>3</sub>. Příjem Ag-NPs červy byl o trochu vyšší než v případě AgNO<sub>3</sub>, což bylo vyjádřeno celkovým obsahem stříbra ve tkáních testovaného organismu (**Tab. 13**). Inhibice reprodukce se pohybovala v rozmezí 46,4% u nejnižší koncentrace a 75,2% u koncentrace nejvyšší. Autoři také diskutovali vliv použitého média na toxicitu. Uvádějí, že vyšší toxicita, pozorovaná v jejich studii, mohla být způsobena rozdílným obsahem organické hmoty v porovnání s dalšími studiemi. Organická hmota ovlivňuje osud Ag-NPs v půdě a všechny formy Ag byly více mobilní v minerální půdě než v půdách bohatých na organickou hmotu.

**Tabulka 13:** Obsah stříbra ve tkáních *E. andrei* (Schlich et al. 2013)

koncentrace (mg/kg půdy)	Ag-NPs (mg/kg červa) ± SD	AgNO <sub>3</sub> (mg/kg červa) ± SD
15	7,0 ± <0,01	8,0 ± 0,9
30	10,5 ± 0,4	7,3 ± 1,5
60	11,1 ± 0,2	6,8 ± 0,4
120	11,3 ± 0,4	6,7 ± 0,2
200	11,2 ± 0,1	5,9 ± 0,1

SD = směrodatná odchylka

Toxicitě nanočástic stříbra se ve své studii také věnovali Gomes et al. (2013). Půdního červa *Enchytraeus albidus* vystavili působení Ag-NPs (s PVP povrchovou úpravou, nominální velikostí 30-50 nm) a soli AgNO<sub>3</sub> v OECD umělé půdě (25 g vlhké půdy). Složení půdy je uvedeno v **Tab. 14**. Ag-NPs byly před přidáním do půdy charakterizovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM) a dynamického rozptylu světla (DLS). Analýza TEM odhalila částice o velikosti 82 ± 2 nm a DLS pak částice s hydrodynamickým rozměrem 235 ± 4 nm. Obě testované formy stříbra byly do půdy přidány jako suchý prášek a ručně vmíchány. Testované koncentrace byly 0; 100; 200; 400; 600; 800 a 1000 mg Ag-NPs/kg půdy a 0; 50; 100; 200; 300; 400 a 600 mg AgNO<sub>3</sub>/kg půdy. Během studie byl pozorován účinek na přežívání a reprodukci testovaného organismu. Vyšší toxicitu v reprodukčním testu vykazovala sůl AgNO<sub>3</sub> s letální koncentrací (LC50) <50 mg/kg zatímco Ag-NPs neměly žádný významný efekt na přežívání dospělců *E. albidus*. Byla však pozorována 50% redukce počtu juvenilů kolem koncentrace 225 mg Ag-NPs/kg.

**Tabulka 14:** Složení umělé půdy (Gomes et al. 2013)

vlastnost	umělá půda
obsah rašeliny (%)	7
obsah kaolinového jílu (%)	20
obsah písku (%)	73
pH (upraveno CaCO <sub>3</sub> )	6

Ribeiro et al. (2015) sledovali schopnost Ag-NPs (AgNM300K) a AgNO<sub>3</sub> vyvolat oxidativní stres u půdního organismu *Enchytraeus crypticus*. Za tímto účelem byly sledovány biochemické markery jako kataláza (CAT), glutathion peroxidáza (GPx), glutathion S-transferáza (GST), glutathion reductáza (GR), celkový glutathion (TG), metalothionein (MT) a peroxidace lipidů (LPO). Testovaný organismus byl exponován po dobu tří a sedmi dnů. Nominální velikost Ag-NPs byla 15 nm avšak analýza TEM indikovala částice o velikosti 17 ± 8 nm a dále menší částice (cca 5 nm). Během testu byla použita standardní půda Lufa 2.2. Její fyzikálně-chemické parametry jsou uvedeny v **Tab. 15**. Nanočástice byly přidány ve formě vodné disperze na navlhčenou půdu, která byla následně homogenně promíchána. Testované koncentrace byly 60; 170 a 225 mg/kg pro Ag-NPs a 45; 60 a 96 mg/kg pro AgNO<sub>3</sub>. Výsledky experimentů prokázaly rozdílnou schopnost Ag-NPs a AgNO<sub>3</sub> vyvolávat u *E. crypticus* oxidativní stres. U Ag-NPs byla pozorována zvýšená odpověď antioxidantních enzymů (CAT, GST, GPx) po delší době (7 dnů) než tomu bylo u AgNO<sub>3</sub> (3 dny). Dále bylo pozorováno počáteční

poškození LPO následované stabilizací u AgNO<sub>3</sub>, zatímco u Ag-NPs se LPO objevila po 7 dnech. Hodnoty MT se zvýšily pouze u organismů vystavených Ag-NPs.

**Tabulka 15:** Fyzikálně-chemické parametry půdy Lufa 2.2 (Ribeiro et al. 2015)

vlastnost	Lufa 2.2
obsah jílu (%)	7,2
obsah humusu (%)	8
obsah písku (%)	77,5
pH	5,5
WHC (g/100 g)	45
CEC (meq/100 g)	10
obsah organického uhlíku (%)	1,77

Vliv nanočástic stříbra na půdní bezobratlé živočichy sledovali ve své studii Gomes et al. (2015). Konkrétně se zaměřili na biomarkery oxidativního stresu (TG, GPx, GR, LPO a GST) u *Eisenia fetida*. Během experimentu byly použity nanočástice o nominální velikosti 10 nm. Pomocí TEM však byly zjištěny částice o velikosti  $49 \pm 8$  nm s tendencí k aglomeraci. Hydrodynamický průměr částic byl hodnocen pomocí DLS analýzy s výsledkem 240 nm. Expozice jednotlivým formám stříbra (Ag-NPs a AgNO<sub>3</sub>) byla prováděna v prostředí umělé půdy, jejíž fyzikálně-chemické parametry jsou uvedeny v **Tab. 16**.

**Tabulka 16:** Fyzikálně-chemické parametry umělé půdy (Gomes et al. 2015)

vlastnost	umělá půda
obsah rašeliny (%)	7
obsah kaolinového jílu (%)	20
obsah písku (%)	72,72
přídavek CaCO <sub>3</sub> (%)	0,275
pH	$6 \pm 0,5$

Nanočástice byly do půdy zamíchány jako suchý prášek a AgNO<sub>3</sub> byla přidána jako vodná disperze. Pro zjištění účinků Ag-NPs byly testovány koncentrace 0; 100; 300; 600; 900 a 1500 mg Ag/kg půdy a v případě AgNO<sub>3</sub> pak koncentrace 0; 25; 50; 75; 100 a 200 mg Ag/kg půdy. Autoři studie vyhodnocovali výsledky po 4 a 28 dnech. Čtyřdenní expozice Ag-NPs způsobila zvýšení hladiny TG u koncentrací 100; 300 a 600 mg/kg

a inhibici aktivity GR u koncentrací 900 a 1500 mg/kg. Delší expozice (28 dnů) měla za následek inhibici aktivity GPx a GR. Hodnoty LPO byly zvýšeny ve všech testovaných koncentracích. V případě testů s AgNO<sub>3</sub> byla zjištěna zvýšená aktivita GR u koncentrací 75 a 100 mg/kg. Při 28-denním testu vykazovala aktivita GR závislost na dávce. Dále byla inhibována aktivita GPx a GST u nejvyšší koncentrace (200 mg/kg). Celkově lze říci, že obě formy Ag způsobily výrazné změny v antioxidantním systému *E. fetida* a byly časově závislé.

Shoults-Wilson et al. (2011) sledovali vliv půdních vlastností na toxicitu a příjem nanočástic stříbra u půdního červa *Eisenia fetida*. Experimenty byly prováděny v umělé OECD půdě, která měla relativně vysoké hodnoty CEC (kationtová výměnná kapacita) a vysoký obsah organické hmoty a jílu. Druhou testovanou půdou pak byla přirozeně se vyskytující, lokálně sebraná písčité půda, která měla nižší CEC a nižší obsah organické hmoty a jílu. Jedinci vystavení Ag-NPs v umělé půdě nevykazovaly žádný významný pokles růstu a přežívání. Autoři však pozorovali významný pokles produkce kokonů při 801,0 ± 74,9 mg/kg 10-nm Ag-NPs a při 773,3 ± 11,2 mg/kg 30-50-nm Ag-NPs v umělé půdě. Organismy vystavené Ag-NPs v přírodní půdě akumulovali výrazně vyšší koncentrace Ag než jedinci v umělé půdě. Celkově byla pozorována vyšší toxicita v kyselější půdě s vyšším obsahem písku. Autoři dále diskutují vliv půdních vlastností, kdy uvádějí, že zvyšující se obsah Ag, větší podíl písku a rostoucí kyselost půdy vedou ke zvyšující se toxicitě.

Collin et al. (2014) sledovali vliv povrchového náboje u CeO<sub>2</sub>-NPs (pozitivní, negativní a neutrální povrchový náboj) a přítomnost přírodní organické hmoty (NOM) na biodostupnost a toxicitu u *Caenorhabditis elegans*. Autoři uvádějí, že pozitivně nabitě CeO<sub>2</sub>-NPs měly výrazně vyšší toxicitu a byly bioakumulovány ve větší míře než neutrálně a negativně nabitě CeO<sub>2</sub>-NPs. Přídavek huminových kyselin (HA) do půdního expozičního média výrazně snížil toxicitu těchto nanočástic a poměr CeO<sub>2</sub>-NPs/HA ovlivnil bioakumulaci Ce. Bioakumulace Ce se snížila v případě, kdy koncentrace HA byla vyšší než koncentrace CeO<sub>2</sub>-NPs. Autoři na závěr shrnují, že toxicita CeO<sub>2</sub>-NPs vždy poklesla v přítomnosti HA a bioakumulace Ce je vysoce závislá na poměru NP/HA.

### 2.3.2 Nanočástice na agarovém kultivačním médiu

Příspěvek jednotlivých mechanismů k celkové toxicitě závisí na fyzikálně-chemických parametrech nanočástic (povrchová úprava, velikost částic, čistota, rozpustnost atd.), vlastnostech příslušné složky životního prostředí (pH, teplota, rozpuštěné organické látky atd.) a na exponovaném organismu. Zatím však není dostatečné množství studií odpovídající kvality, které by umožnily statistickou analýzu

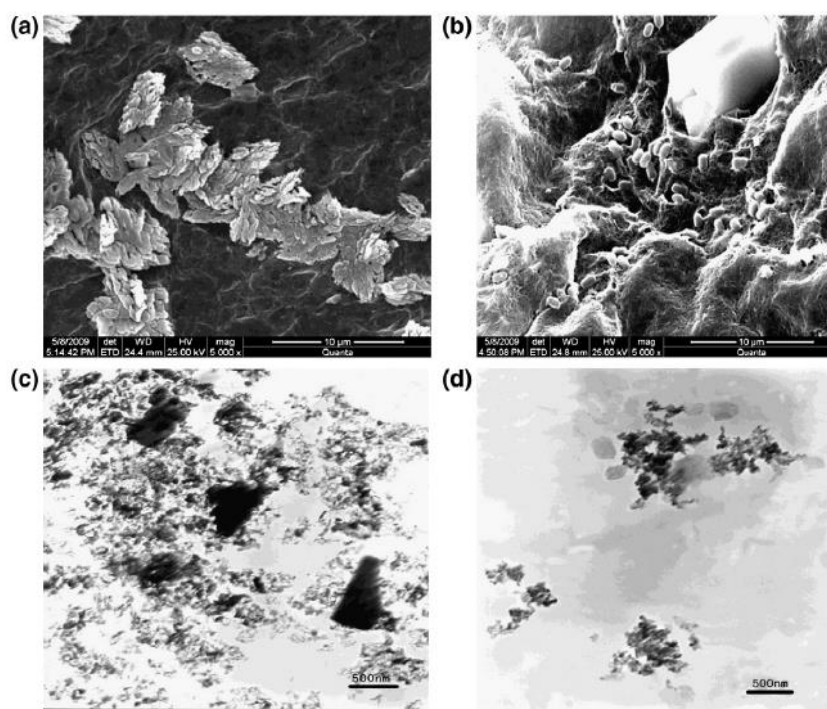


korelace mezi fyzikálně-chemickými parametry částic, vlastnostmi prostředí a ekotoxicitou (Hrdá et al. 2016).

Jedním z hlavních problémů toxikologických studií zabývajících se nanočásticemi je příprava expozičního média (Li et al. 2011). Ve vodném prostředí (říční voda, půdní voda apod.) mají částice tendenci vytvářet agregáty. Stupeň agregace pak zásadním způsobem ovlivňuje toxicitu. V rámci laboratorních testů, kde je požadována vysoká míra reprodukovatelnosti dat a jejich maximálně jednoznačná interpretace, působí procesy aglomerace rušivě (Opršal et al. 2015). S cílem potlačit rušivý vliv aglomerace v průběhu laboratorních testů na půdních organismech bylo navrženo použití agaru jako kultivačního média (Li et al. 2011). Agar je zavedené kultivační médium pro celou řadu organismů a např. půdní červ *Perionyx excavatus* (Perrier) byl, dle Pokarzhevskii et al. (2000), schopen přežít v tomto agarovém prostředí po dobu 6 měsíců. Agarové kultivační médium má výhodu v jednoduché disperzi NPs bez jejich srážení (Pluskota et al. 2009). Expozice v agaru může simulovat typické cesty, prostřednictvím kterých dochází k absorpci nanočástic u půdních organismů (trávicí trakt, kůže) (Li et al. 2011).

Li et al. (2011) ve své studii sledovali biodostupnost a ekotoxicitu ZnO-NPs pro půdního červa *Eisenia fetida*. Expozice v agaru a na filtračním papíře umožnila studovat vliv způsobu příjmu NPs na jejich výslednou ekotoxicitu. Agarové expoziční médium bylo použito za účelem potlačení aglomerace NPs. Podle autorů studie mělo rovněž zajistit rovnoměrné rozložení NPs v testovacích jednotkách a umožnit snadný příjem potravy. Testována byla toxicita nanočástice oxidu zinečnatého o velikosti  $30 \pm 5$  nm. Údaje o velikosti a tvaru částic byly získány pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM). Disperze nanočástic byly připraveny přidáním 2,0% normálního rozpustného agaru a příslušného množství NPs do DW (deionizovaná voda) nebo RW (rekonstituovaná voda). Disperze a rozpustnost ZnO-NPs výrazně závisela na chemickém složení média. Analýza pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) ukázala (**Obr. 3**), že přidání solí zvyšuje agregaci ZnO-NPs v agaru. Stupeň agregace následně ovlivnil i rozpouštění ZnO-NPs a biologickou dostupnost ZnO-NPs či  $Zn^{2+}$ . Toxicita nanočástic oxidu zinečnatého byla vyšší v agaru připraveném s DW než v agaru připraveného s RW. Tento rozdíl lze přičíst agregaci NP v rekonstituované vodě, což je učinilo méně biologicky dostupnými. TEM snímky ZnO ukázaly (**Obr. 3**), že dispergovatelnost a morfologie NPs se výrazně změnila po přidání huminových kyselin (HA), což pomohlo při rozpadu větších vloček do menších samostatných agregátů. Ve výsledku byly pozorovány různé efekty ZnO-NPs na půdní červy, které závisely na použité expoziční metodě (agarové médium vs. filtrační papír). Po krátkodobé expozici (96 h) ZnO-NPs v agarovém médiu, se mortalita *E. fetida* zvyšovala se zvyšující se koncentrací nanočástic. Autoři naznačují, že toxické účinky u *E. fetida* byly způsobeny hlavně požitím malých agarových částic s obsahem ZnO-NPs. Při expozici na filtračním

papíře, kde probíhá pouze dermální příjem, se naopak se zvyšující se koncentrací ZnO-NPs toxicita snižovala. K simulování environmentálně relevantního expozičního systému bylo v testu na filtračním papíře použito půdních extraktů namísto deionizované vody. Půdní extrakty výrazně snížily toxicitu ZnO-NPs, jelikož zvyšovaly stupeň jejich agregace. Použití filtračního papíru v kombinaci s půdními extrakty považovali autoři za vhodný postup, jak získat environmentálně relevantní informace o toxicitě nanočástic pro danou skupinu půdních organismů.



