

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

Katedra geoenvironmentálních věd



**Studium interakcí nanoželeza a zinku s rostlinou
v hydroponickém systému**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR: Bc. Denisa Švengrová

VEDOUCÍ PRÁCE: Mgr. Martina Vítková, Ph.D.

KONZULTANT: Dr. Domingo Martínez-Fernández

2016

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Denisa Švengrová

Ochrana přírody

Název práce

Studium interakcí nanoželeza a zinku s rostlinou v hydroponickém systému

Název anglicky

Investigation of nano zero-valent iron and zinc interactions with plants in the hydroponics

Cíle práce

Hlavním cílem práce je experimentálně zjistit a posoudit účinnost imobilizace zinku pomocí nanoželeza v hydroponickém systému na vybrané modelové rostlině a zhodnotit důsledky vzájemných interakcí pro rostlinu.

Metodika

1. Na základě doporučené a další vyhledané literatury studentka zpracuje rešerši zahrnující problematiku kontaminace půd kovy (zejména Zn), možnosti fytoremediace a chemické stabilizace, využití nanočástic (zejména nanoželeza) při fytostabilizaci a jejich environmentální rizika včetně vlivu na fyziologii rostlin.
2. V metodické části diplomantka popíše použité materiály, experimentální uspořádání, průběh experimentu a také metody zpracování a analýzy vzorků.
3. Praktická část bude zahrnovat (i) předpěstování rostlin, (ii) přípravu hydroponického systému a potřebných roztoků, (iii) aplikaci nanoželeza a zinku, (iv) zajištění a kontrolu průběhu experimentu a (v) sklizení rostlin a přípravu vzorků.

Laboratorní experimenty, přípravu vzorků a zpracování analytických dat bude studentka provádět samostatně pod dohledem odborného konzultanta a vedoucí DP. Výsledky budou prezentovány v písemné a grafické podobě. Práce bude vhodně doplněna fotodokumentací.

Doporučený rozsah práce

60 stran

Klíčová slova

nanočástice železa; kovy; imobilizace; hydroponie; rajče

Doporučené zdroje informací

- Capaldi Arruda S. C., Diniz Silva A. L., Moretto Galazzi R., Antunes Azevedo R. & Zezzi Arruda M. A., 2015: Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta* 131: 693–705.
- Dietz K. J. & Herth J., 2011: Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science* 16: 582–589.
- Grieger K. D., Fjordbøge A., Hartmann N. B., Eriksson E., Bjerg P. L. & Baun A., 2010: Environmental benefits and risks of zero-valent iron nanoparticles (nZVI) for in situ remediation: Risk mitigation or trade-off? *Journal of Contaminant Hydrology* 118: 165–183.
- Khan H. A. & Arif I. A., 2012: *Toxic Effects of Nanomaterials*. Bentham Science Publishers, Saudi Arabia.
- Marusenko Y., Shipp J., Hamilton G. A., Morgan J. L. L., Keebaugh M., Hill H., Dutta A., Zhuo X., Upadhyay N., Hutchings J., Herckes P., Anbar A. D., Shock E. & Hartnett H. E., 2013: Bioavailability of nanoparticulate hematite to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution* 174: 150–156.
- Ma X., Gurung A. & Deng Y., 2013: Phytotoxicity and uptake of nanoscale zero-valent iron (nZVI) by two plant species. *Science of The Total Environment* 443: 844–849.
- Nováková T., Šváb M. & Švábová M., 2009: Využití nanočástic v dekontaminačních technologiích: současný stav. *Chemické listy* 103: 524–523.
- Song U., Jun H., Waldman B., Roh J., Kim Y., Yi J. & Lee E. J., 2013: Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 93: 60–67.
- Sovová T. & Kočí V., 2012: Ekotoxikologie nanomateriálů. *Chemické listy* 106: 82–87.
- Trujillo-Reyes J., Majumdar S., Botez C. E., Peralta-Videa J. R. & Gardea-Torresdey J. L., 2014: Exposure studies of core-shell Fe/Fe₃O₄ and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: Are they a potential physiological and nutritional hazard? *Journal of Hazardous Materials* 267: 255–263.
-

Předběžný termín obhajoby

2015/16 LS – FŽP

Vedoucí práce

Mgr. Martina Vítková, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra geoenvironmentálních věd

Konzultant

Dr. Domingo Martínez-Fernández

Elektronicky schváleno dne 22. 1. 2016

prof. RNDr. Michael Komárek, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 22. 1. 2016

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 19. 04. 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Studium interakcí nanoželeza a zinku s rostlinou v hydroponickém systému“ vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Marty Vítkové Ph.D., a že jsem uvedla všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpala.

V Praze dne 19. dubna 2016

.....

Denisa Švengrová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala Mgr. Martině Vítkové Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, podnětnou kritiku, poskytnuté rady a trpělivost při spolupráci. Mé velké poděkování patří také Dr. Domingovi Martínez-Fernándezovi za pomoc, cenné rady, věcné připomínky a velice vstřícný přístup při realizaci a vyhodnocení pokusu. Děkuji také laboratorním technikům za pomoc v laboratoři a jejich analytickou činnost.

V Praze dne 19. dubna 2016

.....

Denisa Švengrová

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá problematikou aplikace nanoželeza (nZVI) za účelem chemicky podporované fytostabilizace zinku (Zn) pro snížení mobility tohoto prvku v prostředí. Interakce nZVI a Zn byly sledovány během experimentu na rajčeti jedlém (*Lycopersicon esculentum* L.), rostliny byly pěstovány v hydroponickém roztoku. Dále byly posouzeny účinky této interakce na příjem vody, příjem makroživin a železa (Fe). Použití nZVI se ukázalo jako vhodné řešení pro stabilizaci nižších koncentrací Zn (100 μ M) v kořenovém systému rostlin, respektive pro účely podporované fytoremediace. Ovšem působení nZVI nemělo významný vliv na vysoké koncentrace Zn (500 μ M). Během aplikace Zn ve zvýšených koncentracích byla pozorována snížená schopnost příjmu vody rostlinou, což může mít za následek i omezení příjmu makroživin. Nadále je nutné věnovat pozornost dalším výzkumům a studovat vlivy aplikace nanočástic a jejich interakce v životním prostředí.

Klíčová slova:

hydroponie; imobilizace; kovy; nanočástice železa; rajče

Abstract

The diploma thesis deals with the issue of nanoscale Zero-Valent Iron (nZVI) application for the chemically assisted phytostabilization of zinc (Zn) in order to decrease mobility of this element in the environment. The interactions of nZVI and Zn have been investigated during the experiments using tomato plants (*Lycopersicon esculentum* L.), which were grown in a hydroponic solution. Furthermore, the effects of the interactions on the uptake of water, macronutrients and iron (Fe) have been assessed. The use of nZVI proved to be an effective solution for the stabilization of lower concentrations of Zn (100 μM) in the root system or for purposes of the assisted phytoremediation. However, the impact of nZVI was not significant high concentrations of Zn (500 μM). During the application of Zn at increased concentrations a decrease in water uptake has been observed, which can limit the macronutrient uptake. It is necessary to pay attention to further research and study the effects of the nanoparticles application and their interactions in the environment.

Key words:

hydroponics; immobilization; iron nanoparticles; metals; tomato

Obsah

1. Úvod	14
2. Cíle práce.....	15
3. Kontaminace půd kovy.....	16
3.1 Zinek v půdě a rostlinách	16
4. Možnosti fytořediace	17
4.1 Fytostabilizace.....	18
4.2 Chemicky podporovaná fytostabilizace	19
5. Využití nanočástic ke stabilizaci kontaminantů	20
5.1 Nanočástice	20
5.2 Nanoželezo (nZVI – nanoscale Zero-Valent Iron).....	22
6. Rostliny v hydroponickém systému	23
6.1 Příjem zinku	24
7. Rajče jako modelová rostlina pro studium fyziologie.....	25
8. Rizika nanočástic pro životní prostředí	27
9. Toxicita nanočástic pro rostliny	28
10. Metodika.....	30
10.1 Návrh experimentu	30
10.2 Pěstování rostlin	30
10.3 Příprava Hoaglandu a jeho aplikace	31
10.4 Aplikace nZVI.....	32
10.5 Aplikace Zn	33
10.6 Odebírání vzorků rostlin v průběhu pěstování	34
10.6.1 První sklizeň.....	34
10.6.2 Druhá sklizeň.....	34
10.6.3 Třetí sklizeň.....	35

10.7 Analýza ICP-OES	35
10.7.1 Příprava vzorků	35
10.7.2 Digesce rostlinného materiálu	36
10.7.3 Analýza ICP-OES	36
10.8 Analýza SEM	36
10.9 Statistické zpracování.....	36
11. Výsledky.....	38
11.1 Vliv na biomasu	38
11.2 Vliv na příjem a koncentraci makroživin v rostlinách	41
11.3 Vliv na příjem a koncentraci železa v rostlinách	46
11.4 Vliv na příjem a koncentraci zinku v rostlinách	48
11.5 Zobrazení kořenů v mikroměřítku.....	49
12. Diskuze.....	51
12.1 Vliv nanočástic železa na příjem vody.....	51
12.2 Vliv nanočástic železa na příjem makroživin	51
12.3 Vliv nanočástic železa na příjem železa a zinku	52
13. Závěr.....	55
14. Seznam použité literatury.....	56
15. Přílohy	63

Seznam obrázků

Obrázek 1. Toxické účinky působení Zn v podobě chlorózy listu u rajčete.

Obrázek 2. Schéma znázorňující vztahy mezi (i)mobilizací, biodostupností a remediací RP.

Obrázek 3. Fotografie nanomaghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) z transmisního elektronového mikroskopu.

Obrázek 4. Struktura nZVI.

Obrázek 5. Rostliny v hydroponickém systému.

Obrázek 6. Účinky chloridu sodného (NaCl) na semeníky rajčat: a) semeník bez známek hnědnutí, b) první známky hnědnutí semeníku rajčete v důsledku stresu způsobeného salinitou, c) zhnědnutí semeníku rajčete.

Obrázek 7. Zobrazení hydroponického experimentu s upevněnými sazenicemi rajčat.

Obrázek 8. Aplikace Zn ve dvou koncentracích do jednotlivých boxů (nZVI: boxy s aplikací nZVI, K: kontrolní boxy bez aplikace nZVI).

Obrázek 9. Grafické zobrazení čerstvé hmotnosti výhonků rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 10. Grafické zobrazení čerstvé hmotnosti kořenů rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 11. Tvorba hnědých pruhů na stoncích rostlin u boxů s obsahem $500 \mu\text{M}$ Zn.

Obrázek 12. Toxické příznaky rostlin u boxů s nZVI ($500 \mu\text{M}$ Zn).

Obrázek 13. Grafické zobrazení koncentrací Ca ve výhoncích rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 14. Grafické zobrazení koncentrací Mg ve výhoncích rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 15. Grafické zobrazení koncentrací P ve výhoncích rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 16. Grafické zobrazení koncentrací K ve výhoncích rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 17. Grafické zobrazení koncentrací Ca v kořenech rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 18. Grafické zobrazení koncentrací Mg v kořenech rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 19. Grafické zobrazení koncentrací P v kořenech rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 20. Grafické zobrazení koncentrací K v kořenech rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 21. Grafické zobrazení koncentrací Fe ve výhoncích rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 22. Grafické zobrazení koncentrací Fe v kořenech rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 23. Grafické zobrazení koncentrací Zn ve výhoncích rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 24. Grafické zobrazení koncentrací Zn v kořenech rostlin u první a třetí sklizně.

Obrázek 25. Zobrazení kořenů ve zpětně odražených elektronech pomocí SEM s odpovídající analýzou EDS: (A) kořen po expozici částicím nZVI a 500 μM roztoku Zn, (B) kořen po expozici 500 μM roztoku Zn (kontrola).

Seznam tabulek

Tabulka 1. Koncentrace jednotlivých makro- a mikroživin použitých při přípravě modifikovaného Hoaglandu.

Tabulka 2. Upravené koncentrace makro- a mikroživin použité při přípravě Hoaglandu.

Tabulka 3. Integrace shodných vzorků rostlin z 1. sklizně.

Seznam příloh

Příloha 1. Výsledné hodnoty všech sledovaných proměnných ve výhoncích rajčete jedlého v průběhu jednotlivých sklizní ($n = 3$; průměr \pm směrodatná odchylka). Stejná písmena u směrodatných odchylek ve sloupcích podle Tukeyho testu vyjadřují nesignifikantní rozdíly u aplikace: ns: není signifikantní; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Příloha 2. Výsledné hodnoty všech sledovaných proměnných v kořenech rajčete jedlého v průběhu jednotlivých sklizní ($n = 3$; průměr \pm směrodatná odchylka). Stejná písmena u směrodatných odchylek ve sloupcích podle Tukeyho testu vyjadřují nesignifikantní rozdíly u aplikace: ns: není signifikantní; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Příloha 3. Abstrakt na konferenci “18th International Conference on Heavy Metals in the Environment”, 12. – 15. 9. 2016, Ghent, Belgie.

1. Úvod

Vývoj nanotechnologií a nanomateriálů hraje v dnešní době stále důležitější roli při řešení široké škály problémů v oblasti životního prostředí (ŽP) a ve vzniku nových remediačních technologií. Dochází k rozvoji inovativních postupů dekontaminace prostředí (Nováková & kol. 2009; Grieger & kol. 2010; Arruda & kol. 2015). Nanočástice, jako je například nanoželezo (nZVI, nano zero-valent iron), nabízejí díky svým vlastnostem četná využití pro chemickou stabilizaci a tedy remediaci ŽP. Vysoká reaktivita a velký specifický povrch těchto látek mohou vést k imobilizaci rizikových kontaminantů v půdě, čímž dochází ke snižování jejich dostupnosti pro rostliny a živé organismy. Zavedení nanočástic Fe do půdy za účelem fixace kontaminující látky ovšem vyžaduje detailní studium vlivu na procesy a organismy žijící v daném prostředí (O'Carroll & kol. 2013).

Pouze několik studií se zabývalo možnými riziky spojenými s použitím nZVI a jeho aplikací *in situ* (Grieger & kol. 2010; Arruda & kol. 2015). Některé výzkumy upozorňují na to, že nanočástice by měly být studovány přímo v prostředí, ve kterém se reálně vyskytují, protože jejich vlastnosti se značně liší v závislosti na okolních podmínkách (Song & kol. 2013). Nedostatečně prozkoumanou oblastí je také účinek nanočástic na organismy následkem jejich bioakumulace. Rostliny jako primární producenti představují potenciální vstup nanočástic do dalších složek potravního řetězce a jejich hromadění v tělech vyšších organismů (Arruda & kol. 2015).

Studium a posouzení vzájemných interakcí nanočástice-kov-rostlina je pro účely této práce stěžejní. Vliv aplikace Zn a jeho vzájemné interakce s nZVI a rajčetem byly sledovány v hydroponickém systému. Využití hydroponického roztoku umožňuje přímo pozorovat reakce, které se mohou odehrávat v rostlinách během podporované fytostabilizace Zn pomocí nZVI. V důsledku těžby a zpracování nerostných surovin se Zn stal jedním z významných kontaminantů prostředí v některých oblastech ČR. Hlavní oblastí kontaminovanou tímto prvkem je Příbramsko. Získané poznatky budou podkladem pro další studium stabilizace rizikových prvků (RP) v prostředí a navazují tak na dosavadní výzkumy na katedře geoenvironmentálních věd (ČZU), zabývající se mj. vlivem nanoželeza na chování kontaminantů a vývoj rostlin. I přes výhody plynoucí z využívání nZVI při (fyto)remediaci prostředí je nutné věnovat zvýšenou pozornost dalším výzkumům, zejména z hlediska nežádoucího vlivu na fyziologii rostlin.

2. Cíle práce

Hlavním cílem práce je experimentálně zjistit a posoudit účinnost imobilizace Zn pomocí nZVI v hydroponickém systému na vybrané modelové rostlině a zhodnotit důsledky vzájemných interakcí pro rostlinu.

Znalosti získané studiem interakcí modelové rostliny s nZVI a Zn budou přínosem pro další výzkumy týkající se využívání nanočástic jako činidla vhodného ke stabilizaci RP v prostředí v kombinaci s pěstováním plodin.

3. Kontaminace půd kovy

Znečištění půdního prostředí RP se v posledních letech stává závažným problémem a potenciální hrozbou pro lidské zdraví. Hlavními zdroji antropogenního znečištění jsou aplikace hnojiv, průmyslová výroba a likvidace domácích a průmyslových odpadních materiálů. Průmyslová činnost a s ní spojená produkce odpadů obecně vedou ke zvýšenému výskytu řady kovů/metaloidů v půdách, jako je např. arsen (As), kadmium (Cd), chrom (Cr), měď (Cu), rtuť (Hg), olovo (Pb) nebo zinek (Zn). Vstup těchto látek do potravního řetězce závisí jednak na zdroji, ze kterého pocházejí, dále na jejich množství, vlastnostech půdy a schopnosti příjmu rostlinami. Většina přirozeně se vyskytujících RP se nachází ve formách, které nejsou biologicky dostupné pro rostliny. Ovšem prvky, které se do půdy dostaly díky lidské činnosti, mají obvykle vysokou tzv. biodostupnost (Bolan & kol. 2014).

V důsledku těžby a zpracování nerostných surovin dochází k velmi významnému znečišťování prostředí RP. Během těžby a zpracování rud vzniká tzv. hlušina, která tvoří základní složku důlních odpadů. Staré důlní odpady jsou hlavním zdrojem znečištění, neboť obsahují velké množství RP v důsledku využívání neúčinných těžebních technologií. Vzhledem k malé velikosti částic, omezenému množství esenciálních živin a organické hmoty, vysokému obsahu kovů/metaloidů, nízkému pH a nedostatku běžné půdní struktury, tento odpadní materiál nepodporuje růst rostlin nebo půdní mikrobiální společenství. Růst rostliny je omezován zejména klimatickými podmínkami, např. na suchých místech s vysokou mírou salinity. Riziko v suchých oblastech spočívá především v náchylnosti k větrné disperzi a vodní erozi v místě výskytu hlušiny (Valentín-Vargas & kol. 2014).

Mezi oblastmi, které jsou nejvíce postiženy těžbou a zpracováním nerostných surovin v ČR, se řadí severní Čechy, oblast Kutné Hory nebo Příbramsko (Tlustoš & kol. 2007). Právě okolí Příbrami je postiženo kontaminací Zn, kterému je v této práci věnována největší pozornost. Hlavním zdrojem znečištění této oblasti se stala dřívější těžba Pb, které zde společně s Cd stále přetrvává (Vaněk & kol. 2005; Ettler & kol. 2006; Tlustoš & kol. 2007). V důsledku průmyslové činnosti a těžby je Zn často přítomen jako znečišťující látka v průmyslových odpadních vodách (Kržišnik & kol. 2014).

3.1 Zinek v půdě a rostlinách

Zinek je významný esenciální prvek s vysokou mobilitou v půdě a vysokou schopností transferu do rostlin (Němeček & kol. 2010). Nadbytek Zn může negativně působit na Calvinův cyklus a fotosyntézu, jelikož tento prvek zásadním způsobem ovlivňuje

metabolismus rostlin (Mateos-Naranjo & kol. 2014). Zvýšené koncentrace Zn mohou mít toxické účinky pro rostliny, které se projevují v podobě chlorózy listů (obr. 1), zhoršeného růstu a nutriční nerovnováhy (Cambrollé & kol. 2012). V půdním prostředí se v největší míře vyskytuje ve formě Zn^{2+} (Mejstřík 1991; Maderova & Paton 2013). Některé studie prokazují toxické účinky Zn v závislosti na jeho koncentraci např. na cukrové řepě (*Beta vulgaris* L.). Mezi hlavní příznaky se řadí chloróza listů, redukce růstu kořene a výhonků a oxidační stres rostlin (Sagardoy & kol. 2009; Gutierrez-Carbonell & kol. 2013).



