

Univerzita Pardubice

Fakulta Chemicko-Technologická

Testy ekotoxicity nanočástic Ag s modifikovaným povrchem v kultivačním
médiu potlačujícím aglomeraci

Bc. Jakub Link

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jakub Link**
Osobní číslo: **C14579**
Studijní program: **N2807 Chemické a procesní inženýrství**
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**
Název tématu: **Testy ekotoxicity nanočástic Ag s modifikovaným povrchem v kultivačním médiu potlačujícím aglomeraci**

Zadávací katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

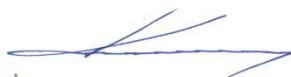
Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na možnosti využití gelů jako kultivačních prostředí pro testy ekotoxicity nanočástic. Popište způsoby vnášení nanočástic do gelů a definujte parametry, které významným způsobem ovlivňují výsledný stupeň aglomerace či agregace testovaných nanomateriálů. Zhodnoťte přednosti a nevýhody dostupných analytických technik používaných pro charakterizaci nanomateriálů dispergovaných v gelových kultivačních médiích.
2. Diskutujte vhodnost využití kroužkoců jako biologických modelů v rámci testů ekotoxicity prováděných v gelových kultivačních prostředích. Zaměřte se zejména na možné přednosti a nevýhody výše zmíněného experimentálního přístupu. Zvláštní pozornost věnujte otázkám environmentální relevance takto koncipovaných testů.
3. Na kroužkovci *Enchytraeus crypticus* proveďte test ekotoxicity povrchově modifikovaných nanočástic Ag. Jako kultivační médium použijte agarózový gel. Definujte kritické parametry, které nejvýznamněji ovlivňují výsledek experimentů. Zhodnoťte možnosti studia vlivu povrchové modifikace nanočástic Ag na jejich ekotoxicitu s využitím testů prováděných v gelových kultivačních médiích.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

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

Datum zadání diplomové práce: **28. ledna 2016**
Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. ledna 2016

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 02.03.2017

Jakub Link

Poděkování

Na tomto místě bych rád vyjádřil několik poděkování. Zejména děkuji vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Miloslavu Pouzarovi, Ph.D. za aktivní přístup k vedení a korigování tohoto projektu a mimo jiné za vyjimečnou trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval. Dále patří poděkování Ing. Kateřině Hrdé za odborné konzultace a cenné rady, které mi byly užitečné během prováděných laboratorních experimentů, Ing. Jakobovi Opršalovi za syntézu testovaných nanočástic, Bc. Ince Vrzáčkové za výpomoc při laboratorních experimentech a mé rodině a přátelům za podporu během studia.

ANOTACE

Hlavním cílem předložené diplomové práce bylo ověření možnosti provedení testů ekotoxicity nanočástic stříbra (AgNPs) a nanočástic stříbra se sulfidizovaným povrchem (Ag@Ag₂S-NPs) v koloidní formě na vybraném modelovém organismu (roupice druhu *Enchytraeus crypticus*) v prostředí agarózového gelu. Agar byl zvolen jako expoziční médium namísto umělé půdy nebo sedimentu zejména díky předpokladu, že při jeho vhodném postupu přípravy dojde k homogennímu rozptýlení testovaných nanočástic (NPs) v celém objemu testovací jednotky a rovněž ke snížení míry aglomerace NPs. Výsledky této práce by mohly napomoci zavést do ekotoxikologických laboratoří nový přístup pro testování různých typů NPs a sjednotit výchozí podmínky pro testování těchto látek napříč různými pracovišti zabývajícími se problematikou ekotoxicity nanomateriálů.

V teoretické části diplomové práce je pojednáváno o použitém expozičním médiu (agar), problematice zavádění NPs do agaru popř. jiných hydrogelů a následné charakterizaci tohoto média, použitém modelovém organismu a testovaných NPs, včetně jejich predikovaných environmentálních koncentrací a ekotoxických účinků pro zástupce různých trofických úrovní.

V experimentální části jsou uvedeny a diskutovány výsledky provedených testů ekotoxicity a doprovodných experimentů vztahujících se k těmto testům. Protože bylo u kovových NPs prokázáno několik mechanismů toxického účinku (např. uvolňování iontů z povrchu NPs) a v odborných kruzích existují diskuze, zdali toxické účinky tohoto typu NPs jsou důsledkem uvolňování kovových iontů z jejich povrchu nebo důsledkem zejména jejich velmi malých rozměrů, byla nejprve v prostředí agarózového gelu zjišťována toxicita Ag⁺ iontů (testováno ve formě AgNO₃).

V rámci provedených experimentů byl zaznamenán velice náhlý účinek AgNO₃ na mortalitu testovacích organismů, kde došlo k změně z žádné toxicity na totální mortalitu během nárůstu koncentrace o pouhých 9,6 mg Ag/kg agaru. Naproti tomu u obou typů testovaných NPs byla u zvolených koncentrací pozorována pouze slabá odezva modelových organismů, přičemž maximální mortality (11,67 %) bylo dosaženo u expozice modelových organismů koncentraci AgNPs odpovídající 100 mg Ag/kg agaru.

KLÍČOVÁ SLOVA

Agar, nanočástice, stříbro, sulfidace, ekotoxicita, roupice (*Enchytraeus crypticus*)

TITLE

Testing toxicity of surface modified silver nanoparticles in culture medium suppressing agglomeration

ANNOTATION

The main aim of this Diploma Thesis is to verify the possibility of carrying out tests of ecotoxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and sulfidized silver nanoparticles (Ag@Ag₂S-NPs) in colloidal form on the selected model organism (potworm *Enchytraeus crypticus*) in agarose gel. The reason why agar was chosen as the exposure medium instead of artificial soil or sediment was mainly based on the assumption that if a suitable preparation procedure is used, the tested nanoparticles (NPs) will be homogeneously dispersed throughout the contents of the test unit, and agglomeration of the NPs will be reduced as well. The results of this thesis might help to establish a new approach for testing various types of NPs in ecotoxicological laboratories and unify the starting conditions for testing these substances across different departments dealing with the problem of ecotoxicity of nanomaterials.

The theoretical part deals with the used exposure medium (agar), the issue of introducing NPs into agar and other hydrogels, as well as the characterization of this medium. It also deals with the used model organism and the tested NPs, including their predicted environmental concentrations and ecotoxic effects on the members of various trophic levels.

The experimental part presents and discusses the results of the conducted ecotoxicity tests and the supporting experiments related to these tests. Due to the fact that several mechanisms of toxic effects had been proved for the metal NPs (e.g. ion release from the surface of the NPs), and there have been discussions among experts, whether the toxic effects of this type of NPs are caused by the release of metal ions from their surface or rather by their very small size, the first thing tested was the toxicity of Ag⁺ ions in agarose gel (tested in the form of AgNO₃).

Within the conducted experiments, a very sudden effect of AgNO₃ was noted on the mortality of the test organisms with a shift from no toxicity to the total mortality during the increase of concentration by only 9,6 mg Ag/kg of agar. In contrast, only a weak response of model organisms was noted at the selected concentrations for both types of the tested NPs, whereas the maximum mortality (11,67 %) was achieved by exposure of model organisms to AgNPs concentration equivalent to 100 mg Ag/kg agar.

KEYWORDS

Agar, nanoparticles, silver, sulfidation, ecotoxicity, potworm (*Enchytraeus crypticus*)

OBSAH

ÚVOD	17
1 TEORETICKÁ ČÁST	18
1.1 Agar.....	18
1.2 Předpokládané výhody použití agaru jako expozičního média při posuzování ekotoxicity nanočástic.....	19
1.3 Zavádění nanočástic do hydrogelů a jejich následná charakterizace.....	20
1.3.1 Zavádění práškové formy nanočástic do hydrogelů a jejich charakterizace	20
1.3.2 Zavádění koloidní formy nanočástic do hydrogelů a jejich charakterizace.....	29
1.4 Roupicovití (Enchytraeidae)	35
1.5 Možné způsoby posuzování ekotoxicity nanočástic na kroužkovcích.....	37
1.6 Nanočástice stříbra a jejich environmentální transformace	38
1.7 Predikované environmentální koncentrace nanočástic stříbra	44
1.8 Ekotoxické účinky nanočástic stříbra na bezobratlé organismy	47
1.8.1 Vliv nanočástic stříbra na půdní bezobratlé organismy.....	47
1.8.2 Vliv nanočástic stříbra na vodní bezobratlé organismy.....	54
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	58
2.1 Chov testovacích organismů (roupice <i>Enchytraeus crypticus</i>).....	58
2.2 Design ekotoxikologických testů	59
2.3 Testy ekotoxicity stříbrných iontů	59
2.4 Testy ekotoxicity dusičnanových iontů.....	60
2.5 Testované nanočástice a jejich syntéza	60
2.5.1 Syntéza nanočástic stříbra (AgNPs)	60
2.5.2 Syntéza sulfidizovaných nanočástic stříbra (Ag@Ag ₂ S-NPs)	61
2.6 Kvantifikace stříbra v připravených koloidech.....	61
2.7 Charakterizace testovaných nanočástic.....	61

2.8	Chování testovaných nanočástic během přípravy expozičního média.....	62
2.9	Testy ekotoxicity nanočástic stříbra (AgNPs)	63
2.10	Testy ekotoxicity sulfidizovaných nanočástic stříbra (Ag@Ag ₂ S-NPs)	64
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	65
3.1	Testy ekotoxicity stříbrných iontů	65
3.2	Testy ekotoxicity dusičnanových iontů.....	69
3.3	Kvantifikace stříbra v připravených koloidech.....	69
3.4	Charakterizace testovaných nanočástic.....	69
3.5	Chování testovaných nanočástic během přípravy expozičního média.....	72
3.6	Testy ekotoxicity nanočástic stříbra (AgNPs)	73
3.7	Testy ekotoxicity sulfidizovaných nanočástic stříbra (Ag@Ag ₂ S-NPs)	77
4	ZÁVĚR	78
5	POUŽITÁ LITERATURA	80

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK, GRAFŮ A ROVNIC

Obrázky:

Obrázek 1 – Struktura opakujících se jednotek agarobiózy	18
Obrázek 2 – Snímek ZnNPs rozptýlených v agaru pořízený SEM s katodoluminiscenčním detektorem	21
Obrázek 3 – Množství uvolněných iontů [%] z povrchů CuO-NPs, NiO-NPs, ZnO-NPs a Sb ₂ O ₃ -NPs.....	23
Obrázek 4 – Snímek expozičního média agar–ZnO-NPs (koncentrace 100 mg ZnO-NPs/kg agaru) pořízený SEM.....	24
Obrázek 5 – Rozpouštění ZnO-NPs během přípravy expozičního média v nepřítomnosti a v přítomnosti solí	25
Obrázek 6 – Snímek expozičního média o koncentraci 1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru pořízený SEM.....	26
Obrázek 7 – EDX spektra útvarů identifikovaných na povrchu expozičního média agar–ZnO-NPs.....	26
Obrázek 8 – Snímek expozičního média o koncentraci 1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru pořízený SEM.....	28
Obrázek 9 – EDX spektra útvarů identifikovaných na povrchu expozičního média agar–ZnO-NPs.....	28
Obrázek 10 – Snímek CeO ₂ -NPs pořízený TEM.....	29
Obrázek 11 – Vzorkovací schéma pro ověření homogenní distribuce NPs v agaru.....	30
Obrázek 12 – Relativní obsah Ce ve vzorcích agaru (200 mg CeO ₂ -NPs/L agaru)	31
Obrázek 13 – Absorpční (A) a transmisní (B) spektrum připravených nanokompozitních filmů agar–AgNPs.....	32
Obrázek 14 – Snímky antimikrobiálních filmů agar–AgNPs (hmotnostní obsah Ag v jednotlivých vzorcích 0; 0,2; 0,5; 1 a 2 %) pořízené FE-SEM	33
Obrázek 15 – Chov rouspic <i>Enchytraeus albidus</i> (A) a <i>Enchytraeus crypticus</i> (B).....	36
Obrázek 16 – Hodnoty LC ₅₀ a EC ₅₀ [ppm] pro embrya dánia pruhovaného, embrya halančíků, háďátka obecné a okřehek nejmenší	40

Obrázek 17 – (A) TEM snímek AgNPs-PVP (polydisperzní, zagregované); (B) Graf velikostní distribuce AgNPs-PVP (polydisperzní, zagregované) získaný pomocí DLS; (C) TEM snímek AgNPs-PVP (neagregované); (D) Graf velikostní distribuce AgNPs-PVP (neagregované) získaný pomocí DLS	41
Obrázek 18 – Graf velikostní distribuce AgNPs-PVP (neagregované) po maximální sulfidaci po dobu 48 hod.....	42
Obrázek 19 – Toxicita AgNPs-PVP (A – zagregované; B – neagregované) s různým stupněm sulfidace	43
Obrázek 20 – Křivka pravděpodobnostního rozložení citlivosti druhů (pSSD) pro AgNPs v půdách	46
Obrázek 21 – Časová závislost viability [%] modelových organismů (<i>Enchytraeus crypticus</i>) exponovaných různými koncentracemi AgNO ₃ (A), AgNPs-Cit (B) a AgNPs-PVP (C)	49
Obrázek 22 – Výsledky analýzy vybraných biochemických markerů oxidativního stresu u roupic exponovaných různými koncentracemi AgNPs.....	51
Obrázek 23 – Výsledky kometového testu poukazující na různý rozsah poškození DNA v coelomocytech modelového organismu (<i>Nereis diversicolor</i>) exponovaného různými koncentracemi AgNPs	53
Obrázek 24 – Srovnání výsledků kometového testu; (A) kontrolní skupina, (B) vzorek modelového organismu exponovaný AgNPs, (C) vzorek modelového organismu exponovaný rozpustnou formou Ag (AgNO ₃).....	55
Obrázek 25 – Vývojové parametry zaznamenané u pakomára <i>Chironomus riparius</i> po 25 denní expozici AgNPs.....	57
Obrázek 26 – SEM snímky AgNPs (A) a Ag@Ag ₂ S-NPs (B).....	70
Obrázek 27 – Difrakční záznamy vzorků AgNPs (A) a Ag@Ag ₂ S-NPs (B).....	71
Obrázek 28 – Topografické snímky testovaných AgNPs (A) a Ag@Ag ₂ S-NPs (B) a topografický profil jedné nanočástice stříbra (C).....	71

Tabulky:

Tabulka 1 – Základní charakteristiky expozičních médií použitých v práci Levard a kol. (2013)	39
Tabulka 2 – Simulované výsledky hodnot predikovaných environmentálních koncentrací AgNPs uvedené v práci Gottschalk a kol. (2009)	44
Tabulka 3 – Simulované výsledky hodnot predikovaných environmentálních koncentrací AgNPs uvedené v práci Sun a kol. (2014).....	45
Tabulka 4 – Hodnoty PNECs odvozené ze středních hodnot pátého percentilu pravděpodobnostního rozložení citlivosti druhů	46
Tabulka 5 – Průměrné koncentrace Ag (mg/L; ± standardní odchylka, počet měření n = 3) naměřené po dvou a sedmi dnech ve vodné fázi expozičního média.....	48
Tabulka 6 – Expoziční koncentrace testovaných látek použité v akutním imobilizačním testu dafnií.....	56
Tabulka 7 – Mortalita testovacích organismů (<i>Enchytraeus crypticus</i>) vůči kontrolní skupině [%] v závislosti na testované koncentraci rozpustné formy Ag (AgNO ₃).....	65
Tabulka 8 – Hodnoty LC ₅₀ pro vybrané terestrické a akvatické organismy (AgNO ₃)	68
Tabulka 9 – Hodnoty hydrodynamického průměru (D _H) a zeta-potenciálu (ζ-potenciál) naměřené u vzorků AgNPs (100 mg Ag/L) a Ag@Ag ₂ S-NPs (150 mg Ag/L)...	70
Tabulka 10 – Hodnoty hydrodynamického průměru částic (D _H) naměřené u roztoků AgNPs (100 mg Ag/L) a Ag@Ag ₂ S-NPs (150 mg Ag/L) před a po zahřívání na teplotu 85 ± 5 °C po dobu 15 min	72
Tabulka 11 – Mortalita testovacích organismů (<i>Enchytraeus crypticus</i>) vůči kontrolní skupině [%] v závislosti na testované koncentraci AgNPs	73
Tabulka 12 – Hodnoty LC ₅₀ pro vybrané terestrické a akvatické organismy (AgNPs)	76
Tabulka 13 – Mortalita testovacích organismů (<i>Enchytraeus crypticus</i>) vůči kontrolní skupině [%] zaznamenaná po 96 hod expozici Ag@Ag ₂ S-NPs v agaru (koncentrace 150 mg Ag/kg agaru).....	77

