

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

**Studium vlivu xenobiotik na životní
prostředí pomocí vybraných
ekotoxikologických testů**

Diplomová práce

Autor: Bc. Zuzana Rigová

Studijní program: N 1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: Ing. Vladimír Dvořák, Ph.D.

Hradec Králové

leden 2017

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Zadání diplomové práce

Autor: Bc. Zuzana Rigová
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název závěrečné práce: Studium vlivu xenobiotik na životní prostředí pomocí vybraných ekotoxikologických testů

Název závěrečné práce AJ: Study of xenobiotics effect on the environment through use of selected ecotoxicological tests

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Cílem diplomové práce je porovnání různých typů ekotoxikologických testů s mikrobiologickým testem. Testy inhibice růstu na jednobuněčné řase nebo na semenech rostlin budou porovnány například s výsledky bakteriálních bioluminiscenčních testů toxicity. Dále bude zhodnocena citlivost testů a reakce testovaných organismů na toxické působení látek.

Garantující pracoviště: Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: Ing. Vladimír Dvořák, PhD.

Oponent práce: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 20. 1. 2015

Datum odevzdání závěrečné práce:

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, a že jsem v seznamu literatury uvedla všechny použité zdroje, ze kterých jsem vycházela.

.....

V Hradci Králové dne

Zuzana Rigová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Ing. Vladimíru Dvořákovi, Ph.D. za pomoc a odborné vedení při zpracování diplomové práce. Dále patří velké poděkování mému příteli Ing. Lubošovi Velinskému, za projevenou trpělivost a poskytnuté rady, a také mojí rodině, za všestrannou podporu.

Anotace

Rigová, Z. *Studium vlivu xenobiotik na životní prostředí pomocí vybraných ekotoxikologických testů*. Hradec Králové, 2017. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Vladimír Dvořák. 66 s.

Tato diplomová práce se zabývá studiem vlivu nanočástic na životní prostředí. Cílem práce je ověřit vliv vybraných testovaných látek na testovací organismy pomocí ekotoxikologických testů. V teoretické části jsou popsány nejpoužívanější nanočástice oxidu zinečnatého, oxidu titaničitého a stříbra, včetně dosavadních poznatků o nich. V experimentální části jsou uvedeny pracovní postupy a získané výsledky jednotlivých testů, včetně vyhodnocení. V kapitole diskuze je pak uvedeno závěrečné porovnání získaných výsledků.

Klíčová slova: ekotoxicita, nanočástice, ZnO, TiO₂, IC50

Annotation

Rigová Z. *Study of xenobiotics effect on the environment through use of selected ecotoxicological tests*. Hradec Králové, 2017. The Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Vladimír Dvořák. 66 p.

This thesis studies the impact of nanoparticles on the environment. The aim is to verify the influence of selected test substances on test organisms using ecotoxicological tests. The theoretical part describes the most widely used nanoparticles of zinc oxide, titanium oxide and silver, including existing knowledge about them. In the experimental section provides operating procedures and the results of tests, including evaluation. In chapter discussion is stated final comparison of the results obtained.

Keywords: ecotoxicity, nanoparticles, ZnO, TiO₂, IC₅₀

Obsah

1	Úvod	9
2	Metodika.....	11
3	Teoretická část:.....	12
3.1	Nanomateriály a nanotechnologie	12
3.2	Moderní využití vybraných nanočástic	13
3.2.1	Nanočástice ZnO a TiO ₂	13
3.2.2	Nanočástice Ag	15
3.3	Toxický účinek nanočástic.....	17
3.4	Ekotoxicita nanočástic	19
3.4.1	Ekotoxicita ZnO a TiO ₂	21
3.4.2	Ekotoxicita Ag.....	24
3.5	Mechanismus působení nanočástic.....	27
3.5.1	Reaktivní formy kyslíku.....	27
3.5.2	Uvolňování kovových iontů.....	28
3.5.3	Genotoxicita.....	30
4	Experimentální část	31
4.1	Materiál a metody	31
4.1.1	Testované látky a jejich roztoky.....	31
4.1.2	Živné roztoky	32
4.1.3	Koncentrační řady.....	34
4.2	Testy ekotoxicity	35
4.2.1	Test inhibice růstu kořene rostliny <i>Sinapis alba</i>	35
4.2.2	Test inhibice růstu rostliny <i>Lemna sp.</i>	36
4.2.3	Test inhibice růstu jednobuněčné řasy <i>Desmodesmus subspicatus</i>	37
4.2.4	Test inhibice bioluminiscence bakterie <i>Vibrio fischeri</i>	38
4.3	Vyhodnocování výsledků	39

4.3.1	Vyhodnocování výsledků testu inhibice růstu kořene <i>Sinapis alba</i>	39
4.3.2	Vyhodnocování výsledků testu inhibice růstu <i>Lemna sp.</i>	40
4.3.3	Vyhodnocování výsledků testu inhibice růstu jednobuněčné řasy <i>Desmodesmus subspicatus</i>	41
4.3.4	Vyhodnocování výsledků testu inhibice bioluminiscence bakterie <i>Vibrio fischeri</i>	42
5	Výsledky	43
5.1	Testování vlivu ZnO na inhibici růstu kořene rostliny <i>Sinapis alba</i>	43
5.2	Testování vlivu TiO ₂ na inhibici růstu kořene rostliny <i>Sinapis alba</i>	44
5.3	Testování vlivu ZnO na inhibici růstu <i>Lemna sp.</i>	45
5.4	Testování vlivu TiO ₂ na inhibici růstu <i>Lemna sp.</i>	46
5.5	Testování vlivu ZnO na inhibici růstu jednobuněčné řasy <i>Desmodesmus subspicatus</i>	47
5.6	Testování vlivu TiO ₂ na inhibici růstu jednobuněčné řasy <i>Desmodesmus subspicatus</i>	48
5.7	Testování vlivu ZnO na inhibice bioluminiscence bakterie <i>Vibrio fischeri</i>	49
5.8	Testování vlivu TiO ₂ na inhibice bioluminiscence bakterie <i>Vibrio fischeri</i>	50
6	Diskuze	51
7	Závěr	54
8	Seznam použitých zdrojů	56
8.1	Seznam použité literatury	56
8.2	Seznam použitých obrázků a jejich zdrojů	63
9	Přílohy	65

1 Úvod

Za xenobiotika jsou považovány cizorodé látky, s kterými se organismy v průběhu evoluce nedostaly do styku, avšak s výjimkou posledních desetiletí. Tyto látky vznikají činností člověka, dostávají se do životního prostředí (dále jen ŽP) a kontaminují ho. Primární zdroj xenobiotik je zejména chemický průmysl, sekundární zdroj představuje oblast spotřeby produktů chemické výroby (Knejzlik, Kas et. Ruml, 2000) . Xenobiotika lze kategorizovat do známých tříd látek, dle způsobu jejich rozšíření a použití, jak lze vyčíst z tabulky č. 1.

Tab. 1 - Vybrané sekundární zdroje xenobiotik

sekundární zdroj xenobiotik	příklad skupiny látek
potravinářství	potravinářská aditiva - ochucovadla, barviva
lékařství	syntetické léky – chemoterapeutika, psychotropní látky
zemědělství	pesticidy, herbicidy
doprava	NOX, Pb, CO ₂
energetický průmysl	CO ₂ , SO ₂ , popílek
spotřební průmysl	plasty, barviva, nátěrové hmoty

K významným xenobiotikům je nutné zařadit také nanočástice, ačkoliv se v životním prostředí vyskytovaly odpradávná. Člověk byl a je vystavován kontaktu s nanočásticemi v rámci přirozených procesů, jako jsou vulkanické erupce nebo hoření. V dnešní době jsou běžnou součástí moderního světa. Nanočástice lze dělit na ty, které vznikají jako vedlejší produkt jiného procesu, jako například hoření pohonných hmot ve spalovacích motorech, spalování odpadu či topných materiálů atd. a na ty synteticky vyráběné, připravované pro určitou aplikaci ve výrobě (Nohavica, 2012). Přehled vybraných nanočástic je zaznamenán v tabulce č. 2.

Tab. 2 – Cíleně připravované nanočástice pro aplikaci ve výrobě (Dohnalová et Dohnal, 2015)

typ nanočástice	popis
uhlíková čern	Čistá forma uhlíku. Velmi jemný černý prášek. Částice menší než 100 nm.
kovy, oxidy kovů, keramika	Množství kompaktních forem NČ včetně nano oxidu titaničitého a křemene. Často v agregované podobě. Kompozity obsahují např. kovové jádro a povrch z oxidu kovu či slitiny.
fullereny	Sférické molekuly složené z atomů uhlíku.
uhlíkové nanotrubičky	Allotropní forma uhlíku s cylindrickou strukturou. Mohou být jednovrstevné (single-walled) či vícevrstevné (multi-walled).
nanodrátky	Vodivé či polovodivé nanodrátky o velikosti desítek nm, např. Co, Au, Cu, Si.
kvantové tečky	Malé (2-10 nm) útvary polovodičového materiálu s elektronickými, optickými nebo katalytickými vlastnostmi.
dendrimery	Polymery s rozvětvenou strukturou, často symetrické okolo jádra. Možnost funkcionalizace periferních funkčních skupin.
nanojíly	Keramické nanočástice, např. bentonit, kaolinit aj.

Vzhledem k chemicko-fyzikálním vlastnostem nanočástic a stoupající kvantitě, která proniká do životního prostředí, nastává významný problém. Nanočástice vykazují kumulativní vlastnosti ve vodě, v půdě, v ovzduší, posléze v tělech mikroorganismů, rostlin i živočichů. Stávají se tak součástí potravinového řetězce (Nohavica, 2011).

Proto je důležité pohyb a chování nanočástic v ŽP pravidelně monitorovat, případné škody eliminovat a v první řadě jim předcházet. Významnou roli zde hraje obor ekotoxikologie, který sleduje toxický účinek těchto látek. Cílem mé práce je právě popis potencionálně problematických nanočástic pronikajících do ŽP a provedení souboru testů toxicity na vybraných testovacích organismech. Dále je zhodnocena citlivost testů a reakce testovaných organismů na toxické působení látek.

2 Metodika

Cílem diplomové práce bylo zjistit toxicitu vybraných xenobiotik, konkrétně nanočástic oxidu zinečnatého a oxidu titaničitého, pomocí vybraných ekotoxikologických testů. Teoretická část práce byla sepsána s pomocí dostupných odborných publikací a internetových zdrojů, k vyhledávání článků byla využívána především databáze Google Scholar a také Web of Science. Experimentální část práce byla realizována v laboratořích Univerzity Hradec Králové. K testům byla využita laboratoř s veškerým potřebným vybavením a přístroji. K testování bylo využito následujících testovacích organismů: semena rostliny hořčice bílé (*Sinapis alba*), vodní rostlina okřehek (*Lemna sp.*), jednobuněčné zelené řasy (*Desmodesmus subspicatus*) a také zástupce bakterií (*Vibrio fischeri*). Po dobu provádění testů byly organismy uchovávány v adekvátních podmínkách pro udržení jejich dobré životaschopnosti. Všechna testování probíhala podle platných ČSN, EN, OECD a ISO norem. Byly aplikovány následující ekotoxikologické testy:

- Test inhibice růstu kořene klíčící rostliny
- Test inhibice růstu vodní rostliny
- Test inhibice růstu jednobuněčné řasy
- Test inhibice bioluminiscence bakterie

Testy byly prováděny za přesně definovaných podmínek. Testované látky byly uchovávány v uzavřených skleněných nádobách při pokojové teplotě.

Výsledky testů byly porovnávány vždy s kontrolním stanovením. Veškeré naměřené hodnoty byly zpracovávány v počítačovém programu MS Excel. Na základě vzorce pro výpočet inhibice byly stanoveny konečné hodnoty inhibice. Podle těchto podkladů byly vygenerovány grafy závislosti inhibice na koncentraci toxikantu. Z grafu byla získána kvadratická rovnice a po vyřešení výsledku byla získána hodnota IC50. V kapitole diskuze byly porovnány konečné výsledky u všech testů mezi sebou pro zjištění míry toxicity testovaných nanočástic. Výsledky byly také porovnány s dostupnými informacemi z odborné literatury.

3 Teoretická část:

3.1 Nanomateriály a nanotechnologie

Dle mezinárodní organizace pro normalizaci (International Organization for Standardization, ISO) zní definice pro „nanomateriál“ následovně: „materiál s jakýmkoli vnějšími rozměry o velikosti v řádu nanometrů nebo s vnitřní strukturou či povrchovou strukturou v řádu nanometrů“, tedy 1-100 nm (ISO Standard 80004-4).

Dle nařízení komise EU 696/2011 zní definice následovně: „*Nanomateriálem se rozumí přírodní materiál, materiál vzniklý jako vedlejší produkt nebo materiál vyrobený obsahující částice v nesloučeném stavu nebo jako agregát či aglomerát, ve kterém je u 50 % nebo více částic ve velikostním rozdělení jeden nebo více vnějších rozměrů v rozmezí velikosti 1 nm – 100 nm*“.

Předpona „nano“ vyjadřuje mocninu 10^{-9} , tj. miliardtinu. Pro představu, existuje několik analogií, které pomohou k reálné představě tohoto rozměru. Například, šířka jednoho lidského vlasu je 50 000 nm. Nanometr ve srovnání s metrem je přibližně stejná proporce jako golfový míček v porovnání se zeměkoulí. ATP syntáza v našich buňkách měří 10 nm v průměru, šířka dvoušroubovice DNA jsou pouze 2 nm (Trujillo, 2014).

Nanočástice se v životním prostředí vyskytovaly vždy, ať ze zdrojů přirozených nebo jako důsledek lidské činnosti. Nanočástice ve vzduchu jsou označovány jako ultrajemné, v půdě a ve vodě jsou to koloidy (Klaine et al., 2008).

Nanotechnologie představují perspektivní obor se slibnou prognózou vývoje. Cílem nanotechnologií je vytvořit strukturu či objekt s novými vlastnostmi, které lze dobře využít (například čip – struktura tisíckrát menší, než ty vyráběné běžnou technologií). Konstrukčními prvky jsou molekuly a také samotné atomy (Hlubina, 2007). Využití nanotechnologií a nanomateriálů je velmi široké, například v elektronice a elektrotechnickém průmyslu, zdravotnictví, strojírenství, chemickém průmyslu, textilním průmyslu, optickém průmyslu, v kosmetice, vojenském průmyslu a také v oblasti životního prostředí, a to k biodegradaci, odstraňování nečistot atd. (Slavík, 2011).

Spektrum produktů nanotechnologií je široké, lze jej rozdělit do několika různých tříd, a to na uhlíkaté nanomateriály, nanopolymery, jako například dendrimery, oxidy kovů, polovodičové materiály, zahrnující kvantové tečky a nulmocné kovy jako je železo, zlato a stříbro. Syntéza nanočástic kovů a oxidů kovů je velmi běžná záležitost většiny chemických laboratoří. Produkce těchto nanočástic probíhá také při broušení sypkými materiály. Nanočástice nulmocného železa byly po určité období využívány na sanaci vod, sedimentů a půd za účelem snížení dusičnanů pomocí redukce a v nedávné době také k detoxikaci organochlorových pesticidů a polychlorovaných bifenyly. Oxid titaničitý (TiO_2) a oxid zinečnatý (ZnO) jsou hojně využívány pro své fotolytické vlastnosti. Zdaleka největší množství spotřebitelských produktů s aplikací nanomateriálů se týkají nanočástic stříbra (Klaine et al., 2008). Již od starověkých časů byly ionty stříbra známy pro svůj antimikrobiální efekt. Dnes jsou stříbrné ionty používány ke kontrole bakteriálního růstu v mnoha oblastech medicíny. Jsou využívány k léčbě popálenin, v zubním lékařství, ale také v mnoha jiných oblastech, například jako součást elektrických spotřebičů. V současné době jsme vystavováni širokému spektru produktů obsahujících stříbro, právě pro své antimikrobiální vlastnosti (Klasen, 2000).

3.2 Moderní využití vybraných nanočástic

3.2.1 Nanočástice ZnO a TiO_2

Miletín (2011) uvádí, že oxid zinečnatý a oxid titaničitý patří k nejvyužívanějším oxidům kovů při výrobě kosmetických přípravků s tzv. minerálními filtry. Jde o fyzikální blokátory, které selektivně rozptylují a odrážejí UV záření. Inovativní výrobní postupy umožňují přípravu minerálních filtrů s částicemi o rozměrech v řádu desítek nanometrů. Po aplikaci na pokožce pak vzniká „UV zrcadlo“ a kosmetický výrobek tak dosahuje vysokých hodnot SPF. Autor dále uvádí, že TiO_2 se dle svých vlastností dá považovat spíše za UVB filtr, kdežto ZnO absorbuje v celé šířce UV záření. Pro dokonalou ochranu před UV zářením bývají proto využívány obě látky společně. Minerálním filtrům je vytýkána například fotokatalytická aktivita či možnost průniku nanočástic do pokožky.

Autorky Hochmannová et Vytřasová (2010) tvrdí, že fotokatalytické vlastnosti ZnO i TiO_2 jsou podobné. Vlivem světla o určité vlnové délce dochází k jejich aktivaci.

Významnou společnou vlastností těchto oxidů je vznik povrchově vázaných hydroxylových radikálů. Fotokatalytické oxidy vykazují antimikrobiální efekt a rozkládají organické polymery. Za chemicky nejstálejší jsou považovány fluorované kopolymery a silikátová pojiva, silikonové oligomery a hybridní silikon-organické reaktivní polymery.

Autorky Hochmannová et Vyřasová (2010) dále uvádí využití nanočástic ZnO a TiO₂ jako příměs do samočisticích nátěrů. Nátěry mají antibakteriální vlastnosti a slouží jako UV filtry. Také jsou doporučovány k ošetření stěn a střech proti zaplísnění či řasovým organismům. V současné době jsou zkoumány silikátové nátěrové hmoty s příměsí výše uvedených nanočástic, které by mohly posloužit v objektech se zvýšenými požadavky na hygienu prostředí (např. zdravotnická zařízení, potravinářská a farmaceutická výroba). ZnO nanočástice jsou využívány k výrobě alkydových, akrylátových, epoxidových a polyurethanových pojivových systémů a nátěrových hmot, plastů, lékařských přístrojů a implantátů. V kombinaci s nanočásticemi stříbra jsou využívány na biocidní nátěrové hmoty.