Obr. 1 Toxické účinky působení Zn v podobě chlorózy listu u rajčete (Taiz & kol. 2015)

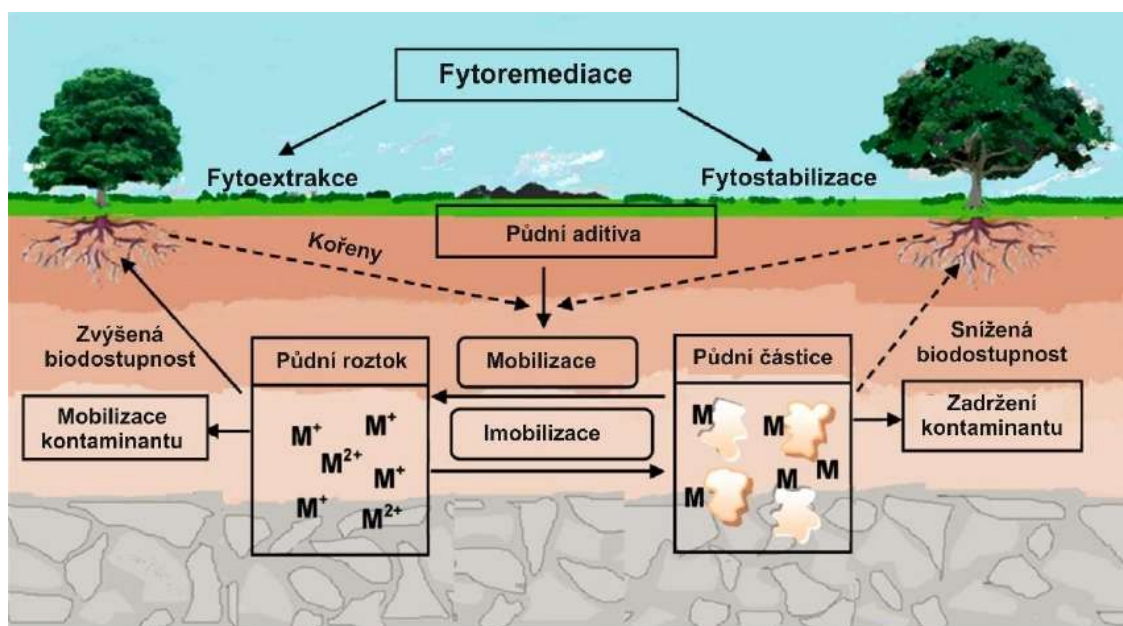
4. Možnosti fytoremediace

Rizikové prvky v půdě nejsou biologicky rozložitelné, proto dochází k jejich hromadění a vstupu do potravního řetězce. Vhodnou remediační metodou lze zabránit dalšímu šíření RP (Ali & kol. 2013; Mahar & kol. 2016). Moderní technologie fytoremediace jsou založeny na různých mechanismech, které zahrnují fytoextrakci, fytodegradaci, rhizodegradaci, fytoakumulaci, rhizofiltraci, fytovolatilizaci a fytostabilizaci (Soudek & kol. 2008; Ali & kol. 2013). Fytoremediace obecně využívá přírodní nebo geneticky modifikované rostliny, které jsou schopny extrakce či stabilizace nebezpečných látek (včetně radionuklidů, pesticidů, polychlorovaných bifenylnů a polycyklických aromatických uhlovodíků) a mění je např. na sloučeniny metabolitů (Ali & kol. 2013; Mahar & kol. 2016). Při fytoremediaci hrají hlavní roli zelené rostliny a asociované mikroorganismy, které snižují koncentraci nebo toxické účinky kontaminujících látek (Ali & kol. 2013).

Mezi nejznámější metody fytořemediace patří fytoextrakce, během které dochází ke vstupu znečišťujících látek z půdy nebo vody do rostlinného těla. Kontaminanty jsou přijímány kořeny rostlin a k jejich hromadění dochází v nadzemní biomase, tedy výhoncích (Ali & kol. 2013; Mahar & kol. 2016). Fytodegradace je degradace organických polutantů rostlinami za pomoci enzymů. Rhizodegradace je metoda, která využívá kořenový systém rostlin pro zvýšení výskytu půdních bakterií a omezuje tak přítomnost znečišťujících látek v půdě. Při fytoakumulaci dochází ke vstřebávání kontaminantů kořeny, s konečnou akumulací ve výhoncích rostlin. Rhizofiltrace se aplikuje při odstraňování znečištění ve vodním prostředí, polutanty jsou absorbovány kořeny. V případě fytovolatilizace se jedná o příjem kontaminantů rostlinami, jejich přeměnu na těkavou formu a uvolnění do atmosféry (Soudek & kol. 2008; Ali & kol. 2013). Tato práce je dále zaměřena zejména na (chemicky podporovanou) fytostabilizaci.

4.1 Fytostabilizace

Další fytořemediační metodou je fytostabilizace, která je založena na využívání rostlin ke stabilizaci kontaminantů v půdním i vodním prostředí. Dochází ke snížení biologické dostupnosti a mobility RP, čímž se zabrání jejich migraci v půdě, do podzemních vod nebo jejich vstupu do potravního řetězce (Soudek & kol. 2008; Michálková & kol. 2014). Kořeny rostlin mohou prostřednictvím sorpce, precipitace a komplexace omezit pohyb kontaminantů v rhizosféře (tj. na rozhraní mezi půdou a kořeny rostlin; obr. 2).



Obr. 2 Schéma znázorňující vztahy mezi (i)mobilizací, biodostupností a remediací RP (Bolan & kol. 2014)

Metodu je vhodné aplikovat v oblastech, kde je zapotřebí obnovit vegetační pokryv, ale z důvodu zvýšené kontaminace prostředí zde nelze využít běžné druhy rostlin. Typickými rostlinami pro remediační aplikaci jsou freatofytické stromy (tj. hluboko kořenící stromy, které jsou schopny získávat vodu z velkých půdních hloubek) pro hydraulickou kontrolu a trávy s vláknitými kořeny pro kontrolu eroze (Soudek & kol. 2008). Mezi úspěšně používané rostliny patří např. některé traviny komerční povahy (*Agrostis* spp. a *Festuca* spp.), které jsou nejčastěji využívány k fytostabilizaci Cu, Zn a Pb (Mahar & kol. 2016). Rostlinné kořeny a vegetační pokryv stabilizují půdní povrch a zabraňují rozptylování kontaminantů vodní a větrnou erozí (Rizzi & kol. 2004; Soudek & kol. 2008). Výběr rostlin je klíčovým aspektem pro úspěšnou sanaci půd degradovaných důlní činností. Takové rostliny by měly tvořit rozsáhlý kořenový systém a velké množství biomasy (Rizzi & kol. 2004). Fytostabilizace znamená, že polutanty přetrvávají v půdě, ale jejich pohyb je omezen (Ali & kol. 2013).

Obnovením vegetačního krytu a mikrobiálních společenstev fytostabilizací půdy kontaminované Pb a Zn (v důsledku důlní činnosti) se zabývali Galende & kol. (2014). Byl sledován vliv aplikace kravské kejdy, drůbežního trusu a papírenského kalu smíchaného s drůbežím trusem, dále byla sledována vhodnost využití přirozeně se vyskytujícího druhu rostliny, kostřavy červené (*Festuca rubra*). Aplikace organických hnojiv vedla k imobilitě Pb a Zn v půdě. Největší produkce biomasy byla pozorována po aplikaci drůbežního trusu.

4.2 Chemicky podporovaná fytostabilizace

Šíření kontaminantů v půdním prostředí může být omezeno různými metodami stabilizace. Stabilizační techniky, včetně chemické stabilizace, fytostabilizace a jejich kombinace, se ukázaly jako vhodnější a méně destruktivní možnosti než běžné způsoby remediace (např. odtěžení půdy, praní půdy nebo její zmrazování atd.). Hlavním cílem chemické stabilizace je snížit biologickou dostupnost a mobilitu RP v prostředí (Komárek & kol. 2013).

Mobilita Zn je ovlivňována přítomností P, Ca, oxidů Fe, Mn, Al a organické hmoty (Kumpiene & kol. 2008). Oxidy kovů jsou přirozenou součástí půdního prostředí. Oxidy jsou schopny adsorbovat toxické kovy/metaloidy a prostřednictvím jejich prekurzorů (např. nZVI) je možné snížit mobilitu a biologickou dostupnost těchto znečišťujících látek. Tak zvané stárnutí oxidů významným způsobem ovlivňuje sorpci a chování kovů/metaloidů. Využití nanooxidů Fe může být účinným nástrojem pro odstranění nebo stabilizaci RP v prostředí (Komárek & kol. 2013). Zinek může precipitovat s hydroxidy, uhličitany, fosfáty, molybdenany, sulfidy a dalšími anionty. V několika studiích byla řešena možnost stabilizace

Zn v půdě pomocí P (Kumpiene & kol. 2008). Brown & kol. (2005) studovali efektivitu sanace kontaminované půdy *in situ*. Bylo zjištěno, že je možné snížit dostupnost Pb, Cd, Zn ve vysoce kontaminované půdě, a to změnami v půdním složení. Jako nejúčinnější se ukázalo přidávat do půdy P ve formě trojitého superfosfátu nebo kyseliny fosforečné (H_3PO_4). Přidání P vedlo ke zvýšenému růstu rostlin, snížené koncentraci kovů v rostlinných pletivech a zvýšení mikrobiální aktivity. Ovšem tyto změny v půdním složení nebyly dostačující pro snížení biologické dostupnosti Cd, Pb a Zn, aby bylo možné obnovit přirozenou funkci půdy. Su & Wong (2004) prokázali, že účinným prostředkem pro snížení dostupnosti Cu, Zn, Ni a Cd je směs poléťavého popílku a čistírenského kalu. Experiment ukázal, že tato směs podporovala nejen růst modelové rostliny, ale také se snižovala dostupnost RP jejich chemickou modifikací na méně dostupné formy. Také Álvarez-Ayuso & García-Sánchez (2003a; 2003b) poukazují na to, že jílové minerály jsou velmi efektivními nástroji pro stabilizaci Zn a dalších prvků. Lee & kol. (2009) testovali účinky využití vápence, červeného bahna a strusky na extrahovatelnost RP, jejich dostupnost pro rostliny (hlávkový salát (*Lactuca sativa*)) a mikrobiální aktivitu. Po aplikaci bylo zjištěno snížené množství rozpustných a extrahovatelných kovů v půdě. Tento jev byl doprovázen zvýšenou mikrobiální aktivitou a sníženou schopností rostlin přijímat kovy. Jako nejúčinnější alternativa pro snižování koncentrace RP v rostlinách se ukázalo využití červeného bahna.

5. Využití nanočástic ke stabilizaci kontaminantů

Nanotechnologie mohou přispívat ke zlepšení stavu ŽP a udržitelného rozvoje. V rámci vývoje nanotechnologií dochází k prevenci vzniku znečištění a stále se vyvíjí nové a účinnější technologie pro sanaci kontaminovaného prostředí. Tyto materiály, díky svým rozměrům a uspořádání, získávají nové vlastnosti, které jsou dané změnou jejich fyzikálních, chemických a biologických vlastností. Částice jsou schopny na základě malých rozměrů reagovat se svým prostředím na úrovni jednotlivých molekul či atomů (Burkhard & kol. 2006).

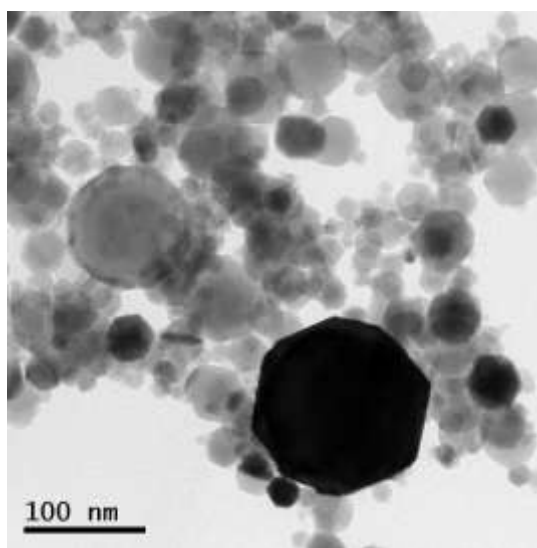
5.1 Nanočástice

Mezi nanočástice patří ty materiály, u nichž se alespoň jeden rozměr pohybuje v rozmezí 1 – 100 nm (Nováková & kol. 2009; Sovová & Kočí 2012). Výroba a využívání anorganických nanočástic se v posledních letech rozšířila do celé řady odvětví, jako jsou chemický průmysl, zdravotnictví, ale také šetrná remediace ŽP (Sánchez & kol. 2011).

I když jsou nanočástice přirozenou součástí prostředí, průmyslová výroba těchto nanomateriálů vyvolává řadu otázek, souvisejících s výrobou, charakterizací a interakcí mezi nanočásticemi a jednotlivými složkami prostředí (Arruda & kol. 2015). Mezi nejvýznamnější zdroje přirozeně se vyskytujících nanočástic se řadí vedlejší produkty spalování, jako je spalování uhlí, ropy, spalování dřeva, výfukové plyny z automobilů, aerosoly v atmosféře a činnost sopek (Bystrzejewska-Piotrowska & kol. 2009).

Konkrétní aplikace nanočástic závisí nejen na jejich počátečních morfologických vlastnostech, složení, velikosti atd., ale také na fyzikálně-chemických vlastnostech jejich okolí (Sánchez & kol. 2011). Mezi nevýhody spojené s využíváním nanočástic se řadí jejich tendence ke shlukování (Van der Waalsovými silami a magnetickými interakcemi), čímž dochází ke zvětšování velikosti částic, a tím se snižuje reakční povrch (Nováková & kol. 2009). Nové postupy se proto zaměřují na povrchovou modifikaci částic s ohledem na jejich pozdější aplikaci. Modifikace povrchu může také ovlivnit agregaci nanočástic, která může ovlivňovat jejich toxicitu a chování v ŽP (Bystrzejewska-Piotrowska & kol. 2009; Sánchez & kol. 2011; Elsaesser & Howard 2012).

Charakterizace nanočástic je zásadní pro získání detailních informací o jejich vlastnostech a pro správnou aplikaci. Existuje velké množství moderních technik pro určení např. složení, morfologie a velikosti částic (skenovací elektronová mikroskopie – SEM, transmisní elektronová mikroskopie – TEM (obr. 3), mikroskopie atomárních sil – AFM atd.; Arruda & kol. 2015).

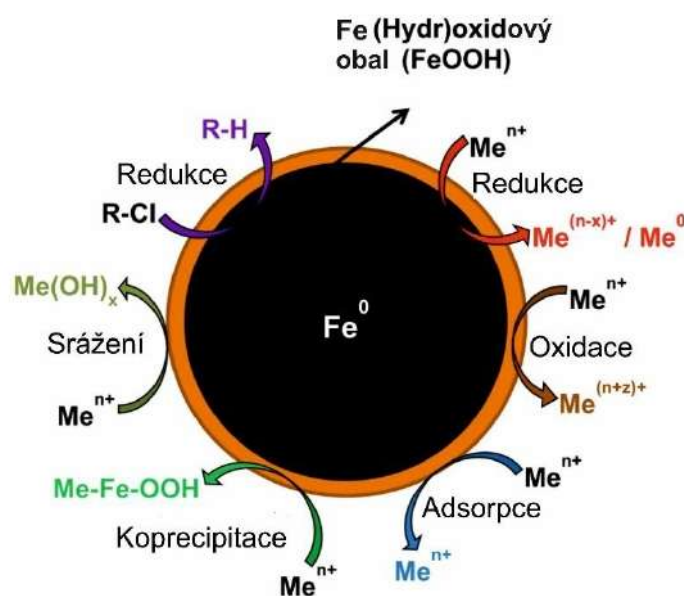


Obr. 3 Fotografie nanomaghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) z transmisního elektronového mikroskopu (Vítková & kol. 2015)

5.2 Nanoželezo (nZVI – nanoscale Zero-Valent Iron)

V současné době se mezi hojně využívané materiály řadí částice nZVI, které fungují jako silné redukční činidlo. Železo patří mezi přirozené složky ŽP, a tudíž při jeho aplikaci za účelem sanace *in-situ* nedochází ke vnášení nežádoucí látky do prostředí (Nováková & kol. 2009).

Struktura nZVI je tvořena jádrem a obalem. Jádro obsahuje zejména elementární Fe a získávají se z něho elektrony, které reagují s kontaminanty ŽP. Obal je složen především z oxidů/hydroxidů Fe a dochází zde ke tvorbě komplexů (Nováková & kol. 2009; Li & kol. 2016; obr. 4).



Obr. 4 Struktura nZVI (O'Carroll & kol. 2013)

Chemická redukce je nejčastěji využívaná metoda k výrobě nZVI, a to především díky své jednoduchosti. Získaný produkt se navíc vyznačuje homogenní strukturou, která ukazuje na vysokou reaktivitu. Hlavním cílem vývoje nových metod pro výrobu nZVI je snížení výrobních nákladů, které umožní rozsáhlejší uplatnění nZVI v praxi (Stefaniuk & kol. 2016).

Bylo dokázáno, že nZVI je účinným dekontaminačním prostředkem zejména při odstraňování nežádoucích látek v podzemních a odpadních vodách, včetně chlorovaných organických sloučenin, aromatických nitroslouchenin, dusičnanů, chloristanů, RP (Pb, Cr, Zn, Cu, As), technických barviv a fenolu (Nováková & kol. 2009; Fu & kol. 2014; Li & kol. 2016). Značnou nevýhodou nZVI je jeho nedostatečná stabilita, obtížné oddělení od (čisticího)

média, rychlá pasivace materiálu a omezená pohyblivost částic v důsledku tvorby aglomerátů (Chekli & kol. 2016; Stefaniuk & kol. 2016). Rychlá agregace částic nZVI snižuje velikost jejich povrchu během reakce. Remediační vlastnosti nZVI lze však účinně zlepšit povrchovou modifikací, např. přidáním jiného kovu a vytvořením slitiny na povrchu Fe (např. Pd, Pt, Ag, Cu, Ni). Malé množství těchto kovů v povrchové vrstvě nZVI způsobuje zvýšenou reaktivitu výsledné částice a poskytuje dobrou ochranu proti pasivaci (Stefaniuk & kol. 2016). Modifikace povrchových vlastností nZVI je jedním z hlavních postupů, jejichž cílem je zvýšení disperze nZVI ve vodném prostředí a mobility v porézním prostředí. Povrchová úprava způsobuje změnu povrchového náboje nZVI, tím se zabráňuje elektrostatické přitažlivosti molekul a snižuje se jejich agregace (Grieger & kol. 2010; Stefaniuk & kol. 2016).

Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují reaktivitu nZVI s kontaminanty, patří sem zejména velikost povrchu, stáří nanočástice, stabilizátory povrchu nZVI a koncentrace kontaminantů (O'Carroll & kol. 2013).

6. Rostliny v hydroponickém systému

Hydroponie je moderní technologie, díky které je možné pěstovat rostliny bez půdního substrátu. Živiny potřebné pro vývoj rostlin jsou získávány z živného roztoku. Pěstování rostlin pomocí hydroponie má své výhody i nevýhody. Mezi hlavní výhody patří recyklovatelnost vody v systému, snadná kontrola výživy rostlin, vysoká produkce pěstovaných plodin a díky možné kontrole se plodinám více daří. Nevýhodou je, že absence půdy může snadno vést k rychlé smrti rostlin. Větší rostliny mají kvůli zhoršené možnosti podpěry špatné podmínky pro růst. Tento systém je vhodný pro pěstování rostlin menšího vzrůstu, jako jsou byliny, rajčata a listová zelenina (Stone 2014; obr. 5).