**Obrázek 3:** SEM obrázek ZnO-NPs v agaru připraveném s RW (a) a s DW (b), TEM obrázek nanočástic v deionizované vodě s HA (c) a bez HA (d), (Li et al. 2011)

Hrdá et al. (2016) studovali vliv dvou rozdílných metod vnášení nanočástic do expozičního média na toxicitu těchto nanočástic pro kroužkovce *Enchytraeus crypticus*. I v tomto případě byl jako médium použit agar. Agarózový gel byl vybrán jako testovací médium, neboť autoři předpokládali potlačení aglomerace nanočástic a zmírnění negativních dopadů tohoto procesu na výsledky testů ekotoxicity. První metoda byla založena na kryogenním mletí nanočástic ZnO (10 nm) se suchým agarem a následném přidání vody. Druhá metoda začala re-suspencí nanočástic (také 10 nm) v demineralizované vodě obsahující disperzant (pyrofosfát sodný dekahydrát). Získaný koloid byl následně smíchán s horkým agarovým gelem. Výsledky SEM analýzy agarů připravených s využitím kryogenního mletí ukázaly, že obsah velkých aglomerátů roste

se zvyšující se koncentrací ZnO-NPs. Relativní mortalita se v rozpětí koncentrací 50-1000 mg/kg pohybovala v rozmezí 28,9% a 34,4%, vykazovala nízkou reprodukovatelnost a nebyla závislá na dávce. V případě testů na agaru připraveném druhým způsobem (re-suspensace nanočástic a následné smíchání s horkým agarovým gelem), byla mortalita způsobena zejména požitím nanočástic a byla závislá na dávce. Test byl proveden v rozmezí dávek 50-1000 mg/kg a výsledná mortalita se pohybovala v rozmezí 0% a 66,7%. Rozpuštěné Zn<sup>2+</sup> ionty se na celkové toxicitě podílely minimálně.

Cui et al. (2014) se ve své studii věnovali fytotoxicitě CeO<sub>2</sub> nanočástic u *Lactuca sativa* var. *angustata* pěstovaném v agarovém expozičním médiu (0,5%). Také v případě testů fytotoxicity je v poslední době agar využíván, neboť poskytuje výhodu spočívající v potlačení agregace a rovnoměrnosti distribuce částic. Velikost a morfologie nanočástic použitých v testech, byly vyhodnoceny pomocí TEM. Testované částice vykazovaly průměr 7,1 ± 0,4 nm a zkrácený oktahedrální tvar. Během přípravy testovacího média byly suspenzí nanočástic naplněné Petriho misky rychle zmrazeny na - 20 °C. Tento postup byl zvolen kvůli zamezení agregace a srážení NPs. V rámci studia fytotoxických účinků byly sledovány růstové parametry (klíčení semen, růst výhonku, prodlužování kořene) a reakce na stres (aktivita superoxid dismutázy (SOD), aktivita peroxidázy (POD), hladina malondialdehydu (MDA)). Výsledky neukázaly žádné významné vlivy na klíčivost semen a růst výhonků ve všech testovaných koncentracích (0-2000 mg/L). Byla však prokázána inhibice prodlužování kořene u koncentrací vyšších než 500 mg/L. Při vyhodnocování stresových reakcí byla pozorována snižující se aktivita SOD při vysokých koncentracích (500, 1000 a 2000 mg/L) a lehce posílená aktivita peroxidázy (POD) ve všech koncentracích kromě 2000 mg/L. Dále byl pozorován významný nárůst hladin MDA a únik elektrolytů u vysokých koncentrací (500, 1000 a 2000 mg/L) což indikovalo poškození membrán kořenových buněk. V porovnání s deionizovanou vodou, byla biodostupnost CeO<sub>2</sub>-NPs v agarovém médiu redukována.

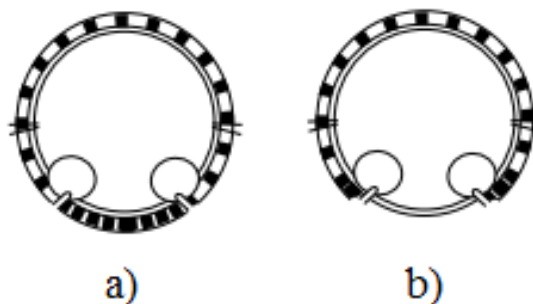
Použití agaru místo půdy nebo sedimentů poskytuje výhodu, zejména pokud jde o analýzu/charakterizaci nanočástic v expozičních médiích, snížení aglomerace a vyloučení interakcí s půdními složkami za účelem zaměření se na dopady nanočástic (Hrdá et al. 2016). Tyto studie jsou zatím v počátcích a vyžadují další pozornost.

## 2.4 Testovací organismus

### 2.4.1 Obecná charakteristika roupic

Čeď roupice (*Enchytraeidae*) patří do kmene kroužkovci (*Annelida*), třídy opaskovci (*Clitellata*) a podtřídy máloštětinatci (*Oligochaeta*), do které se dále zahrnují žížaly, žížalice a nitěnkovci (Šuteková 2006).

Půdní roupice jsou obvykle bezbarvé a dosahují délky okolo 1-40 mm. Jejich tělo se skládá z mnoha segmentů s kruhovým nebo sedlovým glandulárním pásem (clitellum) viz. **Obr. 4**. Počet segmentů se zvyšuje s věkem jedince. Na jednotlivých segmentech obvykle vyrůstá ze svazků různý počet štětín na rozdíl od prvního a posledního segmentu (Kobetičová 2011).



**Obrázek 4:** kruhové clitellum (a); sedlové clitellum (b) (Schmelz et Collado 2010)

Roupice mohou obývat pozemní, sladkovodní nebo mořské prostředí. Celosvětově je popsáno asi 900 druhů roupic. Ve střední Evropě je ve 20 rodech popsáno asi 200 až 300 druhů a jsou stále popisovány nové druhy. Roupice žijí hlavně v úzkém kontaktu s půdní pórovou vodou a tak je jejich vlhká pokožka velmi citlivá na vysychání. Jedná se o saprofágní živočichy, kteří se krmí převážně na rozpadajícím se organickém materiálu, mikroorganismech a houbách (Kobetičová 2011). K expozici chemickým látkám dochází buď pozřením kontaminované potravy anebo přes povrch těla z okolní pórové vody (Šuteková 2006).

Roupice jsou většinou hermafrodité. Obvyklý způsob rozmnožování těchto organismů spočívá ve vzájemné výměně spermatozoí mezi dvěma oboupohlavními jedinci (Peštová 2007). Některé druhy se rozmnožují prostřednictvím partenogeneze (např. *C. glandulosa*, *Buchholzia appendiculata*) (Jänsch et al. 2005). Další reprodukční strategií je fragmentace, kde je jednotlivec autonomně rozdělen do několika částí, z nichž každá regeneruje do kompletního jedince (např. *Enchytraeus fragmentosus*, *Enchytraeus japonensis* či *Cognettia sphagnetorum*) (Kobetičová 2011).

## 2.4.2 Ekologie roupic

Půdní červi jsou důležitými členy půdní komunity díky jejich schopnosti změnit své stanoviště nebo pomocí různých aktivit vytvářet nové stanoviště pro další organismy (Römbke et al. 2005). Roupice jsou nepostradatelné zejména v silně kyselých

oblastech (hlavně lesní půdy s nízkými hodnotami pH), kde se žížaly vyskytují jen zřídka anebo vůbec. V těchto oblastech dosáhnou roupice velmi vysokých hustot a patří k hlavnímu taxonu půdních kroužkovic (Kobetičová 2011). Přebírají zde hlavní funkce žížal v půdě a při rozkladných procesech (Peštová 2007). Podílejí se na tvorbě humusu, produkci exkrementů a napomáhají návratu živin do půdy, které jsou pak k dispozici rostlinám nebo jiným půdním rozkladačům. Červi také transportují minerální částice prostřednictvím jejich požití nebo zachycení na těle. Tímto způsobem jsou minerální částice přepravovány z hlubších vrstev na povrch půdy a organická hmota pak do vrstev hlubších, což může pomoci procesu dekompozice. Kromě toho roupice konzumují mikroorganismy, které obsahují imobilní živiny, a nepřímo tak přispívají k uvolnění živin v cyklu rozkladu (O'Connor 1967).

Roupice se vyskytují v nejsvrchnějších vrstvách půdy do hloubky přibližně 3-6 cm. Vertikální rozmístění roupic v prostředí je druhově závislé. (Peštová 2007). V kyselých půdách je počet roupic často vyšší než v půdách s neutrálním pH. Mezi další faktory ovlivňující jejich výskyt jakož i jejich reakce na stresové faktory patří obsah organických látek v půdě a půdní vlhkost (Römbke 2003).

Roupice jsou v půdní ekotoxikologii používány již od roku 1970. Rod *Enchytraeus* má relativně krátký životní cyklus ve srovnání s ostatními rody. Druhy rodu *Enchytraeus* se snadno chovají a jsou schopny produkovat dostatek jedinců pro zkoušky toxicity a pro udržení chovných kultur. Nejznámějším a jedním z největších druhů tohoto rodu je *Enchytraeus albidus*, který je jasně rozlišitelný od jiných druhů roupic. Vyskytuje se po celém světě v místech s velkým obsahem organických látek, zároveň ho lze nalézt i v lesích a polních lokalitách. Jedinci *E. albidus* se rychle rozmnožují, mohou být uchováváni v různých substrátech a krmeni širokou škálou potravin. Díky tomu jsou často využíváni jako modelový organismus při ekotoxikologických testech. Některé menší druhy rodu *Enchytraeus* jako *E. crypticus*, *E. buchholzi*, *E. luxuriosus*, *E. minutus*, *E. fragmentosus* a *E. bulbosus* jsou také vhodné testovací organismy (Römbke 2003). Často bývá v ekotoxikologických testech používán druh *E. crypticus* (**Obr. 5**). Ve srovnání s *E. albidus* se *E. crypticus* kultivuje v agarovém médiu. Dále má *E. crypticus* vyšší reprodukční rychlost, kratší generační dobu, kratší testovací období a v neposlední řadě širší rozsah tolerance k odlišným půdním vlastnostem (pH, textura a obsah organických látek) (Castro-Ferreira et al 2012).



**Obrázek 5:** *Enchytraeus crypticus* (foto Dominika Nováková)

### 3. Experimentální část

Ekotoxikologické testy a chov testovacího organismu probíhaly v laboratořích Centra materiálů a nanotechnologií (CEMNAT) a Ústavu environmentálního a chemického inženýrství (UEChI) Univerzity Pardubice. Cílem práce bylo prakticky vyzkoušet navržený postup úpravy agarového kultivačního média pro test ekotoxicity nanočástic na půdním kroužkovci *Enchytraeus crypticus*. Postup úpravy agarového média spočíval v přidavku dalších složek (kaolin, huminové kyseliny a kombinace obou těchto složek), které se běžně vyskytují v půdním prostředí a mohou mít vliv na biologickou dostupnost nanočástic a z nich uvolněných iontů pro organismy. Agarové expoziční médium bylo zvoleno především kvůli předpokladu, že při jeho vhodné přípravě dojde k rovnoměrnému rozptýlení nanočástic po celém objemu a dále ke snížení agregace ZnO-NPs.

#### 3.1 ZnCl<sub>2</sub> a nanočástice oxidu zinečnatého

V rámci experimentů, jejichž cílem bylo vyhodnotit ekotoxicitu Zn<sup>2+</sup> kationtu, byl používán chlorid zinečnatý bezvodý p. a. (PENTA, s. r. o.). Testované nanočástice o čistotě min. 99,5 % byly získány od společnosti Bochemie Group, a. s. ve formě nanoprášku. Průměr sférických částic byl výrobcem stanoven na 10 nm s rozsahem 5-50 nm. Nanočástice měly krystalickou strukturu (zincite).

#### 3.2 Chov testovacího organismu - roupice *Enchytraeus crypticus*

Roupice použité k založení chovu byly získány z Centra pro výzkum toxických látek v prostředí (RECETOX) na Masarykově univerzitě v Brně. Chov je v současnosti na pracovišti v Pardubicích udržován již přes 1 rok a je realizován v plastových Petriho miskách s ventilací (Fisherbrand, PS, aseptické, 90 x 14,2 mm), naplněných agarem (Agar přírodní, Dr. Hoffmann) (viz. **Obr. 6**). Chovný agar byl připravován z práškového agaru, destilované vody a z vodných roztoků solí: 0,1M NaHCO<sub>3</sub>; 0,01M KCl; 0,1M MgSO<sub>4</sub> (Lach-ner, s. r. o.) 0,2M CaCl<sub>2</sub> (PENTA, s. r. o.). Po přípravě bylo nutné chovný agar sterilizovat, což bylo prováděno při teplotě 120 °C za zvýšeného tlaku po dobu alespoň 30 minut v tlakovém hrnci (Barazzoni 5 L, elektrický vařič jednoblatný ETA 3109). Následně byl v digestoři za horka rozlit do Petriho misek. Po zchlazení byly roupice převedeny do agaru. Misky byly umístěny v termostatu (WTW TS 606 CZ/2) při teplotě 21 °C ve tmě. Roupice byly krmeny dvakrát týdně jemně namletými ovesnými vločkami. Krmení zároveň zajišťovalo dostatečný přísun čerstvého vzduchu. Ovesné vločky byly

nutné po namletí a jednou za 1–2 měsíce taktéž sterilizovat v sušárně (Memmert UN55 SingleDISPLAY) při teplotě 160–180 °C po dobu 2–6 hod. Roupice bylo nutné přesadit do čerstvého agarů jednou za 1–2 měsíce. Do testů byli vybíráni dospělí jedinci s viditelným opaskem. Při manipulaci s živými jedinci byl používán štěteček.



**Obrázek 6:** Chovná Petriho miska s *Enchytraeus crypticus* (foto Dominika Nováková)

### 3.3 Ekotoxikologické testy

Experimentální design ekotoxikologických testů, včetně testované koncentrační řady (50, 100, 250, 500, 750 a 1000 mg ZnO/kg agarů) vychází z diplomové práce Hrdá (2015). Ve zmíněné studii byla ekotoxicita ZnO-NPs testována v agarů na žížalících *Lumbriculus variegatus* a roupicích *Enchytraeus crypticus*.

V rámci mnou prováděné studie byly testovací organismy po dobu 96 hodin vystaveny působení  $\text{ZnCl}_2$  a ZnO-NPs v upraveném agarovém médiu. Sledovaným endpointem testů byla procentuálně vyjádřená mortalita testovacích organismů v porovnání s kontrolní skupinou. Hodnoty  $\text{LC}_{50}$  byly vypočítány pomocí programu GraphPad Prism 5 metodou nelineární regrese. Testování toxicity na roupicích bylo prováděno v plastových Petriho miskách, které byly naplněny 55 mL upraveného agarů (1,5%). K přípravě agarového média byla použita destilovaná voda a Agar přírodní, (Dr. Hoffmann). Každá koncentrace byla připravena ve třech opakováních, stejně jako



kontrolní skupina kultivovaná v agaru, k jehož přípravě byla použita destilovaná voda bez přídavku nanočástic a živných solí. Petriho misky byly v průběhu testu umístěny v termostatu při teplotě 21 °C a bez osvětlení. Po 96 hodinách byli spočítáni přeživší jedinci. Roupice, které nereagovali na mechanickou stimulaci, byly považovány za mrtvé.