TiO₂ je často používán jako aditivum do mnoha potravin, výrobků osobní hygieny, farmaceutických výrobků a jiných spotřebních produktů lidské spotřeby. Mezi potraviny s nejvyšším obsahem TiO₂ patří sladkosti a žvýkačky. Z produktů osobní hygieny jsou to zejména ty bíle zbarvené, např. zubní pasty atp. Nižší koncentrace TiO₂ pak obsahují různé krémy, šampony, deodoranty, sprchové gely. Nejvyšší expozici TiO₂ z jídla jsou vystavovány děti, právě kvůli vysokým koncentracím této látky v cukrovinkách, což potvrzuje studie z Monte Carla (Weir et al., 2012).

Nanočástice ZnO jsou využívány zejména v UV protektivních krémech, zubních pastách, a dalších kosmetických produktech. Dále jsou tyto nanočástice široce využívány při výrobě gumy, produkci solárních panelů a LCD obrazovek, pigmentů, chemických vláken, elektroniky a textilu. Navíc jsou nanočástice ZnO nezbytnou přísadou téměř všech typů antikoročních nátěrů a pro své antibakteriální vlastnosti v poslední době nahrazují využití oxidu zinečnatého (Bondarenko et al., 2013).

3.2.2 Nanočástice Ag

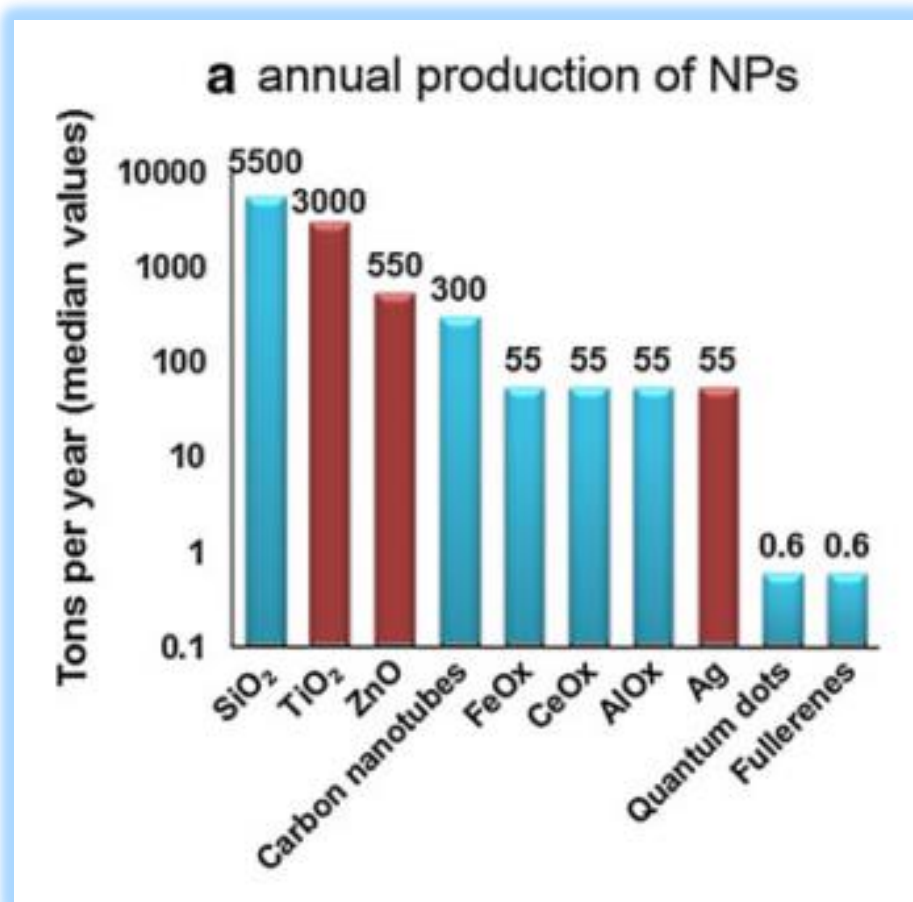
Nanočástice stříbra jsou v mnoha směrech výhodné svou malou velikostí částic s velkým povrchem a pomalým uvolňováním iontů. Proto jsou nanočástice Ag uplatňovány v mnoha odvětvích a jsou aplikovány například v supravodičích, superkondenzátorech, bateriích, lékařských přístrojích, obvazech a katetrech. Ag je k dispozici ve formě prášku či v koloidní formě a využívá se ve výrobě nanokompozitů, nanostrříbrné tiskařské barvy, lepidla atd. Na trhu existuje obrovské množství produktů obsahujících nanočástice Ag, díky jeho vynikajícím vodivým a antimikrobiálním účinkům. Kvůli stoupající poptávce po elektronice, založené na nanočásticích Ag, lze očekávat zvýšení jeho tržní hodnoty. Hnací silou trhu jsou především pračky, ledničky, vzduchové filtry, vodní filtry, fény a náhrada konvenčního stříbra, oxidu idnia dotovaného oxidem cínu atd. ve smartphonech, LED a LCD obrazovkách. Dále je nanočástic Ag hojně využíváno ve zdravotnictví, k úpravě povrchů zdravotnických prostředků, obvazů na rány, klik a madel v nemocnicích atd. Velký potenciál mají nanočástice Ag také v oblasti solární energie, lékařství, farmaceutiky, textilního a kosmetického průmyslu a také při výrobě různých detergentů (Transparency Market Research, 2014).

Byly vyvinuty pračky, které elektricky generují ionty Ag, s účelem prevence snadno přenosných bakteriálních a houbových onemocnění, jejichž transmise probíhá přes kontaminované prádlo. Princip tohoto mechanismu může být využíván zejména v nemocničních zařízeních, ale také v domácnostech, v kterých přebývají osoby s oslabenou imunitou, či zvířata. Byla provedena studie, která potvrdila antifungální aktivitu stříbrných iontů v těchto pračkách (Jung et al. 2007)

V další studii bylo využito průtoková cytometrie a transmisní elektronová mikroskopie, pro zjištění antibakteriální aktivity Ag iontů, generovaných z výše uvedených praček, proti mikroorganismům *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Antibakteriální efekt byl testován s použitím detergentu. *Staphylococcus aureus* byl značně redukován v pračce produkující Ag ionty za použití detergentu v porovnání s konvenční pračkou. *Escherichia coli* byla dokonale eliminována za použití detergentu v pračce produkující Ag ionty i v konvenční pračce. Bez použití detergentu byla *E. coli* značně redukována v pračce produkující Ag ionty na rozdíl od výsledků testů z pračky konvenční (Jung et al., 2008).

V lékařství je Ag využíváno v mnoha odvětvích, například jako součást biokompatibilních materiálů. Výzkum je zaměřen například na vrstvy hydroxyapatitu (HA). Dle Jelínka et al. (2009) se jedná o bioaktivní materiál s osteoindukčními a osteokondukčními vlastnostmi, který je využíván k upravení povrchu implantátů. HA tvoří velmi významnou část kostí, skloviny a dentinu. Vlastnosti HA mohou být zlepšeny různými prvky, jako jsou Ag, Mg, Zn a další. Předpokládá se, že HA dopovaný stříbrem vykazuje významné antibakteriální vlastnosti ve tkáni. Nanočástice Ag a další malé částice vykazují lepší výsledky. Experiment s využitím expozice *E. Coli* různým koncentracím Ag na HA prokázal absolutní absenci kolonií při obsahu stříbra 8,3 % a více.

Shrnující graf produkce nanočástic znázorňuje obrázek 1. Roční produkce nanočástic TiO_2 zaujímá mezi uměle vyráběnými nanočásticemi 2. místo, a dosahuje středních hodnot 3000 t. Následuje údaj o roční výrobě nanočástic ZnO , s hodnotami 550 t. Nanočástice Ag s množstvím 55 t za rok, dosahují na pomyslném žebříčku relativně nižších hodnot.



Obr. 1 – Graf roční produkce nanočástic (Bondarenko et al., 2013)

3.3 Toxický účinek nanočástic

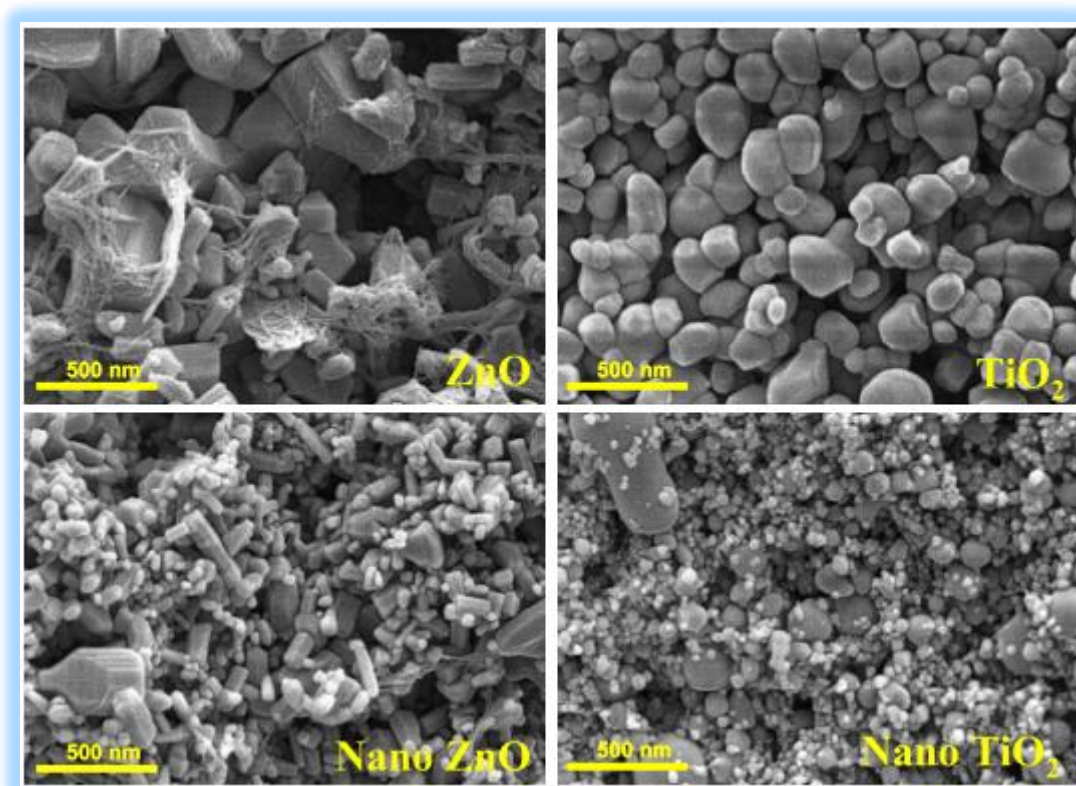
Nanočástice snadno pronikají skrz biomembrány. Epitely jsou primární místa vstupu nanočástic do organismu. U člověka jsou nejmohutněji vstřebávány epitelem plicním. Nanočástice o rozměrech menších než 100 nm difundují přes průdušky a průdušinky do plicních sklípků, kde jsou fagocytovány alveolárními makrofágy či vyplavovány v hlenu. Snadno průchozí epitel pro nanočástice se vyskytuje též na oční spojivce (Holgate, 2010). Dále k průniku nanočástic do organismu slouží epitely trávicího traktu, kde dochází k průniku intercelulárně i intracelulárně. Posléze navazuje transport lymfatickým systémem do jater a sleziny (Hillyer et. Albrecht, 2001). Mnohvrstevný dlaždicový epitel kůže bývá taktéž vstupní branou nanočástic a to především, pokud je integrita kůže mechanicky či geneticky narušena (Jebali et Kazemi, 2013).

Ačkoli je kůže lepší bariérou vůči absorpci nanočástic než trávicí trakt či plíce, existují faktory, které vstřebávání přes pokožku usnadňují. Je to například potřísnění organickými rozpouštědly, která smývají ochranou tukovou bariéru. V případě TiO_2 byl zjištěn průnik částic o velikosti 4 nm až k bazálním buňkám epidermu. Projev systémové absorpce byl doložen po dlouhodobé expozici (60 dnů) nanočásticím TiO_2 o velikosti 10 – 60 nm. Aplikace nanočástic ZnO vedla k jejich pozdější detekci v moči a krvi. Podobně penetrují menší částice (15nm) Ag a Au . Průnik nanočástic ZnO a TiO_2 mj. podporuje UV záření a také například napnutí pokožky (Nohavica, 2011).

K nejvíce využívaným nanočásticím, u nichž je studováno jejich toxické působení, patří TiO_2 , ZnO a Ag . Nanočástice TiO_2 obecně patří mezi ty méně toxické. Z výzkumů vyplývá, že jeho negativní vliv na zdraví spočívá v plicních zánětlivých procesech. Dále jeho přítomnost byla pozorována v mozku, v játrech a ledvinách. Záněty částečně způsobuje reaktivní forma kyslíku, jež je generována plicními mitochondriemi. Přesný mechanismus působení TiO_2 na mitochondrie není dosud znám. Silně antibakteriálně působí nanočástice ZnO (Freyre-Fonesca et al., 2011). Nanočástice Ag vykazují vyšší toxicitu než tento kov ve formě celistvé. Tyto nanočástice inhibují růst buněk i jejich respirační a fotosyntetickou aktivitu (Wang et al., 2012). Nanočástice Ag mohou způsobit změnu permeability vnější membrány za vzniku nepravidelných porinů. Změna

propustnosti je způsobena uvolňováním membránových proteinů a lipopolysacharidových molekul (Kim, 2007).

Důležitý údaj k posouzení toxicity je vždy množství dané látky. Spousta látek je v malém množství z ekotoxikologického hlediska zanedbatelných, se zvyšujícím se množstvím dané látky stoupá také toxicita (Nohavica., 2012). Dalším faktorem ovlivňujícím toxické účinky je velikost nanočástic. Dle některých studií byla dokázána korelace mezi velikostí částic a toxicitou. Na obrázku 2 je zachycena ukázka ZnO a TiO₂ v porovnání s nano formou těchto oxidů. Sovová et Kočí (2012) uvádí, že se snižující se velikostí částic je toxicita stupňována. Toto bylo pozorováno u fullerenů, Al₂O₃, TiO₂ a CuO. V případě ZnO tento vztah potvrzen nebyl. Dalším limitujícím faktorem je agregace nanočástic, jenž je sama ovlivňována dalšími vlivy jako jsou pH, teplota, koncentrace, iontová síla či případné znečištění. Způsob míchání roztoku toxikantů hraje také svou roli. U fotosenzitivních látek, tedy TiO₂ a ZnO je toxický účinek ovlivněn přítomností a intenzitou osvětlení i druhem světelných paprsků. V neposlední řadě svůj vliv má i charakter testovaných organismů Sovová et Kočí (2012).



Obr. 2 Fotografie ZnO a TiO₂ pomocí elektronového mikroskopu (Kahru et al., 2008)

3.4 Ekotoxicita nanočástic

Stoupající výroba i spotřeba uměle vyráběných nanočástic vyvolává obavy z jejich dopadu na životní prostředí, environmentální procesy a organismy, které se těchto procesů účastní. Vliv těchto nanočástic zůstává do značné míry neznámý. Chemicko-fyzikální vlastnosti a chování nanočástic naznačují, že by mohly agregovat a adsorbovat na mnoha typech povrchů, jako jsou vodní sedimenty, řasové porosty, biofilmy, půdy a dokonce i vnější povrchy organismů (Handy et al., 2008).

Ukázalo se, že nanočástice mají vzhledem k jejich velkému povrchu schopnost absorbovat těžké kovy, PAH a chinoliny. Fungují tedy nejen jako vektory polutantů v životním prostředí, ale také usnadňují vstup navázaných látek do buněk a organismů, což potencuje jejich toxický účinek. V této problematice dodnes chybí dostatečné poznatky (Kahru et al., 2008).

Také informace k samotné ekotoxicitě nanočástic jsou dodnes velmi omezené. Dle práce Sovové a Kočího (2012) nejčastěji v minulosti docházelo k testování na bakteriích, sladkovodních řasách, koryších a na rybách. Z bakterií byly nejčastěji testovány *Escherichia Coli* a *Bacillus subtilis*. Toxické účinky na bakterie mělo Ag a TiO_2 . Dále také fullereny, MgO, ZnO a CeO_2 . Z vodního prostředí byly často testovány organismy sladkovodní, a to koryši *Daphnia magna* a *Thamnocephalus platyurus* a mikroskopické řasy *Desmodesmus subspicatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlamydomonas reinhardtii*. Tyto organismy byly z toxikologického hlediska citlivé na nanočástice TiO_2 , ZnO, CuO, Ag, Ni, NiO, kvantové tečky a fullereny. Ryb, jako pokusných sladkovodních obratlovců, se týkalo testování účinků fullerenu, méně pak ostatních nanočástic. Stále chybí dostatečné údaje pro terestrické organismy, vyšší rostliny a velmi omezená jsou také data pro mořské organismy.

Z tabulky č. 3 lze posoudit akutní ekotoxicitu vybraných nanomateriálů. Na základě experimentálních výsledků různých autorů bylo provedeno srovnání toxického účinku nanočástic TiO_2 , CuO, ZnO a Ag na několik ekologicky významných organismů. Je dobře vidět vztah mezi antibakteriálními vlastnostmi nanočástic a jejich ekotoxicitou. Jako nejtoxičtější se jeví nanočástice Ag pro koryše, nanočástice C_{60} pro bakterie, ryby,

prvky, nanočástice CuO pro kvasinky a nanočástice ZnO pro řasy a červy. Některé testovací organismy jsou pro ukázkou zobrazeny na obrázku 3.