Obr. 5 Rostliny v hydroponickém systému (foto Švengrová 2015)

6.1 Příjem zinku

Zinek je důležitou složkou pro mnoho fyziologických procesů odehrávajících se v rostlinách, jako jsou fotosyntéza, dýchání a syntéza proteinů. Síran Zn, Zn-EDTA a Zn-DTPA jsou často využívanými sloučeninami při pěstování kultur v živném roztoku, a to zejména pro udržení potřebné koncentrace tohoto prvku v rostlinách. Uvedené syntetické cheláty mají několik nevýhod, např. toxicita a narušení rovnováhy mezi stopovými prvky, zejména při jejich využití v hydroponických systémech. Cheláty inhibují srážení Zn v roztoku a rostlinami jsou přijímány v mnohem menší míře (vzhledem k jejich velikosti) než volné kationty Zn (Mohammadi & Khoshgoftarmanesh 2014). Bernhard & kol. (2005) studovali vliv Zn, který byl obsažen v lužních sedimentech v Nizozemsku, na příjem a akumulaci u tří modelových rostlin. Psineček výběžkatý (*Agrostis stolonifera*), brukev řepka (*Brassica napus*) a jetel plazivý (*Trifolium repens*) jsou druhy, které se běžně vyskytují v nivách řek. Experiment se uskutečnil jednak v polních podmínkách za přítomnosti všech abiotických a biotických faktorů prostředí a jednak v řízených podmínkách s využitím hydroponie. Koncentrace Zn byly během testování postupně zvyšovány. U všech druhů byla prokázána snížená produkce biomasy nebo délky kořenů a zvýšená koncentrace Zn ve výhoncích. Studie dokazuje, že kombinace dat získaných z obou šetření byly podobného charakteru. Moghaddasi & kol. (2013) pěstovali okurky seté (*Cucumis sativus* L.) v živném roztoku, který obsahoval nanočástice připravené rozemletím pryžových pneumatik. Pneumatiky obsahují 1 – 2 % Zn a

některé studie poukazují na to, že by tyto materiály mohly být použity jako efektivní a bezpečné hnojivo pro rostliny. V této studii byla porovnávána účinnost nanočástic obsahujících Zn a komerčně využívaného hnojiva obsahujícího síran zinečnatý ($ZnSO_4$). U okurek pěstovaných za pomoci hydroponie, do níž byly přidány nanočástice, byla prokázána vyšší akumulace Zn v kořenech i výhoncích a větší produkce plodů okurek.

Mihucz & kol. (2012) zkoumali akumulaci a distribuci Fe, Cd, Ni a Pb v různých rostlinných částech. Modelovou rostlinou byl topol (*Populus jacquemontiana* var. *glauca* cv. Kopeczkii), který byl pěstován za pomoci hydroponie. Hydroponický roztok obsahoval také dva rozdílné chelátory Fe(III): citrát Fe(III) a Fe(III) EDTA. Obsah Fe a akumulace rizikových kovů byla obecně vyšší za použití citrátu Fe(III). Transport Fe k výhonkům rostliny závisel zejména na typu chelátu Fe(III) a rizikovém prvku, který byl použit. Bylo zjištěno, že Pb se hromadilo pouze v kořenovém systému. Topol byl stanoven jako vhodná dřevina pro fytoremediaci prostředí kontaminovaného Cd a Ni.

7. Rajče jako modelová rostlina pro studium fyziologie

Rajče je jednou z hlavních plodin využívaných ke spotřebě lidmi po celém světě, a proto se tato plodina stala předmětem celé řady výzkumů. Jedlé rostliny mohou škodlivé látky akumulovat ve svých pletivech a transportovat je do nadzemních částí nebo plodů (López-Moreno & kol. 2016).

López-Moreno & kol. (2016) studovali účinky ferit kobaltových ($CoFe_2O_4$) nanočástic na růst a vývoj rajčat. Tyto nanočástice jsou studovány pro jejich možné využití v lékařských vědních oborech. Jejich vlastnosti jsou vhodné např. při studiu nanočástic za použití magnetické rezonance. Vědci zkoumali toleranci rajčat jedlých (*Solanum lycopersicum* L.) vůči ferit kobaltovým nanočásticím. Rajčata byla pěstována v hydroponickém médiu, do kterého byl přidáván ferit kobaltu v koncentracích 0–1000 $mg.l^{-1}$. Bylo zjištěno, že nanočástice neovlivnily klíčení ani růst rostlin. Rajčata projevila schopnost tolerovat tyto látky až do koncentrace 1000 $mg.l^{-1}$ bez viditelných příznaků toxicity. Dále bylo zjištěno, že při koncentraci 1000 $mg.l^{-1}$ mohou ferit kobaltové nanočástice stimulovat růst kořenů. Song & kol. (2013) testovali fytotoxicitu rostlin za přítomnosti dvou různých nanočástic, jednalo se o nanočástice oxidu titaničitého (TiO_2 , aerosol) a nanočástice stříbra (Ag, koloid). Autoři si kladli za cíl vyvinout metodu, kterou lze aplikovat na širokou škálu různých typů částic. Pro studium toxicity bylo využito rajče jedlé (*Lycopersicon esculentum* L.), které bylo v případě

zkoumání účinků nanočástic TiO_2 pěstováno ve skleníku za pomoci komerčně využívané půdy a v případě nanočástic Ag byl použit roztok Hoaglandu (živný roztok hydroponického systému). Bylo zjištěno, že studované typy nanočástic nemají toxické účinky na klíčivost rostlin, ale u nanočástic Ag byla při každé testované koncentraci této látky prokázána redukce růstu kořenů. Fytotoxicita nanočástic Ag byla u dospělých rostlin prokázána zejména nižším obsahem chlorofylu, vyšší aktivitou antioxidačního enzymu (superoxid dismutasy) a sníženou tvorbou plodů rostlin. Nanočástice TiO_2 měly fytotoxické účinky při nejvyšší koncentraci (5000 mg.kg^{-1}), kdy se projevila zvýšená aktivita superoxidu dismutasy. Tento metodický přístup by mohl být užitečný pro stanovení relativní toxicity nanočástic u pěstovaných rostlin a pro porovnání výsledků z pokusů prováděných v laboratorních a přírodních podmínkách. Haghghi & Pessarakli (2013) studovali vliv roztoku křemíku (Si) a nanočástic Si ve formě SiO_2 na toleranci rajčat jedlých (*Solanum lycopersicum* L.) vůči zasolení v rané fázi růstu. Experiment byl proveden ve skleníku za využití hydroponického roztoku. Výsledky ukazují, že Si by mohl podporovat fotosyntetickou aktivitu rostlin a chránit je před nebezpečnými účinky zasolení. Nebyly zjištěny významné rozdíly mezi aplikací roztoku Si a aplikací nanočástic Si. Obě formy byly účinné i při nižších koncentracích u většiny měřených charakteristik (obr. 6).



Obr. 6 Účinky chloridu sodného (NaCl) na semeníky rajčat: a) semeník bez známek hnědnutí, b) první známky hnědnutí semeníku rajčete v důsledku stresu způsobeného salinitou, c) zhnědnutí semeníku rajčete (Haghghi & Pessarakli 2013)

Bressy & kol. (2013) ve svém výzkumu demonstrují efektivitu moderních analytických metod při studiu RP obsažených v rostlinách. Využití ICP-OES (optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem) a ICP-MS (hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem) technik je vhodné pro stanovení obsahu stopových prvků v analyzovaných vzorcích rostlin. Pomocí těchto metod lze provést rozsáhlou prvkovou analýzu, umožňující simultánní stanovení celé škály prvků najednou. Mezi výhody patří zejména rychlost analýzy a potřeba malého množství vzorku. Experiment se zabýval koncentracemi patnácti prvků (Al,

Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Se, Sn, Sr, V a Zn) u tří druhů rajčat (Khaki, Cherry a Italy) v různých fázích vývoje. Bylo zjištěno, že v konečné fázi vývoje rajčata vykazovala vyšší koncentrace většiny měřených prvků. Organicky pěstovaná rajčata (ve srovnání s rajčaty pěstovanými konvenčně) obsahovala větší množství stopových prvků a méně toxických prvků.

8. Rizika nanočástic pro životní prostředí

Zvyšující se produkce a využívání nanočástic vede k jejich stále častějšímu uvolňování do ŽP, a tím může docházet k ovlivňování organismů v něm žijících. Nanočástice se díky svým vlastnostem používají také v celé řadě průmyslových a biomedicínských aplikací. Mezi nejvíce vyráběné nanočástice se řadí oxidy kovů (Fe, Ag, Ti, Zn, Si) a nanočástice na bázi uhlíku (fullereny včetně jedno a vícevrstevných uhlíkových nanotrubic), s tím souvisejí obavy spojené s chováním a dopady těchto látek na prostředí (Canesi & kol. 2015).

Chování nanočástic v prostředí závisí na různých parametrech. Nanočástice mohou být seskupeny do mikroskopických částic nebo vloženy do exponovaných materiálů, mohou korodovat, rozpouštět se a měnit svou morfologii (jejich povrch se mění společně se změnami v prostředí; Sánchez & kol. 2011). Tyto částice se v přírodě promíchávají a reagují s dalšími složkami, jako je organická hmota, hydrofobní organické kontaminanty a anorganické ionty včetně RP (Baker & kol. 2014; Canesi & kol. 2015). Výzkum Auffana & kol. (2009) ukázal, že chemicky stabilní kovové nanočástice nemají významný toxický vliv na buňky, ale nanočástice schopné oxidace, redukce nebo rozpouštění jsou cytotoxické a genotoxické pro buněčné organismy. Z těchto důvodů je vhodné ještě před zavedením nanočástic vyhodnotit rizikové faktory jejich aplikace.

Baun & kol. (2008) doporučují, aby posouzení rizik nanočástic bylo zaměřeno nejen na jejich toxicitu jako takovou, ale aby se braly v úvahu i možné interakce s přítomnými polutanty, které by mohly vést ke změnám v jejich biologické dostupnosti, biokoncentraci a toxicitě. Tyto interakce mohou vyvolat celou řadu reakcí v organismech na různých úrovních biologické struktury. Biologické účinky takových škodlivin lze obvykle jen těžko předvídat.

Komplexní využívání nanočástic povede k tvorbě značného množství nové generace odpadu. Z těchto důvodů je nutné věnovat pozornost vývoji nových metod, které budou řešit toxicitu nanomateriálů. Vhodnou alternativou by mohlo být využívání bakterií a jiných organismů k opětovnému použití vybraných nanočástic (Bystrzejewska-Piotrowska & kol. 2009).

9. Toxicita nanočástic pro rostliny

Důležitým aspektem pro posuzování rizik spojených s nanočásticemi je pochopení jejich interakce s rostlinami. Vliv na rostliny se liší v závislosti na složení, koncentraci, velikosti a dalších fyzikálně-chemických vlastnostech nanočástic a rostlinných druhů (Ma & kol. 2010).

Potenciálně toxické kovy, jako jsou Cu, Cd, Hg, Ni a Zn, se váží na buněčné komponenty včetně bílkovin. Tento zásah do buněčných procesů často způsobuje redoxní nerovnováhy a oxidační stres u rostlin (Ma & kol. 2010). Lin & Xing (2007) a Doshi & kol. (2008) dokázali, že nanočástice obsahující Zn a Al mají toxické účinky na klíčení a růst kořenů. Zkoumáno bylo šest sazenic zemědělsky významných druhů rostlin. Výrazně byla snížena biomasa u jílku vytrvalého (*Lolium perenne*), dále byla snížena schopnost tvorby krycích pletiv u kořenů a kortikální buňky byly vysoce vakuolizované. Shah & Belozerova (2009) sledovali vliv nanočástic kovů (Si, Pd, Au, Cu) na klíčení semen salátu. Výsledky ukázaly, že nanočástice Pd a Au při nízkých koncentracích, nanočástice Si a Cu při vysokých koncentracích a kombinace nanočástic Au a Cu měly pozitivní vliv na klíčení semen. Cílem studie Ma & kol. (2013) bylo zhodnotit toxicitu a akumulaci nZVI pomocí dvou běžně se vyskytujících rostlin (orobince širokolistého (*Typha latifolia*) a hybridních topolů (*Populus deltoids* × *Populus nigra*)). Byl prokázán silný toxický účinek na rostliny, a to za zvýšených koncentrací nZVI (> 200 mg.l⁻¹ u orobince a 1 000 mg.l⁻¹ u hybridních topolů), ale při nižších koncentracích (< 50 mg.l⁻¹) byl pozorován zvýšený růst u orobince. Tato nanočástice také pronikla do epidermální buněk vyskytujících se na kořenech rostlin.

V rámci některých výzkumů bylo zjištěno, že nanočástice mohou mít nepříznivý vliv na čisté kultury bakterií, jako je *Escherichia coli*. V těchto případech může oxidace nZVI vést k produkci reaktivních forem kyslíku v živých buňkách. Na druhou stranu ionty Fe mohou vstoupit do buněk a způsobit oxidační stres, který může spolu s dalšími vlivy poškodit jejich membrány, což vede k buněčné smrti (Machado & kol. 2013).

Nanočástice nejsou toxické pouze pro sazenice rostlin, ale také pro rostlinné buňky a řasy (Ma & kol. 2010). Vnější buněčná membrána je rozhraním mezi buňkou a vnějším prostředím a umožňuje selektivní transport iontů, molekul a také nanočástic. Stabilita membrány může být narušena buď přímo (fyzické poškození), nebo nepřímo (oxidace), což může vést k buněčné smrti. Schopnost nanočástic vniknout do rostlinné buňky přes membrány usnadňuje jejich selektivní propustnost a transportní mechanismy. Interakce nanočástic s membránami do značné míry závisí na povrchových vlastnostech nanočástic (Elsaesser & Howard 2012).

Vzhledem k tomu, že tyto látky jsou schopny pronikat buněčnou stěnou a plazmatickou membránou, vnikají také do cévních svazků (xylem). Takto mohou být transportovány do stonků a listů. Díky působení nanočástic může být narušen proces dělení buněk (Ma & kol. 2010).

Nanomateriály mohou zlepšit schopnost klíčení u některých rostlin, ale zároveň mohou nepříznivě ovlivnit jiné druhy rostlin (Khot & kol. 2012). Většina studií této problematiky byla provedena v řízených podmínkách za pomoci hydroponie (Ma & kol. 2010). Pěstování rostlin v půdě, která má komplexní a polyfunkční charakter, se může v porovnání s hydroponií výrazně lišit ve sledovaných parametrech. Fytotoxickému chování nanomateriálů je třeba věnovat zvýšenou pozornost. Pochopení základních mechanismů a interakcí již před jejich zavedením je klíčové.

10. Metodika

10.1 Návrh experimentu

Nanoželezo se dle mnoha výzkumů zdá být vhodným řešením pro sanaci ŽP. Náš experiment do jisté míry simuluje procesy, které se odehrávají v reálném prostředí kontaminovaném RP. Výzkum probíhal za řízených podmínek ve skleníku FŽP. Pěstováním vybrané modelové rostliny v hydroponickém roztoku byl sledován vliv aplikace nZVI na imobilizaci a příjem Zn a vzájemných interakcí mezi nZVI, Zn a rostlinou. Hydroponický systém byl zvolen jako zjednodušený obraz podmínek pro chemicky podporovanou fytostabilizaci.

Pro dosažení stanovených cílů práce byla v hydroponických podmínkách pěstována jedna z nejvíce využívaných plodin, rajče jedlé (*Lycopersicon esculentum* L.). Rajčata jsou zdrojem mnoha živin a sekundárních metabolitů, které jsou důležité pro lidské zdraví. Plody rajčat obsahují antioxidanty (vitamín C, karotenoidy, fenolické sloučeniny, flavonoidy a fenolické kyseliny). Přítomnost nutričních nebo toxických látek v rajčatech je závislá na pěstebních podmínkách a využívání pesticidů a hnojiv. Schopnost akumulace kovů se mezi pěstovanými druhy a kultivary značně liší (Bressy & kol. 2013).

10.2 Pěstování rostlin

Semena rajčat byla s využitím plastových sadbovačů předpěstována v 6 l perlitu, který byl smíchán s 3 l půdního substrátu, tedy v poměru 2:1. Rostliny byly za těchto podmínek pěstovány po dobu 14 dní, dokud nedosáhly velikosti zhruba 5 cm. Následně byly po omytí kořenového systému vybrané vzorky sazenic přeneseny do hydroponického systému (obr. 7). Pro pěstování byly využity neprůhledné Samla boxy (IKEA, velikost: 40x20x20, objem: 5 l), které byly přikryty víkem se 6 otvory pro upevnění rostlin. Reprezentativní vzorky rostlin byly po 6 kusech umístěny do 12 boxů, do kterých byly z akvarijního aerátoru zavedeny hadice s přívodem vzduchu. Zapojení vzduchového systému podporuje provzdušnění kořenového systému rostlin. Sazenice rajčat byly pěstovány za řízených podmínek při teplotách v rozmezí 20–25 °C, sazenice byly osvětleny 24 hodin denně.



Obr. 7 Zobrazení hydroponického experimentu s upevněnými sazenicemi rajčat (foto Švengrová 2015)

10.3 Příprava Hoaglandu a jeho aplikace

Pro účely experimentu bylo připraveno 30 l modifikovaného roztoku Hoagland, který obsahoval specifické množství živin (makro- a mikroživin; tab. 1). Poté bylo do Hoaglandu přidáno 30 ml hydroxidu draselného (KOH) a pomocí pH-metru (pH 3310 SET 2, WTW, Německo) bylo změřeno pH připraveného roztoku. Výsledné pH bylo upraveno tak, aby hodnota dosáhla přibližně pH 6,5. Jednotlivé boxy byly napuštěny zhruba do $\frac{1}{2}$ svého objemu roztokem Hoaglandu a zbytek byl doplněn (přibližně do $\frac{3}{4}$ objemu jednotlivých boxů) destilovanou vodou, která byla dle potřeby průběžně doplňována (tj. v závislosti na vypařování). Hoagland byl za stejných podmínek připraven a obměňován 1× za týden. Pozice jednotlivých boxů umístěných na stole ve skleníku byly jednou týdně náhodně měněny pro zajištění stejných podmínek pro všechny testované boxy.