### 3.4 Testy toxicity Zn<sup>2+</sup> kationtů

Před samotnými testy toxicity nanočástic byly zjišťovány účinky zinečnatých iontů. Za tímto účelem byl použit ZnCl<sub>2</sub> (PENTA, s. r. o.), především kvůli jeho dobré rozpustnosti ve vodě (396 g/100 mL při 20 °C). Nejprve byla testována koncentrační řada 1; 10; 20; 30 a 60 mg Zn/kg agaru. Toto koncentrační rozmezí bylo zvoleno proto, že v práci Hrdá (2015) byla zjištěna hodnota LC<sub>50</sub> 37,2 mg Zn/kg agaru (35,2-38,8). Agar byl připraven v Erlenmeyerových baňkách (250 mL), každá testovaná koncentrace vždy ve třech opakováních. Do baněk bylo převedeno odpovídající množství práškového agaru (0,83 g na misku při přípravě 1,5% agaru), destilovaná voda (55 mL na misku) a následně byl přidán ZnCl<sub>2</sub> (zásobní roztok potřebný k přípravě agaru o požadované koncentraci Zn<sup>2+</sup> byl do Erlenmeyerovy baňky dávkován vždy v objemu 1 mL). Následně bylo změřeno (pH metr VWR pH110) a pomocí 0,1M fosfátového pufru (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O, LACHEMA a. s.) upraveno pH směsi na neutrální hodnoty. Takto připravené směsi, včetně agaru pro negativní kontrolu bez přídavku ZnCl<sub>2</sub>, byly na magnetických míchačkách (IKA-RH basic 2; IKA-RH digital; VWR, VMS-C4; Heidolph MR Hei-Standard; Stuart UC152) zahřáty na 95 ± 5 °C a udržovány při této teplotě 30 minut. V předběžných testech bylo zjištěno, že snížení doby zahřívání a zvýšení teploty vede k dostatečné tuhosti agaru a proto byl agar připravován výše popsaným postupem. Poté byl agar rozlit do jednotlivých Petriho misek. Po ztuhnutí agaru byly pomocí skalpelu vytvořeny rýhy, z důvodu lepšího pronikání organismů do média. Do takto připraveného expozičního média byly následně nasazeny roupice, vždy 10 jedinců na testovací nádobu. Na základě výsledků prvního testu byly následně testovány koncentrace 2,5; 5; 7,5; 12,5; 15; 17,5 a 22,5 mg Zn/kg agaru.

Účinky zinečnatých iontů byly rovněž sledovány ve všech třech úpravách agarového média, tedy v agaru s přídavkem kaolinu (1%; Dr. Hoffmann), s přídavkem huminových kyselin (0,1%; Humatex, a.s.) a s přídavkem kombinace obou komponent, kdy výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.1. Koncentrace kaolinu a huminových kyselin, doporučené v normě 207 OECD (1984) pro test akutní toxicity na půdním červu, kde je popsáno složení umělé půdy, by byly pro naše experimenty příliš vysoké. Z tohoto důvodu jsem začala pouze s nižším přídavkem (0,55 g kaolinu, což odpovídá 1 % hm ve výsledném kultivačním médiu a 0,055 g huminových kyselin, což odpovídá 0,1 hm % ve výsledném kultivačním médiu) za účelem zjištění, zda i takto nízký přídavek ovlivní

chování nanočástic v agaru. Agar byl ve všech experimentech aplikován i na víčka Petriho misek, z důvodu zabránění úniku roupic z expozičního média a případně i jejich vyschnutí a úhynu.

### **3.5 Testy toxicity ZnO-NPs**

#### **3.5.1 Testy ZnO-NPs v upraveném agarovém médiu**

Způsob vnášení nanočástic spočíval v přípravě vodné disperze nanočástic, která byla poté přidána do horkého agaru. Tento způsob vnášení nanočástic byl zvolen na základě výsledků experimentů v práci Hrdá (2015), kde bylo zjištěno, že vnášení nanočástic v podobě vodné disperze vede k menší míře agregace nanočástic a k jejich lepšímu rozptýlení v agaru, než v případě použití alternativních technik (kryogenní mletí suchého agaru s nanočásticemi a následná příprava kultivačního média). Nejprve byly provedeny předběžné testy všech čtyř variant agarového média o koncentraci 1000 mg ZnO-NPs/kg agaru. Na základě výsledků předběžných testů byla pro následné experimenty zvolena koncentrační řada 50; 100; 250; 500; 750 a 1000 mg ZnO-NPs/kg agaru (což odpovídalo koncentracím 40; 80; 201; 402; 603 a 804 mg Zn/kg agaru). Tyto koncentrace odpovídaly koncentrační řadě použité v práci Hrdá (2015). Experimentálně bylo zjištěno, že nejlepší velikostní distribuce je dosaženo po 45 minutové sonikaci koloidního roztoku ZnO-NPs v přítomnosti dispergačního činidla pyrofosforečnanu sodného (0,02%  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ; SYNPO, a. s.). K charakterizaci takto připravené disperze ZnO-NPs byla použita metoda DLS (Brookhaven, ZetaPlus).

Z celkového objemu destilované vody potřebné na přípravu agaru byly 2/5 použity na přípravu disperze. Do tohoto objemu destilované vody byla převedena poloviční navážka dispergačního činidla (0,02%  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) a po jeho rozpuštění i navážka ZnO-NPs. Disperze byla poté umístěna na 45 minut do ultrazvukové lázně (Bandelin Sonorex Digitec). Mezitím bylo do Erlenmeyerových baněk (250 mL) naváženo odpovídající množství agaru, druhá polovina navážky dispergačního činidla, odpovídající množství dalších složek (0,55 g kaolinu, což odpovídá 1 % hm ve výsledném kultivačním médiu; 0,055 g huminových kyselin, což odpovídá 0,1 % hm ve výsledném kultivačním médiu) a přidáno zbývající množství destilované vody. Koncentrace kaolinu a huminových kyselin doporučené v normě 207 OECD (1984) pro test akutní toxicity na půdním červu, kde je popsáno složení umělé půdy, by byly pro mé experimenty příliš vysoké. Z toho důvodu jsem začala pouze s nižším přídatkem (1% kaolin, 0,1% huminové kyseliny) za účelem zjištění, zda i takto nízký přídatek ovlivní chování nanočástic v agaru. V testech s agarovým médiem, upraveným pomocí kaolinu, bylo do Erlenmeyerových baněk ještě přidáváno odpovídající množství červeného

potravinářského barviva (Babeta), z důvodu lepší viditelnosti testovacího organismu při vyhodnocování testů. Dispergant byl přidán i do agaru kontrolní skupiny. I v tomto případě bylo změřeno a upraveno pH směsi na neutrální hodnoty. Agar byl za stálého míchání zahřát na  $95 \pm 5$  °C. Po 15 minutách od dosažení teploty 95 °C byla zbývajících 15 minut do agaru po kapkách přilévána disperze ZnO-NPs (**Obr. 7**). Poté byl agar rozlit do jednotlivých testovacích nádob a po jeho ztuhnutí byly pomocí skalpelu vytvořeny do agaru rýhy. Do takto připraveného expozičního média byly následně nasazeny roupice, vždy 20 jedinců na testovací nádobu. I v případě experimentů s nanočásticemi byl agar taktéž ve všech experimentech aplikován i na víčka Petriho misek.



**Obrázek 7:** Příprava upraveného agarového média s testovanými koncentracemi ZnO-NPs (foto Dominika Nováková)

K charakterizaci nanočástic v agaru byla použita skenovací elektronová mikroskopie (SEM). K analýze byly připraveny vzorky o koncentracích 50 mg ZnO-NPs/kg a 1000 mg ZnO-NPs/kg ve všech čtyřech variantách úpravy agarového média, tedy čistý agar, s přidavkem kaolinu (1%), s přidavkem huminových kyselin (0,1%) a kombinací obou (1% kaolin a 0,1% huminové kyseliny). Vzorky byly připraveny rozlitím horkého agaru mezi sklíčka, vysušením vzorku a následně zvýšením vodivosti povrchu vzorku jeho pozlacením. Vzorky byly lyofilizovány při teplotě  $\leq -50$  °C a voda z nich byla sublimována při tlaku  $\leq 60$  Pa po dobu minimálně 6 hodin. Následně byly pozlacené vzorky analyzovány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu SEM JEOL JSM-5500LV vybaveným rentgenovým energiově disperzním (EDX) mikroanalyzátozem IXRF Systems (detektor GRESHAM Sirius 10).

Vlastní měření probíhalo za nízkého urychlovacího napětí 10 kV pro zvýšení povrchové citlivosti. K analýze chemického složení pozorovaných objektů byla použita metoda EDX. Pro ověření distribuce a míry aglomerace ZnO v analyzovaných vzorcích byly vyšetřovány vždy pozorované útvary různých velikostí a také plocha vzorku.

### 3.5.2 Test toxicity supernatantu ZnO-NPs

Aby bylo možné odlišit toxicitu ZnO-NPs od účinků iontů, které se mohou uvolňovat z povrchu částic zejména v průběhu přípravy kultivačního média, byl proveden test toxicity supernatantu. Testovaný supernatant byl získán odstředěním primárního koloidu ZnO-NPs používaného pro přípravu média o koncentraci 1000 mg ZnO-NPs/kg agaru. Z celkového objemu destilované vody potřebné na přípravu agaru byly 2/5 použity na přípravu supernatantu. Do tohoto objemu destilované vody byla převedena poloviční navážka dispergačního činidla (tedy 0,0165 g pyrofosforečnanu sodného) a po jeho rozpuštění i navážka ZnO-NPs. Disperze byla poté umístěna na 45 minut do ultrazvukové lázně a poté následovala centrifugace po dobu 2 hodin (EPPENDORF, Centrifuge 5804 R, teplota 20 °C, RPM 11000, akcelerace 5, brždění 2). Koncentrace  $Zn^{2+}$  v supernatantu byla měřena pomocí optické emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu (ICP-OES). Výsledná koncentrace Zn v supernatantu byla 36 mg Zn/L. Z tohoto supernatantu byl dále připraven agar o koncentraci 13 mg Zn/kg. V přípravě kultivačního média jsme postupovali stejným způsobem, který je popsán v kapitole 3.5.1.

Dále byl sledován vliv zahřívání na koncentraci  $Zn^{2+}$  v supernatantu. Byl připraven primární koloid o koncentracích, které byly dříve použity (viz kapitola 3.5.1), k přípravě agarových médií o koncentraci 50; 100; 250; 500; 750; 1000 mg ZnO-NPs/kg agaru. Skutečné koncentrace ZnO-NPs v odstředěných roztocích byly 138; 275; 688; 1375; 2063 a 2750 mg ZnO-NPs/L, což odpovídalo 111; 221; 553; 1105; 1658 a 2210 mg Zn/L. Primární koloid byl připraven ve dvou opakováních. Nejprve bylo naváženo odpovídající množství dispergačního činidla (0,02%  $Na_2P_2O_7 \cdot 10H_2O$ ) a po jeho rozpuštění ve 2/5 celkového objemu destilované vody (50 mL) bylo převedeno i odpovídající množství ZnO-NPs. Disperze byla poté umístěna na 45 minut do ultrazvukové lázně a poté následovala centrifugace po dobu 2 hodin (EPPENDORF, Centrifuge 5804 R, teplota 20 °C, RPM 11000, akcelerace 5, brždění 2). Jeden z primárních koloidů byl ještě před centrifugací zahřát na 95 °C a udržován při této teplotě po dobu 15 minut. Poté byly všechny vzorky analyzovány pomocí ICP-OES.

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Testy toxicity Zn<sup>2+</sup> kationtů

Výsledky testů toxicity Zn<sup>2+</sup> kationtů pro *Enchytraeus crypticus* v čistém agaru jsou uvedeny v **Tab. 17**. Během testů byla pozorována 100% mortalita při koncentracích 30 a 60 mg Zn/kg agaru. V negativní kontrole bez přídavku ZnCl<sub>2</sub> nebyla pozorována žádná mortalita. Normalizovaná mortalita byla vypočítána podle rovnice:

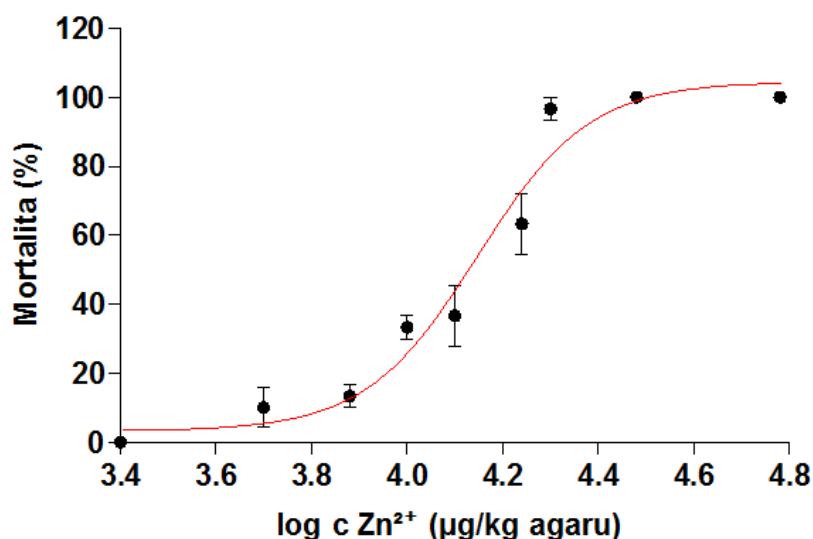
$$\text{Normalizovaná mortalita (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{Počet živých jedinců v testovací nádobě}}{\text{Počet živých jedinců v kontrolní skupině}} * 100 \right)$$

**Tabulka 17:** Normalizovaná mortalita *E. crypticus* (%) v závislosti na koncentraci Zn<sup>2+</sup>

<b>koncentrace Zn (mg/kg agaru)</b>	kontrola	1	2,5	5	7,5	10	12,5	17,5	20	30	60
<b>Nm (%)</b>	0	0	0	10	13	33	37	63	97	100	100
<b>SD (%)</b>	0	0	0	8,2	4,7	4,7	12,5	12,5	4,7	0	0

Nm = normalizovaná mortalita, SD = směrodatná odchylka

Hodnoty LC<sub>50</sub> byly vypočítány pomocí programu GraphPad Prism 5 metodou nelineární regrese. Hodnota LC<sub>50</sub> pro *E. crypticus* v čistém agaru byla vypočtena na 14 mg Zn/kg agaru (12,5-15,8). Hodnota koeficientu determinace R se rovnala 0,944. **Obr. 8** znázorňuje křivku dávka-účinek popisující vliv Zn<sup>2+</sup> na mortalitu *E. crypticus*. Z křivky je patrný trend, kdy se zvyšující se koncentrací roste i mortalita testovaného organismu.



**Obrázek 8:** Křivka dávka-účinek pro *E. crypticus*

Výsledky testů toxicity Zn<sup>2+</sup> kationtů pro *E. crypticus* provedené v jednotlivých typech upraveného agarového média jsou uvedeny v **Tab. 18**. Negativní kontroly byly kultivovány vždy v odpovídajícím typu upraveného agaru bez přídavku Zn<sup>2+</sup>. Úmrtnost v kontrolních skupinách byla vždy < 20 %. Z výsledků je pak patrné, že při nízkých koncentracích se mortalita pohybuje v podobných hladinách. K nejstrmějšímu nástupu toxických účinků dochází v agaru s huminovými kyselinami při koncentraci 15 mg Zn/kg.

**Tabulka 18:** Normalizovaná mortalita *E. crypticus* v jednotlivých modifikacích agaru (%) v závislosti na koncentraci Zn<sup>2+</sup>

koncentrace Zn (mg/kg agaru)	agar + kaolin		agar + HA		agar + kaolin + HA	
	Nm (%)	SD (%)	Nm (%)	SD (%)	Nm (%)	SD (%)
kontrola	3	4,9	0	0	3	4,9
1	13	4,9	0	0	17	12,9
7,5	13	4,9	0	0	10	8,4
15	17	4,9	7	9,4	17	4,9
22,5	20	0	3	4,7	13	4,9
30	27	12,8	17	9,4	40	14,6

Nm = normalizovaná mortalita, SD = směrodatná odchylka

Pro stanovení LC<sub>50</sub> v upraveném agaru by bylo zapotřebí rozšíření koncentrační řady. Z výsledků, které jsem získala, je však patrné, že přídavek půdních složek snížil

toxicitu zinečnatého kationtu pro *E. crypticus*. Rozsah koncentrací  $Zn^{2+}$  v upravených agarových médiích byl zvolen na základě výsledků dříve zmíněného testu na  $LC_{50}$  prováděném v neupraveném agaru. Tento rozsah pokrýval koncentrační oblast, ve které se při experimentech v neupraveném agaru pohybovala mortalita v rozmezí 0 – 100 %.

V práci Hrdá et al. (2016) byla testována akutní toxicita zinečnatého kationtu v agarovém kultivačním médiu na *Enchytraeus crypticus*. Autoři studie uvádí výslednou hodnotu  $LC_{50}$  37,2 (35,5-38,8) mg Zn/kg agaru. Mé výsledky ukazovaly na vyšší toxicitu  $Zn^{2+}$  ( $LC_{50}$  14 mg Zn/kg) než v případě Hrdé et al. (2016). Tyto rozdíly mohly být způsobeny použitím agaru od jiného výrobce a také jeho rozdílnou koncentrací, kdy byl v mém případě zinečnatý kationt testován v 1,5% agaru, kdežto v případě studie Hrdé et al. (2016), byl použit 2% agar. Porovnáme-li výsledné toxické účinky u nejvyšší testované koncentrace (tedy 30 mg Zn/kg), je patrné snížení toxicity po přidání půdních složek, kdy toxicitu nejvíce snížily huminové kyseliny (viz. **Tab. 19**).