Tab. 3 – Akutní ekotoxicita vybraných nanomateriálů (Nohavica, 2012)

skupina organismů	neorganické nanočástice				organické nanočástice		
	Nano TiO ₂ v mg/l	Nano ZnO v mg/l	Nano CuO v mg/l	Nano Ag v mg/l	aSWCNT v mg/l	bMWCNT v mg/l	cC ₆₀ v mg/l
korýši	67,7	0,62	2,65	0,04	15	8,7	35
bakterie	603	20	71	7,6	163	500	0,81
řasy	65,5	0,068	0,87	0,23	01.4	-	100
ryby	300	1,9	-	7,1	-	-	1
prvoci řasnatí	-	5,4	156,5	39	6,8	-	0,25
červi	80,1	2,24	-	-	-	-	-
kvasinky	20 000	121,2	20,5	-	-	-	-
počet exp. dat	24	13	7	10	7	2	14
nejnižší dávka nanočástic	65,5	0,068	0,87	0,04	1,04	8,7	0,25
nejcitlivější organismus	řasy	řasy	řasy	korýši	řasy	korýši	prvoci řasnatí
klasifikace	škodlivý	extrém. toxický	velmi toxický	extrém. toxický	toxický	toxický	velmi toxický

^aSWCNT – jedностěnné uhlíkové nanotrubičky (single-walled carbon nanotubes),

^bMWCNT – víceštěnné uhlíkové nanotrubičky (multi-walled carbon nanotubes),

^cC₆₀ – fulereny

3.4.1 Ekotoxicita ZnO a TiO₂

Toxicita nanočástic ZnO a TiO₂ pro půdní organismy:

Shah et Belozerova (2009) uvádí, že nanočástice negativně ovlivňují složení a růst kolonií půdních mikroorganismů a následně růst rostlin. Kalifornská studie (Ge et al., 2011) hodnotila dopady TiO₂ a ZnO na kolonie půdních bakterií. Vzorčky půd z pastvin byly vystaveny různým dávkám nanočástic ZnO (0, 0,5, 0,1 0,5 mg/g půdy) a TiO₂ (0, 0,5, 1, 2 mg/g půdy) po dobu 60 dnů. Pomocí vědeckých metod (DNA analýza) byl zjištěn vliv TiO₂ i ZnO nanočástic na snížení celkové biomasy půdních mikroorganismů a také jejich diverzity. Účinek nanočástic ZnO se projevil silněji než TiO₂ při stejné expoziční koncentraci.

V další studii (Hu et al. 2010) bylo hodnoceno toxické působení nanočástic ZnO a TiO₂ vůči žížale (*Eisenia fetida*). Po dobu 7 dnů byly žížaly vystaveny umělým půdním systémům s obsahem destilované vody o různé koncentraci nanočástic (0,1, 0,5, 1,5 g/kg). Při testu akutní toxicity byl sledován obsah nanočástic v tělech žížal, aktivita antioxidantních enzymů, poškození DNA, aktivita celulázy a poškození mitochondrií střevních buněk. Ukázalo se, že přítomnost nanočástic ZnO a TiO₂ v půdě může vyvolat značné poškození a to při dávkách vyšších než 1 g/kg. Bylo zjištěno, že ZnO i TiO₂, zejména pak ZnO nanočástice byly akumulovány v tělech žížal a při dávce 5g/kg došlo k poškození mitochondrií. Při stejné koncentraci ZnO byla významně inhibována aktivita celuláz. Stejně jako u předchozí studie, se toxicita ZnO vůči žížale se projevila více, než toxicita TiO₂.

Toxicita nanočástic ZnO a TiO₂ pro vodní organismy:

Toxicita nanočástic ZnO ve vodním prostředí závisí především na rozpustnosti. Skutečnost, že nízké koncentrace (pod 1 mg/l) jsou téměř dokonale rozpustné ve vodě, byla potvrzena několika analytickými metodami, jako je atomová absorpční spektrometrie, atomová absorpční spektrometrie v grafitové pínce atd. Také bylo prokázáno, že rozpustnost ZnO klesá s rostoucí koncentrací Fe (Ivask et al., 2013).

Dle Sovové et Kočího (2012), byly toxické účinky nanočástic ZnO i TiO₂ pozorovány u těchto sladkovodních organismů: *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*, *Desmodesmus subspicatus*, *Pseudokirchnerella subcapitata*, *Chlamydomonas reinhardtii*.

Kägi et al. (2008) poukázal na to, že nanočástice TiO_2 jsou vlivem přirozených povětrnostních podmínek smývány do povrchových vod, mj. například z venkovních fasád staveb. Tento autor prováděl analýzu vzorků těchto vod. Byla potvrzena přítomnost nanočástic TiO_2 o velikosti v rozmezí 20 – 300 nm.

V rámci testu inhibice růstu vystavili Hund-Rinke et Simon (2006) řasu *Desmodesmus subspicatus* nanočásticím TiO_2 . Některé zjištěné hodnoty IC_{50} se pohybovaly okolo 44 mg/l, avšak stejně tak nebyl zjištěn žádný efekt při použité koncentrací 50 mg/l, v závislosti na způsobu přípravy materiálu.

V případě toxicity TiO_2 vůči bakteriím byly shledány jako toxické koncentrace 5 mg/l pro *Escherichia coli*, při čemž byl růst kolonie redukován o 72 %. Citlivěji se projevil *Bacillus subtilis* při koncentraci 1mg/l při 75% inhibici růstu. Pro mořskou bakterii *Vibrio fischeri* nebyl pozorován toxický efekt TiO_2 ani při 20 mg/l. Naopak toxický efekt ZnO byl sledován již při hodnotách IC_{50} 2 mg/l (Kahru et al., 2008). Sovová et al. (2009) uvádějí pro stejnou bakterii hodnoty IC_{50} >50 mg/l TiO_2 a 7,27 mg/l ZnO .

Brayner et a. (2006) testoval nanočástice ZnO na bakterii *Escherichia coli*. Výsledky ukázaly, že gramnegativní bakteriální buňky byly po kontaktu s toxikantem zničeny v důsledku desorganizace membrány. Bylo zaznamenáno zvýšení permeability membrány, což vedlo k akumulaci nanočástic ZnO ve všech částech buňky.

Toxicita nanočástic ZnO a TiO_2 pro rostliny:

Jedním z negativních projevů nanočástic vůči rostlinám je inhibice půdních proteas, katalas a peroxidas působením nanočástic ZnO a TiO_2 . Nanomateriály mohou také agregovat na povrchu kořene a bránit tak volnému průchodu vody. Tím je ovlivněna transpirace a růst rostlin, jak bylo pozorováno například u pšenice (*Triticum aestivum*), cibule (*Alium cepa*), kukuřice (*Zea mays*) a vrby (*Salix*) (Cyrusová et al., 2015).

Autoři Lin a Xing (2007) zkoumali toxicitu nanočástic ZnO na klíčení a růst kořenů šesti druhů rostlin v jednoduchém vodném prostředí při pH 6,5 až 7,5. Hodnoty IC_{50} byly 20 – 50 mg/l, v závislosti na druhů rostlin. Dle Bodarenka et al. (2014) byl prokázán inhibiční efekt nanočástic ZnO na růst ředkvičky (*Raphanus sp.*), řepku (*Brassica sp.*) a jílku (*Lolium sp.*). Roztoky Zn a ZnO vykazovaly fytotoxický efekt, tato toxicita byla prisuzována Zn nanočásticím, nikoli rozptýleným zinečnatým Zn^{2+} iontům. Dle Cyrusové

et al. (2015) nanočástice ZnO způsobují inhibici růstu kořene česneku (*Allium sativum*), přičemž inhibiční efekt byl stanoven na 15 mg/l.

Zheng et al. (2005) se zabýval porovnáváním nanočástic a průměrných částic TiO₂ na klíčení semen špenátu v jednoduchém perlitovém mediu obsahujícím kompletní živiny. Nanočástice TiO₂ v malém množství významně zvýšily klíčivost a následný růst, ve vysokých dávkách však působily naopak. Průměrné částice tohoto kovu neměli téměř žádný efekt.

Škodová et al. (n. d.) testovala nanočástice TiO₂ na semenech hořčice bílé (*Sinapis alba*). Při koncentraci 1000 mg/l byla pozorována jednoznačná stimulace růstu. Cyrusová et al. (2015) uvádí vliv nanočástic TiO₂ na klíčení semen a růst výhonků pšenice (*Triticum aestivum*). Výsledky poukazují na závislost na koncentraci nanočástice. Při koncentracích 2 a 10 mg/l měly nanočástice TiO₂ pozitivní vliv na klíčení a růst. Toto se nepotvrdilo u kontrol ani u TiO₂ o běžné velikosti částic. Při vyšších koncentracích 100 a 500 mg/l neměly nanočástice vliv spíše žádný, popřípadě inhibiční. Autorka dále zmiňuje nevýznamnost vlivu nanočástic TiO₂ na lociku (*Lactuca sativa*) a ředkev (*Raphanus sativus*).

Song et al. (2012) se zabýval testováním toxicity nanočástic TiO₂ na rostlině *Lemna minor* (okřehek menší). Bylo zjištěno, že koncentrace nižší než 200 mg/l způsobovaly stimulaci růstu *Lemna minor*, zatímco koncentrace vyšší než 200 mg/l způsobovaly spíše inhibici a pokles růstu rostliny. Koncentrace od 500 mg/l pak způsobovaly úhyn absolutní. Autor také porovnával působení TiO₂ o běžné velikosti částic a TiO₂ o nano velikosti. Efekt nano formy této látky na růst rostlin byl shledán více zřetelným.

Byla provedena studie, která poukazuje na možnost působení nanočástic TiO₂ jako protekce chloroplastů před stárnutím při dlouhodobém osvětlení. Hlavní roli zde hraje superoxid dimustasa, katalaza a peroxidasa, jejichž zvýšená aktivita vede k snížení množství reaktivních forem kyslíku a malondialdehydu a tím pádem k zachování stability dvojité membrány chloroplastu (Hong et al., 2005).

3.4.2 Ekotoxicita Ag

Toxicita nanočástic Ag pro půdní organismy:

Nanočástic Ag přecházejí do půdy z vlhké či suché depozice nanočástic rozptýlených ve vzduchu, z bodových zdrojů jako jsou například různá výrobní zařízení, zařízení pro spalování a skládkování odpadu, dále přes aplikaci organických odpadů v zemědělství, aplikaci postřiků podporujících růst rostlin, dále prostřednictvím použití čistírenského kalu jako hnojiva zemědělských půd, nebo z dalších nebodových zdrojů, jako jsou spotřebitelské výrobky s obsahem nanočástic Ag (Anjum et al., 2013).

Stříbro má potencionální toxický efekt na bakterie fixující vzdušný dusík. Inhibuje růst půdních bakterií již v nižších koncentracích, než ostatní těžké kovy. Vykazuje také toxický efekt na výhodné heterotrofní a chemolitotrofní bakterie v půdním společenství. Chemolitotrofní bakterie konzumují anorganický materiál a dodávají mnoho důležitých živin při procesu vzniku půdy. Také hrají důležitou roli při fixaci dusíku a rozkladu organické hmoty. Tvoří symbiotický vztah s listovou zeleninou, které poskytují příděl dusíku. Ag také vykazuje potenciální toxicitu pro denitrifikační bakterie, což vede k narušení procesu denitrifikace a tím i celého dotčeného ekosystému. Denitrifikace životního prostředí je velmi důležitá, protože přebytek dusičnanů vede k snížení produkce rostlin, což má za následek eutrofizaci vodních ploch a toků. Mimo jiné dusičnany také znečišťují zdroje pitné vody (Panyala et al., 2008).

Yang et Watts (2005) zaznamenali také například toxicitu vysokých dávek nanočástic hliníku na kořeny několika druhů rostlin, například na salát (*Lactuca sp.*), mrkev (*Daucus sp.*), kukuřici (*Zea sp.*), okurku (*Cucumis sp.*) a sóju (*Glycine sp.*).

Toxicita nanočástic Ag pro vodní organismy:

Nanočástice Ag mohou vodstvo kontaminovat několika způsoby, zejména vypouštěním upravených či neupravených odpadních vod a odtoků z pozemní aplikace čistírenských kalů. Ve vodních ekosystémech mají nanočástice Ag tendenci agregovat a usazovat se na dně. Z toho vyplívá neúměrné vystavení bentických organismů těmto nanočásticím. Přesto, je většina studií postavena na zkoumání planktonních organismů či organismů žijících na otevřené vodě. Plné hodnocení důsledků expozice vodních ekosystémů stříbrným nanočásticím zahrnuje komplexní ekologický a fyzikálně-chemický kontext přírodního prostředí. Tato realita v laboratorním prostředí chybí. Důležitým aspektem

simulace podmínek vodního ekosystému je dodávka limitujících živin, jako je N, P. Zvýšené dávky N nebo P mohou afektovat komunitu a elementární složení primárních producentů, trofickou dynamiku a funkci ekosystémů. Přísun živin může také modifikovat příjem a toxicitu rozpuštěných kovů pro vodní organismy (Norman et al., 2015).

Riedel a Sanders (2003) shledali, že zvýšený nárůst planktonní biomasy vyplývající z přidavku nutrientů, vede k většímu příjmu Cd, Ni a Zn z vodního sloupce v ústí řek. Řasy bohaté na P mohou být méně vnímavé pro toxicitu kovů kvůli sekvestraci kovů intracelulárními polyfosfáty. Několik studií také zaznamenalo vliv eutrofizace na toxicitu nanočástic Ag na vodní bakterie, řasy, houby a zooplankton. Fosfát v životním prostředí může sloužit jako přírodní ligand pro stříbrné ionty rozptýlené z nanočástic Ag (Norman et al., 2015).

Byla provedena studie vlivu nanočástic Ag na proces nitrifikace, jakožto klíčového děje využívaného v čistírnách odpadních vod. Jako modelové organismy byly tedy použity nitrifikační bakterie, vzhledem k jejich citlivosti na teplotu, pH, koncentraci rozpuštěného kyslíku a toxických chemikálií. Bylo testováno působení nanočástic, koloidního Ag a také Ag iontů. Dále byl hodnocen efekt různých přidaných aniontů na inhibici nitrifikace. Výsledky poukázaly na to, že stupeň inhibice nitrifikace byl 86 % pro nanočástice Ag, 46 % pro koloidní stříbro a 42 % pro stříbro iontové. Z těchto údajů vyplývá, že nitrifikační bakterie vykazují značnou citlivost na přítomnost nanočástic Ag a akumulace Ag má škodlivé účinky na čištění odpadních vod. Za přítomnosti různých ligandů či aniontů ve vodě byla toxicita Ag snížena. Toxicita nanočástic Ag byla snížena o 76 % za přítomnosti sulfidu, o 43 %, 28 %, 27 %, 14,8 % za přítomnosti EDTA, chloridu, fosfátu a sulfátu v tomto pořadí. Nebyly zjištěny žádné signifikantní změny toxicity iontů Ag za přítomnosti síranu nebo fosforečnanu. Tyto výstupy naznačují, že průnik nanočástic Ag do odpadních vod si žádá přísnou regulaci (Choi et Hu, 2009).

Toxicita nanočástic Ag pro rostliny:

Studie ukázaly, že nanočástice Ag podléhají akumulaci v rostlinách. Vzhledem k tomu, že rostliny disponují určitou velikostí a listovou plochou a v přírodě se vyskytují stacionárně, mají větší pravděpodobnost vystavení širokému spektru nanočástic z okolí. Rostliny tedy mohou význačně kontrolovat osud nanočástic v životním prostředí

prostřednictvím akumulace do biomasy. Nejčastější cesty k expozici terestrických rostlin nanočásticím zahrnují potencionální vylouhování nanočástic z různých výrobků, záměrnou výsadbu rostlin pro remediaci životního prostředí, pozemní aplikaci kontaminované biomasy či odpadních vod. Za centrum průniku nanočástic do rostliny jsou považovány kořeny. Mohou obsahovat majoritní část nahromaděných nanočástic, což následně v rostlině vede k fyzikální či chemické toxicitě. Pro mobilitu a setkání nanočástic Ag s kořeny je klíčový vodní režim rostlin (Anjum et al., 2013).

V nadzemních částech je Ag ukládáno v případě jednoděložných rostlin do mladých listů a na jejich okraj, méně zjevná je rozdílná distribuce Ag v nadzemní a podzemní části v případě dvouděložných rostlin. Existují rostliny, které jsou schopny akumulovat vysoké koncentrace Ag a jiných kovů. Tento jev je označován jako hyperakumulace, rostliny jsou také nazývány metalofyty. Ve srovnání s neakumulujícími druhy rostlin je obsah těžkého kovu v metalofytech více než 100 krát vyšší. Této vlastnosti je využíváno v technologii zvané fytoextrakce, při fytoremediacích, výrobě funkčních potravin a dokonce kovových nanočástic. Bylo prokázáno, že stříbro ovlivňuje v rostlinách mnoho pochodů, jako například vznik oxidativního stresu, syntézu obraných a detoxikačních peptidů a proteinů, příjem vody, inhibici enzymů, signální dráhy rostlin a syntézu membránových lipidů (Křížková et al., 2009).



Obr. 3 - Přehled používaných organismů k provádění testů ke stanovení ekotoxicity nanočástic (Hjorth et al., 2015)

3.5 Mechanismus působení nanočástic

3.5.1 Reaktivní formy kyslíku

Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) je jedním z ukazatelů toxicity nanočástic pro eukaryotické organismy. Tyto kyslíkové radikály jsou generovány zejména v případě působení nanočástic s fotokatalytickými vlastnostmi jako je například TiO_2 . Ukázalo se, že ROS ničí buněčné lipidy, sacharidy, proteiny a DNA, což vede k zánětům a oxidativnímu stresu. Peroxidace lipidů je považována za nejničivější proces, který vede k nevratným změnám v buněčné membráně a tím pádem k ohrožení životně důležitých funkcí. Mechanismus oxidativního stresu je také přičítáno mnoho patologických změn a stárnutí u člověka. Bylo experimentálně dokázáno, že nanočástice indukují oxidativní stres a následné změny v keratinocytech, monocytech, makrofágách a neurocytech (např. TiO_2), ale i v plicních epitelárních buňkách (např. silikátové nanočástice s obsahem Fe, Co, Mg, Ti, nanočástice oxidů kovů) (Kahru et al., 2008). Produkce ROS i jiné možné mechanismy účinku nanočástic jsou schematicky zobrazeny v obrázku 4.