Tab. 1 Koncentrace jednotlivých makro- a mikroživin použitých při přípravě modifikovaného Hoaglandu (Martínez-Fernández & kol. 2015a)

Hydroponický roztok	Koncentrace (μM)
Makroživiny	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2000
KNO_3	2000
NH_4NO_3	1000
KH_2PO_4	1000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500
Mikroživiny	
H_3BO_3	25
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1
NaCl	50
FeEDDHA	20
pH	6.5

10.4 Aplikace nZVI

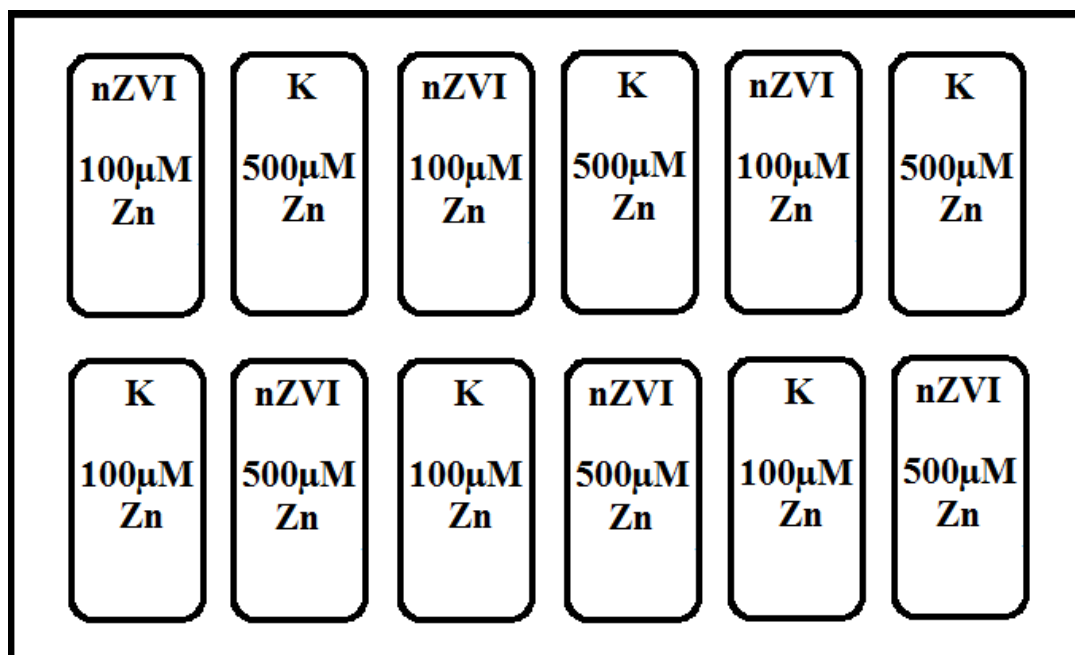
Po 14 dnech bylo do nově připraveného roztoku Hoaglandu přidáno nZVI. Bylo připraveno 60 l Hoaglandu, který tentokrát obsahoval jiné poměry živin, konkrétně u makroživin byla znatelně snížena koncentrace u jednotlivých sloučenin (tab. 2) a chelát FeEDDHA byl nahrazen $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, aby kvůli jeho přítomnosti nedošlo k narušení příjmu nZVI. Poté bylo změřeno/upraveno pH (6,5) a do roztoku byl přidán MES pufr o koncentraci 17,568 g/60 l. V této části pokusu bylo do 30 l roztoku přidáno 1,5 g nZVI a zbylých 30 l bylo ponecháno bez aplikace nZVI, čili 6 boxů obsahovalo nZVI a dalších 6 boxů sloužilo jako kontrola. Umístění boxů bylo opět náhodně změněno. Kvůli usazování nZVI na dně boxů byly tyto boxy každý den promíchávány, dle potřeby byla také doplňována destilovaná voda a kořeny jednotlivých rostlin v každém boxu byly od sebe navzájem separovány, aby nedošlo k jejich prorůstání.

Tab. 2 Upravené koncentrace makro- a mikroživin použité při přípravě Hoaglandu

Hydroponický roztok	Koncentrace (μM)
Makroživiny	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	400
KNO_3	2000
NH_4NO_3	1000
KH_2PO_4	20
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200
Mikroživiny	
H_3BO_3	20
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1
NaCl	50
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10
pH	6.5

10.5 Aplikace Zn

Po 7 dnech od aplikace nZVI byl do všech boxů přidán Zn ve formě $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Pokus byl navržen tak, že do jednotlivých boxů bylo napipetováno buď 100, nebo 500 μM této sloučeniny. Vždy byl vybrán jeden kontrolní box (bez nZVI) a jeden, který obsahoval nZVI a do obou byla aplikována stejná koncentrace $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dle schématu (obr. 8). Roztoky s obsahem nZVI byly z důvodu usazování nadále promíchávány, kořeny oddělovány a destilovaná voda byla v případě potřeby doplňována.



Obr. 8 Aplikace Zn ve dvou koncentracích do jednotlivých boxů (nZVI: boxy s aplikací nZVI, K: kontrolní boxy bez aplikace nZVI)

10.6 Odebírání vzorků rostlin v průběhu pěstování

V průběhu pěstování rostlin bylo v určitých fázích výzkumu odebíráno potřebné množství rostlinných vzorků, aby mohl být sledován a analyzován vliv aplikace roztoku a jeho modifikací na rostliny v čase.

10.6.1 První sklizeň

Těsně před aplikací Zn bylo provedeno první sklizení rostlin. Z každého boxu bylo odejmuto jedno rajče, tj. dohromady 12 rostlin. Následně byly u každé rostliny zvlášť zváženy výhonky a kořeny (tzv. čerstvá hmotnost). Jednotlivé vzorky byly následně uloženy do celkem 24 obálek (tj. 12 obálek s výhonky a 12 obálek s kořeny) a usušeny (70°C).

10.6.2 Druhá sklizeň

O 6 dní později byla provedena druhá sklizeň rostlin (tj. cca týden po aplikaci Zn). Z každého boxu byla odebrána opět jedna rostlina a zaznamenána čerstvá hmotnost jednotlivých výhonků a kořenů. Znovu bylo připraveno 24 obálek, tj. pro 12 kusů kořenů a 12 kusů výhonků pro následné sušení. Zároveň byly odebrány vzorky kořenů pro analýzu SEM, konkrétně vzorky po interakci s 500 µM Zn (kontrolní varianta bez nZVI a kořenový systém vystavený působení nZVI). Vzorky kořenů byly zhruba v polovině své délky odříznuty

pomocí skalpelu a umístěny na Petriho misky. Kořeny byly bez další úpravy následně lyofilizovány.

Po druhé sklizni byl následující den do 12 boxů na hydroponii aplikován standardní typ Hoaglandu (viz kapitola 10.2 Příprava Hoaglandu a jeho aplikace) a sledován vliv zavedení neupraveného roztoku na rostliny.

10.6.3 Třetí sklizeň

Po aplikaci standardního Hoaglandu byla o týden později provedena poslední sklizeň rostlin. Během třetí sklizně byl znovu z každého boxu odebrán 1 vzorek rostliny a obě části (výhonky a kořeny zvlášť) byly opět zváženy a připraveny na sušení jako v předchozích sklizních.

Vzorky rostlin ze všech tří sklizní byly umístěny do sušárny v laboratoři. Po úplném vysušení byla opět zvážena hmotnost obou rostlinných částí. Zaznamenána byla tedy váha čerstvě odebraných i usušených vzorků rostlin (tzv. suchá hmotnost).

10.7 Analýza ICP-OES

10.7.1 Příprava vzorků

Vzorky rostlin z první sklizně byly z původních 24 vzorků zredukovány na 12 vzorků. To znamená, že např. výhonky z kontrolních boxů byly vždy po dvou odebraných vzorcích zpracovány společně, nakonec byly získány 3 vzorky výhonků, respektive kořenů, z kontrolních boxů. Stejným způsobem byly zpracovány vzorky získané z boxů s obsahem nZVI (tab. 3). Vzorky z druhé a třetí sklizně byly ponechány v původních počtech.

Tab. 3 Integrace shodných vzorků rostlin z 1. sklizně

Číslo boxu	Aplikace nZVI	VÝHONKY	KOŘENY
		Zkumavka	Zkumavka
1	Kontrola	1+4	1+4
2	nZVI	2+3	2+3
3	nZVI		
4	Kontrola		
5	Kontrola	5+8	5+8
6	nZVI	6+7	6+7
7	nZVI		
8	Kontrola		
9	Kontrola	9+12	9+12
10	nZVI	10+11	10+11
11	nZVI		
12	Kontrola		

Všech 60 vzorků rostlin (12 z první sklizně, 24 z druhé sklizně a 24 vzorků z třetí sklizně) bylo před začátkem digesce rostlinného materiálu rozemleto pomocí analytického mlýnku (IKA A 11, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo).

10.7.2 Digesce rostlinného materiálu

Pro chemický rozklad rostlinného materiálu bylo naváženo 150 mg materiálu a následně byl tento materiál umístěn do zkumavek z tvrzeného plastu. Do všech zkumavek byly odpipetovány 2 ml peroxidu vodíku (H_2O_2) a později bylo přidáno 8 ml kyseliny dusičné (HNO_3). Po ukončení chemické reakce způsobené přidáním H_2O_2 a HNO_3 byly nádoby umístěny na topnou desku (HT, Harry Gestigkeit, Německo). Teplota byla nastavena na 150 °C a rozklad probíhal přibližně 16 hodin (přes noc). Druhý den byla provedena filtrace materiálu (0,45 μm) do odměrných baněk (25 ml). Objem jednotlivých roztoků/výluhů byl pokaždé doplněn destilovanou vodou po rysku. Vzniklý roztok byl důkladně protřepán a přelit do plastových zkumavek (10 ml) pro ICP-OES analýzu.

10.7.3 Analýza ICP-OES

Analýzou ICP-OES (Agilent 730, Agilent Technologies, USA) byla provedena detekce široké škály prvků, které byly obsaženy v rostlinách. Pro účely této studie nebyly použity informace o všech analyzovaných prvcích, počet prvků byl zredukován a šetření proběhlo pouze u následujících prvků: Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P a Zn. Jedná se o prvky, které byly součástí modifikovaného Hoaglandu a/nebo přidávány v průběhu experimentu.

10.8 Analýza SEM

Z odebraných a lyofilizovaných vzorků kořenů bylo odříznuto cca 0,5 cm materiálu a ten byl umístěn na vodivou lepicí pásku připravenou na speciálním držáku pro SEM. Vzorek byl následně pokoven vrstvou uhlíku. Snímky byly pořízeny skenovacím elektronovým mikroskopem TESCAN VEGA3XMU (TESCAN Ltd., ČR; operátorka: Mgr. Noemi Mészárosová, Geologický ústav AV ČR, v. v. i.) vybaveným energiově disperzním rtg-spektrometrem (EDS) Bruker QUANTAX200 pro semi-kvantitativní chemickou analýzu.

10.9 Statistické zpracování

Data byla v případě první sklizně zpracována pomocí T-testu (Studentův t-test) a v případě druhé a třetí sklizně byla data vyhodnocena pomocí jednocestné analýzy variance (ANOVA) v prostředí počítačového programu SPSS (IBM Corporation 2010). Všechna data podle Kolmogorova-Smirnova testu vykazovala normální rozdělení. Rozdíly mezi vypočtenými

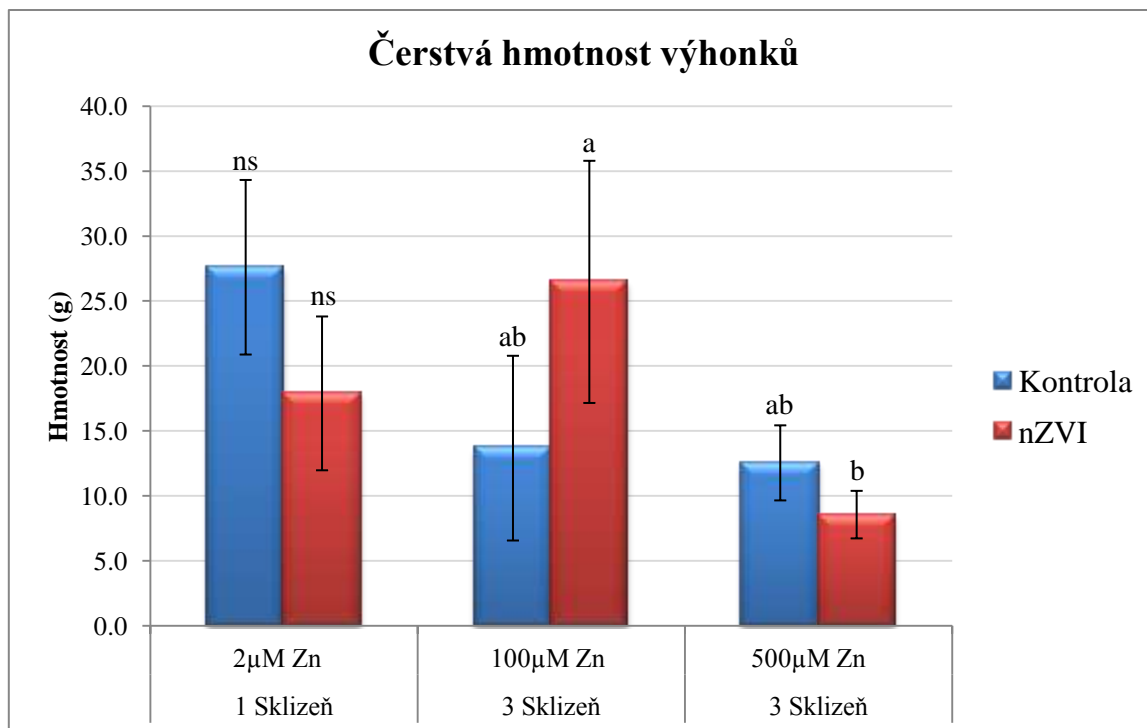
daty, respektive jejich průměry, byly testovány pomocí Tukeyho testu, aby byly rozdíly signifikantní, musely se hodnoty průměrů pohybovat na hladině významnosti $\leq 0,05$. Měření účinků jednotlivých aplikací na rostliny probíhalo vždy ve 3 opakováních ($n = 3$).

11. Výsledky

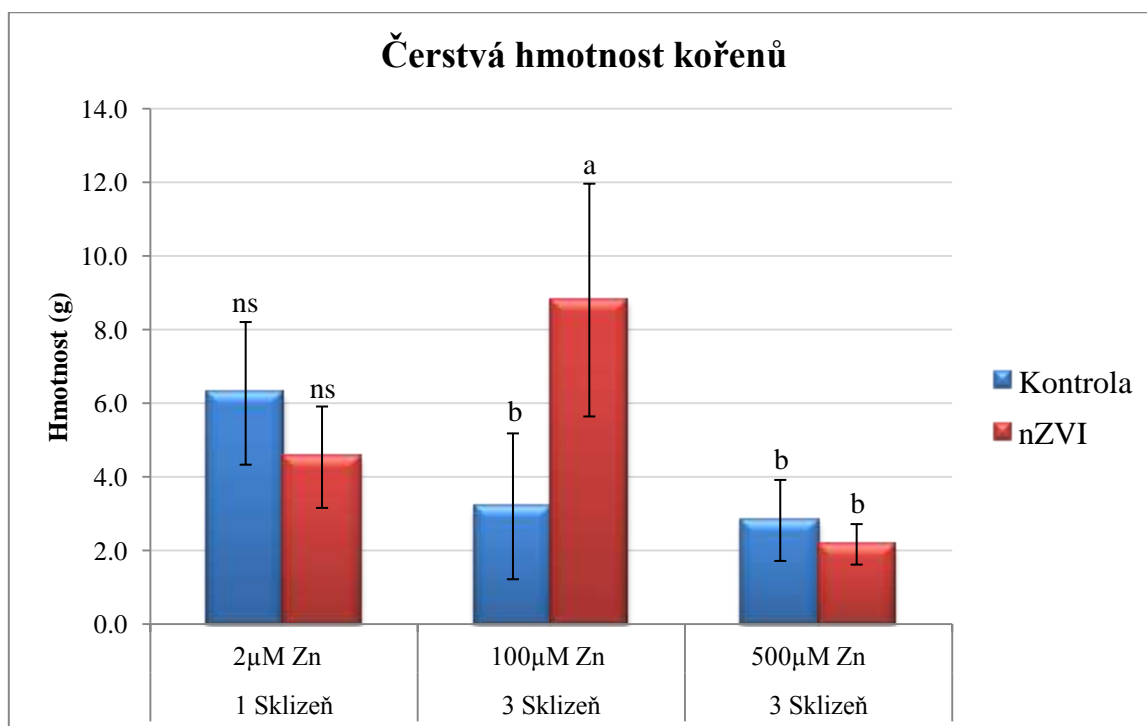
Pro následující grafická zobrazení výsledků byly vybrány pouze nejvýznamnější proměnné, a to: čerstvá váha rostlin, obsah makroživin (Ca, K, P, Mg), Fe a Zn. Pro každou proměnnou byly vytvořeny dva grafy, tj. porovnání pro výhonky a kořeny. Dále byly u sledovaných prvků zobrazeny výsledky pro první a třetí sklizeň, tedy porovnání hlavních změn na začátku a na konci experimentu. Hlavní výsledky jsou slovně zhodnoceny. Stejná písmena u chybových úseček v jednotlivých grafech naznačují, že nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi aplikacemi, zkratka ns = není signifikantní, s = signifikantní. Kompletní výsledky analýz pro všechny měřené parametry jsou uvedeny v příloze č. 1 a 2.

11.1 Vliv na biomasu

V této kapitole je zhodnocen vliv experimentálních podmínek na biomasu se zaměřením na změny v čerstvé hmotnosti rostlin. Bylo zjištěno, že při první sklizni nebyla čerstvá hmotnost kořenů ani výhonků působením nZVI ovlivněna. Bylo však zaznamenáno šedivění kořenů u boxů s aplikovaným nZVI. V dalších etapách, tj. po aplikaci Zn, byly sledovány odlišné reakce rostlin. U kontrolních boxů byl během experimentu pozorován větší úbytek roztoku než u boxů obsahujících nZVI. Při třetí sklizni byly rostliny v kontrolních boxech schopny regulovat příjem vody stejným způsobem pro obě aplikované koncentrace Zn (100 i 500 μM). Přítomnost nZVI v kořenech při koncentraci 100 μM Zn měla pozitivní vliv na příjem vody rostlinou, tzn., že při koncentraci 100 μM Zn byla čerstvá hmotnost vyšší u vzorků s obsahem nZVI, zatímco při aplikaci 500 μM Zn rapidním způsobem klesla (obr. 9, obr. 10). U boxů, které obsahovaly 500 μM Zn, byly prokázány toxické účinky na výhonky i kořeny rostlin ve větší míře než u boxů s obsahem 100 μM Zn. Možným vysvětlením je, že nZVI je schopno lépe zabránit toxicitě způsobené Zn pouze při nižších koncentracích (100 μM Zn). Vzhledem k tomu, že nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly u suché hmotnosti rostlin, změny zjištěné u čerstvé hmotnosti při poslední sklizni musely být ovlivněny akumulací vody v rostlinách.



Obr. 9 Grafické zobrazení čerstvé hmotnosti výhonků rostlin u první a třetí sklizeň



Obr. 10 Grafické zobrazení čerstvé hmotnosti kořenů rostlin u první a třetí sklizeň

Přibližně 5 dní od aplikace Zn byly na rostlinách pozorovány viditelné známky toxicity, a to u všech boxů, do kterých bylo aplikováno 500 μM Zn. Pozorováno bylo žloutnutí a seschnutí listů a tvorba hnědých pruhů na stoncích (pravděpodobně byla narušena funkce vodivých pletiv; obr. 11).



Obr. 11 Tvorba hnědých pruhů na stoncích rostlin u boxů s obsahem 500 μM Zn (foto Švengrová 2015)

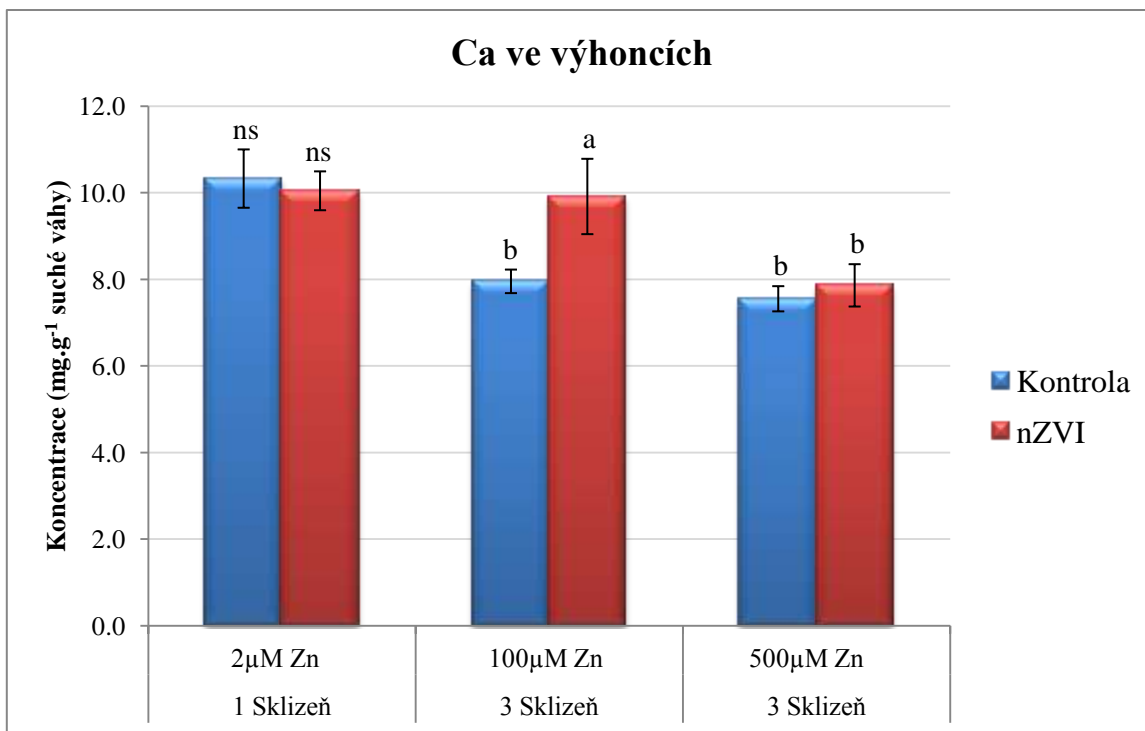
Při poslední sklizni byl u dvou rostlin v boxech s obsahem nZVI (100 μM Zn) pozorován značný nárůst biomasy (kořenů i výhonků) a roztok Hoaglandu byl ve velké míře rostlinami spotřebován. U všech boxů s obsahem 500 μM Zn byla u pěstovaných rostlin sledována inhibice růstu (kořenů i výhonků), tvorba hnědých pruhů na stoncích a chloróza listů (obr. 12).