**Tabulka 89:** Normalizovaná mortalita v upravených agarech pro *E. crypticus* při koncentraci 30 mg Zn/kg

kultivační médium	čistý agar	agar + kaolin + HA	agar + kaolin	agar + HA
Nm (%)	100	40	27	17
SD (%)	0	14,6	12,8	9,4

Nm = normalizovaná mortalita, SD = směrodatná odchylka

Publikací, kde by byly diskutovány výsledky testů toxicity  $Zn^{2+}$  pro půdní kroužkovce v agarovém médiu není mnoho, proto pro srovnání uvádím výsledky získané při testech v půdách (viz. **Tab. 20**).

**Tabulka 20:** Hodnoty  $LC_{50}$  pro půdní kroužkovce získané při testování akutních účinků  $Zn^{2+}$  v půdě

testovací organismus	akutní toxicita (mg Zn/kg suché půdy)	autoři
<i>Eisenia fetida</i>	1340	Lock et Janssen (2003)
<i>Eisenia fetida</i>	1598 (1460-1760)	Spurgeon et al. (1997)
<i>Enchytraeus albidus</i>	72,6 (58,1-84,9)	Novais et al. (2011)
<i>Enchytraeus albidus</i>	603	Lock et Janssen (2003)

Rozdílné toxické účinky  $Zn^{2+}$  pro *Eisenia fetida* a *Enchytraeus albidus* mohou být způsobeny citlivostí těchto organismů. Ačkoli se v obou případech jedná o organismy,

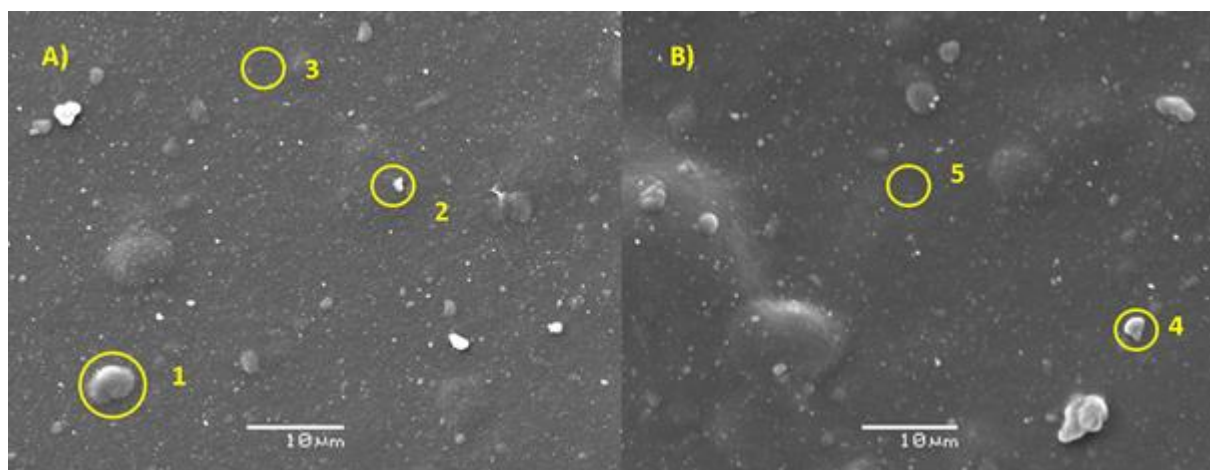
kteřé plní v ekosystému půd podobnou funkci, svou fyziologií se liší. García-Gómez et al. (2014) ve své studii pozorovali 98% inhibici produkce kokonů u *Eisenia fetida* pro  $ZnCl_2$  při koncentraci 1000 mg  $ZnCl_2$ /kg zemědělské půdy, ve které byly experimenty provedeny. Phipps et al. (1995) ve své studii sledovali toxicitu zinečnatého kationtu pro *Lumbriculus variegatus* ve vodním prostředí. Výsledná hodnota  $LC_{50}$  byla 3 mg/L. V práci Posthuma et al. (1997) byla sledována akutní toxicita  $Zn^{2+}$  na *Enchytraeus crypticus* s výslednou hodnotou  $LC_{50}$  336 (266-425) mg Zn/kg suché půdy. Toxicita  $Zn^{2+}$  pro půdní organismy zjištěná ve vodním prostředí je typicky vyšší než toxicita zjištěná v agarovém médiu. Agarové médium obsahuje polysacharidy (agaróza, agropéktin), které mohly interagovat se  $Zn^{2+}$  ionty a snížit tak jejich biologickou dostupnost. Půda pak představuje komplexnější médium, kdy její jednotlivé složky a fyzikálně-chemické procesy v ní ovlivňují toxicitu  $Zn^{2+}$ . Ve výsledku pak není toxicita tak vysoká jako v případě agarového či vodního média, což je patrné i z jednotlivých studií, kdy se výsledky řádově lišily. Vliv na toxické účinky má i složení půd, což dokazují řádově rozdílné výsledky hodnot  $LC_{50}$  ve studiích Novais et al. (2011) a Lock et Janssen (2003) viz. **Tab. 20**. Autoři Novais et al. (2011) ke svým experimentům použili umělou OECD půdu, kdežto Lock et Janssen (2003) prováděli testy ve standardní přírodní půdě LUFA 2.2, která podporuje biologickou dostupnost kovů. I v mém případě došlo ke snížení toxicity po přidání jednotlivých půdních složek do agaru, kdy toxicitu nejvíce snížila přítomnost huminových kyselin. Huminové kyseliny mají schopnost sorbovat těžké kovy vytvářením komplexů s funkčními skupinami (COOH, C=O, -OH) vázanými na povrchu huminových kyselin (Tang et al. 2014), což mohlo být důvodem snížení biologické dostupnosti  $Zn^{2+}$  a následně i toxicity v agaru.



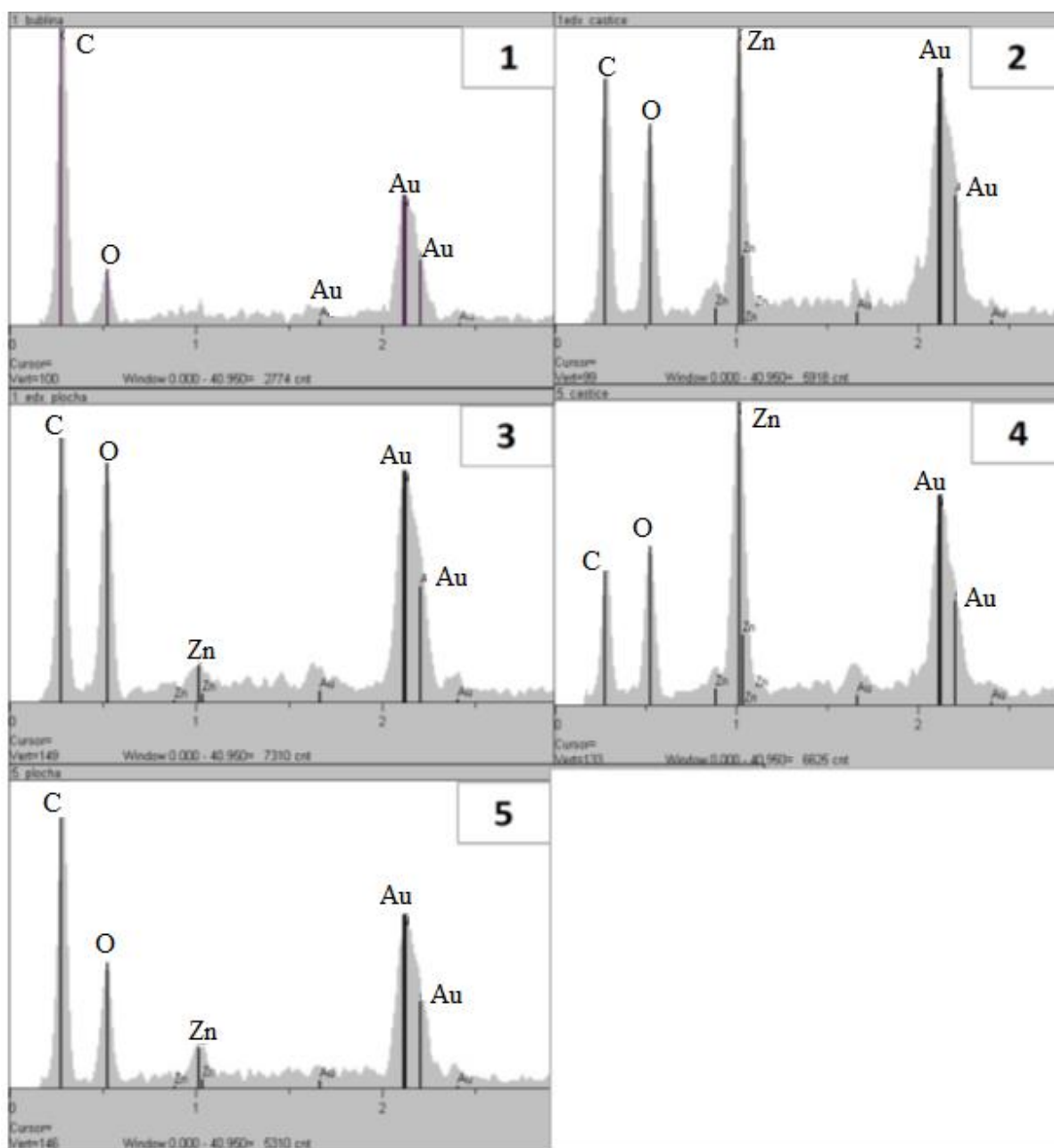
## 4.2 Testy toxicity ZnO-NPs v čistém agaru

### 4.2.1 Charakterizace ZnO-NPs v čistém agaru

K charakterizaci nanočástic v agaru byl použit skenovací elektronový mikroskop (SEM) vybavený energiově disperzním rentgenfluorescenčním (EDX) mikroanalyzátozem. Ve vzorcích byly pozorovány vždy tzv. „boule“ agaru. Analýza chemického složení těchto útvarů pomocí EDX odhalila, že neobsahují detekovatelný zinek. Dále byly v obou analyzovaných vzorcích pozorovány malé aglomeráty ZnO-NPs ( $A < 1 \mu\text{m}$ ,  $B > 1 \mu\text{m}$ ; viz. **Obr. 10**), jak naznačuje intenzita čáry zinku na spektrech 2 a 4. Analýza plochy vzorků ukázala, že v obou vzorcích jsou ZnO-NPs dispergovány v celém objemu agaru, což je patrné z poměru intenzit čar uhlíku a zinku na spektrech 3 a 5. Útvary pozorované na povrchu vzorků mají na SEM odlišnou intenzitu signálu, která souvisí s topologií povrchu a ne se změnou chemického složení (**Obr. 9**).



**Obrázek 9:** Snímky agaru s koncentracemi nanočástic 50 (A) a 1000 mg ZnO-NPs/kg agaru (B) pořízené SEM, zvětšení 2000x.



**Obrázek 10:** Výstup z EDX analýzy s příklady spekter analyzovaných útvarů: (1) boule agaru, (2) částice, (3) plocha, (4) částice, (5) plocha

#### 4.2.2 Toxicita ZnO-NPs v čistém agaru

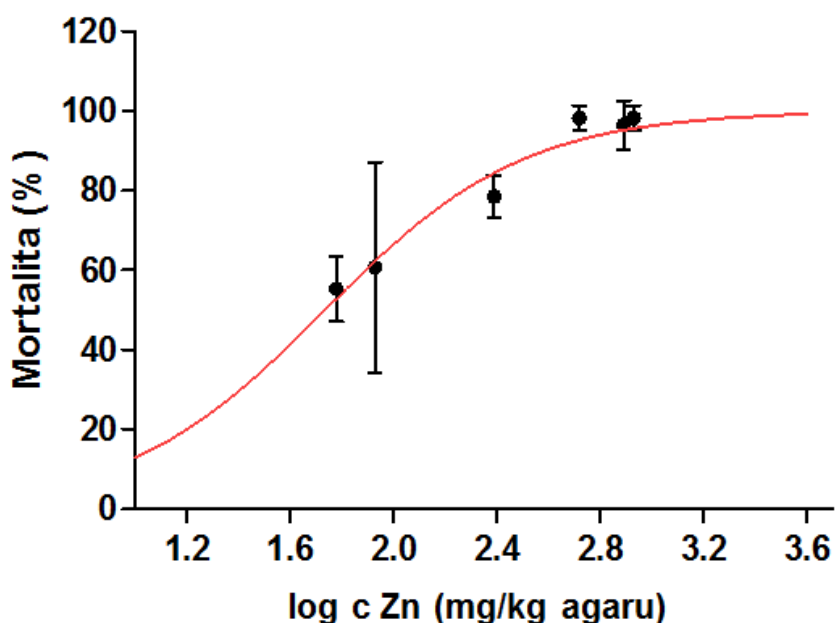
Výsledky testu toxicity ZnO-NPs pro *E. crypticus* v čistém agaru jsou uvedeny v **Tab. 21**. V žádné z testovaných koncentrací nebyla pozorována 100% mortalita. Normalizovaná mortalita byla ve všech případech ZnO-NPs vypočtena pomocí rovnice uvedené v kapitole 4.1.

**Tabulka 21:** Normalizovaná mortalita *E. crypticus* v čistém agaru (%) v závislosti na koncentraci Zn.

koncentrace Zn (mg/kg agaru)	kontrola	40	80	201	402	603	804
Nm (%)	7	55	61	79	98	96	98
SD (%)	2,4	6,7	21,6	4,4	2,5	5,1	2,5

Nm = normalizovaná mortalita, SD = směrodatná odchylka

Hodnoty LC<sub>50</sub> byly vypočítány pomocí programu GraphPad Prism 5 metodou nelineární regrese. Hodnota LC<sub>50</sub> pro *E. crypticus* v čistém agaru byla vypočtena na 54,4 mg ZnO-NPs/kg agaru (36-82,4), což odpovídá 43,7 mg Zn/kg agaru (28,9-66,2). V tomto případě byla hodnota koeficientu determinace R 0,738, což byla nižší hodnota než u Zn<sup>2+</sup> v čistém agaru. **Obr. 11** znázorňuje křivku dávka-účinek popisující vliv ZnO-NPs na mortalitu *E. crypticus*.