Uměle vyráběné nanočástice mohou produkovat ROS také po interakci s biotickými a abiotickými složkami životního prostředí. Jako příklad lze uvést ničivý efekt nanočástic TiO_2 v kombinaci s UV zářením (Adams et al., 2006). Působením kombinace těchto faktorů inaktivovány sinice rodu *Anabaena*, *Microcystis* a *Melosira* (Kim et Lee, 2005). Autor Hong et al. (2005) potvrdil stejné účinky na zelenou řasu *Chroococcus*. Avšak dle Kahru et al. (2008) také při absenci UV záření byly vlivem nanočástic TiO_2 zjištěny tyto reaktivní formy kyslíku v buňkách ryb a také v bakteriálních buňkách *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*. Podobné mechanismy spouští působení nanočástic ZnO .

Toxické účinky nanočástic Ag působí na široké spektrum mikroorganismů, v jejichž buňkách vytváří volné radikály, které napadají buněčné funkce. Kladný náboj stříbrných iontů je přitahován k záporně nabitému povrchu biomembrány (Kim, 2000). Stříbrné ionty u mnoha organismů způsobují indukci oxidativního stresu, což vede k poškození proteinů, mastných kyselin, DNA a zvýšenému vzniku peroxidových mastných kyselin. Bylo zaznamenáno také toxické působení na fotosystém II (Oukarroum, 2011).

3.5.2 Uvolňování kovových iontů

Ionty, které jsou uvolňovány z kovových nanočástic, mohou být dalším klíčovým faktorem jejich toxicity. Je jisté, že rozpustnost nanočástic oxidů kovů, včetně TiO_2 a ZnO , silně ovlivňuje jejich cytotoxicitu. Limbach et al. (2007) tvrdí, že částečně rozpustné nanočástice, jako jsou oxidy Co a Mn, mohou být převedeny do lidských plicních epitelárních buněk pomocí mechanismu trojského koně. To znamená, že do buňky vstoupí ve formě oxidu kovů, ne v příslušné formě iontů. Indukovaný oxidační stres je tedy výrazně vyšší, než v případě iontů, pro které je transport kontrolován buňkou. Autor Derfus et al. (2004) vysvětluje, že nanočástice oxidu kovů v buňce, mají schopnost jednorázově uvolnit vyšší ničivé koncentrace iontů.

Adámková et al. (n. d.) uvádí, že toxicitu Ag nelze přičítat jen nanočásticím, ale také samotným iontům, které se z nanočástic uvolňují. Pro vysvětlení přesného mechanismu toxického působení nanočástic Ag na řasy není dostatek údajů, avšak studie zabývající se toxickým působením kovových nanočástic na mořské či sladkovodní řasy uvádějí, že toxicita byla způsobena právě ionty, uvolněnými z nanočástic, při kontaktu s buňkou.

Mechanismus antimikrobiálního účinku iontů Ag^+ je úzce spojen s interakcí s thiolovou (sulfhydrylovou) skupinou $-\text{SH}$. Aminokyseliny, jako například cystein a další sloučeniny obsahující thiolovou skupinu, jako je thioglykolát sodný, neutralizují antimikrobiální aktivitu Ag. Oproti tomu aminokyseliny obsahující disulfidické vazby, aminokyseliny bez obsahu síry a sloučeniny obsahující síru, jako například kyselina cysteová, L-methionine, taurin, thiosíran sodný a hydrogensíran sodný nemají tuto vlastnost neutralizace aktivity Ag. Tyto skutečnosti naznačují, že interakce Ag^+ iontů s thiolovou skupinou v enzimech i proteinech, hrají ústřední roli v antimikrobiálním působení. Podobně se však mohou podílet i jiné buněčné složky, například vodíkové vazby. Ag také působí prostřednictvím vazby na klíčovou funkční skupinu enzymů. Ionty Ag^+ způsobují uvolňování K^+ iontů z bakterií. Bakteriální plasma či cytoplasmatická membrána, která je asociována s mnoha důležitými enzymy, může být považována za významnou cílovou oblast působení Ag^+ iontů (Jung et al., 2008).

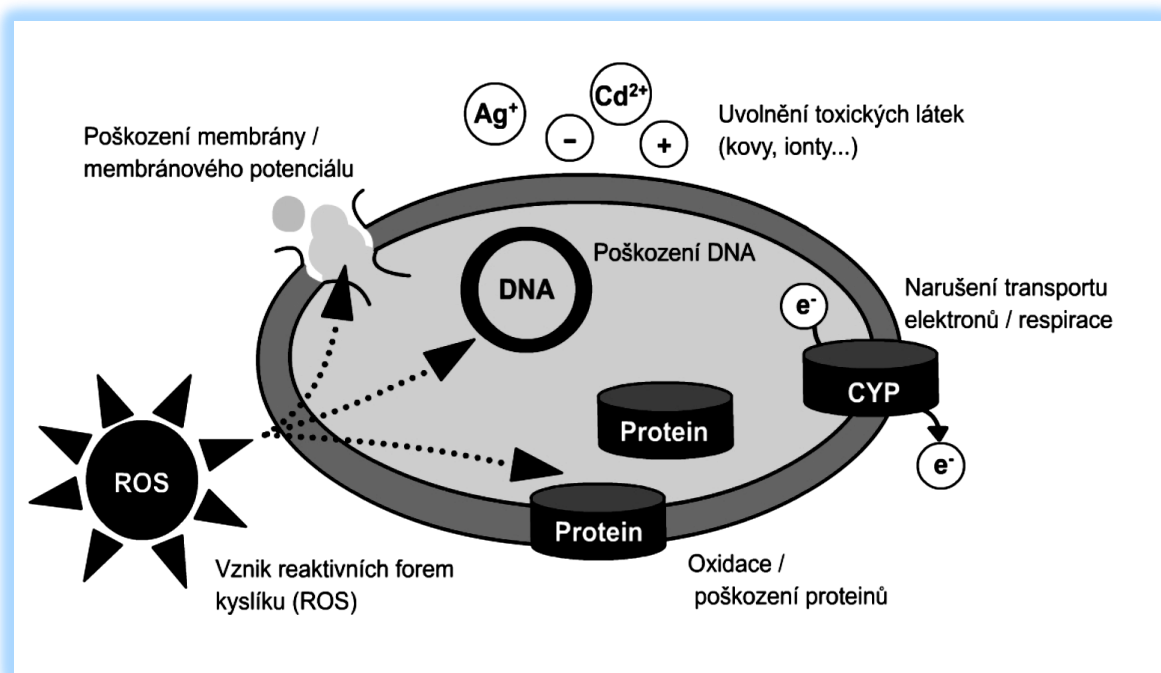
Vzhledem k vlivu na enzymy, Ag^+ ionty způsobují inhibici růstu bakterií a jsou ukládány ve vakuolách a v buněčných stěnách jako zrna. Zastavují dělení buněk a ničí buněčný obal i obsah. Buňky vykazují strukturální abnormality. Ionty Ag^+ reagují s nukleovými

kyselinami, přednostně s bází v DNA, spíše než s fosfátovými skupinami, ačkoli z tohoto hlediska je jejich letální působení nejasné (Jung et al., 2008).

Uvolňování toxických iontů kovů z kovových nanočástic by mělo být bráno v úvahu při hodnocení ekotoxicity. Ukázalo se, že různé druhy organismů ovlivňují pohyb, biologickou dostupnost a toxicitu těžkých kovů v půdách i vodách. Původně nerozpustné formy těžkých kovů se mohou změnit v biologicky dostupné v důsledku přímého kontaktu bakterií a půdních částic (Kahru et al., 2008).

Bakterie nemají vyvinuté mechanismy pro příjem supramolekulárních a koloidních částic. Přesto bylo prokázáno, že CdSe a CdS/ZnS kvantové tečky o velikosti menší než 5 nm vstupují do bakteriální buňky (Kloepfer et al., 2005). Není tomu tak u elipsoidních CdSe/ZnS kvantových teček o rozměrech 12 x 6 nm (Holbrook et al., 2008). Prvoci a živočichové mají vysoce vyvinuté vstupní mechanismy pro nano a mikročástice (Kahru et al., 2008).

Ve snaze potvrdit hypotézu, že toxicita Ag s rostoucí složitostí organismu klesá, byla provedena studie ekotoxicity nanočástic Ag na trepce velké (*Paramecium caudatum*). Výsledky poukazují na významně vyšší toxicitu Ag v iontové formě, než ve formě nanočástic (Kvítek et al., 2009).



Obr. 4 - Možné mechanismy působení nanočástic na buňku (Sovová et Kočí, 2012)

3.5.3 Genotoxicita

Dle Dohnalové et Dohnala (2015) významný vliv při kontaktu nanočástic s buněčnými membránami či tkáněmi představuje povrch těchto nanočástic. Interakce s nanočásticemi může způsobit různá mechanická či chemická poškození buněk a biologicky aktivních látek, u kterých způsobuje změnu konformace a následné ovlivnění funkce. U DNA se může interakce s nanočásticemi projevit mutagenitou či genotoxicitou.

Za faktory poukazující na genotoxicitu lze považovat například biopersistenci, katalytickou aktivitu, distribuci nanočástic ve tkáních a schopnost indukce zánětu, včetně produkce ROS. Genotoxicita po expozici nanočásticím se projevuje vznikem mutací, chromozomových aberací, výměnou sesterských chromatid, tvorbou mikrojader, zlomy v DNA, oxidativním poškozením a vznikem aduktů v DNA. Zvláště nanočástice na bázi kovů mohou přímo interagovat s DNA. Nanočástice Ag jsou v buňce přes cytoplasmu distribuovány do jádra. Zde mohou působit genotoxicky. Buňky po poškození DNA nanočásticemi Ag zastavují svůj buněčný cyklus v G2 fázi mitózy kvůli opravě DNA před oddělením chromozómů. Nanočástice TiO₂ vykazují genotoxicitu a mutagenitu, zejména pokud jsou fotoexcitovány. Podobně se chovají nanočástice ZnO (Filipová et al., 2012). Landa et al. (2012) potvrzuje genotoxické působení na *Arabidopsis thaliana* způsobenou po expozici nanočásticím ZnO a TiO₂.

Tab. 4 - Výsledky genotoxických testů nanočástic dle Dohnalové et Dohnala (2015)

Nanočástice	Amesův test ^a	Chromozomové aberace ^{a, b}	Mikronukleus test ^{a, b}	Kometový test ^b	<i>In vivo</i> genotoxicita ^{a, b}
TiO ₂	0	0	X	X	0
ZnO ₂	0	X	X	0	X
Ag	0	X	X	X	X
SiO ₂	0	X	X	X	X
Al ₂ O ₃	0	X	X	X	X
Fe ₂ O ₃	0	X	X	X	X
SWCNT ^c	0	X	X	X	X
MWCNT ^d	0	0	X	X	X

^a0 – negativní test, ^bX – pozitivní test,

^cSWCNT – jedностěnné uhlíkové nanotrubičky (single-walled carbon nanotubes),

^dMWCNT – víceštěnné uhlíkové nanotrubičky (multi-walled carbon nanotubes)

4 Experimentální část

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Testované látky a jejich roztoky

K testům byly vybrány chemické látky Zn a Ti, konkrétně ve formě nanočástic ZnO a TiO₂. K otestování byly získány vzorky nanočástic, které se využívají v kosmetickém průmyslu, ve formě jemného prášku, o velikosti 10 – 100 nm (viz obr. 5). S pomocí analytických vah bylo naváženo dané množství testovaných látek a byly připraveny roztoky určených koncentrací látek. Pro podporu zvýšení rozpustnosti byla použita ultrazvuková lázeň. Tímto způsobem byly připraveny základní roztoky testovaných látek, ze kterých byly následně připraveny koncentrační řady pomocí příslušných ředících roztoků.



Obr. 5 – Nanočástice ZnO ve formě jemného prášku (Pazdera, 2014)

4.1.2 Živné roztoky

Živný roztok pro *Sinapis alba*:

K přípravě zásobních roztoků solí a následně zředovací vody byla použita destilovaná voda. Živný roztok obsahoval 5 ml od každého ze zásobních roztoků (viz tabulka 5) na 1 l destilované vody. Takto připravená ředící voda byla skladována ve skleněných nádobách za pokojové teploty.

Tab. 5 – zásobní roztoky pro přípravu živného roztoku

Zásobní roztok	Chemikálie	Koncentrace v zásobním roztoku [g·l ⁻¹]
ZR 1	CaCl ₂ ·2H ₂ O	117,6
ZR 2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	49,3
ZR 3	NaHCO ₃	25,9
ZR 4	KCl	2,3

Živný roztok pro *Lemna sp.*:

Pro test na *Lemna sp.* bylo použito kultivační médium podle Steinberga. Pro přípravu 1 l živného roztoku bylo k 900 ml destilované vody přidáno 20 ml zásobních roztoků I, II, III a 1 ml zásobních roztoků IV, V, VI, VII a VIII (viz tabulka 6) a doplněno destilovanou vodou na celkový objem 1000 ml.

Tab. 6 – Složení zásobních roztoků pro kultivaci *Lemna sp.*

Zásobní roztok	Chemikálie	[g/l]
I	KNO ₃	17,50
	KH ₂ PO ₄	4,50
	K ₂ HPO ₄	0,63
II	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,00
III	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	14,75
Zásobní roztok	Chemikálie	[mg/l]
IV	H ₃ BO ₃	120,00
V	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	180,00
VI	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	44,00
VII	MnCl ₂ ·4H ₂ O	180,00
VIII	FeCl ₃ ·6H ₂ O	760,00
	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	1500,00

Živný roztok pro *Desmodemus subspicatus*:

Pro test na řase byl použit živný roztok, který byl připraven následujícím způsobem. Do destilované vody byly nadávkovány předepsané koncentrace určitých solí (viz tabulka 7).

Tab. 7 – Živný roztok pro kultivaci *Desmodemus subspicatus*

Chemikálie	Koncentrace [mg/l]
NaNO ₃	467
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	59
K ₂ HPO ₄	31
MgSO ₄ ·7H ₂ O	25
Na ₂ CO ₃	21
FeCl ₃	1
	koncentrace [ml/l]
Gaffronův roztok	0,08

Tab. 8 – Roztok stopových prvků dle Gaffrona

Chemikálie	Koncentrace [mg/l]
H ₃ BO ₃	3100
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2230
Na ₂ VO ₄ ·2H ₂ O	33
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	88
KBr	119
KI	83
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287
Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	154
Co(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	146
CuSO ₄ ·5H ₂ O	125
NiSO ₄ ·(NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	198
Cr(NO ₃) ₃ ·7H ₂ O	37
V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ ·16H ₂ O	35
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·K ₂ SO ₄ ·24H ₂ O	474

Živný roztok pro *Vibrio fischeri*:

Pro test na bakterii *Vibrio fischeri* byl použit roztok 2% NaCl v množství 20g/l ředící vody.

4.1.3 Koncentrační řady

V případě předběžných testů byla stanovena koncentrační řada zahrnující inhibici od 10 % do 90 %. V případě následujících základních testů byla volena koncentrace dle výsledků testů předběžných. Pro jednotlivé koncentrace byl zvolen objem 100 ml. Aby bylo docíleno požadovaných koncentrací, roztoky testovaných látek byly ředěny pomocí ředící vody, podle vzorce dle Svobodové et al. (2010):

$$\frac{V_1 \cdot c_1}{V_2 \cdot c_2},$$

Z kterého po vyjádření V_2 vznikla rovnice:

$$V_2 = \frac{V_1 \cdot c_1}{c_2},$$

Kde,

V_1 je objem testovaného roztoku (100 ml),

c_1 je požadovaná koncentrace testovaného roztoku,

V_2 je objem testovaného roztoku, který bude smíchán s ředící vodou,

c_2 je koncentrace roztoku testované látky, který má být ředěn.

Postup pro přípravu koncentračních řad:

Kádinky o objemu 150 ml, byly řádně popsány lihovým fixem. Dle vypočítaných hodnot V_2 bylo pomocí odměrného válce odměřeno požadované množství roztoku testované látky, které bylo přelito do kádinky a následně opět pomocí odměrného válce dolito ředící vodou tak, aby celkový objem testovaného roztoku činil 100 ml. U velmi nízkých koncentrací byly k odměření roztoku testované látky použity mikropipety. Do takto připravené koncentrační řady byly nasazeny testovací organismy, kádinky zakryty PVC folií a vloženy do termostatu, kde byly uchovávány za přesně definovaných podmínek, dle požadavků daného testu.

4.2 Testy ekotoxicity

4.2.1 Test inhibice růstu kořene rostliny *Sinapis alba*

Charakteristika testu

Principem tohoto testu bylo stanovení toxicity testovaných látek rozpuštěných ve vodě na inhibici růstu kořene v počátečních stádiích vývoje rostliny *Sinapis alba*. Cílem bylo stanovení koncentrace, při které látka inhibuje právě 50 % testovaných kořenů při expoziční době 72 hodin. Nejprve se provádí orientační test s velkou koncentrační řadou testované látky. Posléze je vybráno několik koncentrací v přibližné geometrické řadě pro základní test. Ten zahrnuje nejnižší koncentraci, ve které byla 100% inhibice kořene v orientačním testu a nejvyšší koncentraci, která nezpůsobila inhibici.