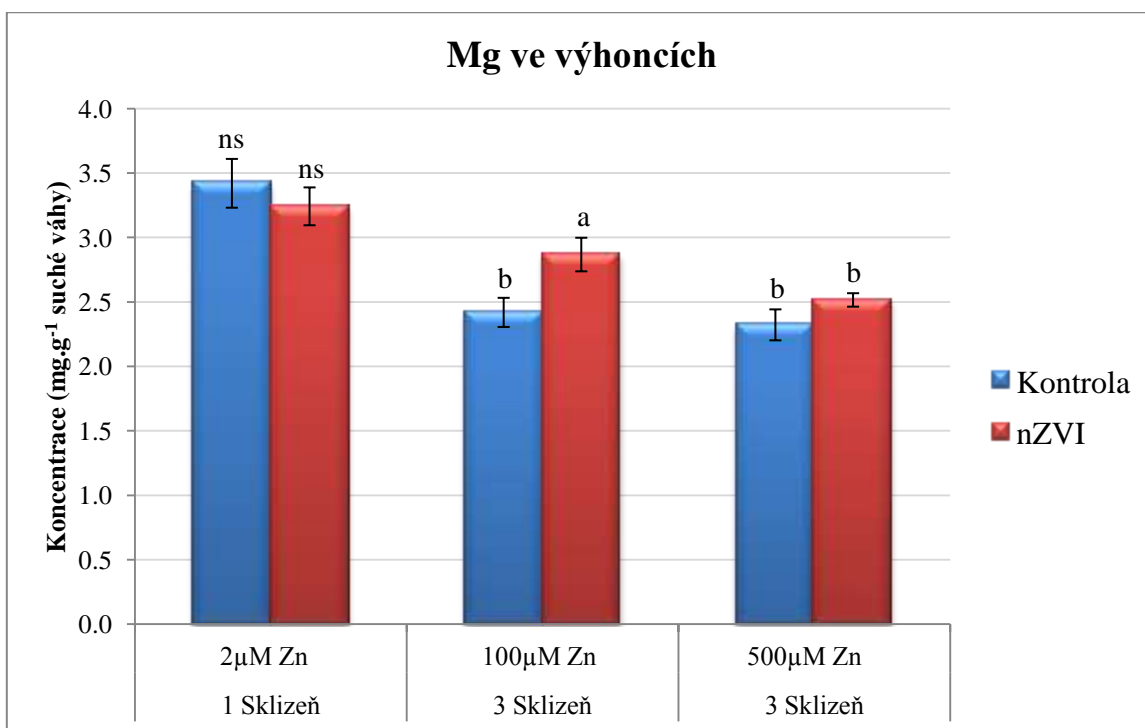
Obr. 12 Toxické příznaky rostlin u boxů s nZVI (500 μM Zn; foto Švengrová 2015)

11.2 Vliv na příjem a koncentraci makroživin v rostlinách

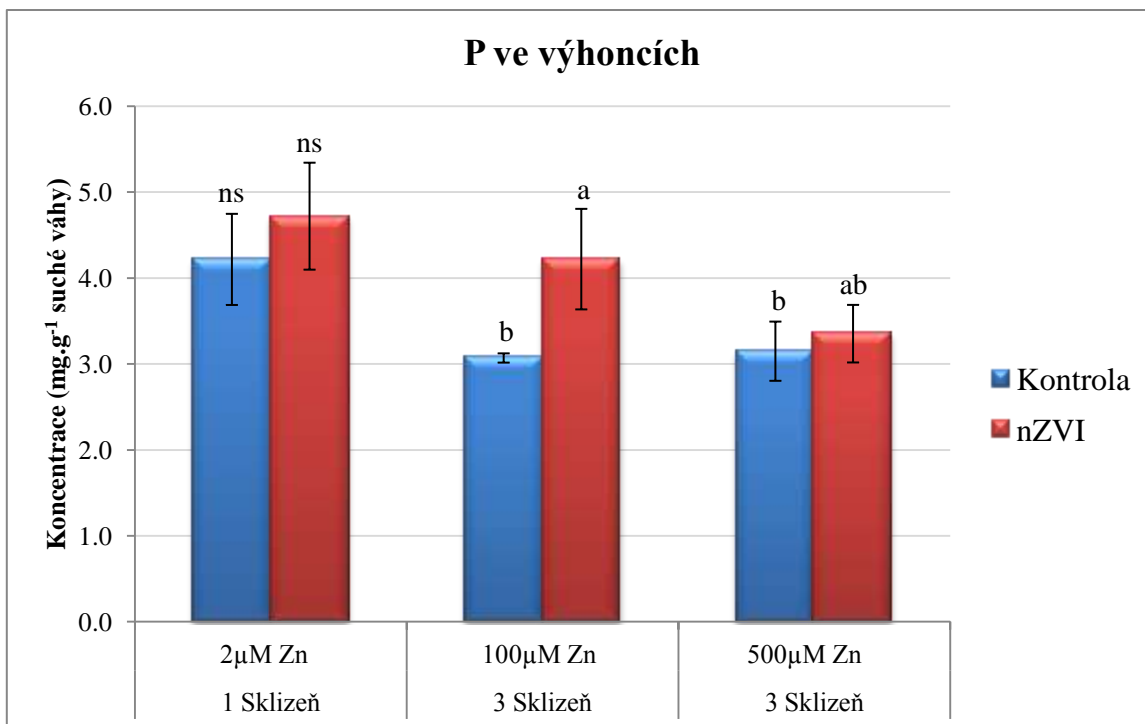
Nejvyšší koncentrace sledovaných živin ve výhoncích byly pozorovány u první sklizně, a to s nevýznamnými rozdíly mezi nZVI a kontrolní variantou. Po aplikaci 100 μM Zn byly v boxech s obsahem nZVI pozorovány zvýšené koncentrace Ca a Mg ve výhoncích (obr. 13, 14) oproti boxům s koncentrací 500 μM Zn, a to díky prokazatelně vyššímu příjmu vody rostlinami pomocí kořenů než u boxů s obsahem 500 μM Zn (v přítomnosti nZVI). U P nebyly pozorovány rozdíly mezi aplikací nZVI společně se 100 μM Zn a aplikací nZVI společně se 500 μM Zn, ale byly pozorovány vyšší koncentrace P po aplikaci nZVI v porovnání s kontrolou (obr. 15). Draslík byl jediným makroprvkem, u kterého nebyly prokázány signifikantní rozdíly mezi sledovanými variantami (obr. 16).



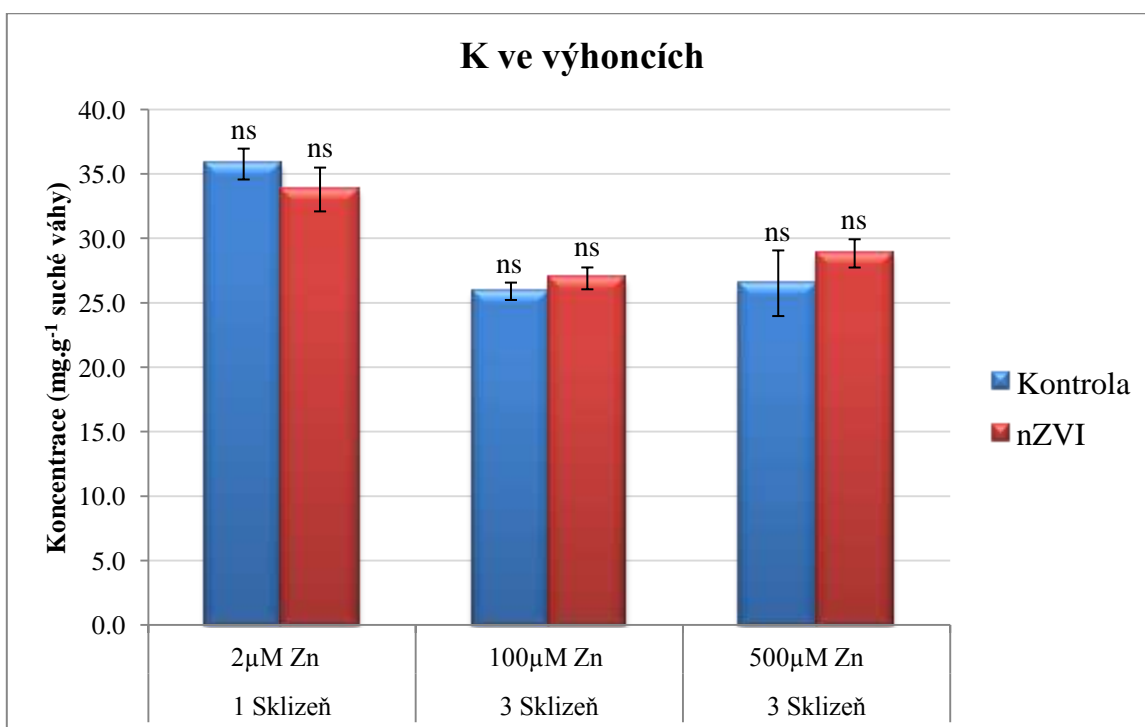
Obr. 13 Grafické zobrazení koncentrací Ca ve výhoncích rostlin u první a třetí sklizně



Obr. 14 Grafické zobrazení koncentrací Mg ve výhoncích rostlin u první a třetí sklizně

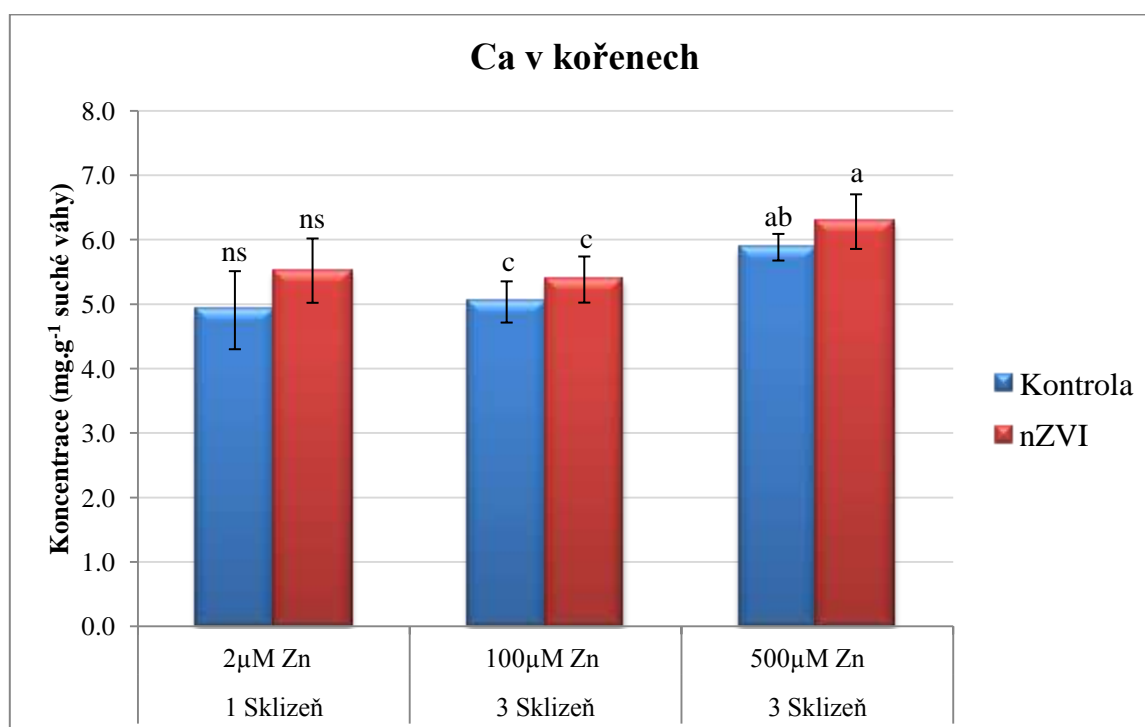


Obr. 15 Grafické zobrazení koncentrací P ve výhoncích rostlin u první a třetí sklizně

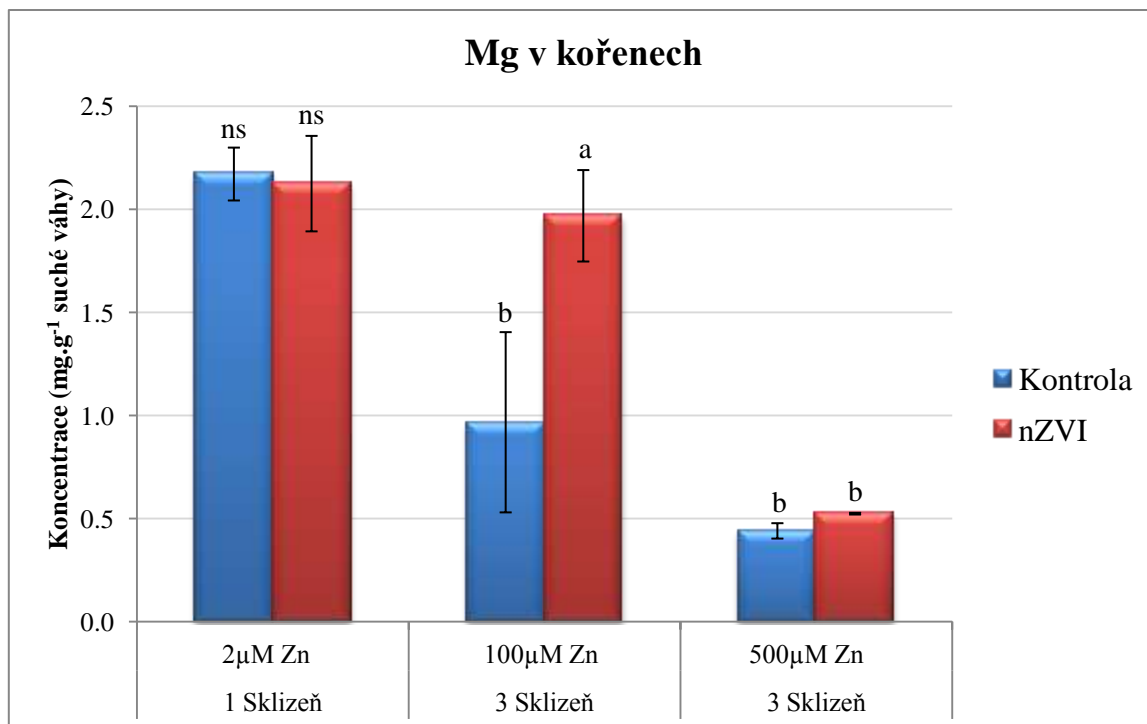


Obr. 16 Grafické zobrazení koncentrací K ve výhoncích rostlin u první a třetí sklizně

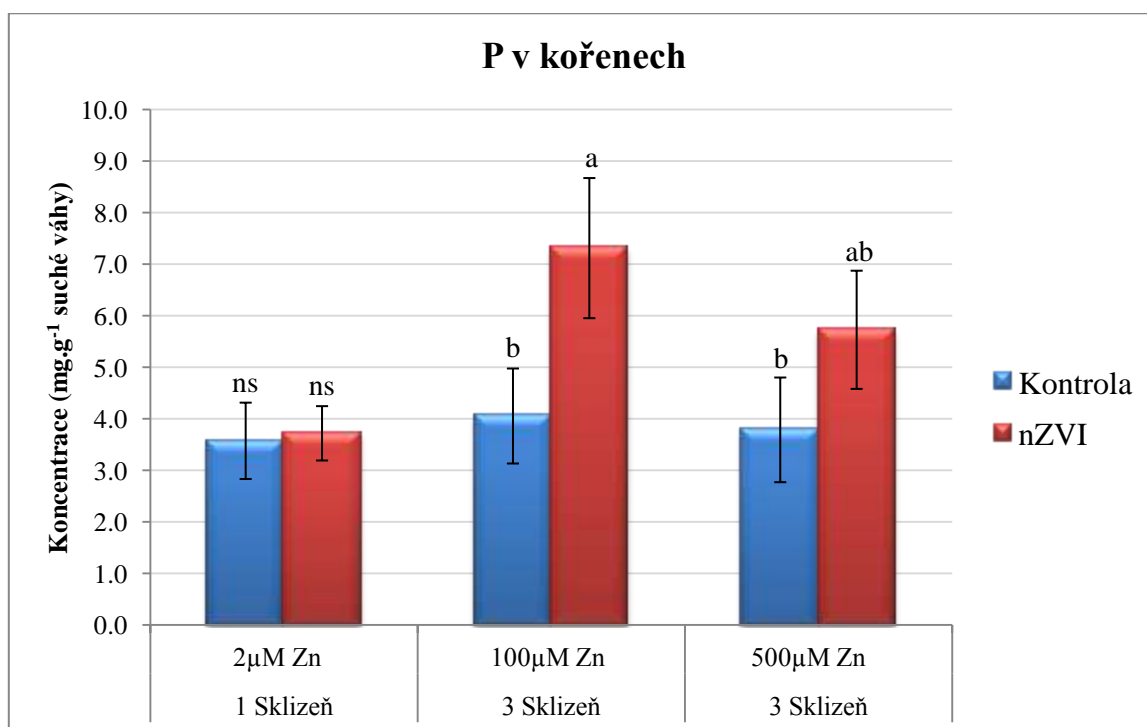
Analýza kořenů obecně ukázala významný vliv koncentrace Zn a/nebo nZVI na příjem makroživin a na rozdíl od výsledků analýzy výhonků byly pozorovány výrazné změny v trendech i mezi sledovanými prvky. V kořenovém systému rostlin byly u třetí sklizně pozorovány signifikantní rozdíly u Ca, Mg a K (obr. 17, 18, 20), a to při porovnání boxů s aplikací nZVI při koncentraci 100 μM Zn a boxů s nZVI při koncentraci 500 μM Zn. Vápník byl dokonce kořeny rostlin přijímán nejvíce při koncentraci 500 μM Zn (6,28 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ suché váhy; obr. 17). Fosfor byl prvkem, u kterého nebyly dokázány rozdíly mezi aplikací 100 a 500 μM Zn u boxů s nZVI (obr. 19).