Grafy:

Graf 1 – Křivka dávka-účinek pro *Enchytraeus crypticus*, 96 hod expozice AgNO₃66

Rovnice:

Rovnice 1 – Boltzmannův model.....65

SEZNAM ZKRATEK

AFM	Atomic Force Microscopy – Mikroskopie atomárních sil
ATP	Adenosine Triphosphate – Adenosintrifosfát
CAT	Catalase – Kataláza
CFU	Colony Forming Units – Kolonie tvořící jednotky
DLS	Dynamic Light Scattering – Dynamický rozptyl světla
DNA	Deoxyribonucleic Acid – Deoxyribonukleová kyselina
EC ₅₀	Effective Concentration – Střední účinná (efektivní) koncentrace, při které dochází k 50% efektu u testovacích organismů za určitý čas
EDX	Energy Dispersive X-ray Spectrometry – Energiově disperzní rentgenová spektrometrie
EFTEM	Energy-Filtered Transmission Electron Microscopy – Transmisní elektronový mikroskop s energiovým filtrem elektronů
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure – Rozšířená rentgenová absorpční spektrometrie jemných struktur
FAAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry – Plamenová atomová absorpční spektrometrie
FE-SEM	Field Emission Scanning Electron Microscopy – Skenovací elektronový mikroskop s autoemisní tryskou
GFAAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry – Atomová absorpční spektrometrie s grafitovou pecí
GPx	Glutathione Peroxidase – Glutathion peroxidáza
GR	Glutathione Reductase – Glutathion reduktáza
GST	Glutathione-S-Transferase – Glutathion-S-transferáza
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry – Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry – Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

ISO	International Organization for Standardization – Mezinárodní organizace pro normalizaci
LC ₅₀	Lethal Concentration – Letální koncentrace, při které uhynie 50 % testovacích organismů za určitý čas
LPO	Lipid Peroxidation – Peroxidace lipidů
MT	Metallothionein – Metalothionein
NPs	NanoParticles – Nanočástice
NOEC	No Observed Effect Concentration – Nejvyšší koncentrace látky, při které nejsou pozorovány negativní účinky
OA	Oleic Acid – Kyselina olejová
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development – Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj
PNEC	Predicted No-Effect Concentration – Predikovaná koncentrace, při které nedochází k nepříznivým účinkům na zvažovaný ekosystém
pSSD	Probabilistic Species Sensitivity Distribution – Pravděpodobnostní rozložení citlivosti druhů
PVP	Polyvinylpyrrolidone – Polyvinylpyrolidon
RCF	Relative Centrifugal Force – Relativní centrifugační síla
ROS	Reactive Oxygen Species – Reaktivní formy kyslíku
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate – Dodecylsulfát sodný
SEM	Scanning Electron Microscopy – Skenovací/Rastrovací elektronová mikroskopie
SERS	Surface Enhanced Raman Spectrometry – Povrchem zesílená Ramanova spektrometrie
TEM	Transmission Electron Microscopy – Transmisní elektronová mikroskopie
TG	Total Glutathione – Celkový glutathion
XRD	X-Ray Diffraction Analysis – Rentgenová difrakční analýza

ÚVOD

Nanomateriály jsou podle Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) materiály s jakýmkoliv vnějším rozměrem v nano-měřítku (1–100 nm) nebo s vnitřní či povrchovou strukturou v nano-měřítku. Nanomateriál lze dále definovat jako jako přírodně, nahodile (vedlejší produkty) nebo záměrně vyprodukovaný materiál obsahující částice v nevázaném stavu nebo jako agregáty či aglomeráty a kde 50 % a více z celkového počtu částic má jeden nebo více vnějších rozměrů ve velikostním rozmezí 1–100 nm [1]. Do skupiny nanomateriálů spadají tzv. nanočástice (NPs), které lze definovat jako materiály mající všechny tři rozměry v rozmezí 1–100 nm [2].

Exponenciální rozvoj aplikací nanomateriálů využívaných např. při výrobě kosmetických přípravků, potravinových doplňků, léčiv, katalyzátorů, biosenzorů atd. vede ke zvýšenému riziku jejich uvolňování do různých složek životního prostředí (ŽP). I přes skutečnost, že roční produkce nanomateriálů je odhadována na tisíce tun, možnosti zjišťování jejich skutečného dopadu na ŽP jsou poměrně omezené [3]. Nanomateriály představují výrazně heterogenní skupinu látek jak z hlediska jejich chemického složení (nanomateriály byly připraveny z více než 44 prvků), tak rovněž z pohledu průměrné velikosti částic a jejich distribuce, náboje a povrchového složení atd., což jsou parametry významným způsobem ovlivňující chování nanomateriálů v ŽP a jejich (eko)toxicitu [4].

AgNPs představují v současnosti jeden z nejvyužívanějších nanomateriálů a výroba produktů obsahující tyto částice se prudce zvyšuje. S jistou nadsázkou lze tvrdit, že používání AgNPs v různých produktech a vývoj jejich nových aplikací předběhly samotný výzkum interakcí těchto částic s živými organismy, včetně člověka.

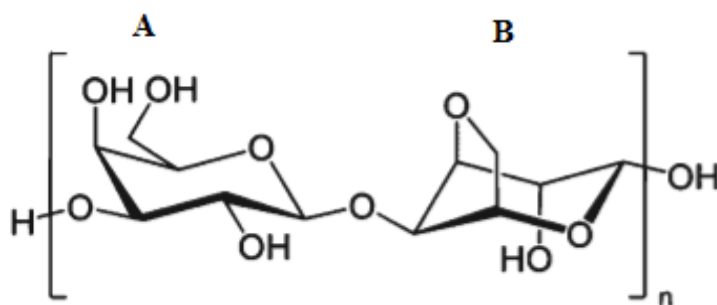
Zatímco v případě výzkumu interakcí NPs s vodními organismy existuje možnost kontrolování fyzikálně-chemických parametrů (myšleny především jevy označované jako aglomerace popř. agregace) těchto částic během samotné expozice (např. periodickým vyměňováním použitého expozičního média), v případě půd jsou možnosti kontroly těchto parametrů velmi omezené. Právě z tohoto důvodu byl zvolen jako expoziční médium agar, jehož klíčovou úlohou je zachování výchozích fyzikálně-chemických parametrů testovaných NPs po dobu trvání celého experimentu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Agar

Český lékopis 2009 definuje agar jako směs polysacharidů získanou z různých druhů řas čeledi *Rhodophyceae*, zejména rodu *Gelidium*. Agar se vyrábí extrakcí řas vařící vodou, získaný výtažek se za horka filtruje, zahušťuje a suší. Tato látka se vyskytuje ve formě prášku, stlačených proužků širokých 2–5 mm nebo někdy ve vločkách [5]. Agar je tvořen zejména dvěma odlišnými polysacharidy: agarózou a agaropektinem. Neionogenní, gelující složkou agaru je agaróza, zatímco agaropektin je ionogenní a gel netvoří. Obsah těchto polysacharidů se v různých typech agaru liší, přičemž některé komerčně dostupné agary jsou agaropektinu zbaveny.

Agaróza je lineární polysacharid tvořený opakujícími se jednotkami agarobiózy. Agarobióza je disacharid složený z D-galaktózových a 3,6-anhydro-L-galaktopyranózových podjednotek (**obr. 1**) [6].



Obrázek 1 – Struktura opakujících se jednotek agarobiózy ($A = 1,3 \beta\text{-D}$ galaktóza; $B = 1,4\text{-}\alpha\text{-L-3,6-anhydrogalaktóza}$) [7]

Molekulová hmotnost agarózy je přibližně 120 000 Da. Polymerní agarózová vlákna vytváří šroubovicovou strukturu, která je schopná agregovat do větších celků nadšroubovicových soustav, které dosahují poloměru 20–30 nm. Vlákna jsou kvazi-rigidní a vyznačují se širokým rozsahem délky v závislosti na koncentraci agarózy. Agaróza je zodpovědná za gelující vlastnosti agaru. Tento polysacharid se velmi dobře rozpouští v horké vodě (např. agaróza s nízkou teplotou tání se rozpouští při teplotě kolem 85 °C), naopak ve studené vodě je agaróza nerozpustná.

Po ochlazení roztoku agaru (při teplotách 30–40 °C) dochází k jeho tuhnutí a vzniku polotuhé gelové látky [8]. Vznik gelu je závislý na tvorbě vodíkových vazeb, s jejichž pomocí se náhodné spirály spojují v dvojité helixy. Záhřevem se agarové gely rozrušují

a po ochlazení opět obnovují, přičemž tento proces je zcela reverzibilní a může se opakovat. Reverzibilita tvorby gelu závisí na pH popř. na přítomnosti oxidačních činidel [9].

Při pH v rozmezí 4–10 jsou vodné roztoky agaru stabilní. Agar tvoří gel již při koncentraci 0,1 %. Teplota tuhnutí gelu se pohybuje kolem 40 °C, naopak k tání dochází při teplotě zhruba 90 °C [10].

1.2 Předpokládané výhody použití agaru jako expozičního média při posuzování ekotoxicity nanočástic

Většina v současné době dostupných studií zabývajících se ekotoxicitou NPs pro půdní organismy je realizována s využitím modelových půd jako expozičního média. Při použití modelových půd pro testování ekotoxicity NPs je velmi obtížné udržet konstantní expoziční koncentraci NPs v celém objemu testovací jednotky mimo jiné i proto, že NPs mají tendenci často vytvářet aglomeráty a interagovat s půdními konstituenty. Půda je komplexním systémem minerálů, organického materiálu, vody, plynů a živých organismů. Všechny tyto komponenty mohou interagovat s testovanými NPs a následně ovlivňovat jejich výslednou ekotoxicitu.

Použití agaru jako expozičního média v experimentální části této práce má za účel vyloučit obtížně monitorovatelné interakce mezi půdními konstituenty a zkoumanými NPs s cílem se zaměřit pouze na účinky vybraného toxikantu (AgNPs popř. Ag@Ag₂S-NPs).

Hlavní předpokládané výhody použití agaru jako expozičního média pro testování ekotoxicity NPs jsou shrnuty v následujících bodech:

- snadná, uniformní distribuce NPs
- nižší riziko aglomerace
- možnost charakterizace připraveného expozičního média
- reprodukovatelnost

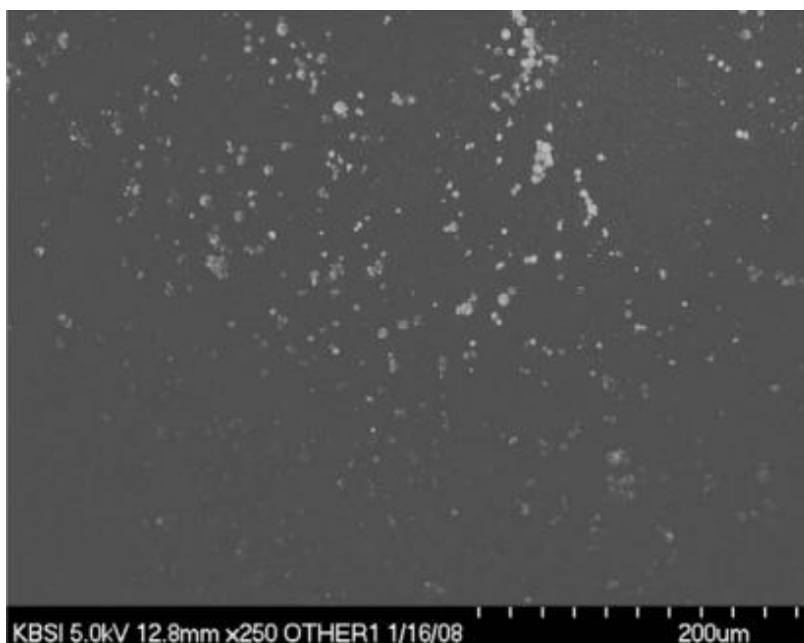
1.3 Zavádění nanočástic do hydrogelů a jejich následná charakterizace

Jak již bylo stručně naznačeno, hlavním cílem přípravy expozičního média (agar–AgNPs popř. agar–Ag@Ag₂S-NPs) v experimentální části této práce je dosáhnout homogenní distribuce NPs v celém objemu testovací jednotky s pokud možno co nejmenší mírou vzniku aglomerátů. V následujících odstavcích bude pojednáváno o možných způsobech zavádění NPs do hydrogelů a jejich následné charakterizaci.

1.3.1 Zavádění práškové formy nanočástic do hydrogelů a jejich charakterizace

Lee a kol. (2008) vyšetřovali vliv CuNPs na růst sazenic fazole mungo (*Phaseolus radiatus*) a pšenice seté (*Triticum Aestivum*) a jejich následnou bioakumulaci v tkáních těchto rostlin. CuNPs použité v této studii byly charakterizovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu s energiovým filtrem elektronů (EFTEM), nicméně přesná informace o rozměrech použitých NPs zde uvedena není (uveden pouze snímek pořízený EFTEM). Hlavním důvodem volby agaru jako expozičního média bylo dle autorů tohoto článku potlačení aglomerace testovaných CuNPs. Expoziční médium bylo připravováno prostřednictvím přidavku agaru (prášková forma) a vhodného množství CuNPs (prášková forma) do ultračisté vody a tímto způsobem získané disperze byly po působení ultrazvuku (1 hod) z důvodu rozbití aglomerátů protřepány a následně rozlity na testovací jednotky (Petriho misky; 87 x 18 mm). Bezprostředně po rozliti expozičního média byly testovací jednotky z důvodu potlačení možné aglomerace NPs umístěny do chladicího boxu (teplota zde uvedená není). Každá testovaná koncentrace byla připravována odděleně přímým vážením NPs a jejich dispergací v agaru. Přídavek NPs se pohyboval v koncentračním rozmezí 0 – 1 000 mg CuNPs/L agaru. Dle autorů článku se jedná o první studii využívající agar jako expoziční médium při posuzování ekotoxicity NPs pro rostliny.

Pro ověření homogenní distribuce CuNPs v testovací jednotce byl použit skenovací elektronový mikroskop (SEM) s katodoluminiscenčním detektorem, přičemž testované CuNPs byly pro tento účel nahrazeny ZnNPs, které vykazují aktivní katodoluminiscenční vlastnosti. Na **obr. 2** je uveden snímek ZnNPs rozptýlených v agaru stejným způsobem jako testované CuNPs pořízený SEM s katodoluminiscenčním detektorem. Na základě tohoto snímku lze hovořit o homogenní distribuci ZnNPs s výskytem poměrně velkého množství aglomerátů.