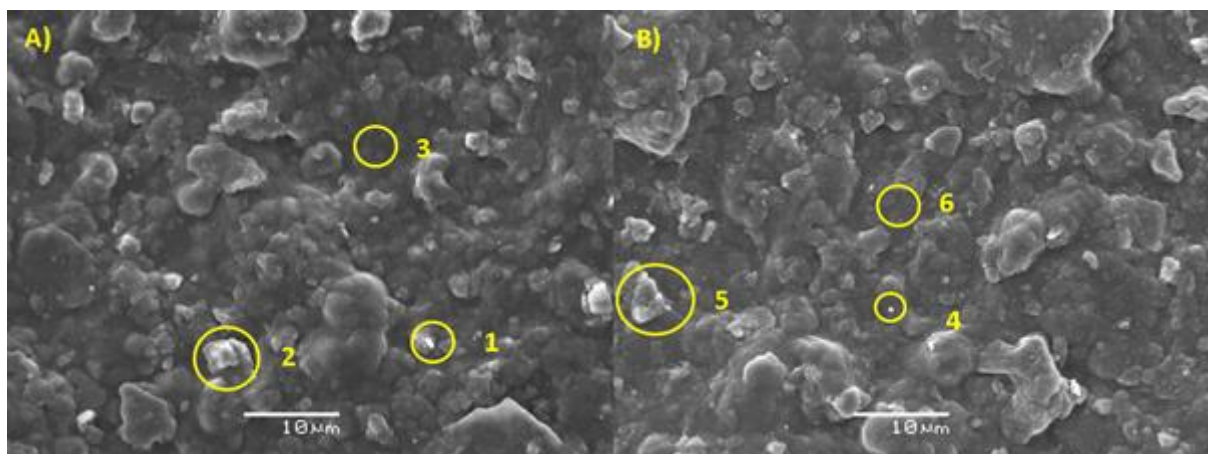


**Obrázek 11:** Křivka dávka-účinek pro *E. crypticus* v čistém agaru

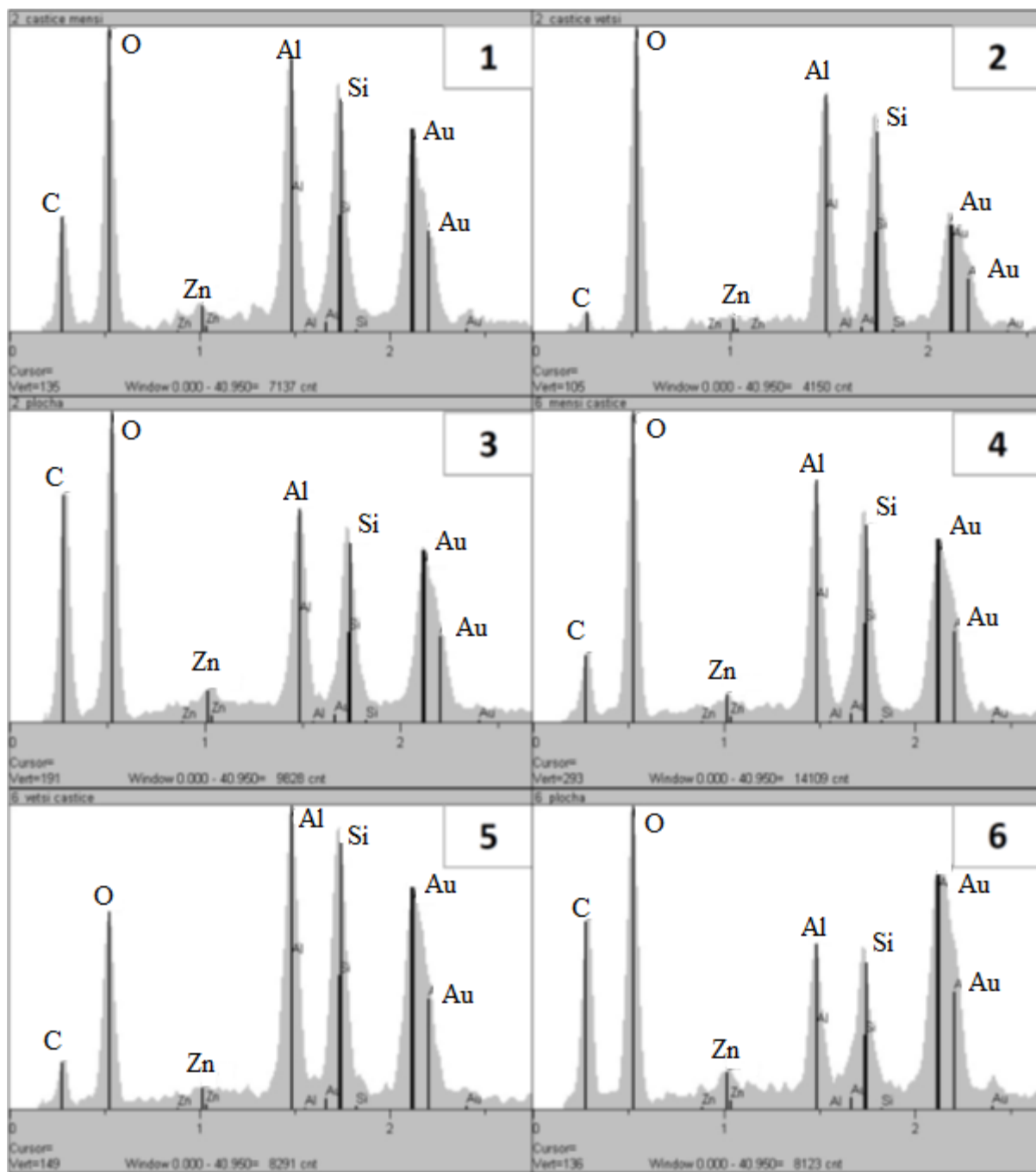
## 4.3 Testy toxicity ZnO-NPs v agaru s přidavkem kaolinu

### 4.3.1 Charakterizace ZnO-NPs v agaru s přidavkem kaolinu

V agaru obsahujícím kaolin byly pozorovány různě velké útvary (viz. **Obr. 12**), které vždy vykazovaly vyšší intenzity čar křemíku a hliníku v porovnání se zinkem, což vede k závěru, že se nejednalo o aglomeráty ZnO-NPs nýbrž zejména o útvary kaolinu (viz spektra 1, 2, 4, 5; viz. **Obr. 13**). V těchto vzorcích nebyly na rozdíl od vzorků ZnO-NPs dispergovaných v čistém agaru nalezeny rozměrnější aglomeráty a plošná koncentrace zinku k uhlíku byla podobná v hladké ploše vzorku i v kaolinových útvarech, jak ukazují intenzity čar na spektrech 3 a 6. Z těchto skutečností lze usuzovat, že v přítomnosti kaolinu jsou nanočástice lépe dispergované oproti čistému agaru a zdá se, jakoby byly nanočástice během přípravy agaru obalovány kaolinem. Tento fakt mohl být důvodem ke snížení jejich biologické dostupnosti a následně toxicity.



**Obrázek 12:** Snímky agaru s kaolinem s koncentracemi nanočástic 50 (A) a 1000 mg ZnO-NPs/kg agaru (B) pořízené SEM, zvětšení 2000x.



**Obrázek 13:** Výstup z EDX analýzy s příklady spekter analyzovaných útvarů: (1) malá částice (2) velká částice (3) plocha, (4) malá částice, (5) velká částice (6) plocha

### 4.3.2 Toxicita ZnO-NPs v agaru s přidavkem kaolinu

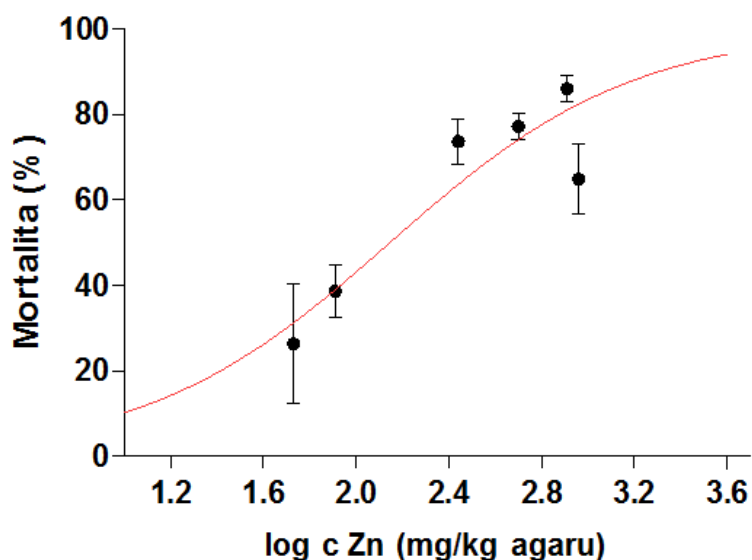
Výsledky testu toxicity ZnO-NPs pro *E. crypticus* v agaru s přidavkem kaolinu jsou uvedeny v **Tab. 22**. Stejně jako v případě čistého agaru i zde nebyla pozorována 100% mortalita v žádné z testovaných koncentrací.

**Tabulka 22:** Normalizovaná mortalita *E. crypticus* v agaru s přidavkem kaolinu (%) v závislosti na koncentraci Zn.

koncentrace Zn (mg/kg agaru)	kontrola	40	80	201	402	603	804
Nm (%)	5	19	39	74	77	86	65
SD (%)	4,1	2,5	5	4,3	2,5	2,5	6,6

Nm = normalizovaná mortalita, SD = směrodatná odchylka

Hodnoty LC<sub>50</sub> byly vypočítány stejným postupem jako v případě čistého agaru. Výsledná hodnota LC<sub>50</sub> pro *E. crypticus* v agaru s přidavkem kaolinu byla vypočtena na 139,9 mg ZnO-NPs/kg agaru (96,6-202,4), což odpovídá 112,4 mg Zn/kg agaru (77,7-162,7). Hodnota koeficientu determinace R byla 0,768, což byla nevýznamně vyšší hodnota než v případě nanočástic v čistém agaru. **Obr. 14** znázorňuje křivku dávka-účiněk popisující vliv ZnO-NPs na mortalitu *E. crypticus*.

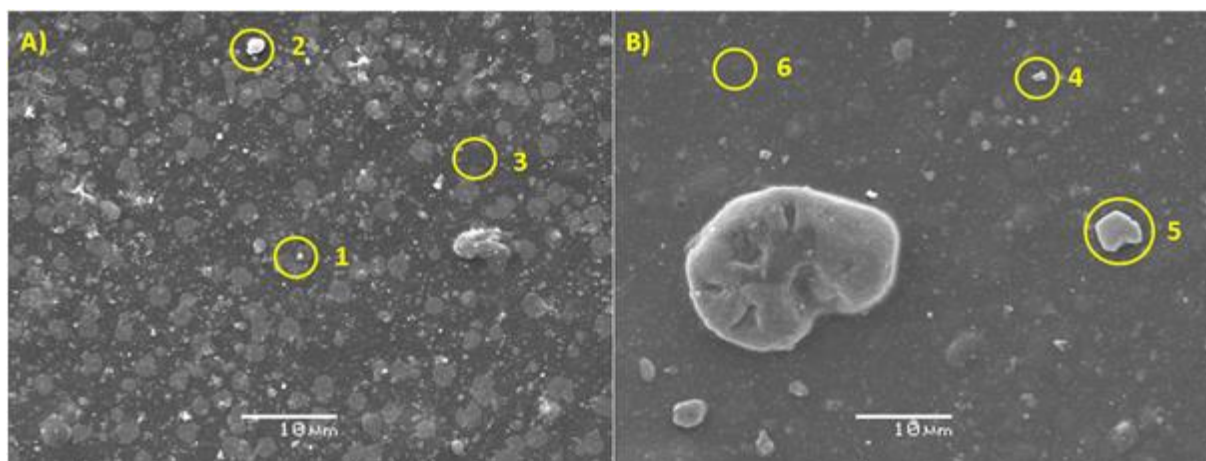


**Obrázek 14:** Křivka dávka-účiněk pro *E. crypticus* v agaru s kaolinem

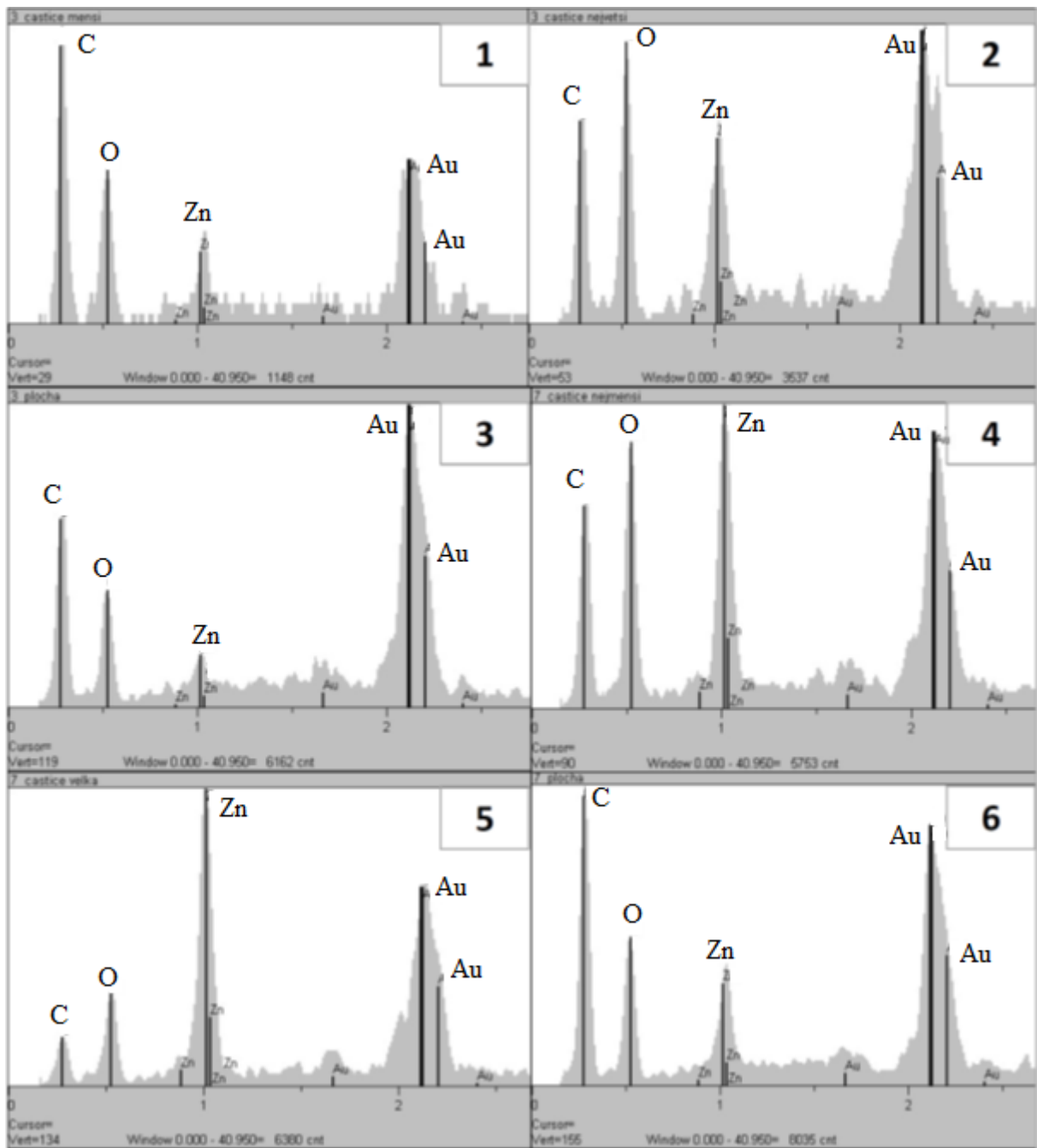
## 4.4 Testy toxicity ZnO-NPs v agaru s přidavkem huminových kyselin

### 4.4.1 Charakterizace ZnO-NPs v agaru s přidavkem huminových kyselin

V přítomnosti huminových kyselin bylo chování ZnO-NPs naprosto odlišené od chování těchto částic v přítomnosti kaolinu. V těchto vzorcích byly pozorovány větší aglomeráty ZnO-NPs ( $> 1 \mu\text{m}$ ; viz. **Obr. 15**), nicméně v menší plošné hustotě, než tomu bylo u čistého agaru. Tvorba větších aglomerátů mohla být způsobena schopností huminových kyselin sorbovat těžké kovy vytvářením komplexů s funkčními skupinami vázanými na povrchu huminových kyselin. I v tomto případě byl zinek detekován i mimo útvary v ploše agaru. Relativní koncentrace zinku k uhlíku v ploše byla vyšší (viz spektra 3 a 6) než tomu bylo v případě čistého agaru, což naznačuje, že větší množství ZnO-NPs bylo dispergováno v objemu agaru (viz. **Obr. 16**).



**Obrázek 15:** Snímky agaru s HA s koncentracemi nanočástic 50 (A) a 1000 mg ZnO-NPs/kg agaru (B) pořízené SEM, zvětšení 2000x



**Obrázek 16:** Výstup z EDX analýzy s příklady spekter analyzovaných útvarů: (1) malá částice (2) velká částice (3) plocha, (4) malá částice, (5) velká částice (6) plocha



#### 4.4.2 Toxicita ZnO-NPs v agaru s přidavkem huminových kyselin

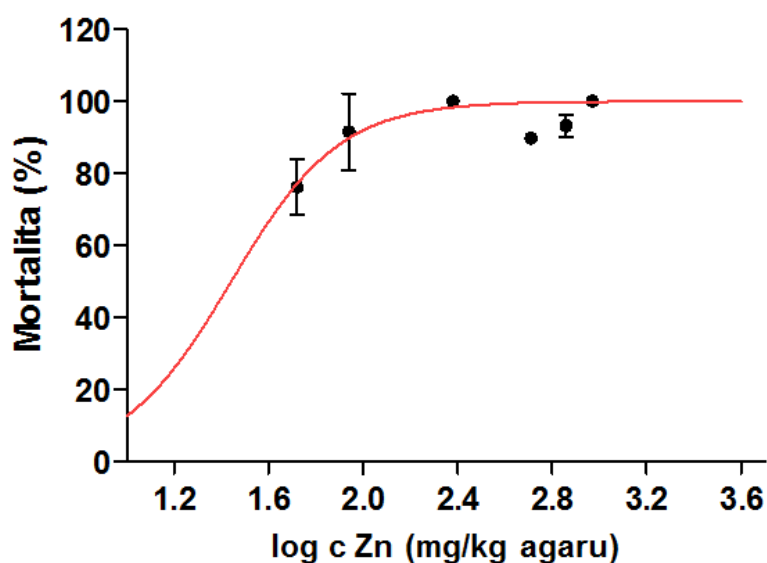
V testu toxicity ZnO-NPs pro *E. crypticus* v agaru s přidavkem huminových kyselin byly získány neobvyklé výsledky (viz. **Tab. 23**). Již při nejnižší testované koncentraci byla toxicita v porovnání s agarem s přidavkem kaolinu vysoká. Během testování byla pozorována 100% úmrtnost při koncentracích 201 a 804 mg Zn/kg agaru.