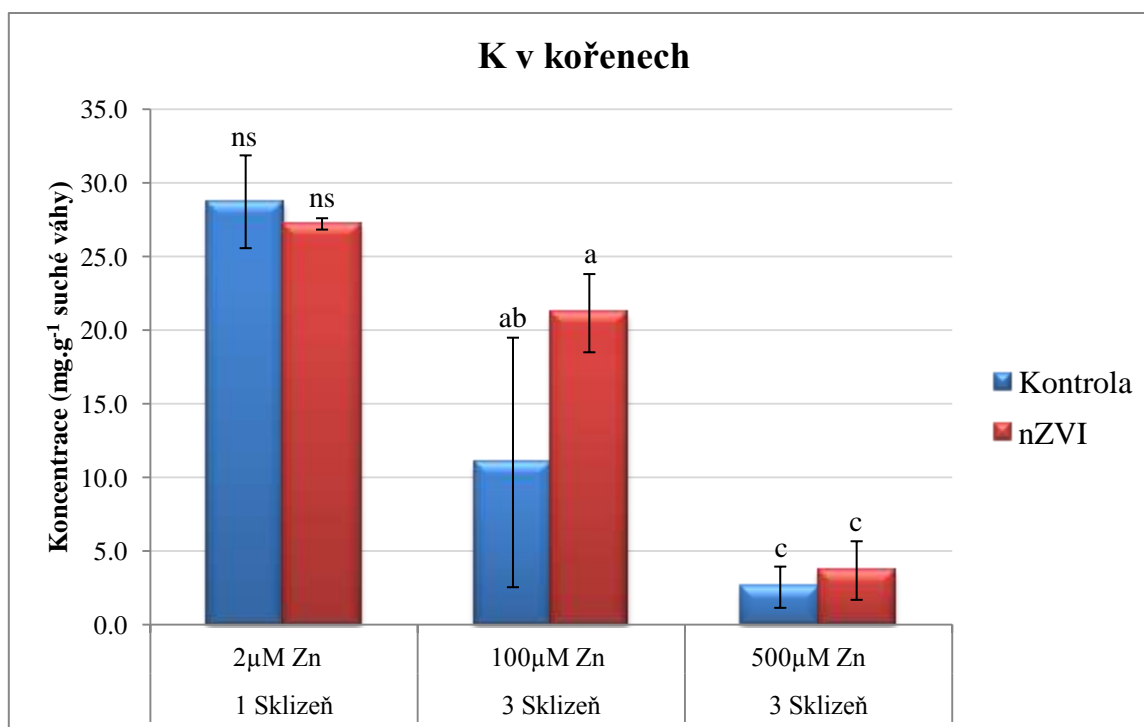
Obr. 17 Grafické zobrazení koncentrací Ca v kořenech rostlin u první a třetí sklizně



Obr. 18 Grafické zobrazení koncentrací Mg v kořenech rostlin u první a třetí sklizně



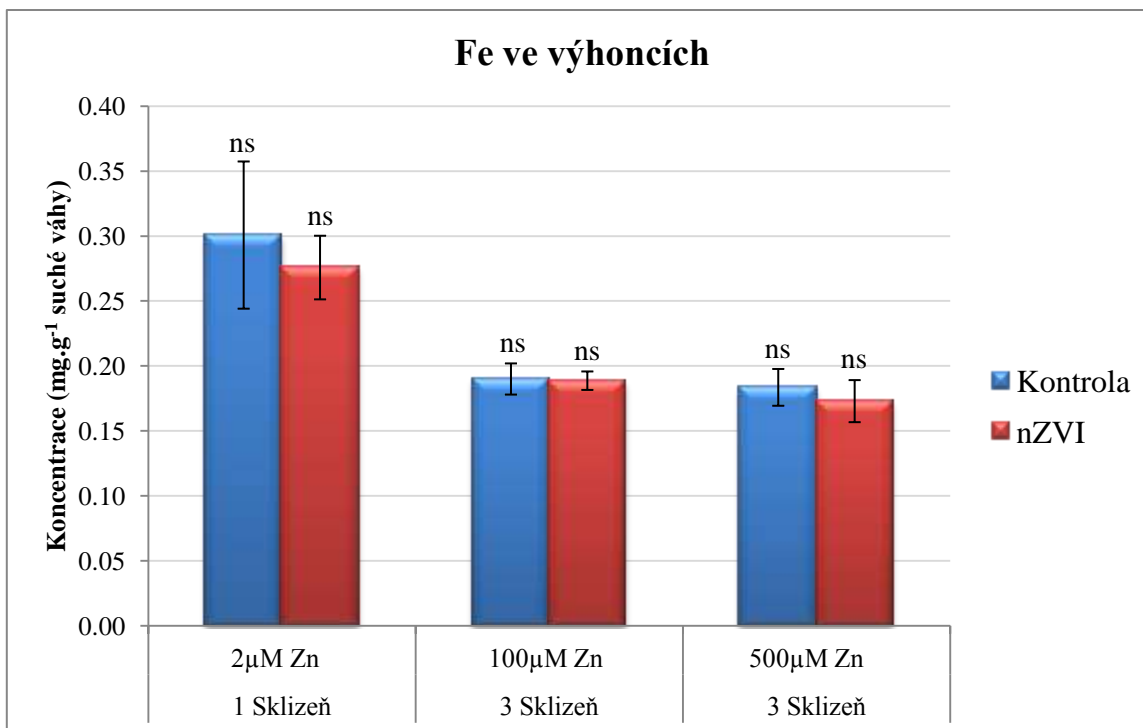
Obr. 19 Grafické zobrazení koncentrací P v kořenech rostlin u první a třetí sklizně



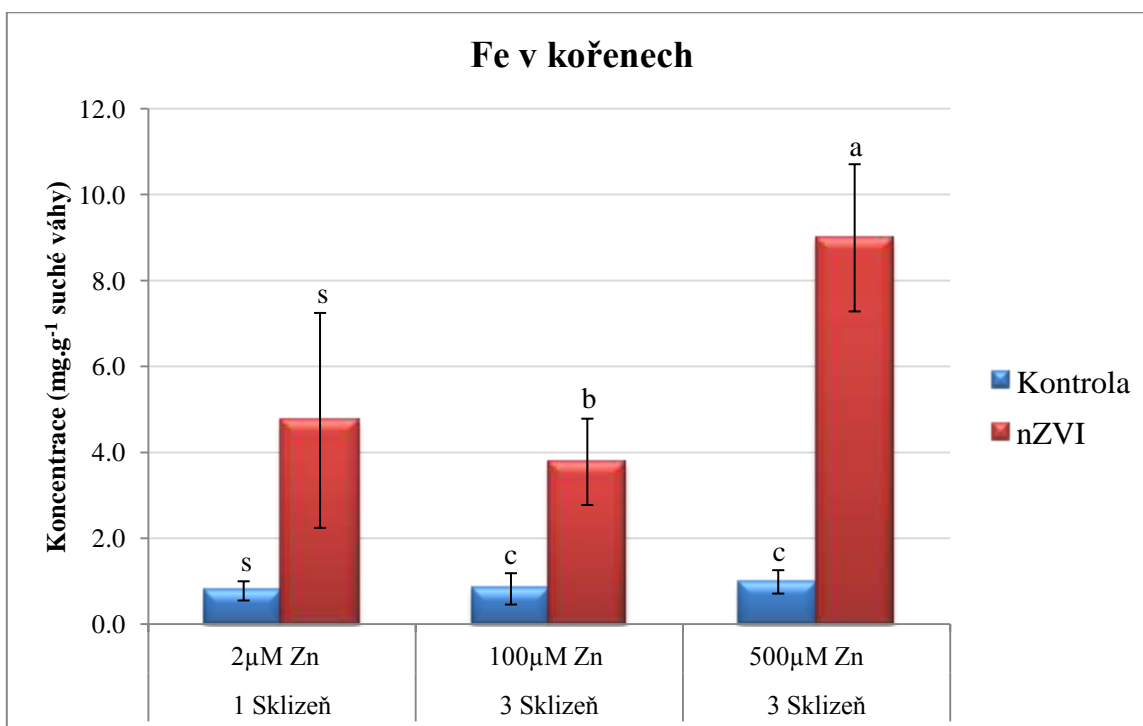
Obr. 20 Grafické zobrazení koncentrací K v kořenech rostlin u první a třetí sklizně

11.3 Vliv na příjem a koncentraci železa v rostlinách

Jelikož aplikované nZVI obsahuje značné množství Fe, byl sledován vliv aplikace částic nZVI na obsah Fe ve výhoncích (obr. 21) a v kořenech (obr. 22). Bylo zaznamenáno, že Fe se ve zvýšené míře akumuluje v kořenech rostlin (obr. 22), nicméně nebyl prokázán jeho příjem do rostlinných výhonků (obr. 21). Zvýšené koncentrace Fe v kořenech rostlin byly oproti kontrolám pozorovány u všech tří sklizní, včetně signifikantních rozdílů v koncentraci Fe zjištěných také u 2. sklizně. Během 3. sklizně byly zjištěny významné rozdíly u boxů s obsahem nZVI, a to mezi dvěma aplikovanými koncentracemi (100 a 500 μM Zn). Nejvyšší koncentrace Fe byly stanoveny u boxů s 500 μM Zn (8,99 mg.g⁻¹ suché váhy; obr. 22). Uvedené výsledky naznačují, že částice nZVI interagují výhradně s kořenovým systémem rostlin a neovlivňují přítomnost Fe ve výhoncích.



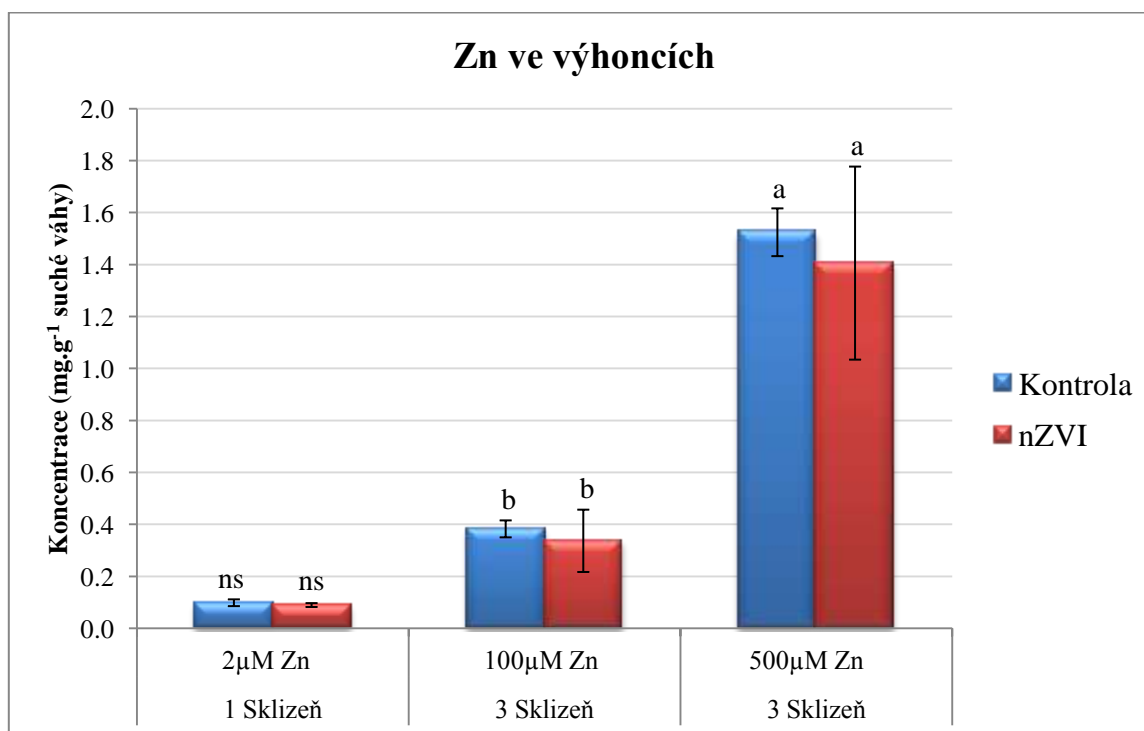
Obr. 21 Grafické zobrazení koncentrací Fe ve výhoncích rostlin u první a třetí sklizně



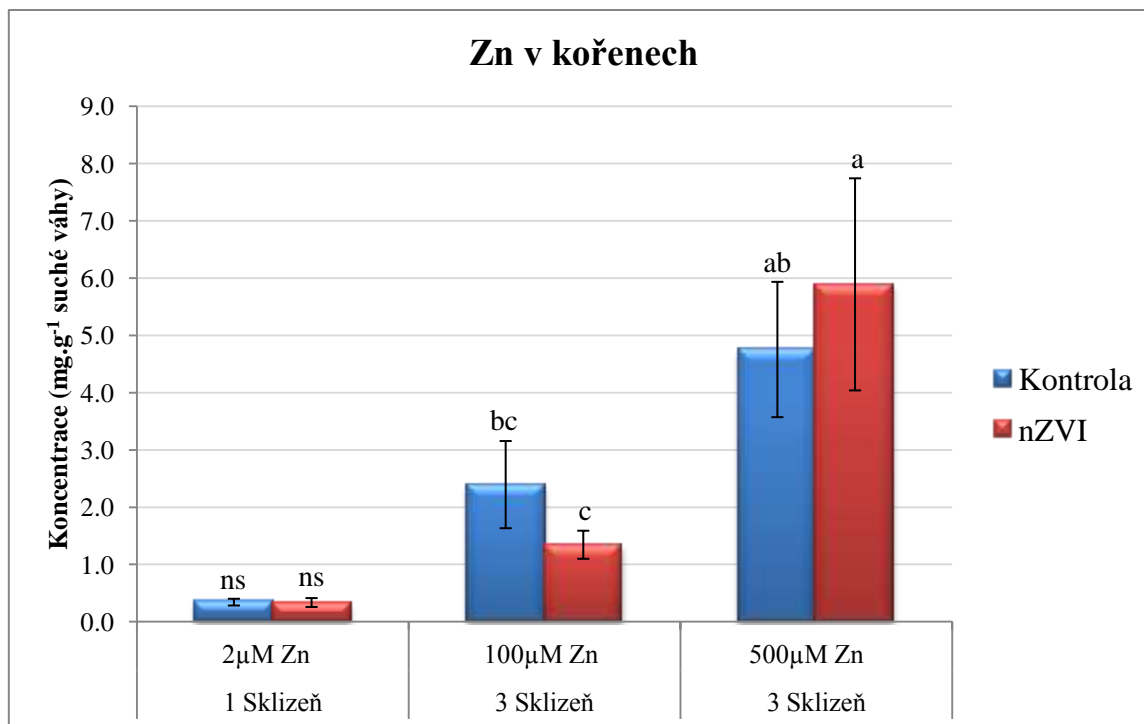
Obr. 22 Grafické zobrazení koncentrací Fe v kořenech rostlin u první a třetí sklizně

11.4 Vliv na příjem a koncentraci zinku v rostlinách

Podle předpokladu se koncentrace Zn ve výhoncích i v kořenech zvyšovaly v závislosti na množství přidaného Zn. Maximální koncentrace byla zaznamenána v případě kořenů a při aplikaci 500 μM Zn (5,89 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ suché váhy). Bylo zjištěno, že koncentrace Zn ve výhoncích byly srovnatelné pro kontrolní boxy bez nZVI a po aplikaci nZVI (obr. 23). Jiná byla situace v případě kořenů, kde u boxů s nZVI byl zaznamenán pokles Zn pro koncentraci 100 μM Zn, respektive nárůst koncentrace Zn při použití 500 μM Zn (obr. 24). Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben tím, že nZVI je schopno stabilizovat Zn pouze při nižších koncentracích (100 μM), dokud se nenaplní jeho sorpční kapacita. V případě vyšší koncentrace Zn (500 μM) není imobilizace tohoto prvku pomocí nZVI účinná. Signifikantní rozdíly pro jednotlivé aplikace (u kořenů i výhonků) byly zjištěny také u 2. sklizně (Příloha 1 a 2).



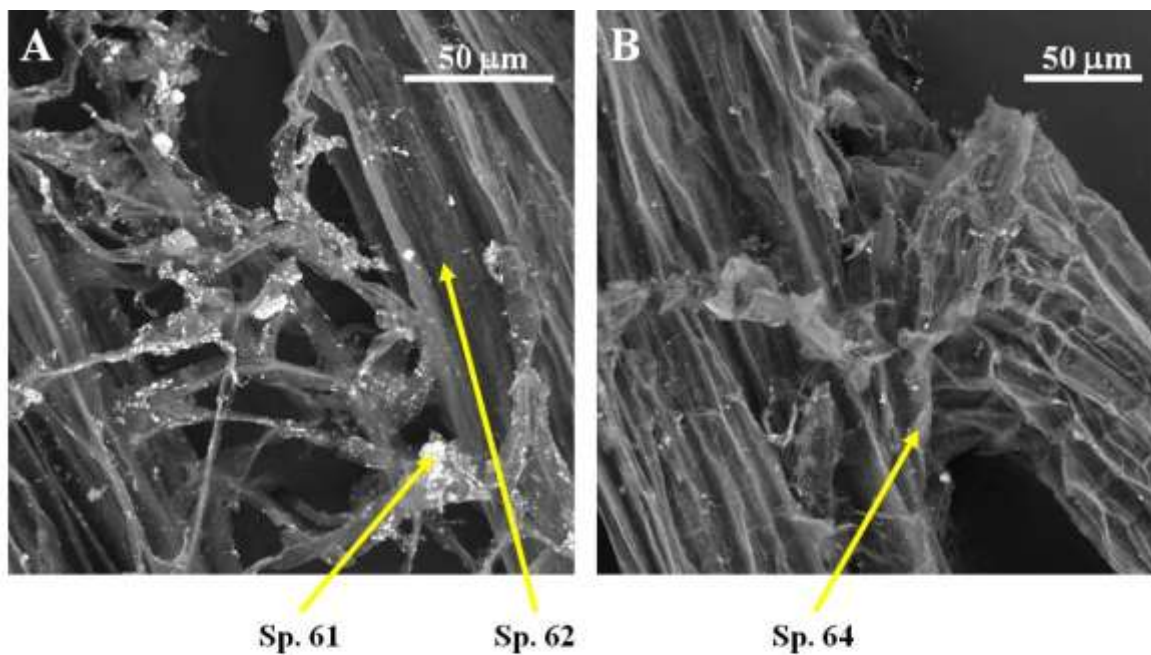
Obr. 23 Grafické zobrazení koncentrací Zn ve výhoncích rostlin u první a třetí sklizně



Obr. 24 Grafické zobrazení koncentrací Zn v kořenech rostlin u první a třetí sklizně

11.5 Zobrazení kořenů v mikroměřítku

Výsledky analýzy SEM jsou znázorněny na obrázku 25, kde je porovnání varianty s nZVI (obr. 25a) a kontrolní varianty bez nanočástic (obr. 25b). Částice Fe jsou reprezentovány světlými shluky na povrchu kořene, zejména na kořenovém vlášení. Bodová analýza EDS prokázala přítomnost Zn v těchto částicích (obr. 25a, sp. 61) s maximální zjištěnou koncentrací 0,72 hmot. %, což ukazuje na sorpci Zn na povrch nZVI. Vzhledem k vysoké použité koncentraci Zn (500 μM) byla přítomnost tohoto kovu ve značné míře detekována také při analýze samotných kořenů (obr. 25a, sp. 62). Maximální naměřená koncentrace Zn dosahovala hodnot 7 hmot. %. V kontrolní variantě byla na první pohled potvrzena absence částic Fe. Opět byla potvrzena přítomnost Zn při analýze kořenů pomocí EDS (obr. 25b, sp. 64). Hodnoty koncentrace dosahovaly až 3,65 hmot. % Zn. Výsledky jsou v souladu s trendem pozorovaným u chemické analýzy Zn u kořenů (obr. 24).