Obrázek 2 – Snímek ZnNPs rozptýlených v agaru pořízený SEM s katodoluminiscenčním detektorem [11]

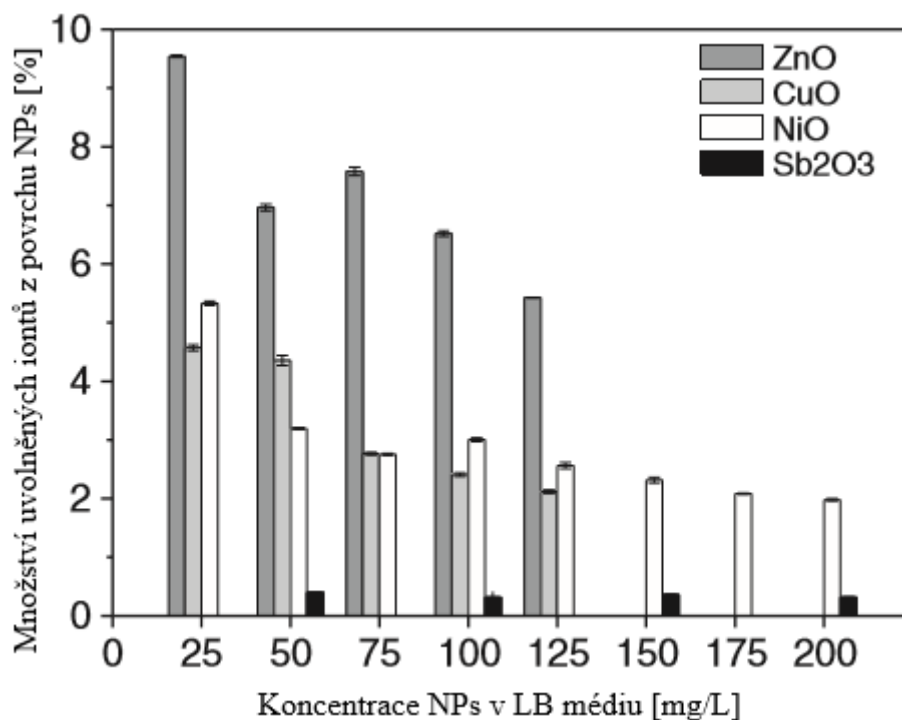
Pro účely stanovení Cu^{2+} iontů uvolněných během přípravy expozičního média (ultrazvuk) byla vodná suspenze CuNPs o maximální expoziční koncentraci (1 000 mg CuNPs/L deionizované vody) umístěna do ultrazvuku po dobu 1 hod a následně filtrována s použitím nylonové membrány s velikostí pórů $0,2 \mu\text{m}$. Koncentrace Cu^{2+} iontů ve filtrátu byla měřena pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES). Tímto způsobem bylo zjištěno, že roztok maximální expoziční koncentrace použité v této studii (1 000 mg CuNPs/L) uvolnil $0,3 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$ deionizované vody. Tato informace umožnila autorům rozlišit účinky vyvolané Cu^{2+} ionty a CuNPs, protože testy ekotoxicity v agaru byly rovněž realizovány s rozpustnou formou Cu ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Příprava média gel–NPs je v této práci popsána velmi stručně, přičemž zde nejsou uvedeny důležité parametry, které mohou významným způsobem ovlivňovat velikost částic v použitém expozičním médiu (např. teplota agaru, při které jsou vnášeny CuNPs; počet otáček na magnetickém míchadle; použitá frekvence ultrazvuku atd.). Na charakterizaci testovaných CuNPs a připraveného expozičního média se autoři této práce příliš nezaměřovali a tudíž je obtížné posoudit vhodnost tohoto postupu pro přípravu média gel–NPs. Popis stanovení Cu^{2+} iontů uvolněných během přípravy expozičního média rovněž postrádá důležité informace a je nejednoznačný. Čtenáře tohoto článku může zmást, zdali bylo stanovení uvolněných Cu^{2+} iontů realizováno v agaru nebo ve vodě. Přímé stanovení Cu^{2+} iontů v agaru by totiž vyžadovalo nepřetržitě zvýšenou teplotu i během filtrace přes nylonovou membránu, což je experimentálně poměrně náročné [11].

Baek a kol. (2011) posuzovali baktericidní účinky nanočástic oxidů kovů (CuO-NPs: 20–30 nm; NiO-NPs: 10–20 nm; ZnO-NPs: 50–70 nm; Sb₂O₃-NPs: 90–210 nm) na bakteriích *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Streptococcus aureus*. Testovací mikroorganismy byly v rámci této práce kultivovány na LB agaru (Luria Bertani Agar), který obsahoval specifické koncentrace testovaných NPs. LB agar byl v této práci připravován z LB média (10 g/L trypton, 5 g/L kvasniční extrakt, 10 g/L NaCl) a Bacto-Agaru.

Obecný postup přípravy expozičního média byl přejat z výše citované práce Lee a kol. (2008) s některými modifikacemi. Nejprve byl připraven 2% LB agar (LB médium (l) + Bacto-Agar (s)), který byl následně podroben sterilizaci v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 min a po uplynutí této doby chlazen 10 min při laboratorní teplotě. Expoziční médium gel-NPs bylo připravováno prostřednictvím přidavku potřebného množství NPs (prášková forma) do LB agaru. Tímto způsobem získané disperze byly následně protřepány a za účelem rozbití aglomerátů vystaveny působení ultrazvuku. Přídavek NPs do LB agaru se pohyboval v koncentračním rozmezí 0–350 mg NPs/L agaru v závislosti na typu testovaných NPs a modelovém mikroorganismu. Testy ekotoxicity byly realizovány v Petriho miskách (87 x 18 mm). Přibližně 17 mL 2% roztoku agaru se specifickou koncentrací NPs bylo rozlito na každou testovací jednotku a bezprostředně po rozlití byly testovací jednotky umístěny do chladicího boxu (teplota uvedená není) pro účely potlačení možné aglomerace NPs během tuhnutí gelu. Pro každou testovanou koncentraci byly připraveny tři repliky.

V této práci rovněž stanovovali množství iontů uvolněných z testovaných NPs. Pro tento účel byly roztoky LB média o maximální expoziční koncentraci CuO-NPs (125 mg/L), NiO-NPs (200 mg/L), ZnO-NPs (125 mg/L) a Sb₂O₃-NPs (350 mg/L) vystaveny působení ultrazvuku a následně filtrovány přes nylonovou membránu s velikostí pórů 0,2 μm. Stejně jako ve výše uvedené studii používají autoři tohoto článku ke stanovení iontů uvolněných z povrchu NPs ICP-OES. Výše uvedené roztoky LB média o maximální expoziční koncentraci jednotlivých typů NPs uvolnily 2,7 mg Cu²⁺/L; 4,0 mg Ni²⁺/L; 6,8 mg Zn²⁺/L a 1,0 mg Sb³⁺/L. Autoři rovněž zaznamenali, že procentuální množství uvolněných iontů klesalo se zvyšujícími se koncentracemi NPs (**obr. 3**), přičemž tento jev přisuzovali aglomeraci NPs při vyšších koncentracích.

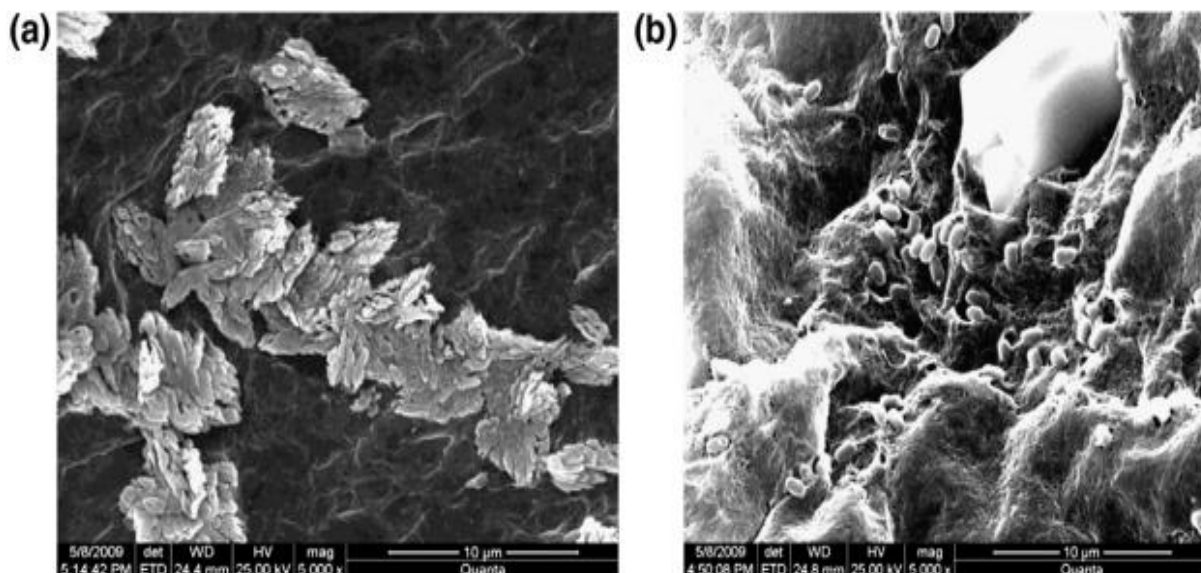


Obrázek 3 – Množství uvolněných iontů [%] z povrchů CuO-NPs, NiO-NPs, ZnO-NPs a Sb₂O₃-NPs (LB médium) [12]

Opět je u této práce obtížné posoudit kvalitu dispergace NPs v testovací jednotce, protože autoři charakterizaci připraveného expozičního média zcela opomenuli. Charakterizace expozičního média gel-NPs je nezbytná, neboť chování NPs v gelu může významným způsobem ovlivnit jejich výslednou ekotoxicitu (např. aglomerace může mít za následek omezenou biodostupnost testovaných NPs a povede rovněž k uvolňování menšího množství iontů kovů, které mohou být z velké části za toxicitu NPs zodpovědné) [12].

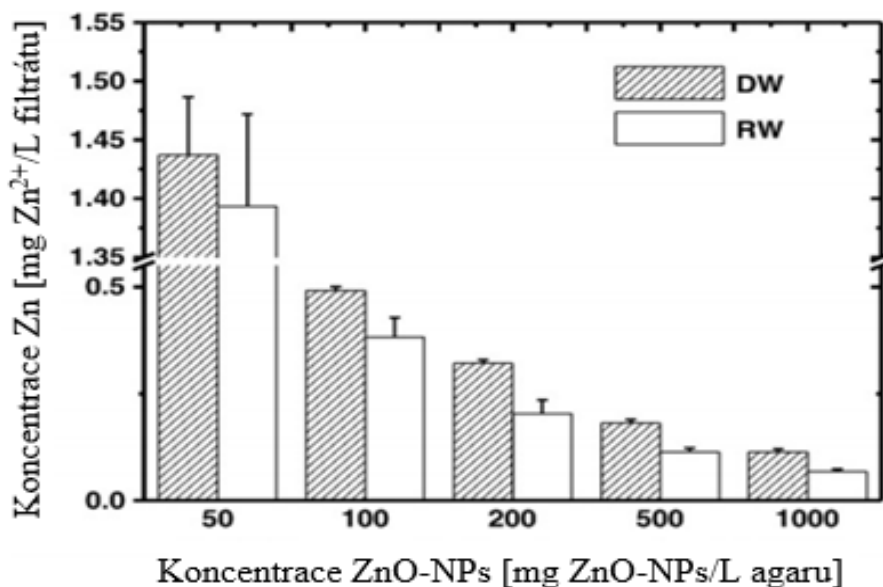
Li a kol. (2011) posuzovali ekotoxicitu a biodostupnost ZnO-NPs (sférický tvar, průměr částic 30 ± 5 nm, prášková forma) na žížale hnojní (*Eisenia fetida*). Jako expoziční médium autoři zvolili agar, který připravovali s přidavkem deionizované nebo rekonstituované (0,1 mmol Ca(NO₃)₂; 1,0 mmol NaNO₃; 0,1 mmol Mg(NO₃)₂ a 0,1 mmol KNO₃ na litr destilované vody; pH rekonstituované vody bylo $7,0 \pm 0,2$) vody, přičemž vyšetřovali vliv přítomnosti solí na výslednou ekotoxicitu ZnO-NPs. Expoziční médium gel-NPs bylo připravováno prostřednictvím přidavku vhodného množství agarózy (odpovídající vzniku 2% gelu) a ZnO-NPs do deionizované popř. rekonstituované vody zahřáté na teplotu 80 °C. Takto připravené disperze byly po působení ultrazvuku (1 hod) protřepány z důvodu rozbití aglomerátů. Následně bylo připravené expoziční médium přelito do plastových nádob. Po ochlazení a ztuhnutí bylo médium nakrájeno na malé krychličky (2 mm). Zvolené testované koncentrace (0, 50, 100, 200, 500 a 1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru) byly

připravovány ve třech replikách. Každá testovací jednotka obsahovala 1 000 mL agaru se specifickou koncentrací ZnO-NPs. Homogenní distribuci ZnO-NPs v agaru autoři ověřovali pomocí SEM. Snímky připraveného expozičního média (koncentrace 100 mg ZnO-NPs/kg agaru) pořízené SEM jsou uvedeny na **obr. 4**.



Obrázek 4 – Snímek expozičního média agar–ZnO-NPs (koncentrace 100 mg ZnO-NPs/kg agaru) pořízený SEM; (a) agar připravený s rekonstituovanou vodou, (b) agar připravený s deionizovanou vodou [13]

Značná aglomerace částic byla pozorována u každé připravované koncentrace. V jejím důsledku docházelo k tvorbě objektů různých velikostí od několika stovek nanometrů až několik mikrometrů v průměru. U média připraveného s deionizovanou vodou byl zaznamenán výskyt většího množství diskretních NPs než v médiu připravovaném z rekonstituované vody, z čehož lze usuzovat, že přítomnost solí v expozičním médiu podporuje aglomeraci NPs. V souladu s touto informací je i skutečnost, že u média připraveného s deionizovanou vodou docházelo k uvolňování většího množství iontů (**obr. 5**).

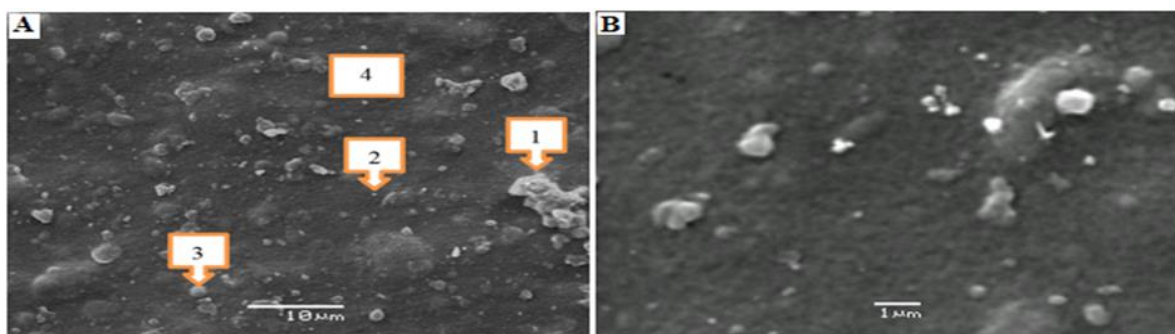


Obrázek 5 – Rozpouštění ZnO-NPs během přípravy expozičního média v nepřítomnosti (DW – deionizovaná voda) a v přítomnosti (RW – rekonstituovaná voda) soli [13]

Množství Zn^{2+} iontů, které se může během přípravy popř. expozice uvolnit z povrchu ZnO-NPs do média bylo stanoveno následujícím způsobem. Krychlička agaru (2 mm) byla rozmačkána a centrifugována při odstředivé síle 20 000 x g po dobu 15 min. Odebraný supernatant byl následně filtrován s použitím nylonové membrány s velikostí pórů 0,2 μm . Koncentrace Zn ve filtrátu byla měřena pomocí plamenové atomové absorpční spektrometrie (FAAS) [13].