Podmínky testu

Norma:	OECD Guideline 208: Terrestrial plants test, Vegetative Vigour Test
Testovací organismus:	<i>Sinapis alba</i>
Hodnocené parametry:	elongace kořene
Podmínky testu:	
Objem testovaného vzorku	10 ml v jedné Petriho misce
Velikost Petriho misky	15 cm
Počet semen	100 na jedné Petriho misce
Doba expozice	96 hodin
Osvětlení	ne
Teplota	21°C ± 2°C
Chemikálie:	testované látky, ředící voda
Pomůcky a zařízení:	kádinky, Petriho misky, pipeta, špičky, filtrační papír, pinzeta, termostat, milimetrové měřítko

Provedení testu

Do Petriho misek byl položen filtrační papír, na který byl nadávkován pipetou testovaný roztok o objemu 10 ml. Na zvlhčený filtrační papír byla pinzetou pokládána semena *Sinapis alba*, vždy 100 semen. Misky byly přikryty víčkem a uloženy do termostatu. Připraveny byly také vždy dva kontrolní vzorky. Měření bylo prováděno po 72 hodinách. Délky kořínků byly spolu s příslušnými koncentracemi zapisovány do tabulek, které byly vytvořeny v MS Excel.

4.2.2 Test inhibice růstu rostliny *Lemna sp.*

Charakteristika testu

Podstata testu spočívá v zjištění toxicity testované látky rozpuštěné ve vodě na inhibici růstu okřehku (*Lemna sp.*). Přesně daný počet stélek této rostliny je vystaven působení různých koncentrací testované látky. Délka expozice je 7 a 14 dní, je tedy hodnoceno i dlouhodobé působení, kdy se projeví v inhibici nárůst nových generací. Cílem je stanovení koncentrace, při které je inhibováno právě 50 % stélek.

Podmínky testu

Norma:	OECD Guideline 221: <i>Lemna sp.</i> Growth Inhibition Test
Testovací organismus:	<i>Lemna sp.</i>
Hodnocené parametry:	inhibice růstu, stav stélek (nekróza, chloróza)
Podmínky testu:	
Objem testovaného vzorku	100 ml
Velikost kádinky	150 ml
Počet stélek	20
Doba expozice	14 dní (kontrola po 7 dnech)
Osvětlení	Ano
Teplota	21°C ± 2°C
Chemikálie:	testované látky, ředící voda
Pomůcky a zařízení:	kádinky, pinzeta, PVC folie, termostat

Provedení testu

Do kádinek byla připravena koncentrační řada testované látky o objemu 100 ml, včetně kontrol ve dvou opakováních. Do kádinek bylo pomocí pinzety přeneseno vždy 20 stélek okřehku. Kádinky byly přikryty PVC folií a umístěny do termostatu s kontinuálním osvětlením a teplotou 21 °C. Po 7 a 14 dnech expozice byl odečítán počet stélek v každé jednotlivé koncentraci.

4.2.3 Test inhibice růstu jednobuněčné řasy *Desmodesmus subspicatus*

Charakteristika testu

Účelem této zkoušky je určit vliv testované látky na růst jednobuněčné řasy. Metoda se používá pro stanovení vlivu látky rozpuštěné ve vodě na inhibici růstu řasy. Exponenciálně rostoucí kultury *Desmodesmus subspicatus* jsou vystaveny účinku různých koncentrací testované látky za definovaných podmínek. Cílem je stanovení koncentrace, při které je inhibováno právě 50 % kultury testované řasy v porovnání s kontrolou. Doba expozice je 72 – 96 hodin.

Podmínky testu

Norma:	OECD Guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria Growth Inhibition Test
Testovací organismus:	<i>Desmodesmus subspicatus</i>
Hodnocené parametry:	nárůst biomasy
Podmínky testu:	
Objem testovaného vzorku	100 ml
Velikost kádinky	150 ml
Počet buněk při nasazení testu	10 000 buněk v 1 ml
Doba expozice	96 hod (kontrola každých 24h)
Osvětlení	Ano
Teplota	21 ± 2°C
Chemikálie:	testované látky, ředící voda
Pomůcky a zařízení:	kádinky, klimabox, mikroskop, počítací Bürkerova komůrka, skleněná tyčinka

Provedení testu

Do kádinek byla připravena koncentrační řada, vždy po 100 ml zvolené koncentrace testované látky. Z exponenciálně rostoucí řasové inokulační kultury bylo pomocí odměrného válce odebráno 4 ml řasové suspenze a toto množství přidáno do každé kádinky. Jednotlivé kádinky byly přikryty PVC folií a vloženy do klimaboxu. Zde byly ponechány kultivaci při teplotě 21 °C při stálém osvětlení bílým světlem. Řasové buňky byly udržovány v suspenzi průběžným mícháním skleněnou tyčinkou. Hustota buněk ve zkušebních kádinkách byla měřena v počítačí komůrce pod mikroskopem. Test trval 96 hod.

4.2.4 Test inhibice bioluminiscence bakterie *Vibrio fischeri*

Charakteristika testu

Tato metoda slouží k stanovení toxických účinků testované látky na fotoaktivní bakterie. Podstata testu spočívá ve srovnání bioluminiscence bakterií před a po expozici toxickou látkou. Testovací organismus je *Vibrio fischeri*, což je mořská gramnegativní bakterie, která přirozeně vyzařuje světlo. Za luminiscenci je zodpovědný enzym luciferasa.

Podmínky testu

Norma:	ČSN EN ISO 8692
Testovací organismus:	<i>Vibrio fischeri</i>
Hodnocené parametry:	bioluminiscence
Podmínky testu:	
Objem testovaného vzorku	1 ml v každé zkumavce
Doba expozice	30 min (kontrola po 15 min)
Osvětlení	ne
Teplota	15 ± 1°C
Chemikálie:	testované látky, živný roztok, ředící voda
Pomůcky a zařízení:	Luminometr (LUMISTOX), zkumavky, termoblok, pipety, odměrné baňky

Provedení testu

Z testovaných látek byla připravena koncentrační řada (10-100 mg/l). Zkumavky se vzorky včetně kontrol byly v termostatu vytemperovány na teplotu $15 \pm 1^\circ\text{C}$. Suspenze bakterií byly rozmrazeny ve vodní lázni při teplotě $20 \pm 2^\circ\text{C}$ a ponechaly se odstát. Následně byla suspenze bakterií naředěna roztokem NaCl (20g/l) na potřebné množství a znovu se nechala odstát. Do vytemperovaných zkumavek bylo nadávkováno 500 μl připravené bakteriální suspenze. Po adaptaci (15 min) byla změřena intenzita luminiscence ve všech zkumavkách. Poté bylo přidáno 500 μl testovaného vzorku daných koncentrací, na kontrolní vzorky byl použit 2% roztok NaCl. Takto připravené vzorky byly promíchány a po 15 a 30 minutách byla opět změřena luminiscence.

4.3 Vyhodnocování výsledků

4.3.1 Vyhodnocování výsledků testu inhibice růstu kořene *Sinapis alba*

Účelem testu bylo stanovit koncentraci testovaných látek, která způsobila 50% inhibici semen *Sinapis alba*. Tato inhibiční koncentrace se vyjadřuje jako IC50. K výpočtu byly využity matematické úkony, které byly prováděny pomocí MS Excel. Pro každé ředění, včetně kontrol, byl vypočítán aritmetický průměr délky kořene. Dle získaných údajů byla vypočítána inhibice růstu v %, podle následujícího vzorce:

$$I_{\mu} = \frac{(L_c - L_v)}{L_c} \cdot 100,$$

Kde,

I_{μ} je inhibice růstu kořene v %,

L_c je aritmetický průměr délky kořene v kontrole v mm,

L_v je aritmetický průměr délky kořene v testovacím roztoku v mm.

Podle získaných hodnot byly určeny hodnoty NOEC, LOEC a LC. Výsledné hodnoty IC50 byly zjištěny lineární regresí, kdy byla inhibice růstu dána do závislosti na dekadickém logaritmu koncentrace. Látky obsažené ve vzorku mohly mít i stimulační efekt. K tomuto faktu bylo třeba přihlížet při výsledném hodnocení.

Z výsledků byl pomocí MS Excel vytvořen graf. Pomocí kvadratické rovnice byla vypočítána hodnota IC50 (mg/l).

4.3.2 Vyhodnocování výsledků testu inhibice růstu *Lemna sp.*

Cílem testu bylo stanovit koncentraci testované látky, která způsobila 50% inhibici stélek *Lemna sp.*, tedy IC50. Byl zhodnocen vegetativní růst *Lemna sp.* tak, že byl spočítán počet stélek po působení testované látky. Stanovení inhibice růstu bylo provedeno porovnáním růstových rychlostí (μ) v testovaných koncentracích a v kontrole, dle vztahu:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}$$

Kde,

N_0 je počet stélek na počátku testu,

N_n je počet stélek na konci testu,

t_n je doba trvání testu.

Z hodnot pro každou testovanou koncentraci a kontrolu byla vypočtena inhibice růstu I_{μ} v % z následující rovnice:

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100,$$

Kde,

$I_{\mu i}$ je inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základně porovnání růstových rychlostí,

μ_c je růstová rychlost v kontrole,

μ_i je růstová rychlost v testované koncentraci.

Na základně výsledků inhibice $I_{\mu i}$ byl s pomocí MS Excel vygenerován graf. Následně byla pomocí kvadratické rovnice spočítána hodnota IC50. Výsledky byly vyjadřovány v mg/l.

4.3.3 Vyhodnocování výsledků testu inhibice růstu jednobuněčné řasy *Desmodesmus subspicatus*

Cílem zkoušky bylo zjistit koncentraci způsobující 50% inhibici růstu buněk, tedy hodnotu IC50. Výsledky testu byly vyhodnocovány na základě závislosti střední hustoty buněk na koncentraci testované látky. Hodnoty IC50 byly stanoveny pomocí růstových rychlostí μ (počet buněk/dny) řasové kultury v testovaných vzorcích a v kontrole. Růstové rychlosti vyjadřuje níže uvedený vzorec:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n},$$

kde,

N_n je hustota buněk naměřená v závěru testu (počet buněk/ml),

N_0 je hustota buněk na počátku testu (počet buněk/ml),

t_n je doba trvání testu (dny).

Pomocí vypočítaných hodnot růstových rychlostí pro testované roztoky a kontroly byly následně vypočítány inhibice pro všechny testované koncentrace, dle vzorce:

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100,$$

kde,

$I_{\mu i}$ je inhibice pro danou koncentraci (%),

μ_c je růstová rychlost v kontrole,

μ_i je růstová rychlost v testované koncentraci.

Pomocí MS Excel byl zpracován graf a pomocí kvadratické rovnice byla vypočítána hodnota IC50.

4.3.4 Vyhodnocování výsledků testu inhibice bioluminiscence bakterie *Vibrio fischeri*

Výsledkem testu je závislost inhibice aktivity bakterií na logaritmu koncentrace testovaného vzorku. Byl hodnocen poměr úbytku světelné produkce bakterií ke zbývající světelné produkci. Veškerá výstupní data byla vyhodnocována zvlášť pro interval 15 a 30 min. Díky tomu bylo možno sledovat reakci organismu na toxikant v průběhu času. Korekční faktor, který upravuje referenční hodnoty ovlivněné ředící vodou a přirozeným úbytkem luminiscence byl vypočten dle následující rovnice:

$$f_t = \frac{I_{kt}}{I_{k0}} \text{ (kde } t = 15, 30 \text{ min),}$$

f_t je korekční faktor pro expozici 15, 30 min,

I_{kt} je intenzita luminiscence kontroly po expozici 15, 30 min,

I_{k0} je intenzita luminiscence kontroly bezprostředně před přidáním ředící vody.

Byl vypočten průměr hodnot f_t dvou paralelních stanovení. Dle rovnice byla vypočtena hodnota I_c a korigovaná hodnota I_{c0} pro zkumavky se zkoušeným vzorkem o koncentraci c , bezprostředně před přidáním zkoušeného vzorku, dle následujícího vzorce:

$$I_{ct} = I_0 \cdot f_t,$$

Kde,

f_t je průměr hodnot f_t ,

I_0 je intenzita luminiscence bezprostředně před přidáním ředící vody pro zkumavky se zkoušeným vzorkem.

Inhibiční účinek zkoušeného vzorku byl vypočten dle následující rovnice:

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_t}{I_{ct}} \times 100,$$

Kde,

H_t je inhibiční účinek zkoušeného vzorku po expozici t min v %,

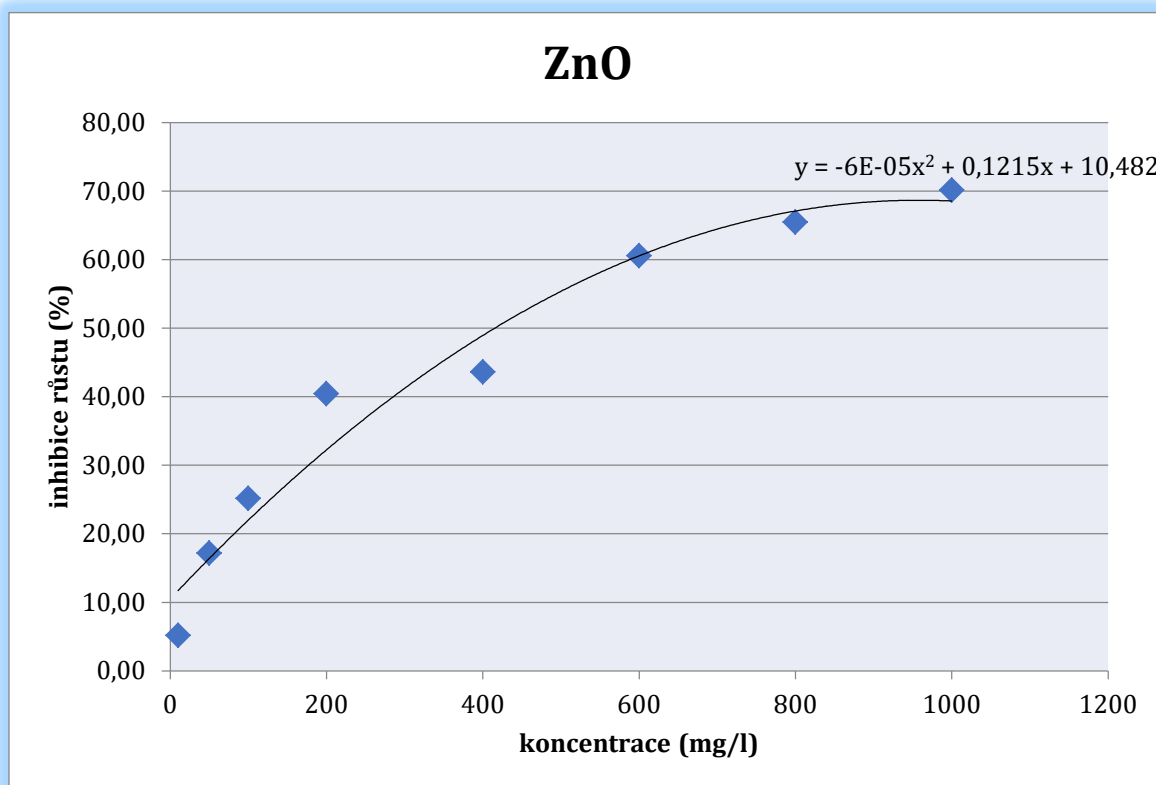
I_t je intenzita luminiscence zkoušeného vzorku po expozici H_t obou paralelních stanovení.

5 Výsledky

5.1 Testování vlivu ZnO na inhibici růstu kořene rostliny *Sinapis alba*

Tab. 5 - Naměřené hodnoty testu inhibice růstu kořene *Sinapis alba* vlivem ZnO

koncentrace číslo	koncentrace v mg/l	délka kořene v mm	Inhibice růstu v %
1.	1000	14,12	70,11
2.	800	16,34	65,41
3.	600	18,64	60,54
4.	400	26,66	43,56
5.	200	28,16	40,39
6.	100	35,36	25,15
7.	50	39,14	17,15
8.	10	44,82	5,12
k 1	0	45,54	3,60
k 2	0	48,94	-3,60
průměr k.	0	47,24	0,00



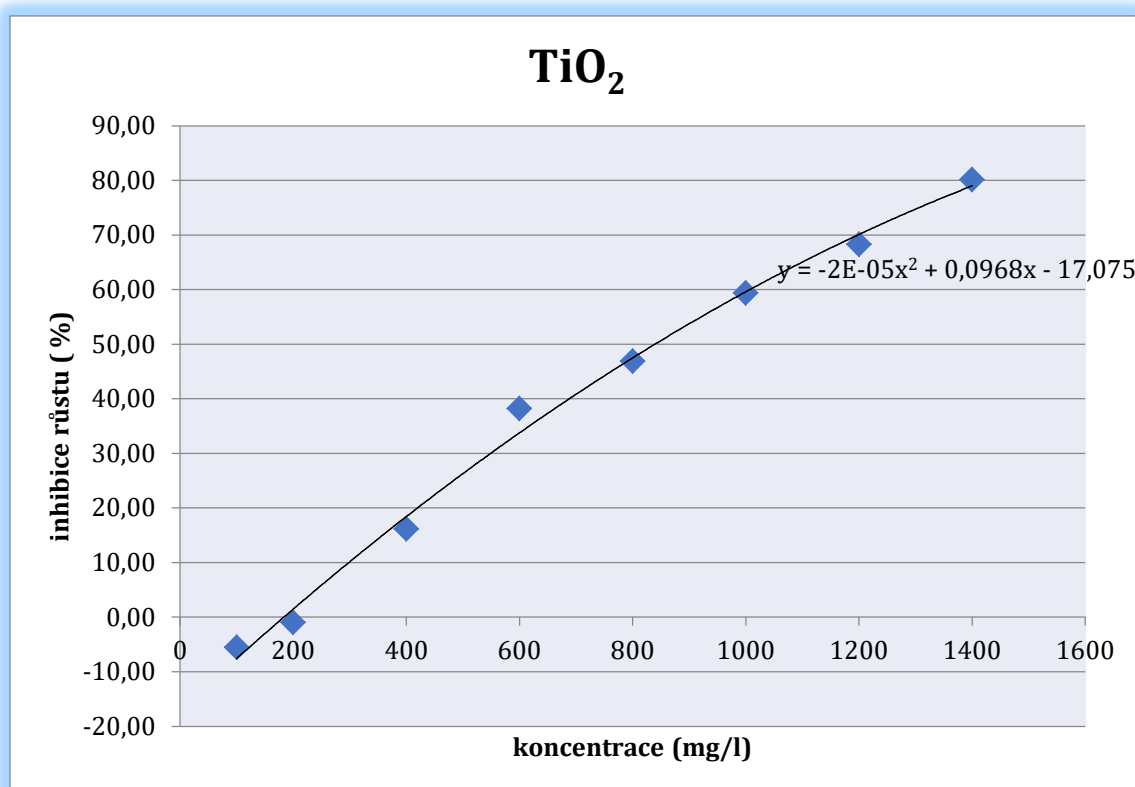
Graf 1 - Závislost inhibice růstu kořene *Sinapis alba* na koncentraci ZnO