Obr.	Spektrum EDS	Vzorek	Jednotky	P	S	K	Ca	Fe	Zn
A	Sp. 61	nZVI	hmot. %	0.31	0.10	0.18		77.60	0.36
A	Sp. 62	nZVI	hmot. %	1.68	1.50	1.91	0.35	2.07	5.18
B	Sp. 64	Kontrola	hmot. %	1.09	1.32	0.73	0.22	0.82	3.50

Obr. 25 Zobrazení kořenů ve zpětně odražených elektronech pomocí SEM s odpovídající analýzou EDS: (A) kořen po expozici částicím nZVI a 500 μM roztoku Zn, (B) kořen po expozici 500 μM roztoku Zn (kontrola; zpracovala: Vítková 2016)

12. Diskuze

12.1 Vliv nanočástic železa na příjem vody

Bylo dokázáno, že přítomnost nZVI v kořenovém systému ovlivňovala transport vody do rostlinného těla, a to v závislosti na koncentraci přidaného Zn. Po aplikaci 100 μM Zn byla pozorována zvýšená schopnost rostlin akumulovat vodu, naopak aplikace 500 μM Zn vedla ke snížené schopnosti rostlin přijímat vodu svými kořeny. Martínez-Fernández & kol. (2015a) kromě jiného sledovali vliv účinků nanomaghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ve dvou koncentracích (50 mg.l^{-1} a 100 mg.l^{-1}) na hydraulickou vodivost kořenů u slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.), pěstované v hydroponickém systému. Bylo zjištěno, že obě koncentrace mají vliv na příjem vody kořeny, největší redukce hydraulické vodivosti kořenů byla zaznamenána u aplikace 100 mg.l^{-1} nanomaghemitu. Trujillo-Reyes & kol. (2013) zkoumali účinky nanočástic CeO_2 na ředkev setou (*Raphanus sativus*), tyto nanočástice byly aplikovány ve třech koncentracích (50 mg.l^{-1} , 100 mg.l^{-1} a 200 mg.l^{-1}), nejvyšší obsah vody v kořenech byl zaznamenán u nanočástic CeO_2 , jejichž povrch byl obalen kyselinou citronovou ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), při koncentraci 50 mg.l^{-1} . Ma & kol. (2013) ve své studii uvádějí, že transpirační rychlost u hybridních topolů a orobince širokolistého byla nejvyšší u kontrolních vzorků a postupně byla snižována se zvyšujícími se koncentracemi přidávaného nZVI (0, 25, 50, 200, 500 a 1000 mg.l^{-1}).

12.2 Vliv nanočástic železa na příjem makroživin

Přítomnost nZVI po přidavku Zn o koncentraci 100 μM ve většině případů prokázala pozitivní dopad, díky kterému dochází ke zvýšenému příjmu těchto živin rostlinou (Ca, Mg, P a K). Zvýšené koncentrace Zn v prostředí však pravděpodobně vedou k narušení transportního systému rostlin, a to i za přítomnosti nZVI. Martínez-Fernández & kol. (2015b) studovali vliv nanomaghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) na slunečnici roční. Bylo zjištěno, že v porovnání s kontrolou a aplikací kompostu společně s nanomaghemitem byla zřetelně snížena koncentrace Mg a Na v kořenech rostlin. V případě výhonků byly zjištěny signifikantní rozdíly u K, Mg a Na. Naproti tomu Martínez-Fernández & kol. (2015a) uvádí po aplikaci nanomaghemitu zvýšené koncentrace Ca, K, Mg a S ve výhoncích slunečnice roční, zatímco u kořenů rostlin nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly v koncentracích sledovaných makroživin. Tripathi & kol. (2015) zkoumali účinky nanočástic Si (využit byl Na_2SiO_3) na sazenice hrachu setého (*Pisum sativum* L. cv. Azad P-1). Při koncentraci 10 μM nanočástic Si byl zjištěn zvýšený obsah Mg, Ca, K a P v kořenech i výhoncích rostlin.

12.3 Vliv nanočástic železa na příjem železa a zinku

Zvýšená koncentrace Fe byla zaznamenána pouze v kořenovém systému sledovaných rostlin (obr. 22). Tento jev může být vysvětlen jednak akumulací nanočástic v kořenech rostlin a jednak jejich částečným rozpouštěním a uvolňováním Fe do roztoku. Nicméně nedochází k jeho transportu do nadzemních částí rostlin. Zvýšené koncentrace Fe v kořenech pozorovali také Martínez-Fernández & kol. (2015a) při použití nanomaghemitu jako stabilizačního činidla. Nejvyšší koncentrace Fe byla zaznamenána při koncentraci 100 mg.l^{-1} této nanočástice v roztoku. Pro výhonky rostlin nebyly stanoveny žádné signifikantní rozdíly. Martínez-Fernández & kol. (2015b) uvádí, že co se týče koncentrace Fe v kořenech a výhoncích, nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly pro jednotlivé aplikace. Trujillo-Reyes & kol. (2014) se zabývali studiem účinků nanomateriálů Fe/Fe₃O₄ a Cu/CuO na hlávkový salát (*Lactuca sativa*). Oba materiály byly syntetizovány pomocí chemické redukce (FeSO₄·7H₂O a CuSO₄·5H₂O). Nanomateriály byly do hydroponického roztoku aplikovány v dávkách 10 a 20 mg.l⁻¹ a iontové sloučeniny (FeSO₄·7H₂O a CuSO₄·5H₂O) byly aplikovány v koncentraci 10 mg.l⁻¹. Bylo zjištěno, že po aplikaci iontových sloučenin a nanočástic oxidů Fe byla koncentrace Fe v kořenech (ve srovnání s kontrolou) významným způsobem navýšena. Zvýšené koncentrace Fe v kořenech byly také (ve srovnání s kontrolou) pozorovány po aplikaci nanočástic a iontových sloučenin obsahujících Cu. Po aplikaci iontových sloučenin (Fe i Cu) nebyly u listů salátu zjištěny žádné rozdíly v koncentraci Fe. Studie tedy naznačuje, že Fe bylo vázáno pouze v kořenech. Iontové sloučeniny a nanočástice Fe neměly skoro žádné negativní účinky na buněčnou membránu. Toto zjištění naznačuje, že nedocházelo k redukci příjmu živin do rostlinného těla. Wang & kol. (2016) sledovali vliv nZVI v následujících koncentracích 0, 100, 250, 500, 750 a 1000 mg.kg⁻¹ na rýži. Bylo zjištěno, že celkový obsah Fe se v prokazatelně větší míře objevoval v kořenovém systému rostlin. U výhonků nebyly zjištěny významné rozdíly v obsahu Fe mezi aplikací nZVI a kontrolou. Výsledky poukazují na to, že zvýšená koncentrace nZVI v půdě může vést k nedostatku Fe u sazenic rýže. Aktivní transport Fe z kořenů do výhonků byl díky nZVI zablokován. V porovnání s kontrolou, byla ve výhoncích sledována významně nižší koncentrace Fe, a to i při aplikaci 1000 mg.kg⁻¹ nZVI. Zvýšené koncentrace nZVI v rostlinách se projevovaly v podobě chlorózy listů a redukce růstu sazenic. López-Moreno & kol. (2016) zkoumali vliv aplikace ferit kobaltových (CoFe₂O₄) nanočástic na rajče jedlé, které bylo pěstováno v hydroponickém roztoku. Největší koncentrace Fe byly stejně jako

v předchozích příkladech stanoveny v kořenech (po aplikaci 1000 mg.l^{-1} ferit kobaltových nanočástic).

Koncentrace Zn v kořenech byla ovlivněna přítomností nZVI (obr. 24). Bylo zaznamenáno, že nZVI lépe váže Zn při nižších koncentracích, a tím nedochází k jeho transportu do výhonků v takové míře jako při vyšších koncentracích. Naproti tomu Martínez-Fernández & kol. (2015a) nezaznamenali žádný vliv nanočástic maghemitu na koncentraci Zn v kořenech či výhoncích. Jiná studie Martíneze-Fernándeze & kol. (2015b) však uvádí významný pokles koncentrace Zn ve výhoncích slunečnice roční, která byla pěstovaná v kompostu s obsahem nanomaghemitu (v porovnání s kontrolou). Podobná situace nastala také u kořenů těchto rostlin. Trujillo-Reyes & kol. (2014) zjistili, že zvýšenou koncentrací Zn v kořenech rostlin hlávkového salátu (ve srovnání s kontrolou) významně ovlivnila aplikace $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a nano-Cu/CuO, ovšem koncentrace Zn v listech salátu ovlivněna nebyla. Na základě výzkumu, který prováděli López-Moreno & kol. (2016), byl pozorován vliv aplikace nanočástic CoFe_2O_4 na rajče jedlé. Kořeny rostlin obsahovaly v porovnání s kontrolou (bez nanočástic) nižší koncentrace Zn. Nanočástice přidané v koncentraci $62,5 \text{ mg.l}^{-1}$ významně redukovaly schopnost příjmu Zn kořeny rostlin. Transport Zn z kořenů do listů byl ve srovnání s kontrolou vyšší při aplikaci $62,5$ a 1000 mg.l^{-1} ferit kobaltových nanočástic.

Barrameda-Medina & kol. (2014) prováděli srovnávací analýzu toxických účinků Zn na hlávkový salát (*Lactuca sativa* cv. Phillipus) a brukev zelnou (*Brassica oleracea* cv. Bronco). Zinek byl do hydroponického roztoku, ve kterém byly rostliny pěstovány, aplikován v koncentraci $500 \mu\text{M}$, a to ve formě ZnSO_4 . Oproti výsledkům této diplomové práce byly zjištěny signifikantní rozdíly (pro kontrolu bez aplikace Zn i pro aplikaci $500 \mu\text{M}$ Zn) v suché hmotnosti kořenů u obou sledovaných rostlin, avšak rozdíly v suché hmotnosti listů byly sledovány pouze u brukve zelné. Sarret & kol. (2002) mimo jiné porovnávali vliv různých koncentrací Zn na akumulaci tohoto prvku v různých rostlinných částech. Pro účely této studie byl v hydroponickém roztoku pěstován huseníček Hallerův (*Arabidopsis halleri*). Semena následně pěstovaných rostlin byla pro porovnání odebírána ze dvou populací, jednalo o populaci vyskytující se v oblasti, která byla kontaminována Zn v důsledku hutního průmyslu, a oblast, v níž nebyla zaznamenána kontaminace tímto prvkem. Na rozdíl od našich výsledků bylo zjištěno, že po aplikaci $100 \mu\text{M}$ Zn ve formě ZnSO_4 (u populace z nekontaminované oblasti) se objevovaly vyšší koncentrace Zn v nadzemních částech rostlin než v kořenovém systému. Výsledky naší studie ukazují, že v kontrolních boxech (bez nZVI, s aplikací $100 \mu\text{M}$ Zn) se vyšší koncentrace Zn v prokazatelně větší míře objevují v kořenech

sledovaných rostlin (obr. 24). Nicméně při vzájemném působení nZVI a 100 μM Zn u našich vzorků nebyly pozorovány viditelné známky toxicity. Podobně nebyly negativní reakce rostlin sledovány ani u huseníčku z nekontaminované populace, jak uvádí Sarreta & kol. (2002). To může dokazovat, že aplikace nZVI (spolu s nižší koncentrací 100 μM Zn) je účinným prostředkem pro potlačení toxických účinků způsobených Zn.

13. Závěr

Aplikace nanočástic železa je v současnosti jedním z aktuálních témat při řešení kontaminace prostředí RP a hledání metod šetrné remediace.

Výsledky testování v hydroponickém systému ukázaly vliv nZVI (50 mg.l^{-1}) a přítomnosti Zn (100 a $500 \text{ }\mu\text{M}$) na schopnost rostlin transportovat vodu z kořenů do výhonků, příjem makroživin, Fe a Zn. V přítomnosti nZVI byl po aplikaci $100 \text{ }\mu\text{M}$ Zn pozorován nárůst biomasy, zatímco následkem zvýšeného množství Zn ($500 \text{ }\mu\text{M}$) byla pozorována snížená schopnost akumulace vody v rostlinách, a tím docházelo k potlačení růstu. Příjem makroživin byl v porovnání s kontrolou (tj. bez nZVI) obecně nejvyšší při koncentraci $100 \text{ }\mu\text{M}$ Zn. Aplikace nZVI zřetelně zvýšila množství Fe pouze v kořenech rostlin. Nižší koncentrace Zn v přítomnosti nZVI byly pozorovány u kořenů a výhonků při aplikaci $100 \text{ }\mu\text{M}$ roztoku. Bylo tedy prokázáno, že nZVI funguje jako stabilizační činidlo Zn pouze při nižších koncentracích tohoto kovu. Koncentrace vyšší než $100 \text{ mg Zn.kg}^{-1}$ suché váhy jsou pro rostliny toxické. Nanoželezo pravděpodobně nedokáže zabránit působení Zn ve vyšších koncentracích z důvodu omezené sorpční kapacity.

Další výzkumy by měly být zaměřeny na sledování těchto interakcí v půdním prostředí, jelikož interakce rostlin v uměle vytvořených podmínkách se mohou značně lišit od těch reálných.

Část výsledků této práce bude prezentována na konferenci “18th International Conference on Heavy Metals in the Environment”, 12. – 15. 9. 2016, Ghent, Belgie (Příloha 3).

14. Seznam použité literatury

Ali H., Khan E. & Sajad A. M., 2013: Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere* 91: 869–881.

Álvarez-Ayuso E. & García-Sánchez A., 2003 (a): Palygorskite as a feasible amendment to stabilize heavy metal polluted soils. *Environmental Pollution* 125: 337–344.

Álvarez-Ayuso E. & García-Sánchez A., 2003 (b): Sepiolite as a feasible soil additive for the immobilization of cadmium and zinc. *Science of The Total Environment* 305: 1–12.

Arruda C. C. S., Silva D. L. A., Galazzi M. R., Azevedo A. R. & Arruda Z. A. M., 2015: Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta* 131: 693–705.

Auffan M., Rose J., Wiesner R. M. & Bottero J.-Y., 2009: Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environmental Pollution* 157: 1127–1133.

Baker J. T., Tyler R. Ch. & Galloway S. T., 2014: Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution* 186: 257–271.

Barrameda-Medina Y., Montesinos-Pereira D., Romero L., Ruiz M. J. & Blasco B., 2014: Comparative study of the toxic effect of Zn in *Lactuca sativa* and *Brassica oleracea* plants: I. Growth, distribution, and accumulation of Zn, and metabolism of carboxylates. *Environmental and Experimental Botany* 107: 98–104.

Baun A., Sørensen N. S., Rasmussen F. R., Hartmann B. N. & Koch B. C., 2008: Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C₆₀. *Aquatic Toxicology* 86: 379–387.

Bernhard J., Verkleij C. A. J., Nelissen M. J. H. & Vink M. P. J., 2005: Plant-specific responses to zinc contamination in a semi-field lysimeter and on hydroponics. *Environmental Pollution* 138: 100–108.

Bolan N., Kunhikrishnan A., Thangarajan R., Kumpiene J., Park J., Makino T., Kirkham B. M. & Scheckel K., 2014: Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials* 266: 141–166.

Bressy C. F., Brito B. G., Barbosa S. I., Teixeira G. S. L. & Korn A. G. M., 2013: Determination of trace element concentrations in tomato samples at different stages of maturation by ICP OES and ICP-MS following microwave-assisted digestion. *Microchemical Journal* 109: 145–149.

Brown S., Christensen B., Lombi E., McLaughlin M., McGrath S., Colpaert J. & Vangronsveld J., 2005: An inter-laboratory study to test the ability of amendments to reduce the availability of Cd, Pb, and Zn in situ. *Environmental Pollution* 138: 34–45.

Burkhard J., Černá M., Černík M., Demnerová K., Dubánek V., Hanuš P., Herčík F., Hocke J., Charvát T., Koutský B., Kubal M., Kvapil P., Kycil R., Lovecká P., Macek T., Macková M., Malecha J., Matějů V., Matic N., Pastuszek F., Pavlíková D., Polenka M., Přikrylová V., Raschman R., Růžička M., Řičica J., Slouka J., Straka M., Veselá L. & Žáčková P., 2006: *Kompendium sanačních technologií. Vodní zdroje Ekomonitor spol. s r. o., Chrudim.*

Bystrzejewska-Piotrowska G., Golimowski J. & Urban L. P., 2009: Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management* 29: 2587–2595.

Cambrollé J., Mancilla-Leytón M. J., Muñoz-Vallés S., Luque T. & Figueroa E. M., 2012: Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. *Chemosphere* 86: 867–874.

Canesi L., Ciacci C. & Balbi T., 2015: Interactive effects of nanoparticles with other contaminants in aquatic organisms: Friend or foe? *Marine Environmental Research* 111: 128–134.

Doshi R., Braidá W., Christodoulatos Ch., Wazne M. & O'Connor G., 2008: Nano-aluminum: Transport through sand columns and environmental effects on plants and soil communities. *Environmental Research* 106: 296–303.

Elsaesser A. & Howard V. C., 2012: Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64: 129–137.

Ettler V., Mihaljevič M., Šebek O., Molek M., Grygar T. & Zeman J., 2006: Geochemical and Pb isotopic evidence for sources and dispersal of metal contamination in stream sediments from the mining and smelting district of Příbram, Czech Republic. *Environmental Pollution* 142: 409–417.

- Fu F., Dionysiou D. D. & Liu H., 2014: The use of zero-valent iron for groundwater remediation and wastewater treatment: A review. *Journal of Hazardous Materials* 267: 194–205.
- Galende A. M., Becerril M. J., Barrutia O., Artetxe U., Garbisu C. & Hernández A., 2014: Field assessment of the effectiveness of organic amendments for aided phytostabilization of a Pb–Zn contaminated mine soil. *Journal of Geochemical Exploration* 145: 181–189.
- Grieger D. K., Fjordbøge A., Hartmann B. N., Eriksson E., Bjerg L. P. & Baun A., 2010: Environmental benefits and risks of zero-valent iron nanoparticles (nZVI) for in situ remediation: Risk mitigation or trade-off? *Journal of Contaminant Hydrology* 118: 165–183.
- Gutierrez-Carbonell E., Lattanzio G., Sagardoy R., Rodríguez-Celma J., Ruiz J. J. R., Matros A., Abadía A., Abadía J. & López-Millán A., 2013: Changes induced by zinc toxicity in the 2-DE protein profile of sugar beet roots. *Journal of Proteomics* 94: 149–161.
- Haghighi M. & Pessarakli M., 2013: Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage. *Scientia Horticulturae* 161: 111–117.
- Chekli L., Bayatsarmadi B., Sekine R., Sarkar B., Maoz Shen A., Scheckel G. K., Skinner W., Naidu R., Shon K. H., Lombi E. & Donner E., 2016: Analytical characterisation of nanoscale zero-valent iron: A methodological review. *Analytica Chimica Acta* 903: 13–35.
- IBM Corporation 2010: IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Khot R. L., Sankaran S., Maja M. J., Ehsani R. & Schuster W. E., 2012: Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Protection* 35: 64–70.
- Komárek M., Vaněk A. & Ettler V., 2013: Chemical stabilization of metals and arsenic in contaminated soils using oxides – A review. *Environmental Pollution* 172: 9–22.
- Kržišnik N., Mladenovič A., Škapin S. A., Škrlep L., Ščančar J. & Milačič R., 2014: Nanoscale zero-valent iron for the removal of Zn^{2+} , Zn(II)–EDTA and Zn(II)–citrate from aqueous solutions. *Science of The Total Environment* 476–477: 20–28.

Kumpiene J., Lagerkvist A. & Maurice Ch., 2008: Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Management* 28: 215–225.

Lee H.-S., Lee S.-J., Choi J. Y. & Kim G.-J., 2009: In situ stabilization of cadmium-, lead-, and zinc-contaminated soil using various amendments. *Chemosphere* 77: 1069–1075.

Li S., Wang W., Liang F. & Zhang W.-x., 2016: Heavy metal removal using nanoscale zero-valent iron (nZVI): Theory and application. *Journal of Hazardous Materials* (v tisku).

Lin D. & Xing B., 2007: Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 150: 243–250.

López-Moreno L. M., Avilés L. L., Pérez G. N., Irizarry Á. B., Perales O., Cedeno-Mattei Y. & Román F., 2016: Effect of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles on the growth and development of *Lycopersicon lycopersicum* (tomato plants). *Science of The Total Environment* 550: 45–52.

Ma X., Geiser-Lee J., Deng Y. & Kolmakov A., 2010: Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of The Total Environment* 408: 3053–3061.