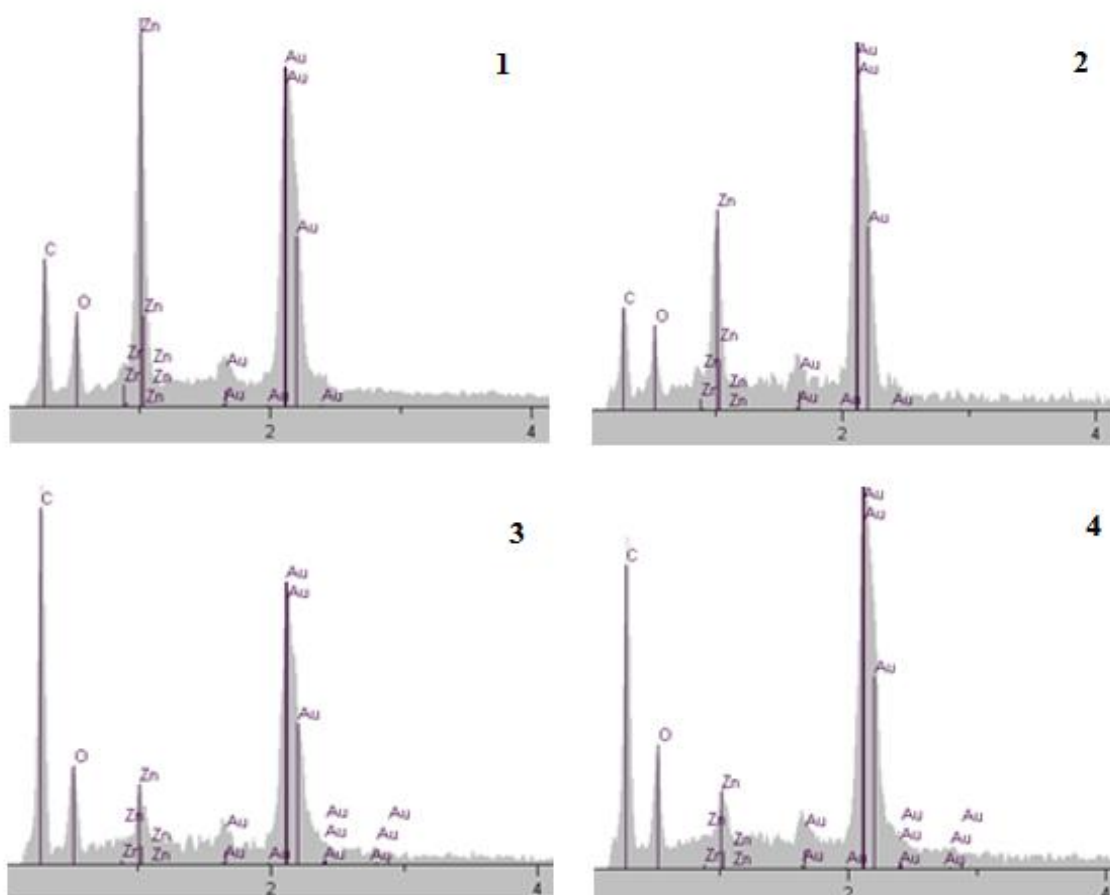
Hrdá a kol. (2016) ve své práci zaměřené na testování ekotoxicity ZnO-NPs na roupici druhu *Enchytraeus crypticus* uvádí dva způsoby vnášení NPs do agaru, který zde využívá jako expoziční médium. Testované ZnO-NPs (prášková forma; Bochemie Group a.s.) byly sférického tvaru s průměrnou velikostí 10 nm s rozsahem 5–50 nm a minimální čistotou 99,5 %. ZnO-NPs byly krystalické struktury (zinkit). Připravované koncentrace byly 0, 50, 100, 200, 500 a 1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru. První způsob vnášení NPs do agaru spočíval v kryogenním mletí suchého agaru s testovanými NPs a následné dispergaci této směsi ve vodě. V rámci tohoto postupu byla vialka kryogenního mlýnu naplněna 1 g agaru (prášek) a odpovídajícím množstvím ZnO-NPs. Podmínky mletí byly zvoleny následovně: doba předchlazení 10 min, délka mlecího cyklu 1 min, chlazení mezi cykly 1 min, frekvence impaktoru 12 Hz, celkový počet mlecích cyklů – 3. Tímto způsobem získaný prášek byl převeden do Erlenmayerovy baňky, do které bylo následně přidáno vhodné množství destilované vody odpovídající vzniku 2% agaru. Nakonec byla připravená směs za neustálého míchání zahřata na teplotu 85 ± 5 °C a po uplynutí 1 hod od dosažení této teploty bylo médium za horka rozlito do Petriho misek (rozlitý objem expozičního média 50 mL). Tímto

způsobem připravené expoziční médium bylo charakterizováno pomocí SEM s rentgenovým energiově disperzním (EDX) mikroanalyzátozem. Ve vzorku s koncentrací 1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru byly identifikovány aglomeráty ve velikostním rozmezí 1–10 μm (**obr. 6**).



Obrázek 6 – Snímek expozičního média o koncentraci 1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru pořízený SEM; A – zvětšení 2 000x, B – zvětšení 10 000x; (1) velký aglomerát, (2) malý aglomerát, (3) bublina agaru, (4) plocha vzorku [14]

Pomocí EDX analýzy byla v této práci ověřována přítomnost Zn v identifikovaných útvarech na povrchu vzorku (**obr. 6a**). EDX spektra těchto útvarů jsou uvedena na **obr. 7**.



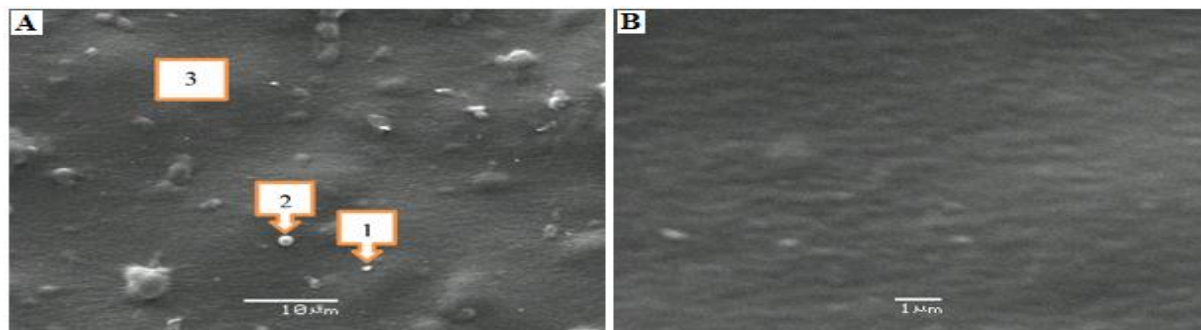
Obrázek 7 – EDX spektra útvarů identifikovaných na povrchu expozičního média agar-ZnO-NPs; 1 – velký aglomerát (1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru), 2 – malý aglomerát (1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru), 3 – bublina agaru (1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru), 4 – plocha vzorku (1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru) [14]

Z uvedených EDX spekter je patrná zvýšená koncentrace Zn v identifikovaných útvarech na povrchu expozičního média (spektrum 1 a 2). Relativní poměr intenzit čar zinku a uhlíku je u těchto útvarů vyšší než 2, přičemž stejný poměr v ploše vzorku a na útvarech agaru (bubliny agaru) je menší než 1/3. Autoři této práce dospěli k závěru, že u vzorku s koncentrací 1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru docházelo k tvorbě velkého množství aglomerátů NPs různých velikostí, přičemž jistá část ZnO-NPs byla distribuována v expozičním médiu uniformě jako diskrétní částice. U vzorku s nejnižší koncentrací (50 mg ZnO-NPs/kg agaru) nebyl identifikován výskyt aglomerátů až na úrovni rozlišovací schopnosti přístroje (100 nm).

Podstatou druhého postupu vnášení ZnO-NPs do agaru byla příprava vodné disperze NPs, která byla následně po kapkách přidávána do míchaného agaru zahřátého na teplotu 85 ± 5 °C. Experimentálně bylo v této práci zjištěno, že prostá dispergace NPs v deionizované vodě a následný ultrazvuk (45 min) je z hlediska hodnot hydrodynamického průměru částic nedostačující. Z tohoto důvodu byl jako dispergační prostředí zvolen 0,02% roztok dekahydrátu pyrofosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). V přítomnosti 0,02% roztoku $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ a po 45 min působení ultrazvuku byl hydrodynamický průměr majoritní frakce NPs (97,4 %) stanovený metodou dynamického rozptylu světla (DLS) 164,6 nm při koncentraci koloidu 50 mg ZnO-NPs/L. Při koncentraci koloidu 1 000 mg ZnO-NPs/L byl hydrodynamický průměr majoritní frakce (96,6 %) 239,8 nm. Autoři této práce rovněž ověřovali hodnoty hydrodynamického průměru částic v přítomnosti 0,04% roztoku $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ a 0,02 popř. 0,04% roztoku hexametafosforečnanu sodného ($\text{Na}_6\text{P}_6\text{O}_{18}$), přičemž výsledky nebyly tak uspokojivé, jako v případě 0,02% roztoku $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

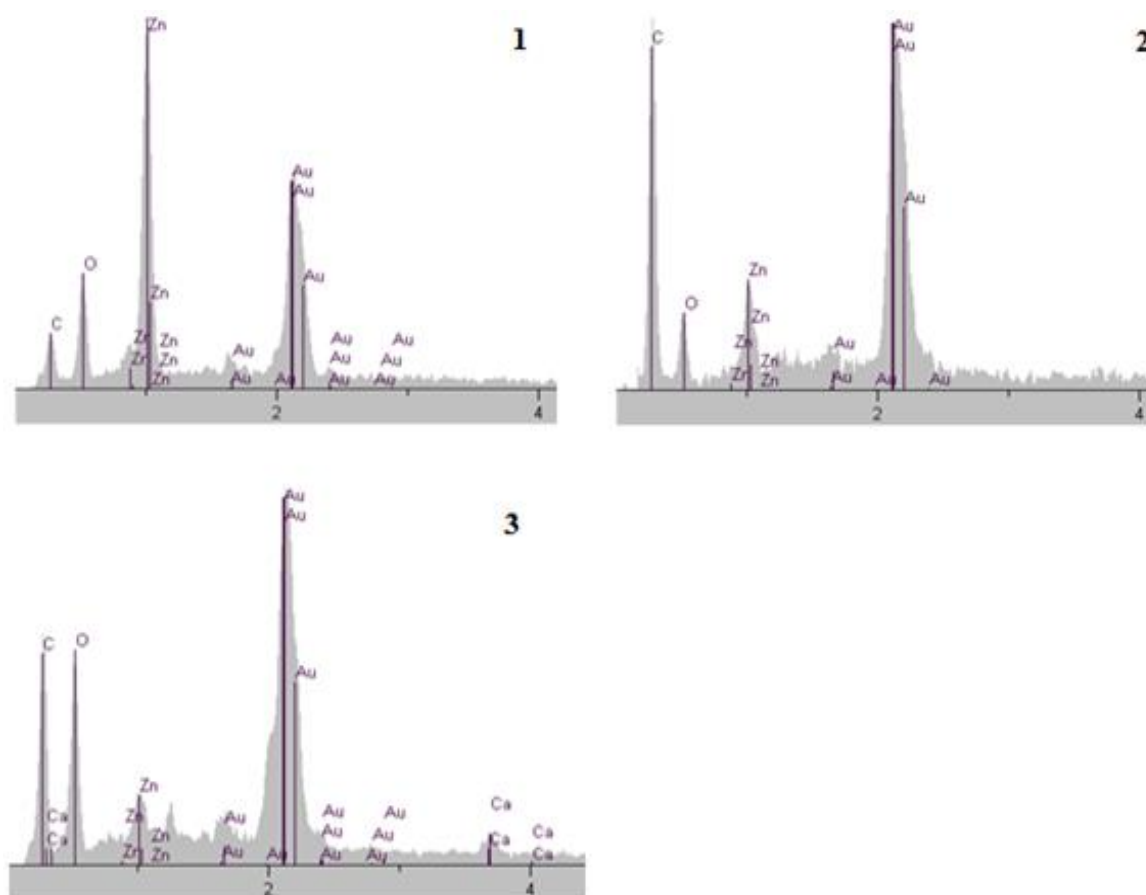
Nakonec byl použit postup, při kterém byly 2/5 celkového objemu deionizované vody potřebné k přípravě 2% agaru použity k přípravě vodné disperze NPs. Do tohoto objemu byla převedena potřebná navážka k přípravě 0,02% roztoku $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ a po jeho rozpuštění i odpovídající navážka ZnO-NPs. Tímto způsobem připravená disperze byla následně umístěna do ultrazvukové lázně na 45 min. Dále bylo do Erlenmayerových baněk naváženo potřebné množství agaru a přidán zbývající objem (3/5) deionizované vody pro přípravu 2% média. Agar v Erlenmayerových bankách byl umístěn na topnou desku s magnetickým míchadlem a zahřán na teplotu 85 ± 5 °C. Po 45 min od dosažení této teploty byla po kapkách přidávána připravená disperze ZnO-NPs v 0,02% roztoku $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Charakterizace připraveného expozičního média byla prováděna obdobně jako v případě prvního postupu vnášení ZnO-NPs do agaru (snímky pořízené SEM a EDX analýza objektů lokalizovaných na povrchu média, **obr. 8** a **9**). Ve vzorku expozičního média s koncentrací 1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru byly identifikovány aglomeráty s největší velikostí 1 μm , což

je výrazně menší velikost než v případě prvního postupu vnášení ZnO-NPs do agaru, kde byly pozorovány aglomeráty ve velikostním rozmezí 1–10 μm . Hustota výskytu aglomerátů je u tohoto postupu rovněž podstatně menší (na pozorované ploše identifikovány 2 aglomeráty, kdežto u prvního postupu 20–30 aglomerátů).



Obrázek 8 – Snímek expozičního média o koncentraci 1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru pořízený SEM; A – zvětšení 2 000x, B – zvětšení 10 000x; (1) aglomerát, (2) bublina agaru, (3) plocha vzorku [14]

EDX spektra výše identifikovaných objektů (aglomerát, bublina agaru a plocha vzorku) jsou uvedeny na **obr. 9**.

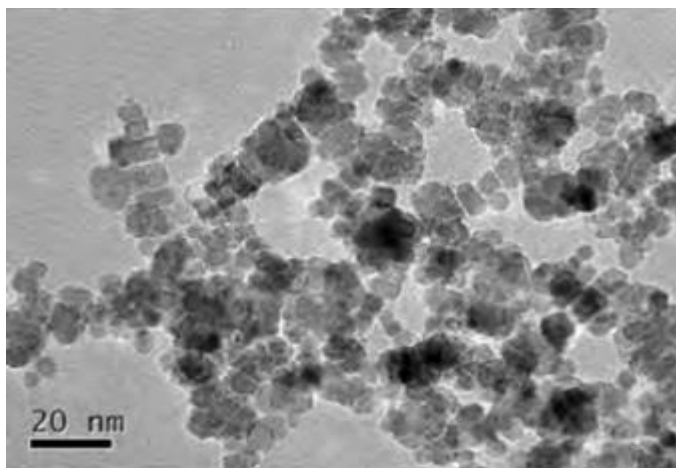


Obrázek 9 – EDX spektra útvarů identifikovaných na povrchu expozičního média agar–ZnO-NPs; 1 – aglomerát (1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru), 2 – bublina agaru (1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru), 3 – plocha vzorku (1 000 mg ZnO-NPs/kg agaru) [14]

Na základě uvedených údajů autoři této práce dospěli k závěru, že vnášení ZnO-NPs do agarů prostřednictvím přikapávání koloidního roztoku těchto částic je optimálnější způsobem než prvně uvedený způsob (kryogenní mletí agarů a ZnO-NPs) [14]. V odborných databázích je takřka nemožné najít ekotoxikologickou studii, která by takto podrobně charakterizovala připravené expoziční médium gel-NPs.

1.3.2 Zavádění koloidní formy nanočástic do hydrogelů a jejich charakterizace

Cui a kol. (2014) hodnotili ekotoxicitu CeO₂-NPs (koloidní forma) na salátu chřestovém (*Asparagus lettuce*). Autoři tohoto článku podrobně charakterizovali primární koloid CeO₂-NPs. Snímek pořízený transmisním elektronovým mikroskopem (TEM) ukazuje, že použité CeO₂-NPs byly komolého oktaedrického tvaru s průměrnou velikostí 7,1 ± 0,4 nm (obr. 10).



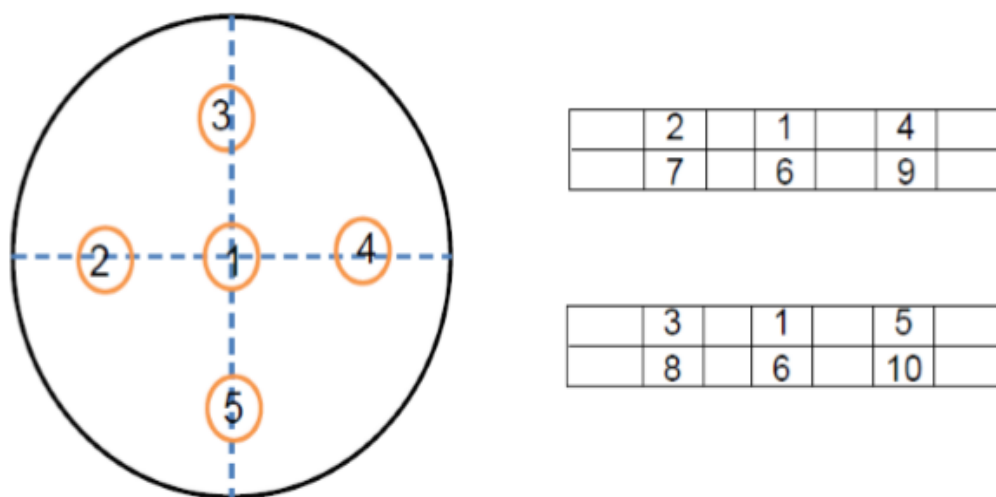
Obrázek 10 – Snímek CeO₂-NPs pořízený TEM [15]

Při koncentraci koloidu 100 mg CeO₂-NPs/L deionizované vody byl hydrodynamický průměr částic 99,3 ± 2 nm a NPs byly v roztoku dobře dispergovány s pozitivním zeta-potenciálem +47,4 mV. Stanovený hydrodynamický průměr NPs je větší než v případě snímků pořízených pomocí TEM, přičemž příčinou tohoto jevu je vznik hydratační vrstvy rozpouštědla na povrchu NPs. Spektrum pořízené rentgenovou difrakční analýzou (XRD) prokázalo u použitých CeO₂-NPs kubickou strukturu fluoritového typu (spektrum v této práci bohužel uvedeno není). Chemická čistota CeO₂-NPs byla 99,98 %.