Výsledná IC50 = 407,08 mg/l

5.2 Testování vlivu TiO₂ na inhibici růstu kořene rostliny *Sinapis alba*

Tab. 6 – Naměřené hodnoty testu inhibice růstu kořene *Sinapis alba* vlivem TiO₂

koncentrace číslo	koncentrace v mg/l	délka kořene v mm	inhibice růstu v %
1.	1400	9,06	80,12
2.	1200	14,48	68,22
3.	1000	18,54	59,32
4.	800	24,22	46,85
5.	600	28,18	38,16
6.	400	38,22	16,13
7.	200	46,02	-0,99
8.	100	48,12	-5,60
k 1	0	42,22	7,61
k 2	0	48,92	-7,05
průměr k.	0	45,57	0,28



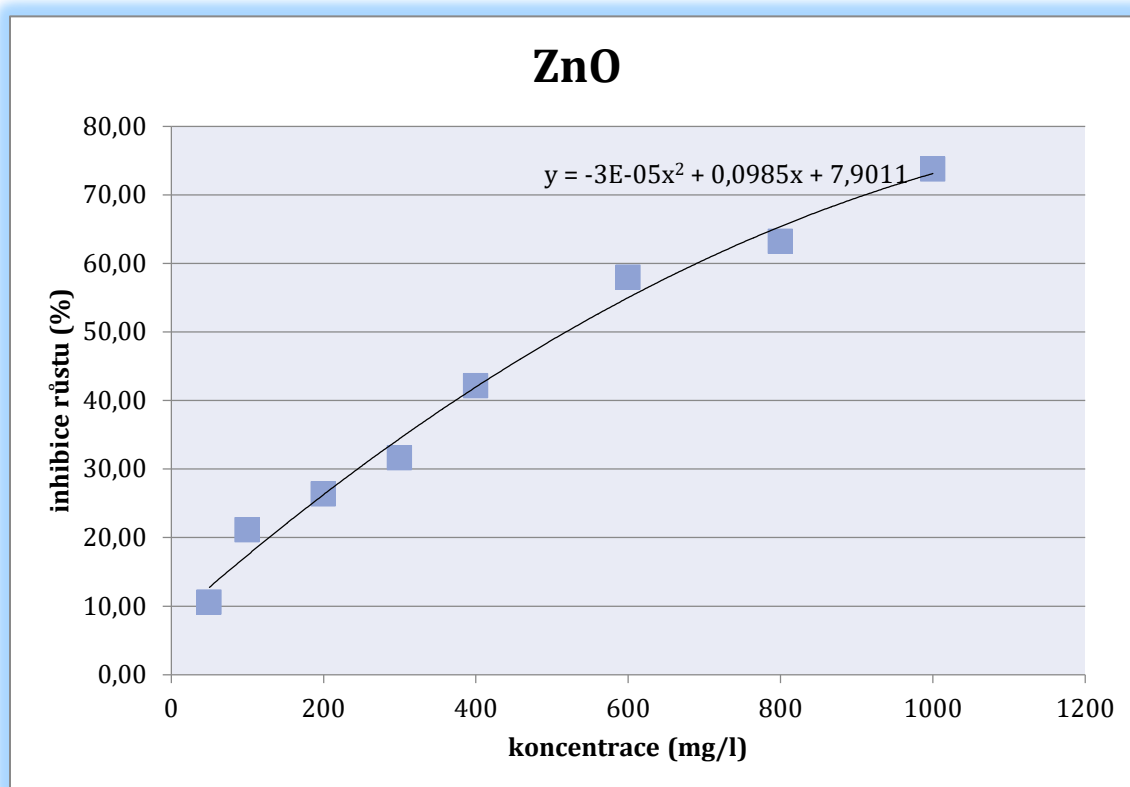
Graf 2 - Závislost inhibice růstu kořene *Sinapis alba* na koncentraci TiO₂

Výsledná IC₅₀ = 838,02 mg/l

5.3 Testování vlivu ZnO na inhibici růstu *Lemna sp.*

Tab. 7 - Naměřené hodnoty testu inhibice růstu *Lemna sp.* vlivem ZnO

koncentrace číslo	koncentrace testované látky v mg/l	počet lístků okřehku při nasazení testu	počet lístků okřehku po 14 dnech od nasazení	inhibice růstu v % (14 dnů)
1.	1000	20	5	73,68
2.	800	20	7	63,16
3.	600	20	8	57,89
4.	400	20	11	42,11
5.	300	20	13	31,58
6.	200	20	14	26,32
7.	100	20	15	21,05
8.	50	20	17	10,53
k 1	0	20	20	-5,26
k 2	0	20	18	5,26
průměr k.	0	20	19	0,00



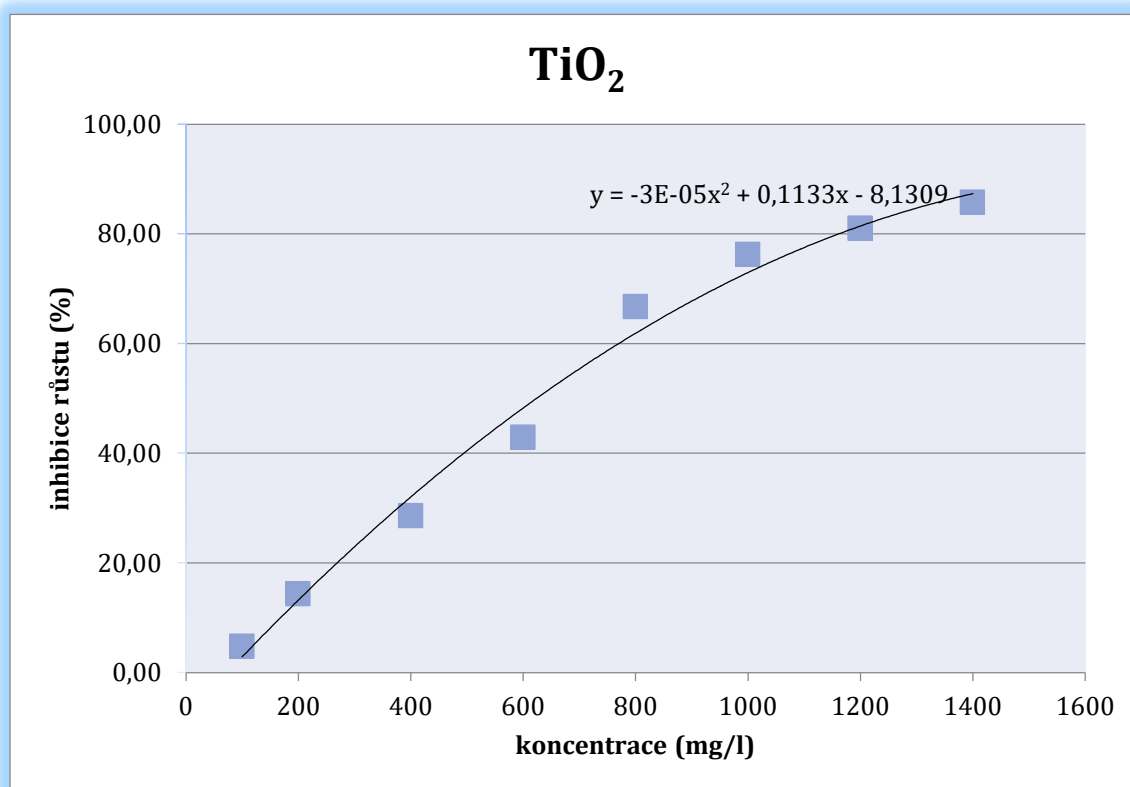
Graf 3 - Závislost inhibice růstu *Lemna sp.* na koncentraci ZnO

Výsledná IC50 = 505,10 mg/l

5.4 Testování vlivu TiO₂ na inhibici růstu *Lemna sp.*

Tab. 8 - Naměřené hodnoty testu inhibice růstu kořene *Lemna sp.* vlivem TiO₂

koncentrace číslo	koncentrace testované látky v mg/l	počet lístků okřehku při nasazení testu	počet lístků okřehku po 14 dnech od nasazení	Inhibice růstu v % (14 dnů)
1.	1400	20	3	85,71
2.	1200	20	4	80,95
3.	1000	20	5	76,19
4.	800	20	7	66,67
5.	600	20	12	42,86
6.	400	20	15	28,57
7.	200	20	18	14,29
8.	100	20	20	4,76
k 1	0	20	21	0,00
k 2	0	20	21	0,00
průměr k.	0	20	21	0,00



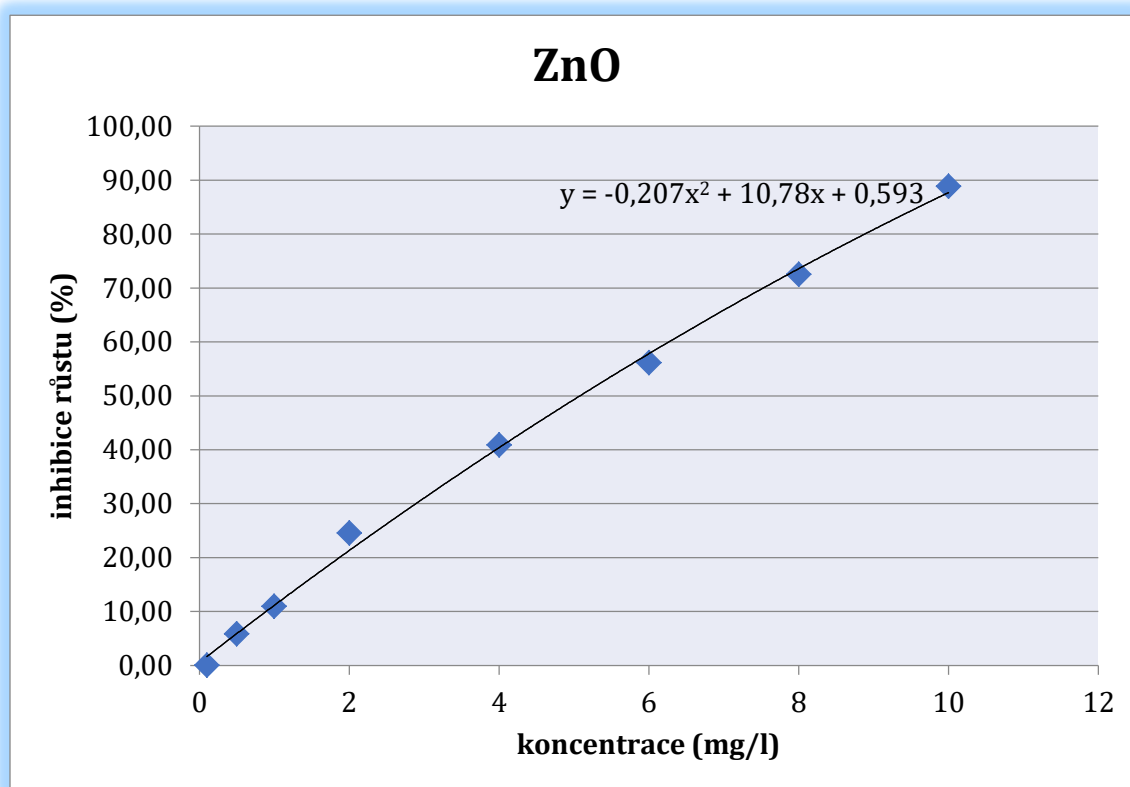
Graf 4 - Závislost inhibice růstu *Lemna sp.* na koncentraci TiO₂

Výsledná IC50 = 612,36 mg/l

5.5 Testování vlivu ZnO na inhibici růstu jednobuněčné řasy *Desmodesmus subspicatus*

Tab. 9 - Naměřené hodnoty testu inhibice růstu jednobuněčné řasy *Desmodesmus subspicatus* vlivem ZnO

koncentrace číslo	koncentrace mg/l	naměřený počet buněk v tis.	vypočítaná inhibice růstu v %
1.	10	51,9	88,80
2.	8	127,4	72,51
3.	6	203,3	56,13
4.	4	274,2	40,83
5.	2	349,6	24,56
6.	1	412,7	10,94
7.	0,5	436,4	5,83
8.	0,1	528,3	stimulace 14,01
k 1	0	455,2	1,77
k 2	0	471,6	-1,77
průměr k.	0	463,4	0,00



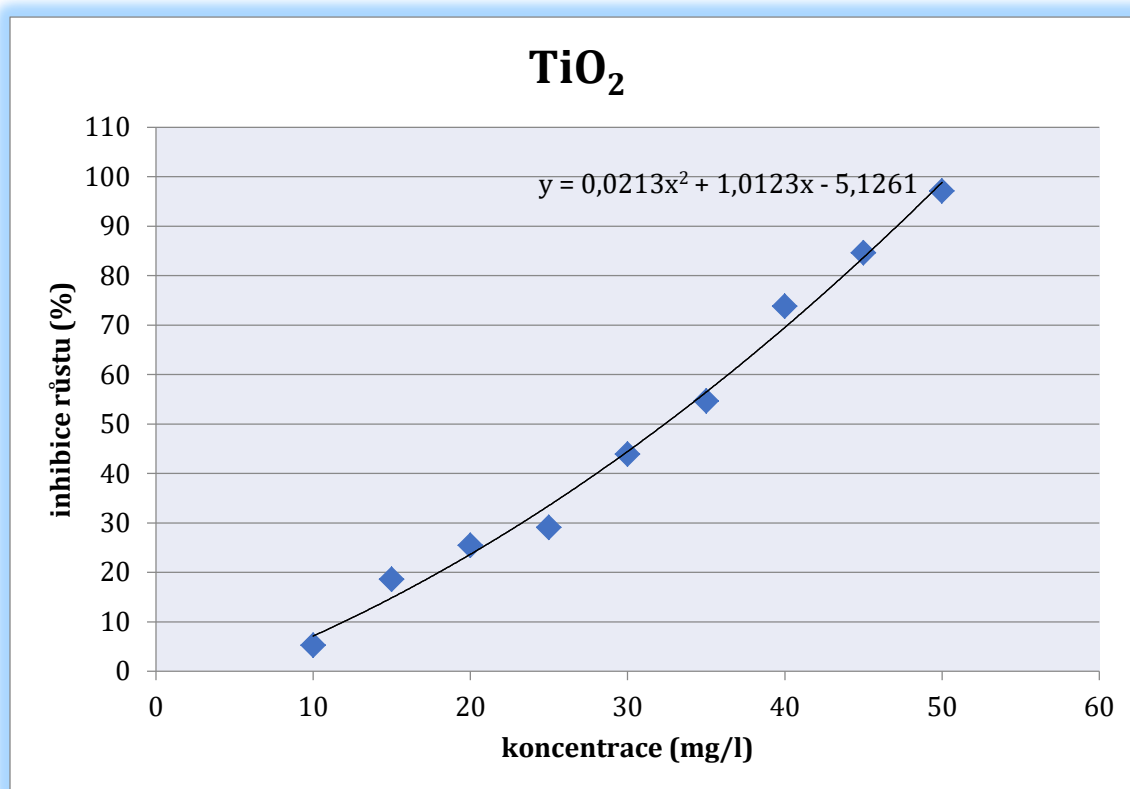
Graf 5 - Závislost vlivu inhibice růstu *Desmodesmus subspicatus* na koncentraci ZnO

Výsledná IC50 = 5,07 mg/l

5.6 Testování vlivu TiO₂ na inhibici růstu jednobuněčné řasy *Desmodesmus subspicatus*

Tab. 10 - Naměřené hodnoty testu inhibice růstu *Desmodesmus subspicatus* vlivem TiO₂

koncentrace číslo	koncentrace v mg/l	počet buněk v tis.	inhibice růstu v %
1.	50	12,6	97,10
2.	45	67,2	84,55
3.	40	114	73,79
4.	35	197,4	54,62
5.	30	244,1	43,88
6.	25	308,7	29,03
7.	20	324,5	25,40
8.	15	354,4	18,52
9.	10	412,3	5,21
k 1	0	428,8	1,42
k 2	0	441,2	-1,42
průměr k.	0	435	0