**Tabulka 23:** Normalizovaná mortalita *E. crypticus* v agaru s přidavkem huminových kyselin (%) v závislosti na koncentraci Zn.

koncentrace Zn (mg/kg agaru)	kontrola	40	80	201	402	603	804
Nm (%)	2	76	92	100	90	93	100
SD (%)	2,4	6,3	8,6	0	0	2,4	0

Nm = normalizovaná mortalita, SD = směrodatná odchylka

Při výpočtu hodnoty  $LC_{50}$  jsme postupovali stejně jako v předchozích případech (viz kapitola 4.2.2). Hodnota  $LC_{50}$  pro *E. crypticus* v agaru s přidavkem HA byla vypočtena na 27,7 mg ZnO-NPs/kg agaru (13,1-58,7). Tato hodnota odpovídala 22,2 mg Zn/kg agaru (10,5-47,1). Hodnota koeficientu determinace R se rovnala 0,471. **Obr. 17** znázorňuje křivku dávka-účinek popisující vliv ZnO-NPs na mortalitu *E. crypticus*. Tvar křivky naznačuje razantnější průběh toxického účinku, kdy při nejnižší testované koncentraci byla toxicita vyšší, než tomu bylo v ostatních úpravách agaru.

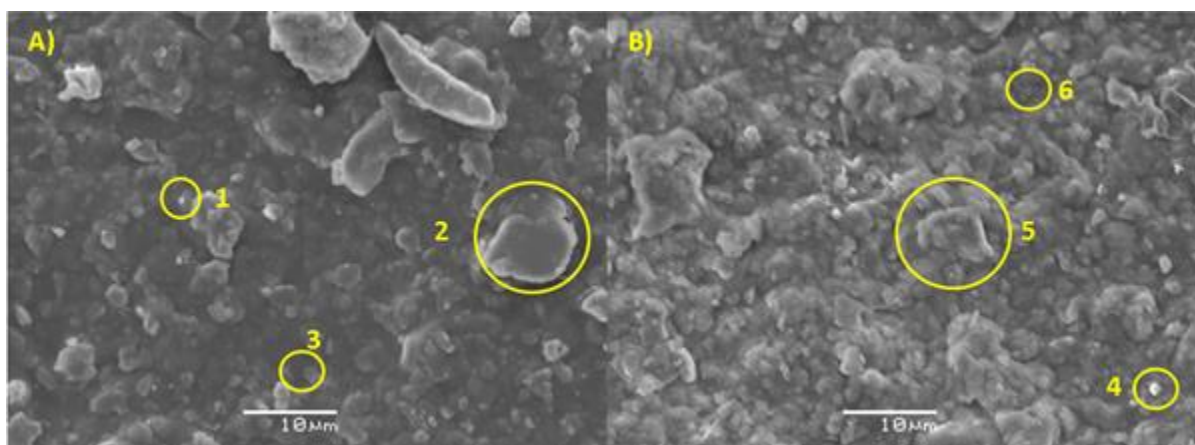


**Obrázek 17:** Křivka dávka-účinek pro *E. crypticus* v agaru s HA

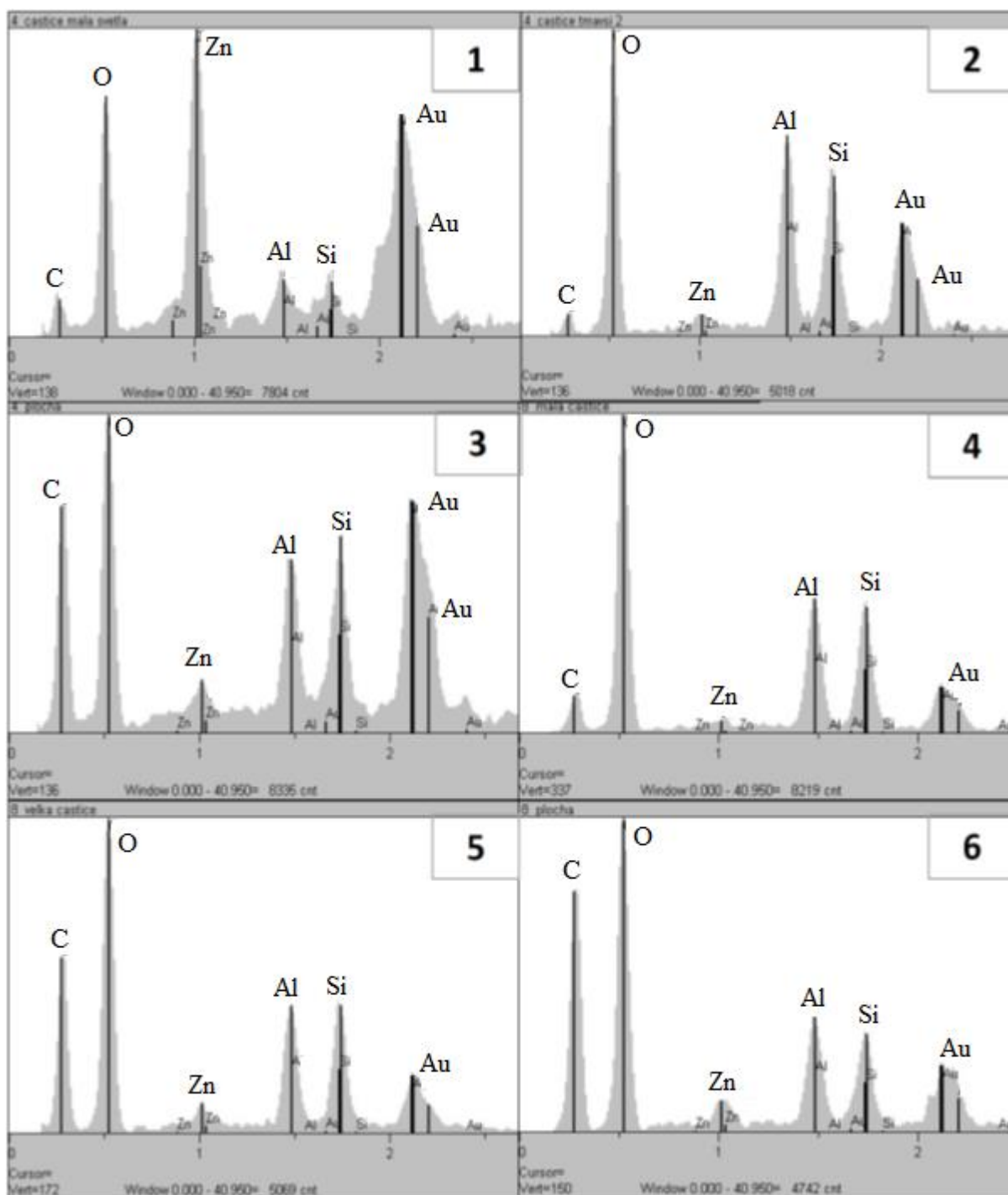
## 4.5 Testy toxicity ZnO-NPs v agaru s přidavkem kaolinu a huminových kyselin

### 4.5.1 Charakterizace ZnO-NPs v agaru s přidavkem kaolinu a huminových kyselin

Ve vzorcích agaru obsahujících kaolin a huminové kyseliny bylo pozorováno obdobné chování ZnO-NPs, jako v případě agaru s kaolinem, jakoby docházelo k obalování nanočástic kaolinem. Tím mohla být snížena jejich biologická dostupnost a posléze toxicita. Spektra ukazují (2, 4, 5), že pozorované útvary (viz. **Obr. 18**) byly opět tvořeny kaolinem, a že ZnO-NPs byly detekovány v celém objemu agaru (3, 6; viz. **Obr. 19**). V tomto případě byly nalezeny velmi malé aglomeráty ZnO-NPs ( $< 1 \mu\text{m}$ ), jak ukazuje spektrum 1, nicméně, velikost a počet aglomerátů byl stále menší, než v případě čistého agaru a agaru s huminovými kyselinami.



**Obrázek 18:** Snímky agaru s kaolinem a HA s koncentracemi nanočástic 50 (A) a 1000 mg ZnO-NPs/kg agaru (B) pořízené SEM, zvětšení 2000x.



**Obrázek 19:** Výstup z EDX analýzy s příklady spekter analyzovaných útvarů: (1) malá částice (2) velká částice (3) plocha, (4) malá částice, (5) velká částice (6) plocha

#### 4.5.2 Toxicita ZnO-NPs v agaru s přidavkem kaolinu a huminových kyselin

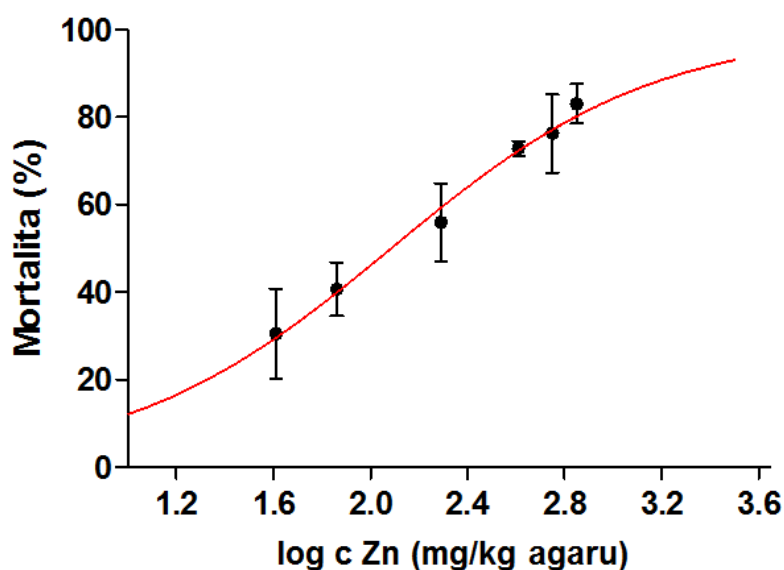
Výsledky testu toxicity ZnO-NPs pro *E. crypticus* v agaru s přidavkem kaolinu a huminových kyselin jsou uvedeny v **Tab. 24**. Během testování nebyla pozorována 100% úmrtnost v žádné testované koncentraci, stejně jako tomu bylo i v případě testů v čistém agaru a v agaru s přidavkem kaolinu. Stoprocentní mortalita byla pozorována pouze v případě agaru s přidavkem huminových kyselin.

**Tabulka 24:** Normalizovaná mortalita *E. crypticus* v agaru s přidavkem kaolinu a huminových kyselin (%) v závislosti na koncentraci Zn.

koncentrace Zn (mg/kg agaru)	kontrola	40	80	201	402	603	804
Nm (%)	2	31	41	56	73	76	83
SD (%)	2,4	14,6	8,7	12,7	2,4	12,7	6,3

Nm = normalizovaná mortalita, SD = směrodatná odchylka

I v tomto případě se při výpočtu hodnoty  $LC_{50}$  postupovalo stejným způsobem jako v předchozích kapitolách. Výsledná hodnota  $LC_{50}$  pro *E. crypticus* v takto upraveném agaru byla vypočtena na 149,8 mg ZnO-NPs/kg agaru (104-215,8), což tedy odpovídalo 120,4 mg Zn/kg agaru (83,6-173,4). Hodnota koeficientu determinace R byla v tomto případě 0,765. **Obr. 20** znázorňuje křivku dávka-účinek popisující vliv ZnO-NPs na mortalitu *E. crypticus*.



**Obrázek 20:** Křivka dávka-účinek pro *E. crypticus* v agaru s kaolinem a HA

## 4.6 Test toxicity supernatantu ZnO-NPs

Výsledky testů toxicity supernatantu ZnO-NPs v jednotlivých modifikacích agarového média jsou uvedeny v **Tab. 25**. Nejvyšší mortalita byla pozorována v agaru s přídatkem kaolinu a nejnižší pak v čistém agaru.

**Tabulka 25:** Normalizovaná mortalita (%) *E. crypticus* v jednotlivých modifikacích agaru při koncentraci 13 mg Zn/kg agaru

typ média	Nm (%)	SD (%)
kontrola	5	4,3
čistý agar	8	2,5
agar + kaolin	30	22,7
agar + HA	28	2,5
agar + kaolin + HA	20	4,3

Nm = normalizovaná mortalita, SD = směrodatná odchylka

V porovnání s výsledky toxicity  $Zn^{2+}$  kationtů (viz kapitola 4.1) měly v tomto případě půdní složky opačný vliv na výslednou toxicitu (viz. **Tab. 26**). Nejvyšší mortalita v případě zinečnatého kationtu byla v čistém agaru, kdežto u supernatantu byla mortalita v tomto médiu nejnižší. V agaru s přídatkem kombinace obou dvou komponent bylo dosaženo srovnatelných výsledků jak u  $Zn^{2+}$ , tak i u supernatantu, kdy se mortalita tolik nelišila.

**Tabulka 96:** Porovnání normalizovaných mortalit u  $Zn^{2+}$  a supernatantu v čistém a upraveném agaru

	koncentrace mg Zn/kg	médium	Nm (%)	SD (%)
$Zn^{2+}$	12,5	čistý agar	37	12,5
	15	agar + kaolin	17	4,9
		agar + HA	7	9,4
		agar + kaolin + HA	17	4,9
supernatant	13	čistý agar	8	2,5
		agar + kaolin	30	22,7
		agar + HA	28	2,5
		agar + kaolin + HA	20	4,3

Nm = normalizovaná mortalita, SD = směrodatná odchylka

Příčinou rozdílů mezi toxicitou  $Zn^{2+}$  a  $Zn^{2+}$  pocházejících ze supernatantu mohla být skutečnost, že při odstředování mohly v supernatantu zůstat nějaké ZnO-NPs. Jejich podíl však nebylo možné s dostupným zařízením detekovat. K získání jasnějších

výsledků by bylo vhodné analyzovat vzorky supernatantu pomocí SEM nebo TEM. V mé studii tyto analýzy nebyly provedeny zejména z finančních důvodů. V rámci pokračování výzkumného úkolu by bylo vhodné provést testy toxicity ZnO-NPs v koncentraci odpovídající koncentraci  $Zn^{2+}$  v supernatantu (tedy okolo 13 mg Zn/kg agaru). S výsledky získaných z těchto testů by bylo možné lépe diskutovat teorii ohledně přítomnosti ZnO-NPs v supernatantu.

Sledování vlivu zahřívání na koncentraci  $Zn^{2+}$  kationtů v supernatantu jsem prováděla z důvodu zjištění, zda při zahřívání nedochází k uvolňování dalších iontů. Výsledky jsou uvedeny v **Tab. 27**. Z těchto výsledků vyplývá, že zahřívání nemělo žádný vliv na koncentraci  $Zn^{2+}$  v supernatantu, jelikož se naměřené koncentrace pohybují řádově ve stejných hodnotách. Také je zde patrný trend, že s rostoucí koncentrací klesá rozpustnost ZnO-NPs.