Testy ekotoxicity CeO₂-NPs byly v této práci realizovány v agaru. Každá testovací jednotka obsahovala 30 mL 0,5% agarů se specifickou koncentrací CeO₂-NPs. Zásobní roztoky CeO₂-NPs v deionizované vodě byly nejprve sterilizovány pomocí UV záření a důkladně rozdispergovány pomocí ultrazvuku, a to 15 min před použitím k přípravě

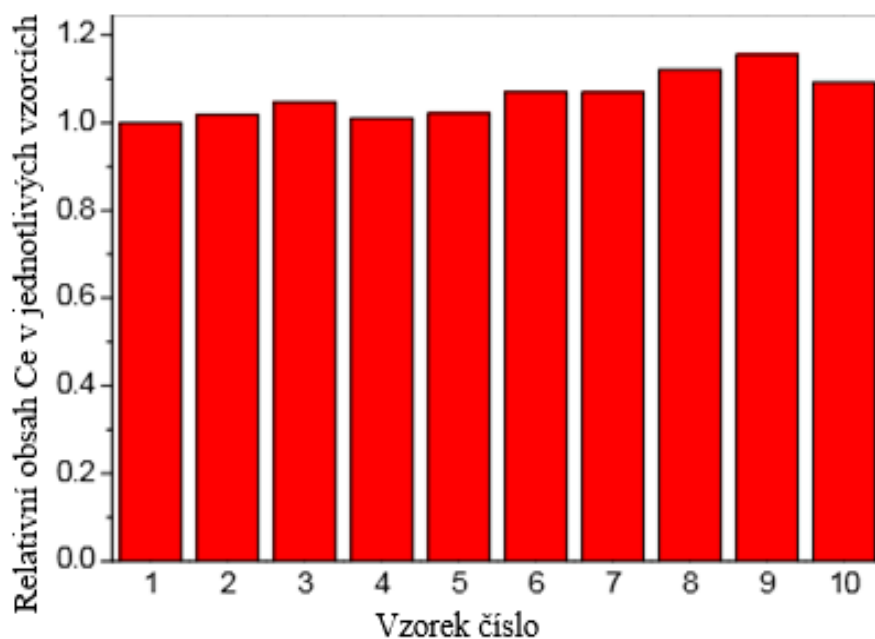
expozičního média agar–NPs. Autoklávovaný agar (120 °C, 2 hod) byl důkladně smísen s NPs (přikapávání zásobního roztoku CeO₂-NPs), přičemž byla připravena série suspenzí agar–CeO₂-NPs o koncentraci 0, 2, 20, 200, 500, 1 000 a 2 000 mg CeO₂-NPs/L agaru. Takto připravené disperze byly následně vystaveny působení ultrazvuku při teplotě 60 °C po dobu 15 min. Po uplynutí této doby byly suspenze rozlity do Petriho misek (90 x 18 mm) a rychle ochlazeny při teplotě 20 °C v chladicím boxu z důvodu potlačení možné aglomerace NPs během tuhnutí gelu.

Pro ověření homogenní distribuce CeO₂-NPs v agaru autoři článku odebrali 10 vzorků z 5 různých míst u média s koncentrací 200 mg CeO₂-NPs/L agaru (5 vzorků z horní části a 5 vzorků z dolní části média). Vzorkovací schéma pro tuto analýzu je uvedeno na **obr. 11**.



Obrázek 11 – Vzorkovací schéma pro ověření homogenní distribuce NPs v agaru; pět vzorků odebíráno z horní části (1, 2, 3, 4 a 5), pět vzorků z dolní části (6, 7, 8, 9 a 10) [15]

Obsah Ce ve vzorcích byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Na základě následujícího grafu získaného z podpůrných dat k tomuto článku lze hovořit o homogenní distribuci částic v testovací jednotce (**obr. 12**).



Obrázek 12 – Relativní obsah Ce ve vzorcích agaru (200 mg CeO₂-NPs/L agaru); obsah Ce ve vzorku č. 1 byl zvolen jako 1 [15]

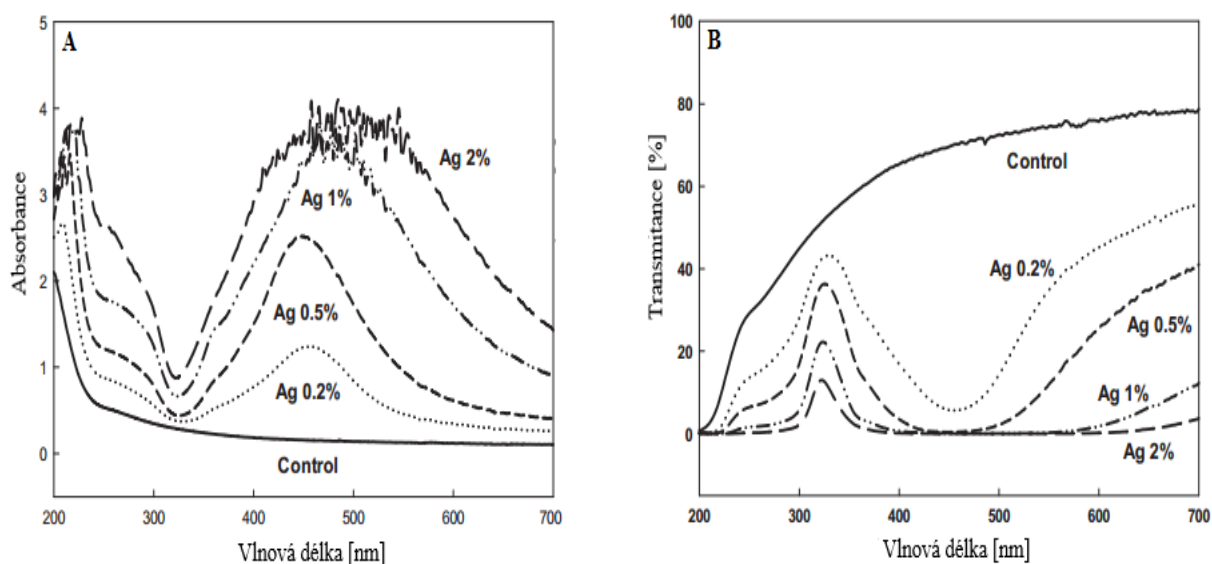
Výše uvedený způsob sice umožňuje ověřit homogenitu rozptýlení NPs v rámci testovací jednotky, neposkytuje ovšem informaci o chování těchto částic v testovacím médiu (myšleny především jevy označované jako aglomerace popř. agregace). Závěrem lze k této studii uvést, že zásobní roztok testovaných CeO₂-NPs byl charakterizován podrobně, avšak připravené expoziční médium nikoliv [15].

Dalším způsobem přípravy expozičního média může být in-situ syntéza NPs některou z ekologicky šetrných metod a následný přídavek potřebného množství agaru do připraveného koloidního roztoku NPs. Například v práci Rhim a kol. (2013) tímto způsobem připravují antimikrobiální nanokompozitní filmy agar–AgNPs. AgNPs použité k přípravě nanokompozitních filmů byly syntetizovány následujícím způsobem. Nejprve byl připraven zásobní roztok AgNO₃ rozpuštěním 6,299 g AgNO₃ ve 100 mL destilované vody (zásobní roztok obsahoval 0,04 g Ag/mL). Pro syntézu AgNPs byl různý objem zásobního roztoku (0; 0,2; 0,5; 1,0 a 2 mL) rozpuštěn ve 150 mL destilované vody a takto připravený roztok byl přiveden k varu. Pro redukci Ag⁺ iontů v roztoku byly následně přidány 2 mL 1% roztoku citronanu trisodného (Na₃C₆H₅O₇) a reakční směs byla udržována při teplotě varu po dobu 1 hod. Připravený koloid byl zeleno-žluté barvy. Pro přípravu nanokompozitních filmů agar–AgNPs byly v připravených koloidech (obsahující navíc 1,2 g glycerolu – plastifikátor) rozpuštěny za intenzivního míchání (30 min) a při teplotě 95 °C 4 g agaru. Po uplynutí 30 min bylo médium rozlito na skleněnou desku potaženou teflonem (24 x 30 cm) a následně

vysušeno za laboratorní teploty (24 hod). Po vysušení byl výsledný film oddělen od povrchu desky, na které bylo médium rozlito. Hmotnostní obsah Ag v připravených filmech agar–AgNPs byl 0; 0,2; 0,5; 1,0 a 2 %.

U takto připravených filmů byla dále pomocí různých technik ověřována jejich barva a transparentnost, struktura, prvkové složení, tepelná stabilita, mechanické vlastnosti, paropropustnost a antimikrobiální vlastnosti. Z hlediska použití těchto metod během charakterizace expozičního média při testech ekotoxicity jsou důležité techniky charakterizující optické vlastnosti popř. strukturu připravených filmů a jejich prvkové složení.

Optické vlastnosti filmů byly stanoveny měřením jejich UV-VIS absorpčních a transmisních spekter. Měření UV-VIS absorpce a transmise bylo v této práci provedeno v intervalu vlnových délek 200–700 nm. Výsledná UV-VIS absorpční a transmisní spektra jsou uvedena na **obr. 13**.

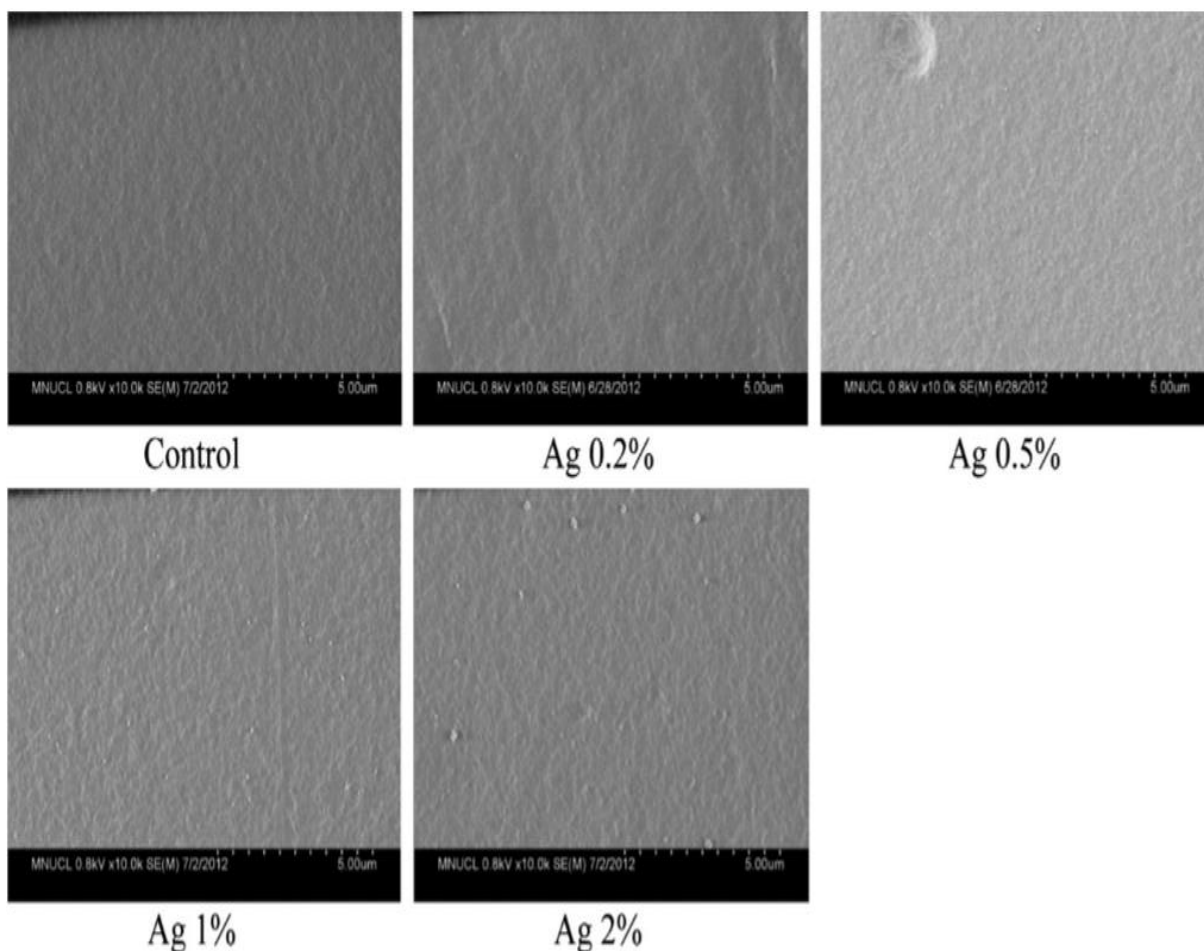


Obrázek 13 – Absorpční (A) a transmisní (B) spektrum připravených nanokompozitních filmů agar–AgNPs (hmotnostní obsah Ag v jednotlivých vzorcích 0; 0,2; 0,5; 1 a 2 %) [16]

Z výše uvedených spekter je patrné, že kontrolní (bez přídavku AgNPs) agar nevykazoval při zvolených vlnových délkách žádnou absorpci popř. transmitanci, přičemž agar s přídavkem AgNPs vykazoval absorpční maximum nebo transmisní minimum (**obr. 13**) při vlnové délce cca 450 nm. Toto absorpční maximum popř. transmisní minimum je důsledkem přítomnosti lokalizovaného povrchového plazmonu u AgNPs. Obecně je plazmonový rezonanční pík u AgNPs pozorován v intervalu vlnových délek 400–450 nm. Z uvedeného absorpčního spektra je rovněž patrné, že se zvyšující se koncentrací AgNPs v agaru se zvyšuje absorpční pík optické plazmonové rezonance. Absorpční pík se

může při vysokých koncentracích AgNPs v agaru rozšířit a absorpční maximum posunout k větším vlnovým délkám, což lze přisuzovat tvorbě aglomerátů AgNPs. Šířka absorpčního píku může být rovněž přičítána polydisperzitě AgNPs přítomných v agaru (čím je absorpční pík širší, tím je systém agar–AgNPs polydisperznější).

Na **obr. 14** jsou uvedeny snímky jednotlivých vzorků filmů agar–AgNPs pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem s autoemisní tryskou (FE-SEM) při urychlovacím napětí $V_{acc} = 1$ kV a proudu elektronů $I_e = 10$ μ A.



Obrázek 14 – Snímky antimikrobiálních filmů agar–AgNPs (hmotnostní obsah Ag v jednotlivých vzorcích 0; 0,2; 0,5; 1 a 2 %) pořízené FE-SEM [16]

Z uvedených snímků lze usuzovat, že při nižších koncentracích Ag (hmotnostní obsah Ag 0,2 a 0,5 %) jsou AgNPs v agaru rozptýleny homogenně s minimálním výskytem aglomerátů, přičemž při vyšších koncentracích Ag (hmotnostní obsah Ag 1 a 2 %) v agaru docházelo k tvorbě aglomerátů AgNPs, což je v souladu s širokými absorpčními/transmisními pásy, které byly u těchto filmů zaznamenány.