Ma X., Gurung A. & Deng Y., 2013: Phytotoxicity and uptake of nanoscale zero-valent iron (nZVI) by two plant species. *Science of The Total Environment* 443: 844–849.

Maderova L. & Paton I. G., 2013: Deployment of microbial sensors to assess zinc bioavailability and toxicity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 66: 222–228.

Mahar A., Wang P., Ali A., Awasthi K. M., Lahori H. A., Wang Q., Li R. & Zhang Z., 2016: Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126: 111–121.

Machado S., Pinto L. S., Grosso P. J., Nouws A. P. H., Albergaria T. J. & Delerue-Matos C., 2013: Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts. *Science of The Total Environment* 445–446: 1–8.

Martínez-Fernández D., Barroso D. & Komárek M., 2015 (a): Root water transport of *Helianthus annuus* L. under iron oxide nanoparticle exposure. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 1732–1741.

- Martínez-Fernández D., Vítková M., Bernal P. M. & Komárek M., 2015 (b): Effects of nano-maghemite on trace element accumulation and drought response of *Helianthus annuus* L. in a contaminated mine soil. *Water, Air, & Soil Pollution* 226: 101.
- Mateos-Naranjo E., Castellanos M. E. & Perez-Martin A., 2014: Zinc tolerance and accumulation in the halophytic species *Juncus acutus*. *Environmental and Experimental Botany* 100: 114–121.
- Mejstřík V., 1991: Ekotoxikologie ovzduší, vody, půdy a cizorodé látky: půda, 3. vydání. Vysoká škola zemědělská, České Budějovice.
- Mihucz G. V., Csog Á., Fodor F., Tatár E., Szoboszlai N., Silaghi-Dumitrescu L. & Záray G., 2012: Impact of two iron(III) chelators on the iron, cadmium, lead and nickel accumulation in poplar grown under heavy metal stress in hydroponics. *Journal of Plant Physiology* 169: 561–566.
- Micháلكová Z., Komárek M., Šillerová H., Puppa D. L., Joussein E., Bordas F., Vaněk A., Vaněk O. & Ettler V., 2014: Evaluating the potential of three Fe- and Mn-(nano)oxides for the stabilization of Cd, Cu and Pb in contaminated soils. *Journal of Environmental Management* 146: 226–234.
- Moghaddasi S., Khoshgoftarmanesh H. A., Karimzadeh F. & Chaney L. R., 2013: Preparation of nano-particles from waste tire rubber and evaluation of their effectiveness as zinc source for cucumber in nutrient solution culture. *Scientia Horticulturae* 160: 398–403.
- Mohammadi P. & Khoshgoftarmanesh H. A., 2014: The effectiveness of synthetic zinc(Zn)-amino chelates in supplying Zn and alleviating salt-induced damages on hydroponically grown lettuce. *Scientia Horticulturae* 172: 117–123.
- Němeček J., Vácha R. & Podlešáková E., 2010: Hodnocení kontaminace půd v ČR. Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, v. v. i., Praha.
- Nováková T., Šváb M. & Švábová M., 2009: Využití nanočástic v dekontaminačních technologiích: současný stav. *Chemické listy* 103: 524–532.
- O'Carroll D., Sleep B., Krol M., Boparai H. & Kocur Ch., 2013: Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation. *Advances in Water Resources* 51: 104–122.

- Rizzi L., Petruzzelli G., Poggio G. & Vigna Guidi G., 2004: Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. *Chemosphere* 57: 1039–1046.
- Sagardoy R., Morales F., López-Millán F. A., Abadía A. & Abadía J., 2009: Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biology* 11: 339–350.
- Sánchez A., Recillas S., Font X., Casals E., González E. & Puntès V., 2011: Ecotoxicity of, and remediation with, engineered inorganic nanoparticles in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30: 507–516.
- Sarret G., Saumitou-Laprade P., Bert V., Proux O., Hazemann J.-L., Traverse A., Marcus A. M. & Manceau A., 2002: Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology* 133: 1815–1826.
- Shah V. & Belozeroва I., 2009: Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water, Air, & Soil Pollution* 197: 143–148.
- Song U., Jun H., Waldman B., Roh J., Kim Y., Yi J. & Lee J. E., 2013: Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 93: 60–67.
- Soudek P., Petrová Š., Benešová D., Kotyza J. & Vaněk T., 2008: Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chemické listy* 102: 346–352.
- Sovová T. & Kočí V., 2012: Ekotoxikologie nanomateriálů. *Chemické listy* 106: 82–87.
- Stefaniuk M., Oleszczuk P. & Ok S. Y., 2016: Review on nano zerovalent iron (nZVI): From synthesis to environmental applications. *Chemical Engineering Journal* 287: 618–632.
- Stone M., 2014: How to hydroponics: A beginner's and intermediate's in depth guide to hydroponics. Martha Stone, United States.
- Su C. D. & Wong C. W. J., 2004: Chemical speciation and phytoavailability of Zn, Cu, Ni and Cd in soil amended with fly ash-stabilized sewage sludge. *Environment International* 29: 895–900.

Taiz L., Zeiger E., Møller M. I., & Murphy A., 2015: Plant Physiology and Development, 6. Edition. Sinauer Associates, U. S. (online) [cit. 1. 4. 2016], dostupné z

<<http://6e.plantphys.net/topic05.01.html>>.

Tlustoš P., Száková J., Šichorová K., Pavlíková D. & Balík J., 2007: Rizika kovů v půdě v agroekosystémech v ČR. Nепublikováno. Dep.: Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.

Tripathi K. D., Singh P. V., Prasad M. S., Chauhan K. D. & Dubey K. N., 2015: Silicon nanoparticles (SiNp) alleviate chromium (VI) phytotoxicity in *Pisum sativum* (L.) seedlings. Plant Physiology and Biochemistry 96: 189–198.

Trujillo-Reyes J., Vilchis-Nestor R. A., Majumdar S., Peralta-Videa R. J. & Gardea-Torresdey L. J., 2013: Citric acid modifies surface properties of commercial CeO₂ nanoparticles reducing their toxicity and cerium uptake in radish (*Raphanus sativus*) seedlings. Journal of Hazardous Materials 263: 677–684.

Trujillo-Reyes J., Majumdar S., Botez E. C., Peralta-Videa R. J. & Gardea-Torresdey L. J., 2014: Exposure studies of core-shell Fe/Fe₃O₄ and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: Are they a potential physiological and nutritional hazard? Journal of Hazardous Materials 267: 255–263.

Valentín-Vargas A., Root A. R., Neilson W. J., Chorover J. & Maier M. R., 2014: Environmental factors influencing the structural dynamics of soil microbial communities during assisted phytostabilization of acid-generating mine tailings: A mesocosm experiment. Science of The Total Environment 500–501: 314–324.

Vaněk A., Borůvka L., Drábek O., Mihaljevič M. & Komárek M., 2005: Mobility of lead, zinc and cadmium in alluvial soils heavily polluted by smelting industry. Plant, Soil and Environment 7: 316–321.

Vítková M., Komárek M., Tejnecký V. & Šillerová H., 2015: Interactions of nano-oxides with low-molecular-weight organic acids in a contaminated soil. Journal of Hazardous Materials 293: 7–14.

Wang J., Fang Z., Cheng W., Yan X., Tsang E. P. & Zhao D., 2016: Higher concentrations of nanoscale zero-valent iron (nZVI) in soil induced rice chlorosis due to inhibited active iron transportation. Environmental Pollution 210: 338–345.

Příloha 2. Výsledné hodnoty všech sledovaných proměnných v kořenech rajčete jedlého v průběhu jednotlivých sklizní (n = 3; průměr ± směrodatná odchylka). Stejná písmena u směrodatných odchylek ve sloupcích podle Tukeyho testu vyjadřují nesignifikantní rozdíly u aplikace:

ns: není signifikantní; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

KÖRENY					(mg.g ⁻¹ suché váhy)									
Sklizeň	Aplikace nZVI	Aplikace Zn	Čerstvá váha (g)	Suchá váha (g)	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	P	Zn
1	Kontrola	2 µM Zn	6.27 ± 1.94	0.26 ± 0.12	4.90 ± 0.61	0.021 ± 0.006	0.77 ± 0.224	28.7 ± 3.15	2.17 ± 0.128	0.15 ± 0.035	0.022 ± 0.0060	0.90 ± 0.657	3.57 ± 0.74	0.35 ± 0.06
	nZVI	2 µM Zn	4.53 ± 1.38	0.18 ± 0.05	5.52 ± 0.50	0.031 ± 0.008	4.74 ± 2.501	27.2 ± 0.39	2.13 ± 0.231	0.11 ± 0.021	0.027 ± 0.0004	0.54 ± 0.031	3.72 ± 0.53	0.34 ± 0.08
	<i>t Student</i>		ns	ns	ns	*	**	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
2	Kontrola	100 µM Zn	5.18 ± 0.18	0.22 ± 0.03	3.71 ± 0.66	0.015 ± 0.002	0.43 ± 0.067 b	17.1 ± 1.90	1.11 ± 0.227	0.05 ± 0.010	0.009 ± 0.0016	0.62 ± 0.136	3.01 ± 0.61	6.39 ± 0.12 b
		500 µM Zn	3.85 ± 0.95	0.16 ± 0.06	3.61 ± 0.49	0.015 ± 0.003	0.57 ± 0.131 b	16.1 ± 4.32	0.92 ± 0.236	0.04 ± 0.010	0.010 ± 0.0026	0.69 ± 0.237	2.69 ± 0.35	8.55 ± 0.22 a
	nZVI	100 µM Zn	4.87 ± 0.83	0.28 ± 0.07	4.23 ± 0.37	0.019 ± 0.001	2.90 ± 0.736 a	20.8 ± 1.51	1.38 ± 0.239	0.04 ± 0.005	0.016 ± 0.0047	0.46 ± 0.080	3.03 ± 0.15	3.96 ± 1.04 c
		500 µM Zn	4.25 ± 0.23	0.20 ± 0.05	3.89 ± 0.64	0.029 ± 0.012	3.45 ± 1.455 a	14.6 ± 3.04	1.01 ± 0.115	0.04 ± 0.010	0.018 ± 0.0083	0.58 ± 0.083	3.10 ± 0.51	9.08 ± 0.61 a
	<i>ANOVA</i>		ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3	Kontrola	100 µM Zn	3.20 ± 1.98 b	0.14 ± 0.15	5.03 ± 0.32 c	0.030 ± 0.013	0.82 ± 0.365 c	11.0 ± 8.47 ab	0.97 ± 0.437 b	0.03 ± 0.010 c	0.009 ± 0.0019	0.24 ± 0.057 ab	4.06 ± 0.92 b	2.40 ± 0.76 bc
		500 µM Zn	2.82 ± 1.10 b	0.16 ± 0.03	5.88 ± 0.21 ab	0.034 ± 0.013	0.98 ± 0.273 c	2.56 ± 1.40 c	0.44 ± 0.037 b	0.03 ± 0.003 c	0.012 ± 0.0081	0.22 ± 0.009 b	3.79 ± 1.02 b	4.75 ± 1.18 ab
	nZVI	100 µM Zn	8.80 ± 3.16 a	0.34 ± 0.15	5.38 ± 0.36 c	0.028 ± 0.003	3.78 ± 1.004 b	21.2 ± 2.65 a	1.97 ± 0.222 a	0.07 ± 0.015 a	0.019 ± 0.0081	0.32 ± 0.021 a	7.31 ± 1.36 a	1.35 ± 0.25 c
		500 µM Zn	2.17 ± 0.55 b	0.10 ± 0.05	6.28 ± 0.42 a	0.052 ± 0.017	8.99 ± 1.713 a	3.69 ± 1.99 c	0.52 ± 0.004 b	0.05 ± 0.015 ab	0.021 ± 0.0065	0.19 ± 0.015 b	5.73 ± 1.15 ab	5.89 ± 1.85 a
	<i>ANOVA</i>		*	ns	**	ns	***	**	***	**	ns	**	*	**
<i>Generální ANOVA</i>			**	*	ns	*	***	*	ns	ns	ns	ns	*	**
<i>H</i>			ns	ns	***	***	**	***	***	***	***	**	***	***
<i>nZVI</i>			ns	ns	**	**	***	ns	**	ns	***	ns	**	ns
<i>Zn</i>			*	ns	ns	*	*	***	***	ns	ns	ns	ns	***
<i>H*nZVI</i>			*	ns	ns	ns	*	*	*	**	ns	ns	**	ns
<i>H*Zn</i>			*	ns	*	ns	*	***	***	ns	ns	ns	ns	***
<i>nZVI*Zn</i>			*	ns	ns	ns	*	*	*	ns	ns	ns	ns	**
<i>H*nZVI*Zn</i>			*	ns	ns	ns	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns

Příloha 3. Abstrakt na konferenci “18th International Conference on Heavy Metals in the Environment”, 12. – 15. 9. 2016, Ghent, Belgie

EFFECTS OF NANOSCALE ZERO-VALENT IRON (nZVI) AND Fe_2O_3 NANOPARTICLES ON ROOT HYDRAULIC CONDUCTIVITY OF *Solanum lycopersicum*

Domingo Martínez-Fernández, D. Švengrová, M. Komárek

Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Environmental Sciences, Department of Environmental Geosciences, Prague, Czech Republic
domingo.msarfer@gmail.com

Keywords: nano-oxide; tomato; water transport, chlorophyll, iron

Introduction

Recently, the synthesis and utilization of iron based nanomaterials with novel properties and functions have been widely studied, both for their nano size and for their magnetic characteristics (Komárek et al., 2015). For that reason, the application of iron nanoparticles (NPs) is being rapidly extended and environmental engineering has used them for remediation purposes, especially for the removal of metal/metalloids from contaminated waters and soils, or their stabilization therein (Gómez-Pastora et al., 2014; Martínez-Fernández et al., 2016b). However, their safety still represents an unknown barrier to their full application. Even when most of the available studies on phytotoxicity of iron NPs have focused mainly on their advantages, relatively few have examined the mechanisms of phytotoxicity, uptake, translocation, and bioaccumulation (Zhang et al., 2015). Considering the roots as the first organ which can suffer from NPs interference in the soil, there is a need to evaluate the impacts on plant physiology of NPs together with their potential ecotoxicity and interactions with the key processes in the rhizosphere (Elsasser and Howard, 2012). The aim of this experiment was to study the effects of two iron nanomaterials (nZVI and nFe_2O_3) on the plant response of tomato, focusing on the root water conductivity and the effects derived directly from physical phytotoxicity.

Methods

To evaluate the root functionality of *Solanum lycopersicum* L. under nanoparticles exposure, a hydroponic experiment was conducted to obtain intact root systems, and then evaluate the consequences of the individual effects of the two selected NPs. It was performed in 5-l containers, with 4 plants in each, randomly distributed in a glasshouse (20-25°C, 13 h daylight/11 h darkness, PAR 225 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 60-80% H°). The plants were growing 23 days in a modified nutrient solution (Martínez-Fernández et al., 2016a), until the root system had developed sufficiently to allow the determination of the root hydraulic conductivity (L_w). Then, five treatments were imposed: Control without NPs; 50 and 100 mg l^{-1} of nZVI or nFe_2O_3 . After the 5 days of treatment with nZVI or nFe_2O_3 , L_w was measured by pressurising the roots into a Scholander chamber (model 600; PMS instruments Co., Corvallis, OR, USA) (Martínez-Fernández et al., 2016a). Sap was collected every 60 seconds using a syringe, placed in Eppendorf tubes and weighed on a precision balance. Finally, the L_w ($\text{mg g}^{-1} \text{FW h}^{-1} \text{MPa}^{-1}$) was calculated as the slope of the line relating mg of gathered sap per g of fresh root and per hour to the external pressure applied (from 0.1 to 1.5 MPa). The plants (shoot and roots separately) were weighed just after harvesting (FW) and were dried to constant weight for the dry weight determination (DW). The Fe concentration was extracted from the plant material by acid digestion ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$) at 210°C, and determined by inductively-coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) (Varian, VistaPro, Australia). The chlorophyll a (Chl a) and chlorophyll b (Chl b) contents were determined with the method of Lichtenthaler and Wellburn (1983).

Results

Table 1. Root hydraulic conductivity (L_0), Fe in the sap and shoot, and chlorophyll contents in FW of *S. lycopersicum* cultivated hydroponically, after 5 days of exposure to nZVI or nFe₂O₃. Mean values denoted by the same letter do not differ significantly according to Tukey's test ($p > 0.05$); ns not significant.

Nanomaterial	Treatment	L_0 ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{MPa}^{-1}$)	Fe in the sap (mg l^{-1})	Fe in the Shoot	Chl a (mg kg^{-1})	Chl b (mg kg^{-1})
nZVI	Control	2131	0.502	0.6314	1542 a	487 a
	+50 mg l^{-1}	2961	0.316	0.4941	922 b	289 ab
	+100 mg l^{-1}	2316	0.419	0.4336	621 b	276 b
	ANOVA	ns	ns	ns	**	*
nFe ₂ O ₃	Control	2087 a	0.469	0.4824	1458 a	460
	+50 mg l^{-1}	1613 ab	0.451	0.5686	1116 ab	350
	+100 mg l^{-1}	1266 b	0.395	0.4040	669 b	299
	ANOVA	**	ns	ns	**	ns

The high reactive capacity of NPs could stimulate their adhesion to the epithelial root cell wall, and NPs particles appeared changing the color of the roots surfaces (gray for nZVI and red for nFe₂O₃), affecting their interactions with the external medium. Presumably, the accumulation of NPs in the epithelial cells of the root surface interfered with the water transport because of physical and chemical interactions, with the consequent L_0 reduction. However, changes in FW or DW were not detected here (data not shown). The recorded effects of nano-oxides on plants indicate lack of uptake, insignificant translocation to the shoots (Martínez-Fernández et al., 2016 a, b). The impacts on the roots may have affected the uptake of elements such as Mg from the solution, a nutrient associated with the synthesis of chlorophyll.

Conclusions

Short-term treatments with nFe₂O₃ at concentrations of 100 mg l^{-1} had significant effects on the root water uptake of *S. lycopersicum* plants, but no effects were detected for nZVI, which could be crucial during the maintenance of plant water relations during more privative water conditions.

Acknowledgements: D. Martínez-Fernández: postdoctoral grant (19835/PD/15) financed by the "Consejería de Educación y Universidades de la CARM", through the "Fundación Séneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia". M. Komárek: Czech Science Foundation (project 15-07117S).

References

- Elsaesser, C.; Howard, V. (2012). Toxicology of nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64, 129-137.
- Gómez-Pastora, J.; Bringas, E.; Ortiz, I. (2014). Recent progress and future challenges on the use of high performance magnetic nano-adsorbents in environmental applications. *Chem. Eng. J.*, 256, 187-204.
- Komárek, M.; Koretsky, C. M.; Stephen, K.J.; Alessi, D. S.; Chrástný, V. (2015). Competitive adsorption of Cd(II), Cr(VI), and Pb(II) onto nanomaghemite: A spectroscopic and modeling approach. *Environ. Sci. Technol.*, 49, 12851-12859.
- Lichtenhaler, H.K.; Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. T.*, 11 (5), 591-592.
- Martínez-Fernández, D.; Barroso, D.; Komárek, M. (2016a). Root water transport of *Helianthus annuus* L. under iron oxide nanoparticle exposure. *Environ. Sci. Pollut. R.*, 23, 1732-1741.
- Martínez-Fernández, D.; Vitková, M.; Michálková, Z.; Komárek, M. (2016b). Engineered nanomaterials for phytoremediation of metal/metalloids contaminated soils; implications for plant physiology. In: Ansari, A.A., Gill, S.S., Gill, R., Lanza, G.R., Lee, N. (Eds.), *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants* Volumen V. Springer, New York, USA.
- Zhang, P.; Ma, Y.; Zhang, Z. (2015). Interactions between engineered nanomaterials and Plants: Phytotoxicity, uptake, translocation, and biotransformation. Springer International Publishing Switzerland. MH Siddiqui et al. /eds.). *Nanotechnology and Plants Sciences*.