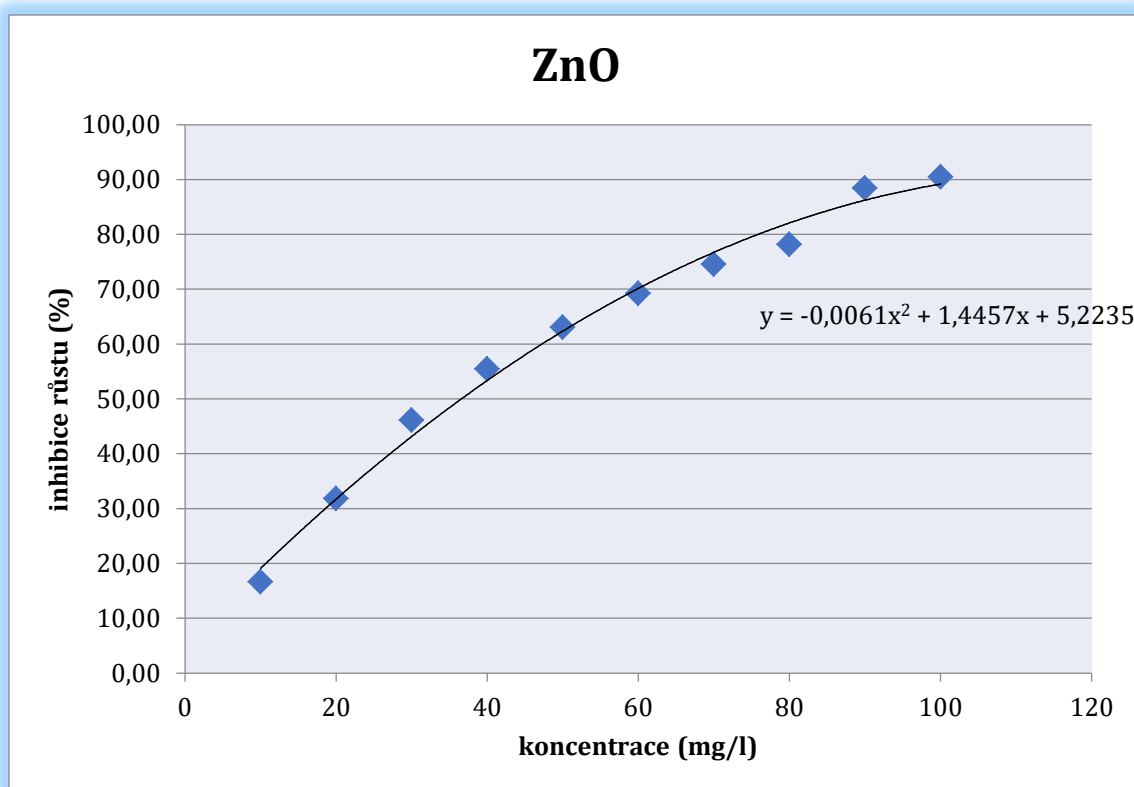
Graf 6 - Závislost vlivu inhibice růstu *Desmodesmus subspicatus* na koncentraci TiO₂

Výsledná IC50 = 32,37 mg/l

5.7 Testování vlivu ZnO na inhibici bioluminiscence bakterie *Vibrio fischeri*

Tab. 11 - Naměřené hodnoty testu inhibice bioluminiscence *Vibrio fischeri* vlivem ZnO

koncentrace číslo	koncentrace v mg/l	naměřená bioluminiscence	vypočtená inhibice v %
1.	100	39,7	90,49
2.	90	48,2	88,46
3.	80	91,1	78,18
4.	70	106,3	74,55
5.	60	128,5	69,23
6.	50	154,4	63,03
7.	40	186,1	55,44
8.	30	224,9	46,14
9.	20	284,7	31,82
10.	10	348,2	16,62
k 1	0	422,5	-1,17
k 2	0	412,7	1,17
průměr k.	0	417,6	0,00



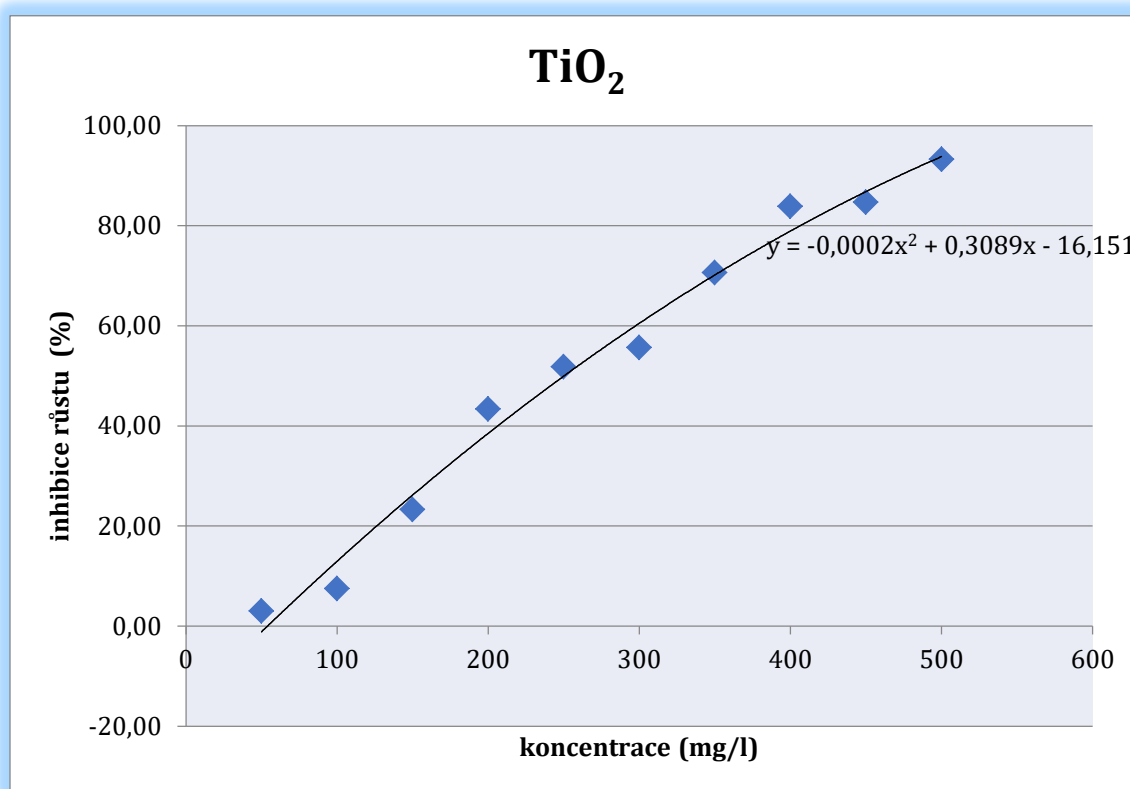
Graf 7 - Závislost vlivu koncentrace ZnO na inhibici bioluminiscence bakterie *Vibrio fischeri*

Výsledná IC50 = 36,63 mg/l

5.8 Testování vlivu TiO₂ na inhibice bioluminiscence bakterie *Vibrio fischeri*

Tab. 12 - Naměřené hodnoty testu inhibice bioluminiscence *Vibrio fischeri* vlivem TiO₂

koncentrace číslo	koncentrace mg/l	naměřená bioluminiscence	vypočtená inhibice v %
1.	500	28,4	93,20
2.	450	64,2	84,63
3.	400	67,6	83,81
4.	350	122,8	70,59
5.	300	185,4	55,60
6.	250	201,3	51,80
7.	200	236,7	43,32
8.	150	320,4	23,28
9.	100	386,5	7,45
10.	50	405,3	2,95
k 1	0	422,5	-1,17
k 2	0	412,7	1,17
průměr k.	0	417,6	0,00



Graf 8 - Závislost vlivu koncentrace TiO₂ na zhášení bioluminiscence bakterie *Vibrio fischeri*

Výsledná IC50 = 256,87 mg/l

6 Diskuze

Existuje mnoho odborných vědeckých publikací zabývajících se ekotoxikologií nanočástic. Poměrně dostatečné informace o ekotoxicitě lze dohledat o nanočásticích Ag. Méně poznatků však můžeme nalézt v oblasti ekotoxikologie nanočástic ZnO a TiO₂.

Dle naměřených výsledků při testování toxicity nanočástic ZnO a porovnání hodnot IC₅₀ lze konstatovat, že nejcitlivěji reagoval organismus *Desmodemus subspicatus*, a to s výslednou hodnotou IC₅₀ 5,07 mg/l. Při koncentraci 0,1 mg/l došlo dokonce ke stimulaci růstu (viz graf 1).

Testy inhibice bioluminiscence bakterie *Vibrio fischeri* vlivem expozice nanočásticím ZnO byly vyhodnoceny hodnotou IC₅₀ 36,63 mg/l (viz graf 7). Tato koncentrace je však poměrně vyšší, než uvádí například autorka Sovová et al. (2009), která pro stejný druh bakterie naměřila hodnotu IC₅₀ 7,27 mg/l. Autor Kahru et al. (2008), který se také zabýval testováním nanočástic ZnO na organismu *Vibrio fischeri*, prezentuje naměřené hodnoty IC₅₀ 2 mg/l. Autor Nohavica (2012) uvádí průměrnou hodnotu akutní toxicity ZnO pro bakterie, a to 20 mg/l.

Vyšší koncentrace ZnO způsobující 50% inhibici byly naměřeny u *Sinapis alba*, a to 407,08 mg/l (viz graf 1). Zdá se, že rostlina je dolnější vůči působení nanočástic ZnO, než ostatní druhy rostlin. Autoři Lin a Xing (2007) zkoumali toxicitu nanočástic ZnO na klíčení a růst kořenů šesti druhů rostlin. Hodnoty IC₅₀ se pohybovaly kolem 20 – 50 mg/l, v závislosti na druzích rostlin, což jsou významně nižší fyto toxické koncentrace, než byly naměřeny během našeho testování.

Také u *Lemna sp.* byly v případě testování nanočástic ZnO zjištěny poměrně vysoké hodnoty IC₅₀, a to 505,10 mg/l (viz graf 3).

Při testování toxicity nanočástic TiO₂ bylo dosaženo následujících výsledků. Nejcitlivěji se opět projevila řasa *Desmodemus subspicatus*, s výslednou IC₅₀ 32,37 mg/l (viz graf 6). Autoři Hund-Rinke et Simon (2006) zjistili u stejného druhu sladkovodní řasy hodnotu IC₅₀ okolo 44 mg/l, která odpovídá našim naměřeným hodnotám. Testováním nanočástic na *Desmodemus subspicatus* se zabýval také autor Sadiq et al. (2011), který uvádí hodnotu IC₅₀ 39,35 mg/l.

Inhibiční koncentrace nanočástic TiO₂ pro bakterii *Vibrio fischeri* byla vyhodnocena na 256,87 mg/l (viz graf 8). Naopak autor Kahru et al. (2008) nepozoroval toxický efekt TiO₂ ani při hodnotách 20 mg/l. Obecně pro bakterie uvádí autor Nohavica (2012) hodnoty akutní toxicity 603 mg/l. Autoři Joško et Oleszczuk (2013) uvádějí vyšší toxicitu nanočástic TiO₂ vůči bakterii *Vibrio fischeri* v porovnání s nanočásticemi ZnO. Testováním nanočástic na stejném druhu bakterie se zabývala také autorka Rossetto et al. (2014), která naměřila hodnoty IC50 kolem 250 mg/l, což koreluje s našimi zjištěnými hodnotami.

Při testování toxicity TiO₂ na *Lemna sp.* byly naměřeny vysoké hodnoty IC50 612,36 mg/l. Autor Song et al. (2012) udává stimulaci růstu *Lemna minor* při koncentracích do 200 mg/l, naopak inhibici růstu při koncentracích nad 200 mg/l, totální úhyn pak při koncentracích od 500 mg/l. Zheng et al. (2005) potvrzuje stimulaci růstu rostlin při nízkých koncentracích nanočástic TiO₂.

Inhibiční koncentrace nanočástic TiO₂ pro *Sinapis alba*, byly vypočítány na hodnotu 838,02 mg/l. Autorka Škodová et al. (n. d.) však při koncentraci 1000 mg/l pozorovala jednoznačnou stimulaci růstu *Sinapis alba*. Tyto rozdíly mohou být ovlivněny například způsobem promíchání roztoků nanočástic.

Tab. 13 – Shrnutí výsledných hodnot IC50 po testovací organismy

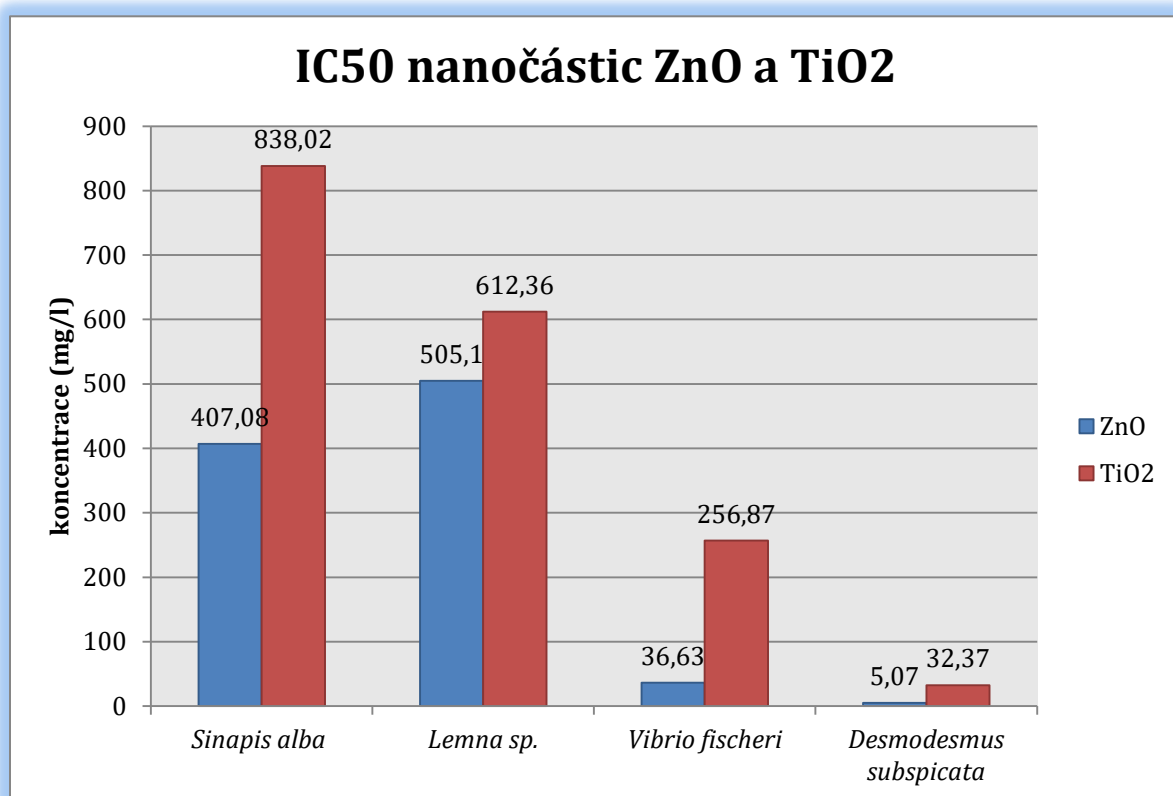
testovací organismus	IC50 nanočástice ZnO (mg/l)	IC50 nanočástice TiO ₂ (mg/l)
<i>Sinapis alba</i>	407,08	838,02
<i>Lemna sp.</i>	505,1	612,36
<i>Vibrio fischeri</i>	36,63	256,87
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	5,07	32,37

V tabulce 13 a grafu 9 jsou porovnány zjištěné hodnoty IC50 pro všechny testované organismy, a to jak pro nanočástice ZnO tak pro nanočástice TiO₂. Je zřejmé, že nanočástice ZnO projevují vyšší toxicitu vůči všem testovaným organismům než TiO₂. Nejzřetelněji se tento rozdíl projevil u organismu *Vibrio fischeri* (36,63 mg/l ZnO a 256,87 mg/l TiO₂) a také u *Desmodesmus subspicatus* (5,07 mg/l ZnO a 32,37 mg/l TiO₂). Pro *Sinapis alba* byly nanočástice ZnO vyhodnoceny téměř o polovinu více toxické

než nanočástice TiO₂ (407,08 mg/l ZnO a 838,02 mg/l TiO₂). Srovnatelné hodnoty IC50 byly vypočítány u organismu *Lemna sp.* (505,1 mg/l ZnO a 612,36 mg/l TiO₂).

Pokud srovnáme citlivost organismů na ZnO vzestupně od nejcitlivějšího, vznikne následující řada: *Desmodesmus subspicatus* (IC50 5,07 mg/l) < *Vibrio fischeri* (IC50 < 36,63 mg/l) < *Sinapis alba* (IC50 407,08 mg/l) < *Lemna sp.* (IC50 505,1 mg/l). V případě nanočástic TiO₂ vypadá posloupnost následovně: *Desmodesmus subspicatus* (IC50 32,37 mg/l) < *Vibrio fischeri* (IC50 256,87 mg/l) < *Lemna sp.* (612,36 mg/l) < *Sinapis alba* (IC50 838,02 mg/l).

Vzhledem k vyšším hodnotám IC50 lze tedy nanočástice TiO₂ zhodnotit jako méně toxické než nanočástice ZnO. Autoři Shah et Belozerova (2009) a Hu et al. (2010) také potvrzují vyšší toxicitu nanočástic ZnO než TiO₂.



Graf 9 – Porovnání výsledných hodnot IC50 mezi organismy a nanočásticemi

Řasu, jako nejcitlivější organismus při testování nanočástic ZnO i TiO₂ ve své práci uvádí také Nohavica (2012). Autor Adam et al. (2015), který se zabýval testováním nanočástic ZnO a CuO na mnoha organismech, potvrzuje řasu jako nejvíce senzitivní organismus.

7 Závěr

Tato diplomová práce byla zpracována v reakci na soudobý obrovský rozmach nanotechnologií. Vzhledem k chemicko – fyzikálním vlastnostem mohou nanočástice představovat potencionální nebezpečí pro lidské zdraví, tedy toxicitu, a také pro životní prostředí, tedy ekotoxicitu. Je velmi důležité provádět kontrolu míry toxicity těchto látek prostřednictvím organismů zahrnujících zástupce všech trofických úrovní.

V práci bylo využito několika ekotoxikologických testů k zjištění toxicity nanočástic ZnO a TiO₂ vůči vybraným testovacím organismům. Použité nanočástice měly formu jemného prášku, k testování byl vždy použit roztok těchto látek o daných koncentracích. Byl proveden test inhibice růstu kořene rostliny *Sinapis alba*, test inhibice růstu *Lemna sp.*, test inhibice růstu jednobuněčné řasy *Desmodesmus subspicatus* a test inhibice bioluminiscence bakterie *Vibrio fischeri*.

Provedené testy ukázaly, že dle získaných hodnot inhibiční koncentrace, při níž je inhibováno alespoň 50 % organismů (IC₅₀), byla jako nejcitlivější organismus shledána jednobuněčná řasa *Desmodesmus subspicatus*, a to v případě testování nanočástic ZnO i TiO₃ (viz tabulka 13, graf 9). Tuto skutečnost potvrdilo několik autorů (Adam et al., 2012; Hund-Rinke et Simon, 2006), kteří ve svých pracích dosáhli podobných výstupů.