Krystalická povaha AgNPs v připravených filmech byla ověřována pomocí difraktometru (použité napětí 40 kV a proud 30 mA) vybaveného zdrojem $CuK\alpha$ záření vlnové délky

0,15406 nm. Jednotlivé vzorky filmů byly skenovány při laboratorní teplotě v celém rozsahu difrakčního úhlu $2\theta = 10\text{--}80^\circ$ s rychlostí skenování $0,5^\circ/\text{min}$. Na základě výsledných difrakčních píků autoři dospěli k závěru, že u filmů s nízkým obsahem Ag (méně než 0,5 %) se vyskytovaly pouze krystaly stříbra s plošně centrovanými krystalografickými rovinami označovanými dle Millerova indexu symbolem 111, kdežto při vyšších koncentracích Ag (více než 1 %) byly pozorovány krystalografické roviny 111, 200, 220 i 311. Průměrná velikost krystalitů AgNPs v nanokompozitních filmech se pohybovala ve velikostním rozmezí 21,3–23,8 nm (stanoveno pomocí Scherrerovy aproximace).

Prvkové složení filmů bylo stanovováno pomocí EDX analýzy při urychlovacím napětí $V_{\text{acc}} = 15$ kV. Obsah C, O a Ag ve vzorcích byl stanovován s použitím CaCO_3 , SiO_2 a kovového Ag jako standardních materiálů.

Pro charakterizaci nanokompozitních filmů autoři použili i další techniky, které jsou ovšem v rámci charakterizace expozičního média gel–NPs během ekotoxikologických testů méně významné. Například hrubost povrchu filmů byla pozorována pomocí trojrozměrných snímků pořízených mikroskopií atomárních sil (AFM) v nekontaktním módu s velikostí skenu $20\ \mu\text{m}$ [16].

Závěrem lze konstatovat, že postup přípravy expozičního média agar–NPs je závislý především na formě testovaných NPs (koloidní popř. prášková forma) a velikost aglomerátů v médiu je závislá zejména na koncentraci NPs v hydrogelu.

V případě práškové formy NPs máme tyto možnosti: 1) přímé vnášení navážených NPs (za míchání a určité teploty) do připraveného agaru s následným ultrazvukem této směsi; 2) kryogenní mletí agaru a NPs s následným přidavkem vody a zahřátí této směsi na teplotu 85 ± 5 °C; 3) Resuspenze NPs v demineralizované vodě s použitím netoxického dispergantu a ultrazvuku (45 min), příprava agaru a opatrné přikapávání zásobního roztoku NPs do míchaného agaru zahřátého na teplotu 85 ± 5 °C.

V případě použití NPs v koloidní formě byly v odborných databázích nalezeny tyto dva postupy: 1) příprava zásobního roztoku NPs v deionizované vodě, sterilizace tohoto roztoku pomocí UV záření a dispergování NPs pomocí ultrazvuku (15 min před použitím k přípravě expozičního média) a následné přikapávání tohoto zásobního roztoku do autoklávovaného agaru (120 °C, 2 hod) a ultrazvuk této směsi (60 °C, 15 min); 2) příprava koloidního roztoku NPs některou z ekologicky šetrných metod a přidavek agaru za stálého míchání při teplotě, kdy dochází k jeho rozpouštění (85 ± 5 °C).

1.4 Roupicovití (*Enchytraeidae*)

Čeď roupicovití patří stejně jako žížalovití do řádu máloštětinatců (třída opaskovci, kmen koužkovci) [17; 18]. Mohou obývat terestrické, limnické nebo mořské prostředí. V současnosti je celosvětově popsáno kolem 900 druhů, přičemž ve střední Evropě se vyskytuje celkem 200–300 druhů z 20 rodů [18; 19]. Většina druhů roupic jsou malí (1–40 mm), bělaví červi, kteří se obvykle rozmnožují pohlavně, ovšem nepohlavní rozmnožování fragmentací nebo partenogenezí je rovněž možné. Jejich tělo je složeno z mnoha segmentů s prstenčítým nebo sedlovitým opaskem (clitellum), přičemž jejich počet se s věkem zvyšuje [17; 20].

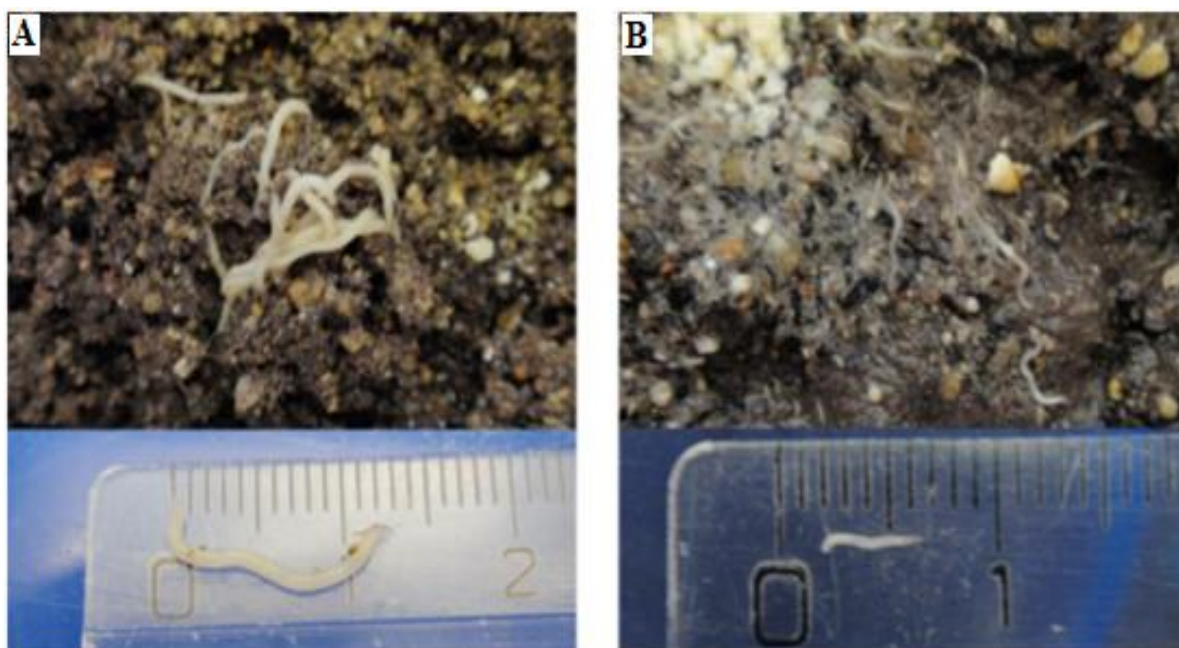
Roupice se řadí mezi významné půdní dekompozitory. Jejich funkce v půdních ekosystémech je podobná jako u žížal, které mohou být roupicemi u silně kyselých půd zcela nahrazeny (zejména u lesních půd s nízkým pH). V těchto lokalitách mohou roupice představovat hlavní taxon kroužkovců. Roupice jsou mikrosaprofágové, přičemž jejich hlavním zdrojem potravy je houbové mycelium (dále se živí více či méně rozloženými zbytky rostlin a mikroorganismy). V půdních ekosystémech se během roku jejich průměrné množství pohybuje mezi 20 000 až 60 000 jednotlivci/m², ovšem v jejich počtu dochází k silným sezónním fluktuacím. Hustota osídlení roupicemi je ovlivňována mnohými abiotickými (pH, vlhkost, teplota atd.) a biotickými (kompetice, predace, parazitismus, vegetace atd.) faktory. Roupice preferují především mírně kyselé až mírně alkalické půdy. Většina roupic se nachází v horní vrstvě půdy (do 20 cm od povrchu), přičemž jejich počet s hloubkou klesá. A. Federschmidt a J. Römbke (1992) uvádí, že 70 % roupic se vyskytuje v horních 8 cm půdního profilu a některé druhy v porovnání s ostatními preferují větší hloubky. Jejich vertikální migrace závisí na ročním období a výskytu teplotních inverzí. Horizontální migrace je rovněž možná. U roupic bylo dále prokázáno, že se vyskytují v multidruhových agregačních centrech. Vysvětlením takového chování může být přítomnost potravy, příznivé fyzikální podmínky, heterogenní kontaminace půdy atd [17; 19].

Roupice lze v laboratorních podmínkách snadno kultivovat v agaru nebo v uměle připravených půdních substrátech a jako potrava jim mohou být dodávány ovesné vločky [21]. Z důvodu jejich vysoké ekologické relevance, klíčové role ve fungování půdních ekosystémů a praktičnosti při manipulaci v laboratorních podmínkách (kratší životní cyklus a menší prostorové nároky na chov a testy ekotoxicity v porovnání s žížalami) jsou roupice (zejména druhu *Enchytraeus albidus* a *Enchytraeus crypticus*) při testech ekotoxicity vhodným a poměrně oblíbeným modelovým organismem [18; 19].

V současnosti jsou roupice rodu *Enchytraeus* používány v rámci testů prováděných podle mezinárodních směrnic ISO 16387 (Vliv znečišťujících látek na *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) – Stanovení vlivu na reprodukci a na přežití) a OECD 220 (Reprodukční test roupic). Tyto směrnice doporučují pro testy ekotoxicity použití druhu *E. albidus*, ačkoliv je možné použití i jiných alternativních druhů rodu *Enchytraeus* (zejména *E. crypticus*).

E. albidus je nejznámějším druhem rodu *Enchytraeus* používaným v půdní ekotoxikologii. Při dosažení dospělosti (přibližně 21 dnů při teplotě 18 °C) se velikost dospělých jedinců pohybuje mezi 15 a 40 mm. V závislosti na environmentálních podmínkách jsou pozorovány u roupic tohoto druhu rozdíly v celkovém vývojovém cyklu (33–74 dnů), embryonálním vývoji (12–18 dnů), počtu vajíček připadajících na jeden kokon (7–10) a v procentuálním množství životaschopných kokonů (40–50 %). Ideální reprodukční teplotou pro tento druh je 15 °C, ačkoliv jejich reprodukce může probíhat v teplotním rozmezí 12–22 °C. Teploty nad 25 °C mohou reprodukci potlačovat.

E. crypticus má ve srovnání s výše uvedeným druhem (*E. albidus*) následující výhody: možnost snadného chovu v agaru, vyšší reprodukční rychlost, kratší generační čas a vyšší tolerance vůči širší škále půdních vlastností. Dospělci tohoto druhu dosahují velikosti 3–12 mm a jejich generační čas při použití agaru jako kultivačního média je při teplotě 21 °C přibližně 18 dnů. Průměrný počet vajíček připadajících na jeden kokon se může pohybovat mezi 1–35 s průměrem 4,6 vajíček vyprodukovaných za den [17]. Na **obr. 15** jsou uvedeny fotografie roupic druhu *E. albidus* a *E. crypticus*.



Obrázek 15 – Chov roupic *Enchytraeus albidus* (A) a *Enchytraeus crypticus* (B) [22]

1.5 Možné způsoby posuzování ekotoxicity nanočástic na kroužkovcích

V této kapitole bude pojednáváno o způsobech, které lze aplikovat pro stanovení ekotoxicity nanomateriálů v půdním prostředí s využitím kroužkovců jako testovacích organismů. Kroužkovci se jeví jako vhodný modelový organismus pro biomonitoring zejména z důvodu jejich trvalého přímého kontaktu s půdou, a to jak vnějším povrchem (kůže), tak vnitřním povrchem (střevní výstelka). Z těchto důvodů lze kroužkovce používat při výzkumech interakcí nanomateriálů s žijícími organismy a v posuzování bezpečnosti těchto látek [23].

Hned na úvod je důležité zmínit, že testování ekotoxicity NPs je spojeno s otázkou, zdali ekotoxikologické parametry (endpoints), běžně posuzované u tradičních chemikálií jako např. mortalita a růst, jsou dostatečně citlivé pro stanovení ekotoxických účinků NPs. Například v práci Scott-Fordsmand a kol. (2008) se uvádí, že nejvíce citlivým ekotoxikologickým parametrem u žížal (*Eisenia veneta*) při testování ekotoxicity dvoustěnných uhlíkatých nanotrubic (koncentrace až 495 mg/kg) a nanočástic fulerenu C₆₀ (koncentrace až 1 000 mg/kg) byla reprodukce (produkce kokonů), přičemž při těchto koncentracích nebyly zaznamenány žádné účinky na schopnost líhnouti a mortalitu [24].

Nebezpečnost a rizika expozice nanočásticím lze hodnotit za použití různých endpointů. Těmito endpoints mohou být profily proteinů, metabolitů a genové exprese, které představují rychlou a citlivou odezvu testovacích organismů vůči kontaminaci prostředí. Endpoints na buněčné úrovni zahrnují indukci apoptózy, produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), změny potenciálu mitochondriální membrány, snížení hladin adenosintrifosfátu (ATP), produkci cytokinů, změny ve fagocytární aktivitě atd. Účinky NPs lze posuzovat i na úrovni tkáňové (histologické změny), na úrovni organismu (mortalita, růst a reprodukce) a na úrovni populační (rychlost růstu populace a stupeň distribuce v rámci stanoviště) [23].

Za další citlivý endpoint ekotoxikologických testů s kroužkovci lze považovat chování. Při použití žížaly hnojní (*Eisenia fetida*) jako testovacího organismu bylo u AgNPs prokázáno únikové chování. Změny v chování mohou být důležité pro interpretaci falešně negativních výsledků. Zejména žížaly mohou vykazovat obranný mechanismus (pohyb v kontaminované půdě dokola a vyhýbání se potravě), který zabraňuje samotné expozici a v akutních testech ekotoxicity, kde je posuzovaným endpointem mortalita, může dojít k falešně negativním výsledkům. Měření tělesné hmotnosti testovacích organismů a množství internalizovaných NPs může tudíž napomoci interpretovat získaná data [25].

1.6 Nanočástice stříbra a jejich environmentální transformace

AgNPs zaujímají mezi kovovými nanomateriály výjimečné postavení nejen díky jejich unikátním katalytickým a optickým vlastnostem, ale zejména z důvodu jejich vysoké biologické aktivity. Biologická aktivita kovového stříbra je známa již tisíce let, ovšem stříbro ve formě nanočástic vykazuje při porovnání s makroskopickými formami stříbra mnohem vyšší aplikační potenciál [26]. V současnosti nacházejí AgNPs uplatnění v široké škále aplikací. Používají se například v katalýze, fotonice, biologickém značkování nebo povrchem zesílené Ramanově spektrometrii (SERS) [27]. Dále se zkoumá využití AgNPs v oblasti biosenzorů, cílené distribuce léčiv nebo v medicíně, kde o tyto částice vzrůstá zájem vzhledem k jejich antibakteriálním účinkům [28]. Z důvodu velmi rozsáhlého používání NPs je nutné sledovat, jakým způsobem je zacházeno s produkty obsahující tyto částice, které již dále nenachází uplatnění a stávají se odpadem. AgNPs se mohou uvolňovat do ŽP z rozličných zdrojů v různých formách. Do ŽP se mohou uvolnit v případě, že nejsou recyklovány, buď jako pevný odpad ze skládek nebo jako emise z čistíren odpadních vod, ale i jako zbytkový odpad ze spaloven. Dalším zdrojem uvolňování AgNPs do ŽP mohou být různá odvětví průmyslu (např. potravinářský nebo textilní průmysl) a medicínské aplikace [29].

Po uvolnění AgNPs do ŽP dochází k jejich transformacím. Mezi tyto transformace lze zařadit změny v agregačním a oxidačním stavu, precipitaci sekundárních fází (např. uvolňování Ag^+ iontů a jejich následné interakce s S^{2-} a HS^- ionty za vzniku Ag_2S -NPs), sorpci anorganických/organických ligandů, fotodegradaci atd [30; 31]. Jednou z běžných environmentálních transformací AgNPs je jejich sulfidace. Elementární Ag na povrchu AgNPs snadno podléhá oxidaci na Ag^+ ionty, které mohou následně interagovat s anorganickými popř. organickými sulfidy nebo jinými látkami obsahujícími S za vzniku Ag_2S -NPs nebo core-shell nanostruktur $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$ -NPs (jádro tvořeno elementárním stříbrem a „slupka“ tvořena Ag_2S). Tyto NPs se běžně vyskytují v kalech z čistíren odpadních vod a při následné potenciální aplikaci těchto kalů na zemědělské půdy se mohou dostat do různých složek ŽP (např. do povrchových vod a půd). Na základě současných poznatků lze předpokládat, že sulfidace snižuje dostupnost Ag^+ iontů v důsledku nižší rozpustnosti Ag_2S (s) a tudíž může omezovat i výslednou ekotoxicitu AgNPs [32].