**Tabulka 27:** Koncentrace  $Zn^{2+}$  kationtů v supernatantu

koncentrace mg Zn/l	naměřená koncentrace mg Zn/l		$Zn^{2+}$ rozpustnost (%)
	normální vzorek	zahřátý vzorek	
111	29	33	26
221	28	29	13
553	32	35	6
1105	35	32	3
1658	26	28	2
2210	28	23	1

#### 4.7 Srovnání toxicity $Zn^{2+}$ a ZnO-NPs v jednotlivých typech agarových médií

Z výsledků analýzy pomocí SEM vyplývá, že ZnO-NPs tvořily v čistém agaru malé aglomeráty a byly dispergované v celém objemu agaru. V agaru s kaolinem byly ZnO-NPs lépe dispergované v porovnání s čistým agarem. Dále se zdálo, jakoby byly nanočástice během přípravy agaru obalovány kaolinem, z čehož usuzuji, že tento fakt mohl vést ke snížení biologické dostupnosti a následně pak toxicity nanočástic. Podobný trend se pak také projevil v agaru s přídatkem kaolinu a huminových kyselin, kdy je hodnota  $LC_{50}$  (120,4 mg Zn/kg) téměř srovnatelná s hodnotou  $LC_{50}$  (112,4 mg Zn/kg) v agaru s kaolinem. V agaru s kombinací obou komponent byly nanočástice taktéž dispergovány v celém objemu agaru a tvořily malé aglomeráty. U agaru s huminovými kyselinami byly přítomné větší aglomeráty než v agaru s kaolinem, ale jejich počet byl menší než v čistém agaru. V této modifikaci agaru se toxicita oproti agaru s kaolinem razantně

zvýšila. Při porovnání hodnot LC<sub>50</sub> v jednotlivých úpravách agaru je však patrné, že více toxické jsou pro *E. crypticus* zinečnaté kationty než ZnO-NPs (viz. **Tab. 28**).

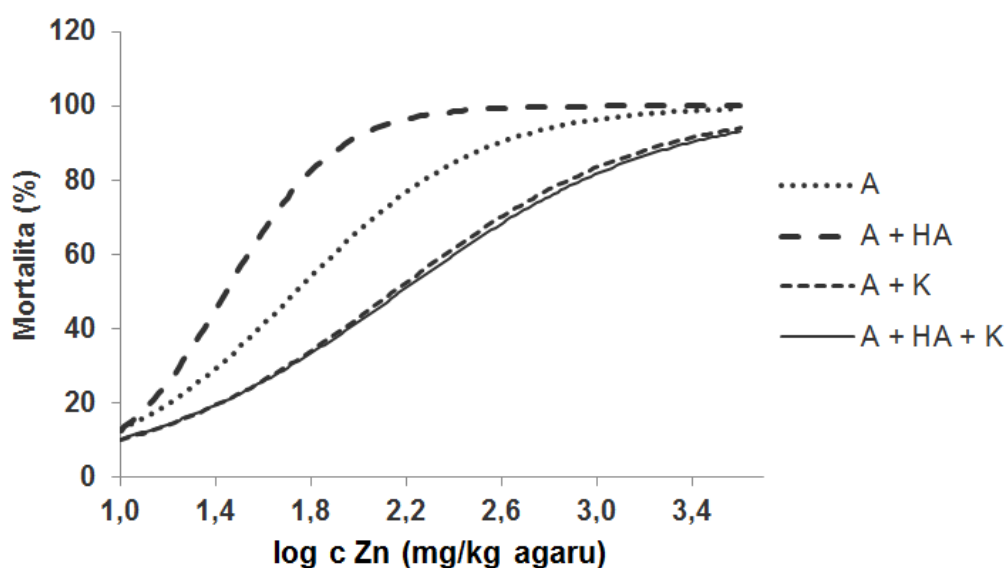
**Tabulka 28:** Hodnoty LC<sub>50</sub> pro *E. crypticus* v jednotlivých úpravách agaru

	médium	LC <sub>50</sub> (mg Zn/kg)
ZnCl <sub>2</sub>	čistý agar	14
ZnO-NPs	čistý agar	43,7
	agar + HA	22,2
	agar + kaolin	112,4
	agar + kaolin + HA	120,4

Vzhledem k nedostatku informací o toxicitě ZnO-NPs pro půdní organismy uvádím pro srovnání údaje o toxicitě pro žížaly *Eisenia fetida* a *Eisenia veneta* získané během testování v různých médiích. Li et al. (2011) ve své studii testovali toxicitu ZnO-NPs (30 ± 5 nm) pro *Eisenia fetida* na filtračním papíře a v agarovém médiu připraveném z deionizované vody a z rekonstituované vody. Nejvyšší toxicita byla zaznamenána při testech na filtračním papíře, kterou sledovali již při nejnižší testované koncentraci. Autoři uvádí, že tento jev byl způsoben zvýšenou agregací u koncentrovanějších disperzí, jelikož v tomto případě toxicita klesala s rostoucí koncentrací. Při testech na agarovém médiu byla vyšší toxicita zaznamenána v agaru připraveném z deionizované vody, kdy se akutní toxicita projevila při koncentraci 232 mg ZnO/kg (104-495), což odpovídalo 186,5 mg Zn/kg (83,6-397,8). V agaru připraveném z rekonstituované vody se pak akutní toxicita projevila při koncentraci 374 mg ZnO/kg (264-598), což odpovídalo koncentraci 300,6 mg Zn/kg (212,2-480,6). Tento rozdíl byl způsoben přítomností solí v rekonstituované vodě, které měly za následek vyšší agregaci nanočástic a následně jejich sníženou biodostupnost pro testovaný organismus. Canas et al. (2011) ve své studii pozorovali akutní toxicitu ZnO-NPs (40~100 nm) v písčitém expozičním médiu pro *Eisenia fetida*. Autoři pozorovali 10% mortalitu při koncentracích 10 a 100 mg/kg a 20% mortalitu při koncentraci 10 000 mg/kg. Dále autoři pozorovali vliv ZnO-NPs na produkci kokonů v umělé půdě, kdy s rostoucí koncentrací ZnO-NPs klesal počet kokonů. Při koncentraci 0,1 mg/kg byly zaznamenány 3 kokony, při koncentraci 100 mg/kg 2 kokony a při nejvyšší koncentraci (1000 mg/kg) ZnO-NPs nebyla pozorována žádná produkce kokonů. Hooper et al. (2011) ve své studii sledovali 50% snížení reprodukce u ZnO-NPs u žížaly *Eisenia veneta* v hlinité půdě upravené 3 % organické hmoty při koncentraci 750 mg Zn/kg. Porovnáme-li různá média, zjistíme, že nejvyšší toxicita byla zjištěna v agaru. Tento jev je nejspíše důsledkem nepřítomnosti půdních složek v tomto médiu.

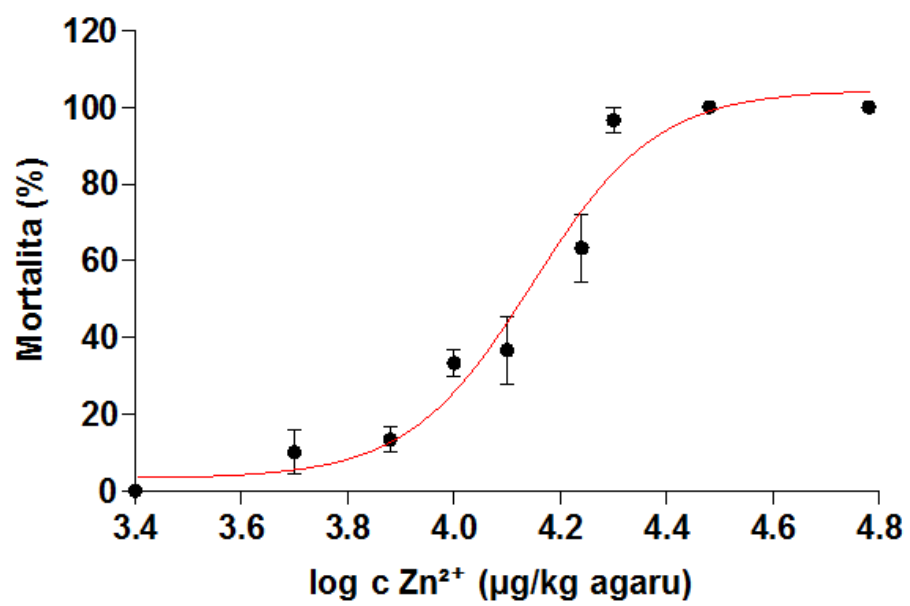
Dále je patrné, že toxicita ZnO-NPs pro žížalu *Eisenia fetida* v půdě je nižší než pro *Enchytraeus crypticus* v agaru.

Z výsledků toxicity je patrné, že v případě testování ZnO-NPs v různých modifikacích agarového média, byla nejvyšší toxicita v agaru s přidavkem huminových kyselin. Dále následovala toxicita v čistém agaru a poté v agaru s přidavkem kaolinu. Nejnižší toxicitu vykazovalo agarové médium s přidavkem kombinace obou složek (viz. **Tab. 28**). Půdní složky ovlivnily chování zinku v expozičním médiu a tím i jeho biologickou dostupnost a následně toxicitu. Přidáním kaolinu do agaru byla toxicita ZnO-NPs značně redukována, zatímco přítomnost huminových kyselin měla opačný efekt. Na **Obr. 21** jsou znázorněny jednotlivé křivky dávka-účinek pro čistý a upravený agar. Ze znázorněných křivek je patrný trend, kdy s rostoucí koncentrací ZnO-NPs roste i mortalita testovaného organismu. Nejstrmější průběh má křivka agaru s přidavkem huminových kyselin (A + HA), což je v souladu s výsledky toxicity, která v tomto prostředí byla největší a nejrazantnější. Téměř srovnatelné výsledky v agaru s kaolinem (A + K) a agaru s kaolinem a huminovými kyselinami (A + K + HA) se projeví na téměř totožném průběhu jejich křivek. V případě testování  $Zn^{2+}$  (viz. **Obr. 22**) měly půdní složky opačný vliv na toxicitu v porovnání se ZnO-NPs. Při porovnání průběhu křivek  $Zn^{2+}$  a nanočástic (A) v čistém agaru, je patrný rozdíl, kdy u ZnO-NPs není efekt tak strmý a křivka má pozvolnější průběh. U nanočástic leží 50 % efektu v rozmezí 950 mg Zn/kg a rozdíl v mortalitě je přibližně 40 %. U chloridu zinečnatého byla pozorována mortalita 0-100 % v rozmezí 1-30 mg Zn/kg agaru. Celkově se pro *E. crypticus* zdají více toxické zinečnaté kationty než ZnO-NPs.



**Obrázek 21:** Křivky dávka-účinek Zn v čistém a upraveném agaru





Obrázek 22: Křivka dávka-účinek Zn<sup>2+</sup> v čistém agaru pro *E. crypticus*

## 5. Závěr

Z provedených experimentů vyplývá, že je možné použít agarového kultivačního média při ekotoxikologických testech na půdním organismu *Enchytraeus crypticus*. Do budoucna je však vhodné provést další výzkum, jelikož jsou doposud na téma „užití agaru při testování toxicity na půdních organismech“ dostupné jen dvě publikace a to od autorů Li et al. (2011) a Hrdá et al. (2016). Má práce byla zaměřena na optimalizaci agarového média pomocí přísadků půdních složek a zjištění jak tyto složky ovlivňují toxicitu nanočástic. Přidáním půdních složek do agaru bylo dosaženo vyšší environmentální relevance výsledků těchto ekotoxikologických testů. Zatím se jedná o jediný dostupný zdroj informací o testování toxicity v upraveném agarovém médiu a proto i zde je žádoucí další výzkum.

V experimentální části jsem vycházela z práce Hrdá et al. (2016) a potvrdila jsem vhodnost užití půdního červa *Enchytraeus crypticus* jako modelového organismu pro ekotoxikologické testy v agarovém kultivačním médiu. V předchozích studiích bylo popsáno únikové chování tohoto organismu z expozičního média. V mém případě jsem tomuto chování předešla aplikováním agaru i na víčka Petriho misek. Tím bylo zabráněno vyhýbání působení testované látky u testovaného organismu.

Půda je komplexní systém minerálů, organického materiálu, vody, plynů, žijících organismů a představuje významný rezervoár průmyslově vyráběných nanočástic a dalších polutantů uvolňovaných do životního prostředí. Všechny její složky mohou interagovat s nanočásticemi a ovlivnit tak jejich biologickou dostupnost a toxicitu pro půdní organismy. Z mých výsledků je patrné, že toxicita ZnO-NPs v agaru je vyšší než jejich toxicita v půdě, důvodem mohl být fakt, že agar je jednodušší médium a neobsahuje půdní složky. Přidáním kaolinu do agarového média byla toxicita nanočástic oxidu zinečnatého značně redukována, zatímco přítomnost huminových kyselin vedla ke zvýšení toxicity pro *E. crypticus*. V případě  $Zn^{2+}$  měly půdní složky opačný účinek na toxicitu, než tomu bylo v případě nanočástic. Při případném pokračování práce by bylo vhodné rozšířit koncentrační řadu  $Zn^{2+}$  v upravených agarech, tak aby bylo dosaženo 100% mortality a bylo tak možné zkonstruovat kompletní křivky dávka-účinek a spočítat odpovídající hodnoty  $LC_{50}$ . Nicméně nízká hodnota  $LC_{50}$  u  $Zn^{2+}$  v čistém agaru naznačuje, že pro *E. crypticus* jsou více toxické zinečnaté ionty než nerozpuštěné nanočástice oxidu zinečnatého.

## 6. Seznam použité literatury

BARNES, R.J., RIBA, O., GARDNER, M.N., SCOTT, T.B., JACKMAN, S.A. et THOMPSON, I.P. Optimization of nano-scale nickel/iron particles for the reduction of high concentration chlorinated aliphatic hydrocarbon solutions. *Chemosphere* [online]. 2010, 79(4), pp. 448-454.

BEN-MOSHE, T., FRENK, S., DROR, I., MINZ, D. et BERKOWITZ, B. Effects of metal oxide nanoparticles on soil properties. *Chemosphere* [online]. 2013, 90(2), pp. 640-646.

BENN, T.M. et WESTERHOFF, P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental science & Technology* [online]. 2008, 42, pp. 4133-4139.

BOUR, A., MOUCHET, F., SILVESTRE, J., GAUTHIER, L. et PINELLI, E. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2015, 283, pp. 764-777.

CANAS, J.E., QI, B., LI, S., MAUL, J.D., COX, S.B., DAS, S. et GREEN, M.J. Acute and reproductive toxicity of nano-sized metal oxides (ZnO and TiO<sub>2</sub>) to earthworms (*Eisenia fetida*). *Journal of Environmental Monitoring* [online]. 2011, 13(12), pp. 3351-3357.

CARBONE, S., HERTEL-AAS, T., JONER, E.J. et OUGHTON, D.H. Bioavailability of CeO<sub>2</sub> and SnO<sub>2</sub> nanoparticles evaluated by dietary uptake in the earthworm *Eisenia fetida* and sequential extraction of soil and feed. *Chemosphere* [online]. 2016, 162, pp. 16-22.

CASTRO-FERREIRA, M.P., ROELOFS, D., VAN GESTEL, C.A.M., VERWEIJ, R.A., SOARES, A.M.V.M. et AMORIM, M.J.B. *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. *Chemosphere* [online]. 2012, 87(11), pp. 1222-1227.

COLLIN, B., OOSTVEEN, E., TSYUSKO, O.V. et UNRINE, J.M. Influence of natural organic matter and surface charge on the toxicity and bioaccumulation of functionalized ceria nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental science & Technology* [online]. 2014, 48, pp. 1280-1289.

CORNELIS, G., DOOLETTE, C.T.M., MCLAUGHLIN, M.J., KIRBY, J.K., BEAK, D.G. et CHITTLEBOROUGH, D. Retention and dissolution of engineered silver nanoparticles in natural soils. *Soil Science Society of America Journal* [online]. 2012, 76(3), pp. 891-902.

CORNELIS, G., HUND-RINKE, K., KUHLBUSCH, T., VAN DEN BRINK, N. et NICKEL, C. Fate and bioavailability of engineered nanoparticles in soils: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* [online]. 2014, 44(24), pp. 2720-2764.

CUI, D., ZHANG, P., MA, Y., HE, X., LI, Y., ZHANG, J., ZHAO, Y. et ZHANG, Z. Effect of cerium oxide nanoparticles on asparagus lettuce cultured in an agar medium. *Environmental Science Nano* [online]. 2014, 1(5), pp. 459-465.

DARLINGTON, T., NEIGH, A.M., SPENCER, M.T., NGUYEN, O.T. et OLDENBURG, S.J. Nanoparticle characteristics affecting environmental fate and transport through soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2009, 28(6), pp. 1191-1199.