Testy provedené na bakterii *Vibrio fischeri* poukázaly na hodnoty IC₅₀, které jsou oproti inhibičním koncentracím naměřeným na řase o něco vyšší (viz tabulka 13, graf 9). Z toho vyplývá, že pro tento druh bakterie nejsou nanočástice ZnO a TiO₂ v tak značné míře toxické, jako je tomu u řasy.

Z výsledků testů toxicity nanočástic TiO₂ byly vyhodnoceny vyšší inhibiční koncentrace pro *Sinapis alba* (838,02 mg/l) a o něco nižší inhibiční koncentrace pro *Lemna sp.* (612,36 mg/l). Z hodnot získaných při měření toxicity nanočástic ZnO byly vyhodnoceny vyšší inhibiční koncentrace pro *Lemna sp.* (505,1 mg/l) a o něco nižší inhibiční koncentrace pro *Sinapis alba* (407,08 mg/l).

Z těchto zjištěných hodnot lze konstatovat, že nanočástice ZnO působí více toxicky na rostlinu *Sinapis alba* než na rostlinu *Lemna sp.* Naopak nanočástice TiO₂ vykazují vyšší toxicitu vůči *Lemna sp.* než vůči *Sinapis alba*.

Problematika ekotoxikologie nanočástic kovů zůstává stále dostatečně nepopsaná. Tato práce se snaží přispět k ucelení informací v uvedené tématice. Vlivem rozvoje civilizace přirozeně stoupají požadavky v oblasti vývoje nových technologií. Nanotechnologie zcela jistě usnadní progres v mnoha oborech. Důležité je však uvědomit si jaká jsou doprovázející rizika, a to environmentální i zdravotní. Aby převažovaly pozitiva tohoto oboru, musí být zajištěn detailní výzkum a zaveden odpovídající kontrolní dohled.

8 Seznam použitých zdrojů

8.1 Seznam použité literatury

Adam, N., Schmitt, C., De Bruyn, L., Knapen, D., Blust, R. (2015). Aquatic acute species sensitivity distributions of ZnO and CuO nanoparticles. *Science of The Total Environment*, 526, 233-242.

Adámková, P., Říhová Ambrožová, J., Škopová, V. (2013). Budoucnost a perspektiva využití nanočástic stříbra v technologiích úpravy a čištění vod. *Vodovod.info - vodárenský informační portál* [online], cit. 2016-11-08. Dostupné z: <<http://vodovod.info>>.

Adams, L. K., Lyon, D. Y., Alvarez, P. J. (2006). Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water research*, 40(19), 3527-3532.

Allhoff, F., Lin, P., & Moore, D. (2009). What is nanotechnology and why does it matter?: from science to ethics. *John Wiley & Sons*. 28(3), 321-323.

Anjum, N. a., Gill, S. S., Duarte, A. C., Pereira, E., Ahmad, I. (2013). Silver nanoparticles in soil–plant systems. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(9), 1896.

Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., & Kahru, A. (2013). Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review. *Archives of Toxicology*, 87(7), 1181–1200.

Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F., Fiévet, F. (2006). Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*, 6(4), 866-870.

Cyrusová, T., Podlipná, R., Veněk, T. (2015). Vliv nanočástic na rostliny. *Chem. Listy*, 109, 276-280.

ČSN EN ISO 8692, (2012): Kvalita vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. Praha: Český normalizační institut, (17 s.).

Derfus, A. M., Chan, W. C., Bhatia, S. N. (2004). Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano letters*, 4(1), 11-18.

Doporučení komise ze dne 18. října 2011 o definici nanomateriálu 2011/696/EU, cit. 2016-10-02.

Dostupné z:

<http://www.sgpstandard.cz/editor/files/on_line/reach/demo/reach/nano.pdf>

Filipová, Z., Kukutschová, J., Mašláň, M. (2012). Rizika nanomateriálů. Univerzita Palackého v Olomouci, 1. vyd. ISBN 978-80-244-3201-4. Dostupné z: <<https://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/rizika.pdf>>

Freyre-Fonseca, V., Delgado-Buenrostro, N. L., Gutiérrez-Cirlos, E. B., Calderón-Torres, C. M., Cabellos-Avelar, T., Sánchez-Pérez, Y., Pinzón, E., Torres, I., Molina-Jijón, E., Zazueta, C., Pedraza-Chaverri, J. (2011). Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicology letters*, 202(2), 111-119.

Ge, Y., Schimel, J. P., Holden, P. A. (2011). Evidence for negative effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities. *Environmental science & technology*, 45(4), 1659-1664.

Handy, R. D., Von Der Kammer, F., Lead, J. R., Hassellöv, M., Owen, R., Crane, M. (2008). The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17(4), 287-314.

Hillyer, J. F., Albrecht, R. M. (2001). Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of pharmaceutical sciences*, 90(12), 1927-1936.

Hlubina, I. (2007) Nanotechnologie. *Nanotechnologie na VŠB – TUO* [online], cit. 3. 1. 2015. Dostupné z: <<http://nanotechnologie.vsb.cz>>

Hochmannová, L., Vytřasová, J. (2010). Vliv nanočástic TiO₂ a ZnO na fotokatalytické a antimikrobiální účinky silikátových nátěrů. *Chemické Listy*, 104(10), 940-944.

Holbrook, R. D., Murphy, K. E., Morrow, J. B., Cole, K. D. (2008). Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web. *Nature Nanotechnology*, 3(6), 352-355.

- Holgate, S. T. (2010). Exposure, uptake, distribution and toxicity of nanomaterials in humans. *Journal of biomedical nanotechnology*, 6(1), 1-19.
- Hong, F., Yang, F., Liu, C., Gao, Q., Wan, Z., Gu, F., Yang, P. (2005). Influences of nano-TiO₂ on the chloroplast aging of spinach under light. *Biological trace element research*, 104(3), 249-260.
- Hong, J., Ma, H., Otaki, M. (2005). Controlling algal growth in photo-dependent decolorant sludge by photocatalysis. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(6), 592-597.
- Hu, C. W., Li, M., Cui, Y. B., Li, D. S., Chen, J., Yang, L. Y. (2010). Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(4), 586-591.
- Choi, O. K., Hu, Z. Q. (2009). Nitrification inhibition by silver nanoparticles. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 59(9), 1699-702.
- ISO Standard 80004-4: Nanotechnologies – Vocabulary – Part 4: Nanostructured materials. International Organisation for Standardisation, Geneva, Švýcarsko (2011).
- Ivask, A., Juganson, K., Bondarenko, O., Mortimer, M., Aruoja, V., Kasemets, K., Kahru, A. (2013). Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: *A comparative review*. *Nanotoxicology*, 5390, 1-15.
- Jelínek, M., Weiserová, M., Kocourek, T., Jurek, K., Kudrna, P. (2009). Nanokompozitní Ag-HA biokompatibilní vrstvy, *Nanocon*, 7, 4-10.
- Joško, I., Oleszczuk, P. (2013). The influence of ZnO and TiO₂ nanoparticles on the toxicity of sewage sludges. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(1), 296-306.
- Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H., Park, Y. H. (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2171-2178.

Jung, W. K., S. H. Kim, H. C. Koo, S. Shin, J. M. Kim, Y. K. Park, S. Y., Hwang, H. Yang, and Y. H. Park., Y. H. (2007). Antifungal activity of the silver ion against contaminated fabric. *Mycoses*, 50(4), 265–269.

Kägi, R., Ulrich, A., Sinnet, B., Vonbank, R., Wichser, A., Zuleeg, S., Boller, M. (2008). Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental pollution*, 156(2), 233-239.

Kahru, A., Dubourguier, H. C., Blinova, I., Ivask, A., Kasemets, K. (2008). Biotests and biosensors for ecotoxicology of metal oxide nanoparticles: A minireview. *Sensors*, 8(8), 5153–5170.

Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, Ch. Y., Kim, Y. K., Lee, Y. S., Jeong, D. H., & Cho, M. H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95-101.

Kim, S. C., & Lee, D. K. (2005). Preparation of TiO₂-coated hollow glass beads and their application to the control of algal growth in eutrophic water. *Microchemical Journal*, 80(2), 227-232.

Klaine, S. J., Alvarez, P. J. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 27(9), 1825–1851.

Klasen, H. J. (2000). Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*, 26(2), 117-130.

Kloepfer, J. A., Mielke, R. E., & Nadeau, J. L. (2005). Uptake of CdSe and CdSe/ZnS quantum dots into bacteria via purine-dependent mechanisms. *Applied and environmental microbiology*, 71(5), 2548-2557.

Knejzlik, Z., Kas, J., Ruml, T. (2000). Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické Listy*, 94, 913–918.

Kvítek, L., Pruček, R., Paná, A., Ek, Č., Soukupová, J. (2009). Nanočástice stříbra – příprava, vlastnosti a aplikace, *Nanocon*, 20(22), 10.

Landa, P., Vankova, R., Andrlova, J., Hodek, J., Marsik, P., Storchova, H., Vanek, T. (2012). Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂, and fullerene soot. *Journal of hazardous materials*, 241, 55-62.

Limbach, L. K., Wick, P., Manser, P., Grass, R. N., Bruinink, A., Stark, W. J. (2007). Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental science & technology*, 41(11), 4158-4163.

Lin, D., Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150(2), 243-250.

Mansuy, D. (2012). [Metabolism of xenobiotics: beneficial and adverse effects]. *Biologie aujourd'hui*, 207(1), 33-37.

Miletín, M. (2011). Prostředky na ochranu pokožky proti škodlivým vlivům UV záření, *Praktické lékárenství*, 7(1), 34–38.

Nohavica, D. (2011). Rizika nanomateriálů a nanotechnologií pro lidské zdraví a životní prostředí, *Československý časopis pro fyziku*, 3-4.

Norman, B. C., Xenopoulos, M. a., Braun, D., Frost, P. C. (2015). Phosphorus Availability Alters the Effects of Silver Nanoparticles on Periphyton Growth and Stoichiometry. *Plos One*, 10(6).

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, (2006). Guideline 201. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, (2006). Guideline 221. *Lemna* sp. Growth Inhibition Test.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, (2006). Guideline 227. Terrestrial Plant Test:Vegetative Vigour Test.

Oukarroum, A., Polchtchikov, S., Perreault, F., Popovic, R. (2012). Temperature influence on silver nanoparticles inhibitory effect on photosystem II photochemistry in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(5), 1755-1762.

Panyala, N. R., Peña-méndez, E. M., Havel, J. (2008). Silver or silver nanoparticles : a hazardous threat to the environment and human health ? *J. Appl. Biomed.*, 6, 117–129.

Riedel, G. F., Sanders, J. G. (2003). The interrelationships among trace element cycling, nutrient loading, and system complexity in estuaries: A mesocosm study. *Estuaries*, 26(2), 339-351.

Rossetto, A. L., Melegari, S. P., Ouriques, L. C., Matias, W. G. (2014). Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Science of the total environment*, 490, 807-814.

Sadiq, I. M., Pakrashi, S., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2011). Studies on toxicity of aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles to microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3287-3299.

Shah, V., Belozeroва, I. (2009). Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water, air, and soil pollution*, 197(1-4), 143-148.

Slavík, M. (2007). Nanotechnologie. *Nano.tul.cz* [online], cit. 14. 12. 2015. Dostupné z: <<http://nano.tul.cz/nanotechnologie>>

Song, G., Gao, Y., Wu, H., Hou, W., Zhang, C., Ma, H. (2012). Physiological effect of anatase TiO₂ nanoparticles on *Lemna minor*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(9), 2147-2152.

Sovová, T., Koci, V. (2012). Ecotoxicology of nanomaterials. *Chemicke Listy*, 106, 82-87.

Sovová, T., Kocí, V., Kochánková, L. (2009). Ecotoxicity of nano and bulk forms of metal oxides. In *Proceedings, Nanocon Conference, Roznov pod Radhostem. Czech Republic*, 62-71.

Škodová, P., Křiklavová, L., Lederer, T., Bakalova, T. (n.d.). Hodnocení toxicity vybraných nanočástic na biologické činitele. *Oddělení nanomateriálů v přírodních vědách, Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace*, Technická univerzita v Liberci, Česká republika.

Transparency Market Research (2014), Nanosilver Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2014 – 2020. Region: Global, Transparency Market Research, (72 p.), ID: 3001308.

Trujillo, L. C. (2014). What is Nanotechnology and why Does it Matter?: from Science to Ethics. *NanoEthics*, 8(2), 211–213.

Wang, Z., Chen, J., Li, X., Shao, J., & Peijnenburg, W. J. (2012). Aquatic toxicity of nanosilver colloids to different trophic organisms: contributions of particles and free silver ion. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(10), 2408-2413.

Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., Von Goetz, N. (2012). Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental science & technology*, 46(4), 2242-2250.

Yang, L., Watts, D. J. (2005). Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology letters*, 158(2), 122-132.

Zheng, L., Hong, F., Lu, S., Liu, C. (2005). Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological trace element research*, 104(1), 83-91.

8.2 Seznam použitých obrázků a jejich zdrojů

Obrázek 1 – Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., & Kahru, A. (2013). Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review. *Archives of Toxicology*, 87(7), 1181–1200.

Obrázek 2 – Kahru, A., Dubourguier, H. C., Blinova, I., Ivask, A., Kasemets, K. (2008). Biotests and biosensors for ecotoxicology of metal oxide nanoparticles: A minireview. *Sensors*, 8(8), 5153–5170.

Obrázek 3 – Hjorth, R., Coutris, C., Nguyen, N., Ševců, A., Baun, A., Joner, E. (2015). Ecotoxicity Testing of Nanoparticles for Remediation of Contaminated Soil and Groundwater [online], cit. 3. 1. 2017. Dostupné z: http://orbit.dtu.dk/files/110839634/Ecotoxicity_Testing.pdf

Obrázek 4 – Sovová, T., Koci, V. (2012). Ecotoxicology of nanomaterials. *Chemické Listy*, 106, 82-87.

Obrázek 5 – Pazdera, J., (2014). Některé nanočástice nám škodí, ale které? *Objective Source E-Learning* [online], cit. 3. 1. 2017. Dostupné z: <<http://www.osel.cz/7568-nektere-nanocastice-nam-skodi-ale-ktere.html>>

Seznam použitých zkratek

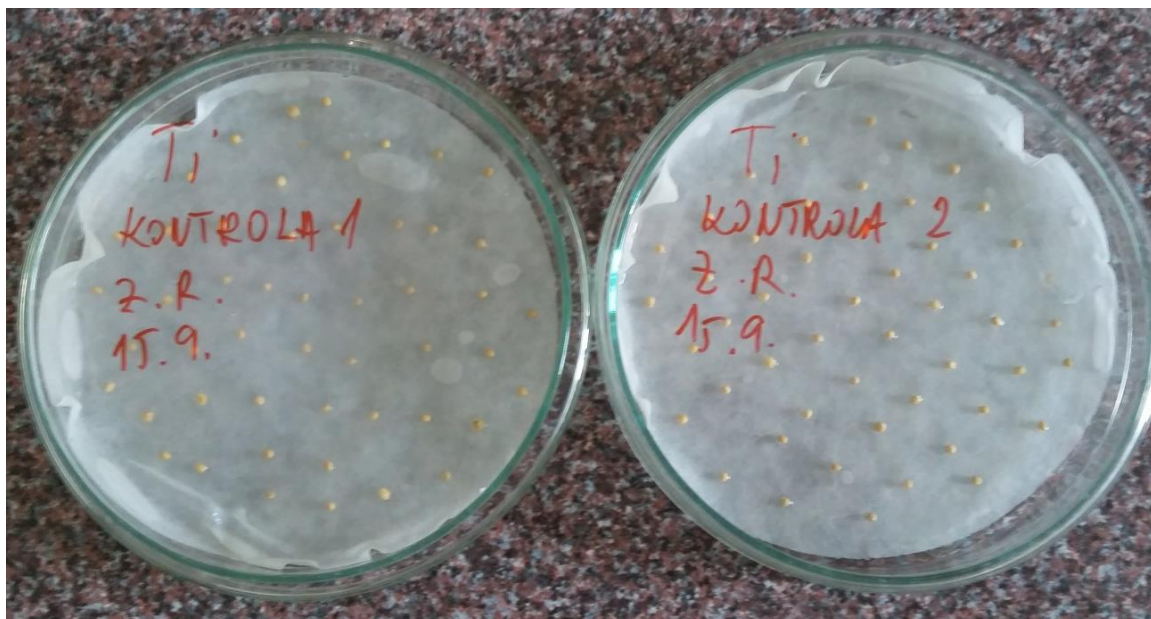
ATP	adenosintrifosfát
C ₆₀	fulereny
ČSN	označení českých technických norem
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EN	označení evropských norem
EU	Evropská unie
HA	hydroxyapatit
IC50	inhibiční koncentrace 50 %
ISO	International Organization for Standardization
LC	letální koncentrace
LCD	liquid crystal display
LED	light emitting diode
LOEC	nejnižší pozorovatelná účinná koncentrace
MS	Microsoft
MWCNT	vícestěnné uhlíkové nanotrubičky (multi-walled carbon nanotubes),
NOEC	koncentrace bez pozorovatelných účinků
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
PVC	polyvinylchlorid
ROS	radical oxygen species
SPF	sun protect factor
SWCNT	jednostěnné uhlíkové nanotrubičky (single-walled carbon nanotubes),
UV	ultraviolet (ultrafialový)
ŽP	životní prostředí

9 Přílohy

Příloha 1- Ukázka fotografií z průběhu testování nanočástic



Fotografie 1 - Testování na rostlině *Sinapis alba* – vzešlá semena (Rigová, 2016)



Fotografie 2 - Testování na rostlině *Sinapis alba* – nasazená semena (Rigová, 2016)



Fotografie 3 – Koncentrační řada roztoků nanočástic (Rigová, 2016)



Fotografie 4 - Testování na rostlině *Lemna sp.* (Rigová, 2016)