Jelikož je tato práce zaměřena na posuzování ekotoxicity AgNPs a $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$ -NPs, bude v následujících odstavcích pojednáváno o vlivu sulfidace na výslednou ekotoxicitu AgNPs.

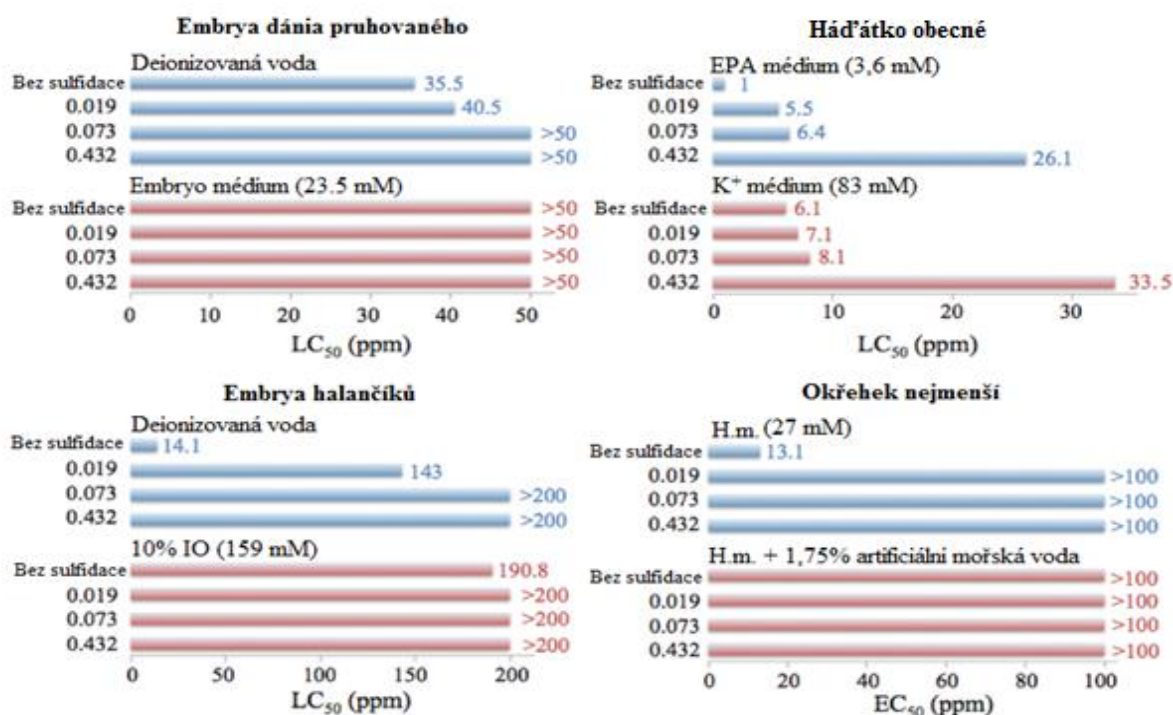
Například v práci Levard a kol. (2013) posuzovali a porovnávali ekotoxicitu nanočástic stříbra stabilizovaných polyvinylpyrolidonem (AgNPs-PVP; průměrná velikost $37,3 \pm 5,8$ nm) s obdobnými nanočásticemi, které byly podrobeny částečné sulfidaci (zvolený hmotnostní poměr S:Ag byl u těchto částic 0,019; 0,073 a 0,432). Jako testovací organismy autoři zvolili embrya dánia pruhovaného (*Danio rerio*), embrya halančíků (*Fundulus heteroclitus*), háďátka obecné (*Caenorhabditis elegans*) a okřehek nejmenší (*Lemna minuta*). Testy ekotoxicity byly v této studii realizovány v různých médiích (**tab. 1**). Zvolené testované koncentrace byly pro jednotlivé modelové organismy a stupeň sulfidace různé. Například test ekotoxicity s háďátkem obecným v EPA médiu (nízká iontová síla a koncentrace Cl^- iontů) byl realizován při koncentracích 0; 0,5; 1 a 2 ppm pro částice bez sulfidace (hmotnostní poměr S:Ag = 0) a při koncentracích 3; 15; 30 ppm pro částice s různým stupněm sulfidace (hmotnostní poměr S/Ag = 0,019; 0,073; 0,432).

Tabulka 1 – Základní charakteristiky expozičních médií použitých v práci Levard a kol. (2013); X^+ – monovalentní ionty (Na^+ , K^+ , Cl^-), X^{2+} – divalentní ionty (Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-}); H.m – Hutnerovo médium [32]

Expoziční médium	Testovací organismus	Koncentrace X^+ [mmol]	Koncentrace X^{2+} [mmol]	Iontová síla [mmol]	pH	Konduktivita [mS]
Deionizovaná voda	Embrya <i>Dania reria</i> a <i>Fundulus heteroclitus</i>	-	-	-	-	-
EPA médium	<i>Caenorhabditis elegans</i>	1,2	0,6	3,6	7,7	3,6
Hutnerovo médium (H.m)	<i>Lemna minuta</i>	6,0	3,0	27,0	5,0	1,9
H.m + 1,75% umělé mořská voda	<i>Lemna minuta</i>	34,7	9,1	66,0	5,1	2,4
K^+ médium	<i>Caenorhabditis elegans</i>	104,0	6,0	83,0	5,7	83,0
Embryo médium	Embrya <i>Dania reria</i>	16,5	2,1	23,5	7,3	23,5
10% IO (Instant Ocean)	Embrya <i>Fundulus heteroclitus</i>	159,0	20,7	224,3	8,1	10,0

Autoři této práce na základě výsledků zjistili, že i velmi nízký stupeň sulfidace AgNPs (hmotnostní poměr S:Ag = 0,019) významným způsobem snižuje jejich ekotoxicitu u všech vybraných testovacích akvatických a terestrických eukaryotických organismů. Vliv sulfidace na ekotoxicitu AgNPs byl nejvýraznější u média s nízkou iontovou silou (deionizovaná voda). U jednotlivých druhů testovacích organismů byl rovněž zaznamenán různý vliv sulfidace

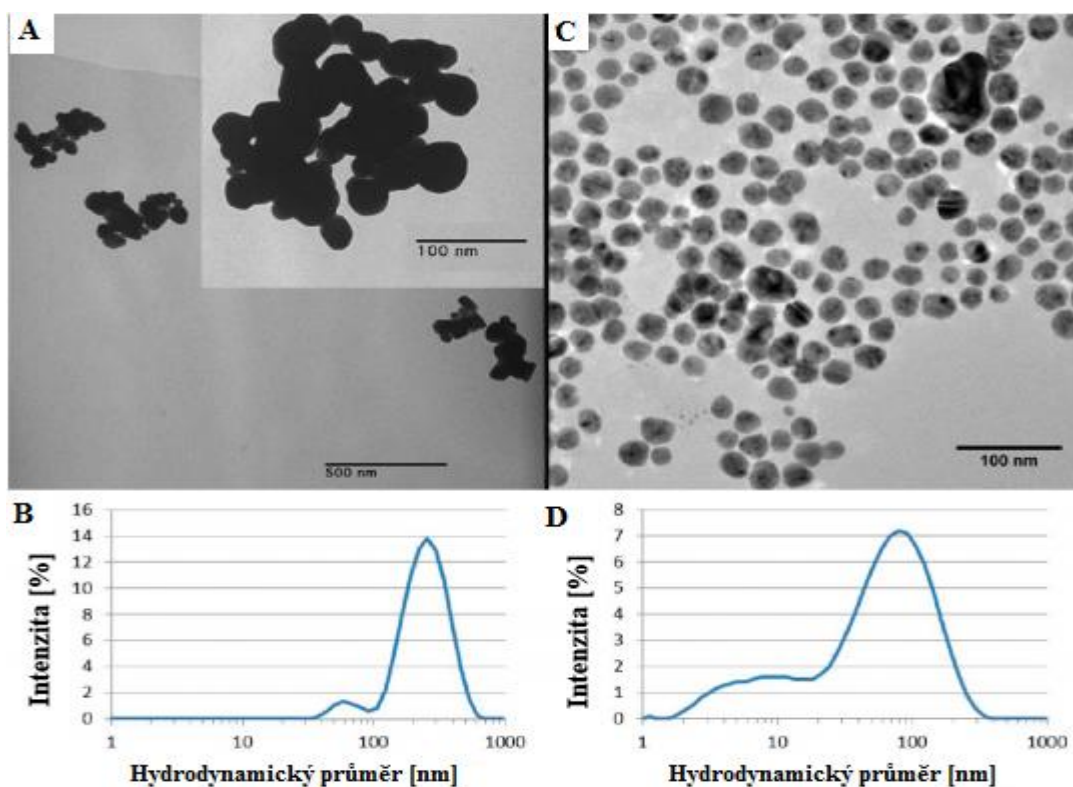
na ekotoxicitu AgNPs. Například u okřehku nejmenšího a embryí halančíků sulfidace zvýšila hodnoty EC_{50} a LC_{50} až o řád, zatímco u hád'átek obecných se hodnota LC_{50} zvýšila 5-krát a u d'ania pruhovaného pouze o 14 %. Toxicita AgNPs byla rovněž ovlivněna přítomností různých solí v jednotlivých expozičních médiích. Ve všech případech byla zaznamenána nižší toxicita nesulfidizovaných AgNPs-PVP v médiích s vyšší iontovou silou. Při vyšších hodnotách iontové síly nebyly pozorovány projevy toxicity u halančíků, d'ania pruhovaného nebo okřehku nejmenšího exponovaných „čistým“ nebo sulfidizovaným AgNPs-PVP při koncentracích (např. >50 mg/kg), které jsou podstatně vyšší než environmentálně relevantní koncentrace (pouze u testu s hád'átkem obecným byla zaznamenána toxicita v médiu s vyšší iontovou silou). Výše uvedené výsledky jsou graficky znázorněny na **obr. 16** [32].



Obrázek 16 – Hodnoty LC_{50} a EC_{50} [ppm] pro embrya d'ania pruhovaného, embrya halančíků, hád'átka obecné a okřehek nejmenší; se zvyšujícím se hmotnostním poměrem S/Ag klesá u AgNPs-PVP citlivost testovacích organismů; hodnoty označené symbolem > překračují rozsah testovaných koncentrací; H.m. – Hutnerovo médium [32]

V práci Reinsch a kol. (2012) se zabývali otázkou, jakým způsobem ovlivňuje počáteční velikostní distribuce a agregační stav AgNPs-PVP míru sulfidace a následně jaký vliv má různý stupeň sulfidace těchto částic na růst bakterií *Escherichia coli*. Pro tyto účely autoři použili dva typy AgNPs-PVP. Tyto částice byly charakterizovány pomocí TEM, měření

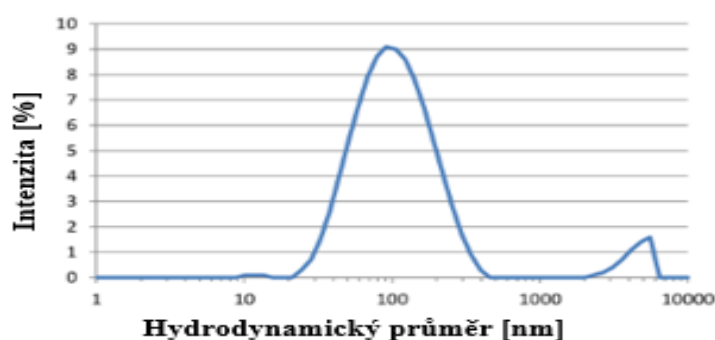
hydrodynamického průměru a zeta-potenciálu. DLS a zeta-potenciál byly u obou typů nanočástic měřeny v 0,1 mM roztoku NaNO₃ obsahujícím 0,1 g AgNPs/L při pH = 7 ± 0,2. Prvním typem byly polydisperzní a zagregované AgNPs-PVP (prášková forma). Ze snímků pořízených pomocí TEM je zřejmá polydisperzita částic. Průměry těchto částic se pohybují ve velikostním rozmezí 30–80 nm a většina aglomerátů má v průměru 75–200 nm. Pomocí DLS bylo zjištěno, že většina NPs byla přítomna ve formě aglomerátů s hydrodynamickým průměrem 265 nm. Druhý typ AgNPs-PVP (ve formě vodné disperze) byl při porovnání s výše uvedeným relativně monodisperzní s průměrnou velikostí jednotlivých částic v rozmezí 25–30 nm (zjištěno pomocí TEM). Hydrodynamický průměr majoritní frakce stanovený metodou DLS byl 83 nm. Oba použité typy AgNPs-PVP, bez ohledu na jejich agregační stav, měly podobný náboj a zeta-potenciál (-30 mV až -40 mV při pH = 7 ± 0,2). Výsledky charakterizace obou typů AgNPs-PVP jsou uvedeny na **obr. 17**.



Obrázek 17 – (A) TEM snímek AgNPs-PVP (polydisperzní, zagregované); (B) Graf velikostní distribuce AgNPs-PVP (polydisperzní, zagregované) získaný pomocí DLS; (C) TEM snímek AgNPs-PVP (neagregované); (D) Graf velikostní distribuce AgNPs-PVP (neagregované) získaný pomocí DLS [33]

Před samotnou sulfidací byly oba typy AgNPs-PVP promyty za účelem odstranění přebytečných Ag⁺ iontů ze zásobních roztoků těchto částic. Po promytí byly oba typy AgNPs-PVP podrobeny sulfidaci (po dobu 48 hod) prostřednictvím redispergace promytých

částic v roztocích Na₂S o různé koncentraci (0; 0,1; 0,5; 2; 8 nebo 15 mM). Zvolená koncentrace AgNPs-PVP v těchto roztocích byla 800 mg/L. Každý roztok Na₂S byl navíc za laboratorní teploty a tlaku probubláván vzduchem (130 cm³/min). Molární poměry redukované síry a stříbra (vyjadřováno jako molární poměr HS⁻/Ag) se u takto připravených roztoků pohybovaly v rozmezí hodnot 0 až 2,02. Po 48 hod sulfidace obou typů AgNPs-PVP byly tyto částice podrobeny centrifugaci při 51 485 x g po dobu 20 min, dále promyty a redispersgovány v deionizované vodě. Po sulfidaci byly u obou typů AgNPs-PVP zaznamenány změny v barvě (výrazné ztmavnutí z šedé až modrošedavé barvy na tmavě šedou/černou) a agregační stabilitě. U druhého typu NPs (neagregované) se po maximální sulfidaci (molární poměr HS⁻/Ag = 2,02) hodnota hydrodynamického průměru majoritní frakce posunula z 83 nm na 115 nm, přičemž tento systém byl při porovnání s původními AgNPs-PVP více polydisperzní a obsahoval i některé mikrometrové aglomeráty (**obr. 18**).