DINESH, R., ANANDARAJ, M., SRINIVASAN, V. et HAMZA, S. Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. *Geoderma* [online]. 2012, 173-174, pp. 19-27.

DOOLETTE, C.L., MCLAUGHLIN, M.J., KIRBY, J.K., BATSTONE, D.J., HARRIS, H.H., GE, H. et CORNELIS, G. Transformation of PVP coated silver nanoparticles in a simulated wastewater treatment proces and the effect on microbial communities. *Chemistry Central Journal* [online]. 2013, 7:46, pp. 1-18.

DUNPHY GUZMAN, K.A., FINNEGAN, M.P. et BANFIELD, J.F. Influence of surface potential on aggregation and transport of titania nanoparticles. *Environmental science & Technology* [online]. 2006, 40(24), pp. 7688-7693.

FAJARDO, C., SACCA, M.L., COSTA, G., NANDE, M. et MARTIN, M. Impact of Ag and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on soil organisms: In vitro and soil experiments. *Science of the Total Environment* [online]. 2014, 473-474, pp. 254-261.

FANG, J., SHAN, X., WEN, B., LIN, J. et OWENS, G. Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns. *Environmental Pollution* [online]. 2009, 157(4), pp. 1101-1109.

FARRÉ, M., GAJDA-SCHRANTZ, K., KANTIANI, L. et BARCELÓ, D. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2009, 393(1), pp. 81-95.

GARCÍA-GÓMEZ, C., BABIN, M., OBRADOR, A., ÁLVAREZ, J.M. et FERNÁNDEZ, M.D. Toxicity of ZnO nanoparticles, ZnO bulk, and ZnCl<sub>2</sub> on earthworms in a spiked natural soil and toxicological effects on leachates on aquatic organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2014, 67(4), pp. 465-473.

GARNER, K.L. et KELLER, A.A. Emerging patterns for engineered nanomaterials in the environment: a review of fate and toxicity studies. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2014, 16:2503, pp. 1-28.

GHOSH, S., MASHAYEKHI, H., PAN, B., BHOWMIK, P. et XING, B. Colloidal behavior of aluminum oxide nanoparticles as affected by pH and natural organic matter. *Langmuir* [online]. 2008, 24(21), pp. 12385-12391.

GOMES, S.I.L., HANSEN, D., SCOTT-FORDSMAND, J.J. et AMORIM, M.J.B. Effects of silver nanoparticles to soil invertebrates: Oxidative stress biomarkers in *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* [online]. 2015, 199, pp. 49-55.

GOMES, S.I.L., SOARES, A.M.V.M., SCOTT-FORDSMAND, J.J. et AMORIM, M.J.B. Mechanisms of response to silver nanoparticles on *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta): Survival, reproduction and gene expression profile. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2013, 254-255, pp. 336-344.

GOTTSCHALK, F., SONDERER, T., SCHOLZ, R.W. et NOWACK, B. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental science & Technology* [online]. 2009, 43(24), pp. 9216-9222.

GOTTSCHALK, F., SUN, T.Y. et NOWACK, B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environmental Pollution* [online]. 2013, 181, pp. 287-300.

GRILLO, R., ROSA, A.H. et FRACETO, L.F. Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. *Chemosphere* [online]. 2015, 119, pp. 608-619.

HANDY, R.D., CORNELIS, G., FERNANDES, T., TSYUSKO, O., DECHO, A., SABO-ATTWOOD, T., METCALFE, C., STEEVENS, J.A., KLAINE, S.J., KOELMANS, A.A. et HORNE, N. Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: Practical experiences and recommendations from the bench. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2012, 31(1), pp. 15-31.

HANDY, R.D., OWEN, R. et VALSAMI-JONES, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* [online]. 2008, 17, pp. 315-325.

HECKMANN, L.H., HOVGAARD, M.B., SUTHERLAND, D.S., AUTRUP, H., BESENBACHER, F. et SCOTT-FORDSMAND, J.J. Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology* [online]. 2011, 20(1), pp. 226-233.

HEGSELUND, L.R., DIEZ-ORTIZ, M., LOFTS, S., LAHIVE, E., JURKSCHAT, K., WOJNAROWICZ, J., CEDERGREEN, N., SPURGEON, D. et SVENDSEN, C. Soil pH effects on the comparative toxicity of dissolved zinc, non-nano and nano ZnO to the earthworm *Eisenia fetida*. *Nanotoxicology* [online]. 2014, 8(5), pp. 559-572.

HOOPER, H.L., JURKSCHAT, K., MORGAN, A.J., BAILEY, J., LAWLOR, A.J., SPURGEON, D.J. et SVENDSEN, C. Comparative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm *Eisenia veneta* in a soil matrix. *Environment International* [online]. 2011, 37(6), pp. 1111-1117.

HRDÁ, K. Testy ekotoxicity nanomateriálů dispergovanych v agarózovém gelu: diplomová práce. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2015. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.

- HRDÁ, K., OPRŠAL, J., KNOTEK, P., POUZAR, M. et VLČEK, M. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to the annelid *Enchytraeus crypticus* in agar-based exposure media. *Chemical Papers* [online]. 2016, 70(11), pp. 1-9.
- CHEN, K.L., MYLON, S.E. et ELIMELECH, M. Enhanced aggregation of alginate-coated iron oxide (Hematite) nanoparticles in the presence of calcium, strontium and barium cations. *Langmuir* [online]. 2007, 23, pp. 5920-5928.
- JÄNSCH, S., AMORIM, M.J. et RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. *Environmental Reviews* [online]. 2005, 13(2), pp. 51-83.
- JIANG, J., OBERDÖRSTER, G. et BISWAS, P. Characterization of size, surface charge and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2009, 11(1), pp. 77-89.
- JU-NAM, Y. et LEAD, J.R. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the Total Environment* [online]. 2008, 400(1-3), pp. 396-414.
- KAEGI, R., ULRICH, A., SINNET, B., VONBANK, R., WICHSER, A., ZULEEG, S., SIMMLER, H., BRUNNER, S., VONMONT, H., BURKHARDT, M. et BOLLER, M. Synthetic TiO<sub>2</sub> nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution* [online]. 2008, 156(2), pp. 233-239.
- KLAINE, S.J., ALVAREZ, P.J.J., BATLEY, G.E., FERNANDES, T.F., HANDY, R.D., LYON, D.Y., MAHENDRA, S., McLAUGHLIN, M.J. et LEAD, J.R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2008, 27(9), pp. 1825-1851.
- KOBETIČOVÁ, K. Effects and risks of contaminants for Enchytraeids in soil environment. Brno, 2011. Dissertation thesis [online]. Masaryk University, Faculty of Science.
- KOBETIČOVÁ, K. Ekotoxicita nanomateriálů v půdním prostředí. *Acta environmentalica universitatis comenianae (Bratislava)* [online]. 2012, 20(1), pp. 24-28.
- KOOL, P.L., DIEZ-ORTIZ, M. et VAN GESTEL, C.A.M. Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl<sub>2</sub> to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Pollution* [online]. 2011, 159(10), pp. 2713-2719.
- LAHIVE, E., JURKSCHAT, K., SHAW, B.J., HANDY, R.D., SPURGEON, D.J. et SVENDSEN, C. Toxicity of cerium oxide nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*: subtle effects. *Environmental Chemistry* [online]. 2014, 11(3), pp. 268-278.

LI, LZ., ZHOU, DM., PEIJNENBURG, W.J.G.M., VAN GESTEL, C.A.M., JIN, SY., WANG, YJ. et WANG, P. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. *Environment International* [online]. 2011, 37(6), pp. 1098-1104.

LOCK, K. et JANSSEN, C.R. Comparative toxicity of a zinc salt, zinc powder and zinc oxide to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Chemosphere* [online]. 2003, 53(8), pp. 851-856.

LOMBI, E., DONNER, E., TAVAKKOLI, E., TURNEY, T.W., NAIDU, R., MILLER, B.W. et SCHECKEL, K.G. Fate of zinc oxide nanoparticles during anaerobic digestion of wastewater and post-treatment processing of sewage sludge. *Environmental science & Technology* [online]. 2012, 46, pp. 9089-9096.

MAURER-JONES, M.A., GUNSOLUS, I.L., MURPHY, C.J. et HAYNES, C.L. Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Anal Chem.* [online]. 2013, 85(6), pp. 3036-3049.

MUELLER, N.C. et NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental science & Technology* [online]. 2008, 42(12), pp. 4447-4453.

NAVARRO, E., BAUN, A., BEHRA, R., HARTMANN, N.B., FILSER, J., MIAO, AJ., QUIGG, A., SANTSCHI, P.H. et SIGG, L. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants and fungi. *Ecotoxicology* [online]. 2008, 17(5), pp. 372-386.

NOVAIS, S.C., GOMES, S.I.L., GRAVATO, C., GUILHERMINO, L., DE COEN, W., SOARES, A.M.V.M. et AMORIM, M.J.B. Reproduction and biochemical responses in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) to zinc or cadmium exposures. *Environmental Pollution* [online]. 2011, 159(7), pp. 1836-1843.

NOWACK, B. et BUCHELI, T.D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* [online]. 2007, 150(1), pp. 5-22.

O'CONNOR, F.B. The Enchytraeidae. In: BURGESS, A. et RAW, F. [eds.]: *Soil Biology* [online]. 1967, pp. 213-256. Academic Press, London and New York. Dostupné z WWW: [https://books.google.cz/books?id=8 DPNNEUAikC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?id=8 DPNNEUAikC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).

OECD 207. GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: *Earthworm, acute toxicity tests*. 1984, France.

OPRSAL, J., BLAHA, L., POUZAR, M., KNOTEK, P., VLCEK, M. et HRDA, K. Assessment of silver nanoparticle toxicity for common carp (*Cyprinus carpio*) fish embryos using a novel method controlling the agglomeration in the aquatic media. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2015, 22(23), pp. 19124-19132.

PACHAPUR, V.L., LARIOS, A.D., CLEDÓN, M., BRAR, S.K., VERMA, M. et SURAMPALLI, R.Y. Behavior and characterization of titanium dioxide and silver nanoparticles in soil. *Science of the Total Environment* [online]. 2016, 563-564, pp. 933-943.

PEŠTOVÁ, J. Bioakumulace polutantů bezobratlými v půdě ve vztahu k jejich biodostupnosti: diplomová práce [online]. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2007. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

PETERSEN, E.J., ZHANG, L., MATTISON, N.T., O'CARROLL, D.M., WHELTON, A.J., UDDIN, N., NGUYEN, T., HUANG, Q., HENRY, T.B., HOLBROOK, R.D. et CHEN, K.L. Potential release pathways, environmental fate and ecological risks of carbon nanotubes. *Environmental science & Technology* [online]. 2011, 45, pp. 9837-9856.

PHENRAT, T., SALEH, N., SIRK, K., TILTON, R.D. et LOWRY, G.V. Aggregation and sedimentation of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions. *Environmental science & Technology* [online]. 2007, 41, pp. 284-290.

PHIPPS, G.L., MATTSON, V.R. et ANKLEY, G.T. Relative sensitivity of three freshwater benthic macroinvertebrates to ten contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 1995, 28, pp. 281-286.

PLUSKOTA, A., HORZOWSKI, E., BOSSINGER, O. et VON MIKECZ, A. In *Caenorhabditis elegans* nanoparticle-bio-interactions become transparent: silica-nanoparticles induce reproductive senescence. *PLoS ONE* [online]. 2009, 4(8), e6622.

POKARZHEVSKII, A.D., VAN STRAALLEN, N.M. et SEMENOV, A.M. Agar as a medium for removing soil from earthworm guts. *Soil Biology & Biochemistry* [online]. 2000, 32(8-9), 1315-1317.

POSTHUMA, L., BAERSELMAN, R., VAN VEEN, R.P.M. et DIRVEN-VAN BREEMEN, E.M. Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotoxicology and environmental safety* [online]. 1997, 38, pp. 108-121.

RIBEIRO, M.J., MARIA, V.L., SCOTT-FORDSMAND, J.J. et AMORIM, M.J.B. Oxidative stress mechanisms caused by Ag nanoparticles (NM300K) are different from those of AgNO<sub>3</sub>: Effects in the soil invertebrate *Enchytraeus crypticus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2015, 12(8), pp. 9589-9602.

RODRIGUES, S.M., TRINDADE, T., DUARTE, A.C., PEREIRA, E., KOOPMANS, G.F. et RÖMKENS, P.F.A.M. A Framework to measure the availability of engineered nanoparticles in soils: Trends in soil tests and analytical tools. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, 75, pp. 129-140.

RÖMBKE, J. Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. *Pedobiologia* [online]. 2003, 47(5-6), pp. 607-616.



RÖMBKE, J., JÄNSCH, S. et DIDDEN, W. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2005, 62(2), pp. 249-265.

SALEH, N.B., PFEFFERLE, L.D. et ELIMELECH, M. Influence of biomacromolecules and humic acid on the aggregation kinetics of single-walled carbon nanotubes. *Environmental science & Technology* [online]. 2010, 44, pp. 2412-2418.

SHOULTS-WILSON, W.A., REINSCH, B.C., TSYUSKO, O.V., BERTSCH, P.M., LOWRY, G.V. et UNRINE, J.M. Role of particle size and soil type in toxicity of silver nanoparticles to earthworm. *Soil Science Society of America Journal* [online]. 2011, 75(2), pp. 365-377.

SCHLICH, K., KLAWONN, T., TERYTZE, K. et HUND-RINKE, K. Effects of silver nanoparticles and silver nitrate in the earthworm reproduction test. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2013, 32(1), pp. 181-188.

SCHMELZ, R.M. et COLLADO, R. A guide to european terrestrial and freshwater species of Enchytraeidae (Oligochaeta). *Soil organisms* [online]. 2010, 82(1), pp. 1-176.

SPURGEON, D.J., TOMLIN, M.A. et HOPKIN, S.P. Influence of temperature on the toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 1997, 58, pp. 283-290.

STONE, V., NOWACK, B., BAUN, A., VAN DEN BRINK, N., VON DER KAMMER, F., DUSINSKA, M., HANDY, R., HANKIN, S., HASSELLÖV, M., JONER, E. et FERNANDES, T.F. Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of the Total Environment* [online]. 2010, 408(7), pp. 1745-1754.

ŠUTEKOVÁ, E. Zavedení a optimalizace metod pro vybrané biomarkery půdních bezobratlých: diplomová práce [online]. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2006. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

TANG, W.W., ZENG, G.M., GONG, J.L., LIANG, J., XU, P., ZHANG, CH. et HUANG, B.B. Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: A review. *Science of the Total Environment* [online]. 2014, 468-469, pp. 1014-1027.

TOURINHO, P.S., van GESTEL, C.A.M., LOFTS, S., SVENDSEN, C., SOARES, A.M.V.M. et LOUREIRO, S. Metal-based nanoparticles in soil: fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2012, 31(8), pp. 1679-1692.

UNRINE, J.M., HUNYADI, S.E., TSYUSKO, O.V., RAO, W., SHOULTS-WILSON, W.A. et BERTSCH, P.M. Evidence for bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms (*Eisenia fetida*). *Environmental science & Technology* [online]. 2010, 44, pp. 8308-8313.

VAN DER PLOEG, M.J.C., HANDY, R.D., WAALEWIJN-KOOL, P.L., VAN DEN BERG, J.H.J., RIVERA, Z.E.H., BOVENSCHEN, J., MOLLEMAN, B., BAVECO, J.M., TROMP, P., PETERS, R.J.B., KOOPMANS, G.F., RIETJENS, I.M.C.M. et VAN DEN BRINK, N.W. Effects of silver nanoparticles (NM-300K) on *Lumbricus rubellus* earthworms and particle characterization in relevant test matrices including soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2014, 33(4), pp. 743-752.

WAALEWIJN-KOOL, P.L., DIEZ-ORTIZ, M. et VAN GESTEL, C.A.M. Effect of different spiking procedures on the distribution and toxicity of ZnO nanoparticles in soil. *Ecotoxicology* [online]. 2012, 21(7), pp. 1797-1804.

WANG, H., WICK, R.L. et XING, B. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution* [online]. 2009, 157(4), pp. 1171-1177.

YIRSAW, B.D., MAYILSWAMI, S., MEGHARAJ, M., CHEN, Z. et NAIDU, R. Effect of zero valent iron nanoparticles to *Eisenia fetida* in three soil types. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2016, 23(10), pp. 9822-9831.