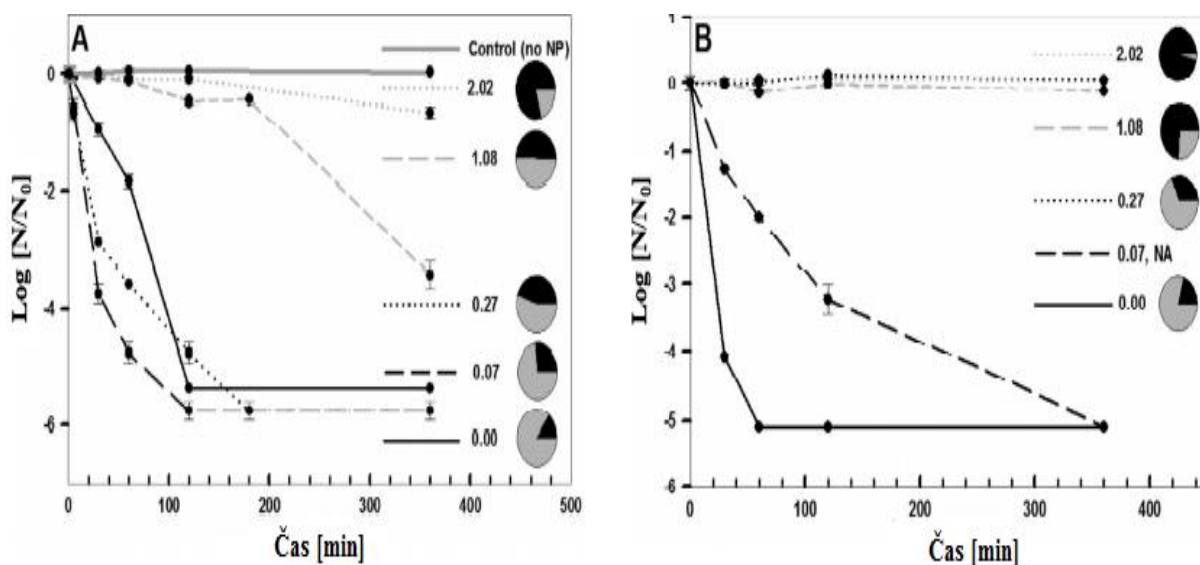
Obrázek 18 – Graf velikostní distribuce AgNPs-PVP (neagregované) po maximální sulfidaci (molární poměr HS⁻/Ag = 2,02) po dobu 48 hod [33]

Hodnota zeta-potenciálu byla u obou typů sulfidizovaných AgNPs-PVP shodná (~ -20 mV ±10 mV při pH = 7 v 0,1 mM roztoku NaNO₃ u molárních poměrů HS⁻/Ag mezi hodnotami 0–0,27) a byla nižší než v případě nesulfidizovaných částic. Při molárním poměru HS⁻/Ag > 0,27 byla hodnota povrchového náboje získaných NPs (0 mV ±10 mV) blízká izoelektrickému bodu (pH ~ 7).

Vliv sulfidace na inhibici růstu bakterií *E. coli* (ATCC kmen 33876) byl stanoven prostřednictvím expozice těchto bakterií při počáteční populaci 1 až 2 x 10⁶ CFU/mL (CFU – kolonie tvořící jednotky) „čistým“ nebo sulfidizovaným AgNPs-PVP (s různým stupněm sulfidace) při koncentraci 50 mg Ag/L v 5 mM roztoku NaHCO₃ s pH upraveným pomocí HCl na hodnotu 7. Zvolená doba expozice u tohoto testu byla 360 min.

Na základě získaných dat autoři dospěli k několika závěrům. Zaprvé, sulfidace snižovala u obou typů AgNPs-PVP jejich schopnost inhibovat růst bakterií *E. coli*, přičemž se zvyšujícím se stupněm sulfidace klesala schopnost těchto částic inhibovat růst bakterií

(obr. 19). Z druhé, pokles v inhibici růstu bakterií koreloval s poklesem Ag^+ iontů přítomných v roztoku Na_2S po ukončení sulfidace. Nakonec, inhibice růstu bakterií korelovala se ztrátou povrchové plochy v důsledku aglomerace sulfidizovaných AgNPs-PVP.



Obrázek 19 – Toxicita AgNPs-PVP (A – zagregované; B – neagregované) s různým stupněm sulfidace; N – počet životoschopných mikroorganismů [CFU/mL], N_0 – počáteční koncentrace mikroorganismů před expozicí [CFU/mL]; koláčové grafy značí míru sulfidace testovaných AgNPs-PVP, šedá oblast znázorňuje procentuální obsah Ag^0 , černá oblast obsah Ag_2S [33]

Autoři tohoto článku rovněž zjistili, že počáteční velikostní distribuce a agregační stav AgNPs-PVP ovlivňovaly vlastnosti výsledných sulfidizovaných částic. U větších částic nebo aglomerátů docházelo k pomalejší oxidaci/sulfidaci a sulfidace byla z hlediska kinetiky limitována difuzí sulfidu. Například při nejvyšší koncentraci Na_2S (15 mM) použité během sulfidace došlo u neagregovaných AgNPs-PVP téměř ke kompletní sulfidaci (3,4 % Ag^0 a 96,6 % Ag_2S), zatímco u zagregovaných AgNPs-PVP za stejných reakčních podmínek došlo k menšímu stupni sulfidace (20,3 % Ag^0 a 79,7 % Ag_2S). Složení sulfidizovaných AgNPs-PVP bylo v této práci stanoveno pomocí metody EXAFS (rozšířená rentgenová absorpční spektrometrie jemných struktur). Výše uvedené informace naznačují, že u polydisperzních systémů s výskytem větších částic nebo aglomerátů docházelo k pomalejší sulfidaci a tyto částice následně vykazovaly vyšší toxický potenciál než druhý typ sulfidizovaných AgNPs-PVP (neagregované) [33].

1.7 Predikované environmentální koncentrace nanočástic stříbra

Jaké lze očekávat koncentrace AgNPs v půdách popř. v jiných složkách ŽP? Na tuto otázku nelze v současnosti podat jednoznačnou odpověď, nicméně existuje několik studií, ve kterých se autoři pokoušeli pomocí pravděpodobnostního modelování predikovat možné koncentrace těchto částic v různých složkách ŽP (vody, půdy, sedimenty a ovzduší) popř. v jiných environmentálních systémech (např. výtoky z čistíren odpadních vod, čistírenské kaly, pevné odpady, popel a polétavý prach ze spaloven odpadů atd). Například v práci Gottschalk a kol. (2009) se zabývali výpočtem predikovaných environmentálních koncentrací 5 nanomateriálů (TiO₂-NPs, ZnO-NPs, AgNPs, CNTs a fullereny) s použitím pravděpodobnostní analýzy jejich materiálových toků pro 3 různé regiony (USA, Evropa a Švýcarsko). V **tab. 2** jsou uvedeny hodnoty predikovaných environmentálních koncentrací AgNPs pro ovzduší, povrchové vody, výtoky z čistíren odpadních vod (ČOV) a čistírenské kaly pro rok 2008 a hodnoty předpokládaného ročního nárůstu koncentrací AgNPs (počáteční rok 2008) pro půdy, půdy ošetřované kaly a sedimenty.

Tabulka 2 – Simulované výsledky hodnot predikovaných environmentálních koncentrací AgNPs uvedené v práci Gottschalk a kol. (2009); výsledky jsou vyjadřovány jako modus (hodnota s největší relativní četností v daném statistickém souboru) a jako rozpětí dolního ($Q_{0,15}$) a horního ($Q_{0,85}$) kvartilu [34]

	EU			U.S.			Švýcarsko			Jednotka
	Modus	$Q_{0,15}$	$Q_{0,85}$	Modus	$Q_{0,15}$	$Q_{0,85}$	Modus	$Q_{0,15}$	$Q_{0,85}$	
Půda	22,7	17,4	58,7	8,3	6,6	29,8	11,2	8,7	41,2	$\Delta \text{ng kg}^{-1} \text{ y}^{-1}$
Půda ošetřovaná kaly	1 581	1 209	4 091	662	526	2 380				$\Delta \text{ng kg}^{-1} \text{ y}^{-1}$
Povrchová voda	0,764	0,588	2,16	0,116	0,088	0,428	0,717	0,555	2,63	ng L^{-1}
Výtok z ČOV	42,5	32,9	111	21	16,4	74,7	38,7	29,8	127	ng L^{-1}
Čistírenský kal	1,68	1,31	4,44	1,55	1,29	5,86	1,88	1,46	6,24	mg kg^{-1}
Sediment	952	978	8 593	195	153	1 638	1 203	965	10 184	$\Delta \text{ng kg}^{-1} \text{ y}^{-1}$
Ovzduší	0,008	0,006	0,02	0,002	0,002	0,0097	0,021	0,017	0,074	ng m^{-3}

Jak je z výše uvedené tabulky patrné, tato práce poskytuje v případě AgNPs v půdách pouze představu o očekávaném ročním nárůstu koncentrace, přičemž předpokládá nejvyšší koncentrace AgNPs (s výjimkou čistírenského kalu) v půdách ošetřovaných kaly a sedimentech. Autoři na základě výsledků této studie předpokládali zvýšení koncentrace AgNPs v sedimentech (U.S.) v letech 2008–2012 z 0,7 na 2,2 $\mu\text{g Ag/kg}$ a v případě půd ošetřovaných kaly (U.S.) ve stejném období nárůst koncentrace z 2,3 na 7,4 $\mu\text{g Ag/kg}$ [34].

V práci Sun a kol. (2014) uvádí hodnoty predikovaných environmentálních koncentrací pro totožné nanomateriály jako v případě výše citované práce, přičemž použili aktualizovaná data vztahující se k předpokládaným objemům produkce, uvolňování z různých kategorií produktů, materiálovým tokům napříč různými složkami ŽP popř. jinými systémy (např. výtoky z ČOV, čistírenské kaly atd.), environmentálním transformacím atd. V **tab. 3** jsou uvedeny hodnoty predikovaných environmentálních koncentrací AgNPs pro výtoky z ČOV, povrchové vody, čistírenské kaly, ovzduší, pevné odpady, popel ze spaloven odpadů a poléťavý prach ze spaloven odpadů (ve výpočtech byly zohledněny předpokládané materiálové toky AgNPs pro rok 2012) a hodnoty předpokládaného ročního nárůstu koncentrací AgNPs pro sedimenty, přírodní/městské půdy a půdy ošetřované kaly.

Tabulka 3 – Simulované výsledky hodnot predikovaných environmentálních koncentrací AgNPs uvedené v práci Sun a kol. (2014); výsledky jsou vyjadřovány jako modus (hodnota s největší relativní četností v daném statistickém souboru) a jako rozpětí dolního ($Q_{0,15}$) a horního ($Q_{0,85}$) kvartilu [35]

	EU			Švýcarsko			Jednotka
	Modus	$Q_{0,15}$	$Q_{0,85}$	Modus	$Q_{0,15}$	$Q_{0,85}$	
Výtok z ČOV	0,17	0,06	16	0,32	0,08	23	ng L ⁻¹
Povrchová voda	0,66	0,51	0,94	0,45	0,37	0,73	ng L ⁻¹
Sediment	2,3	1,8	3,3	1,6	1,3	2,6	Δμg kg ⁻¹ y ⁻¹
Čistírenský kal	0,02	0,01	0,08	0,04	0,02	0,16	mg kg ⁻¹
Přírodní a městské půdy	1,2	0,91	1,8	5,1	3,9	7,4	Δng kg ⁻¹ y ⁻¹
Půda ošetřovaná kaly	0,11	0,09	0,65				Δμg kg ⁻¹ y ⁻¹
Ovzduší	0,003	0,003	0,004	0,01	0,01	0,02	ng m ⁻³
Pevný odpad	0,06	0,05	0,08	0,05	0,04	0,07	mg kg ⁻¹
Popel ze spaloven odpadů	0,23	0,18	0,36	0,21	0,17	0,33	mg kg ⁻¹
Poléťavý prach ze spaloven odpadů	0,38	0,24	0,85	0,33	0,22	0,77	mg kg ⁻¹

Výše uvedeně hodnoty predikovaných environmentálních koncentrací a hodnoty předpokládaného ročního nárůstu koncentrací AgNPs jsou výrazně nižší než v případě práce Gottschalk a kol. (2009), přičemž důvodem jsou dle autorů této studie nižší odhady produkce AgNPs a zohlednění sulfidace během úpravy odpadních toků obsahujících tyto částice [35].

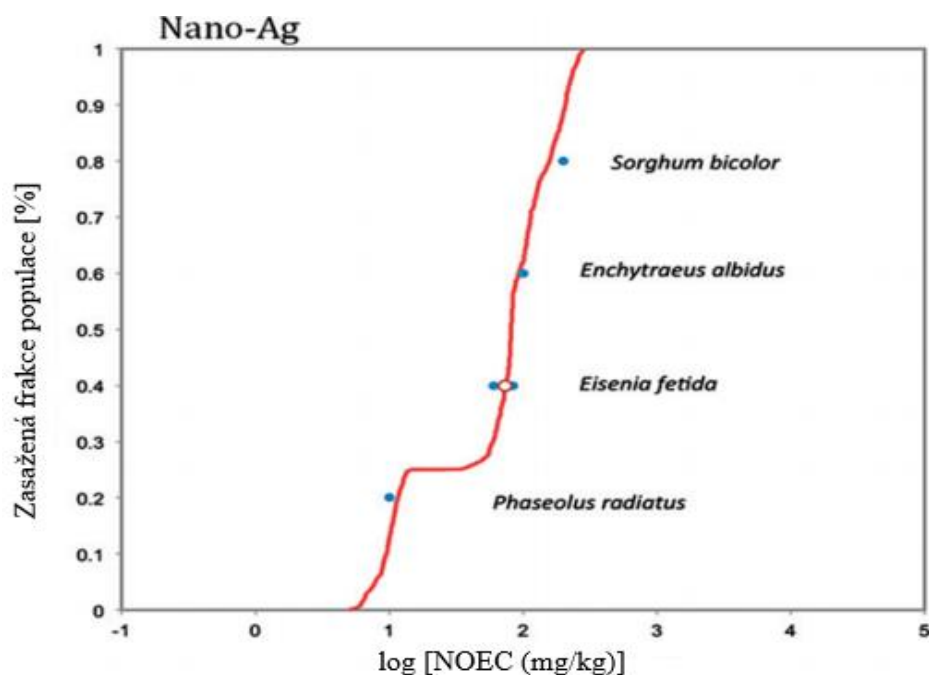
V práci Coll a kol. (2016) kvantifikují environmentální rizika shodných nanomateriálů jako v případě předchozích dvou studií pro vody, půdy a sedimenty s využitím pravděpodobnostního rozložení citlivosti druhů (pSSD) a predikovaných environmentálních koncentrací uvedených v práci Sun a kol. (2014). Ze získaných pSSD křivek autoři získali

hodnoty HC₅ (hraniční koncentrace látky, která ještě nemá významný vliv na populaci a která ovlivní maximálně 5 % organismů), které byly následně použity jako hodnoty predikovaných koncentrací, při nichž nedochází k nepříznivým účinkům na zvažovaný ekosystém (PNECs – Predicted No Effect concentrations). Výsledné hodnoty těchto koncentrací pro různé složky ŽP (vody, půdy a sedimenty) jsou shrnuty v **tab. 4**.

Tabulka 4 – Hodnoty PNECs odvozené ze středních hodnot pátého percentilu pravděpodobnostního rozložení citlivosti druhů; v závorkách je uveden 95% interval spolehlivosti [36]

Nanomateriál	Vody [µg/L]	Půdy [mg/kg]	Sedimenty [mg/kg]
TiO ₂ -NPs	15,7 (10,6 - 20,7)	91,1 (47,6 - 134,9)	
AgNPs	0,017 (0,014 - 0,021)	8,2 (4,3 - 12,5)	
ZnO-NPs	1,0 (0,60 - 1,38)	1,1 (0,6 - 1,6)	
CNTs	55,6 (39,9 - 78,0)	16,2 (8,5 - 23,8)	26,8 (14,0 - 39,9)
Fullereny	3,84 (2,7 - 5,3)	2,4 (1,3 - 3,5)	

Hodnota PNEC pro AgNPs v případě půd byla odvozena na základě poměrně malého množství dat zohledňujících výsledky studií realizovaných pouze na 4 modelových organismech (*Phaseolus radiatus*, *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* a *Sorghum bicolor*) s použitím 6 různých endpointů. Na **obr. 20** je uvedena výchozí křivka, ze které byla odvozena hodnota PNEC pro AgNPs v případě půd.



Obrázek 20 – Křivka pravděpodobnostního rozložení citlivosti druhů (pSSD) pro AgNPs v půdách; modré kruhy představují všechny datové body použité pro modelování, červený kruh představuje geometrický průměr pro určitý druh a červená linie představuje pravděpodobnostní rozložení citlivosti druhů [36]

Dle výše uvedené křivky je hodnota NOEC (nejvyšší testovaná koncentrace, ve které nebyl pozorován statisticky významný účinek v porovnání s kontrolní skupinou) v případě AgNPs pro roupici druhu *Enchytraeus albidus* 100 mg Ag/kg půdy [36]. Tato hodnota může být nápomocná při hledání optimálního koncentračního rozmezí AgNPs v rámci testů ekotoxicity prováděných v experimentální části diplomové práce, ve které je používán podobný modelový organismus (roupice druhu *Enchytraeus crypticus*).

1.8 Ekotoxické účinky nanočástic stříbra na bezobratlé organismy

1.8.1 Vliv nanočástic stříbra na půdní bezobratlé organismy

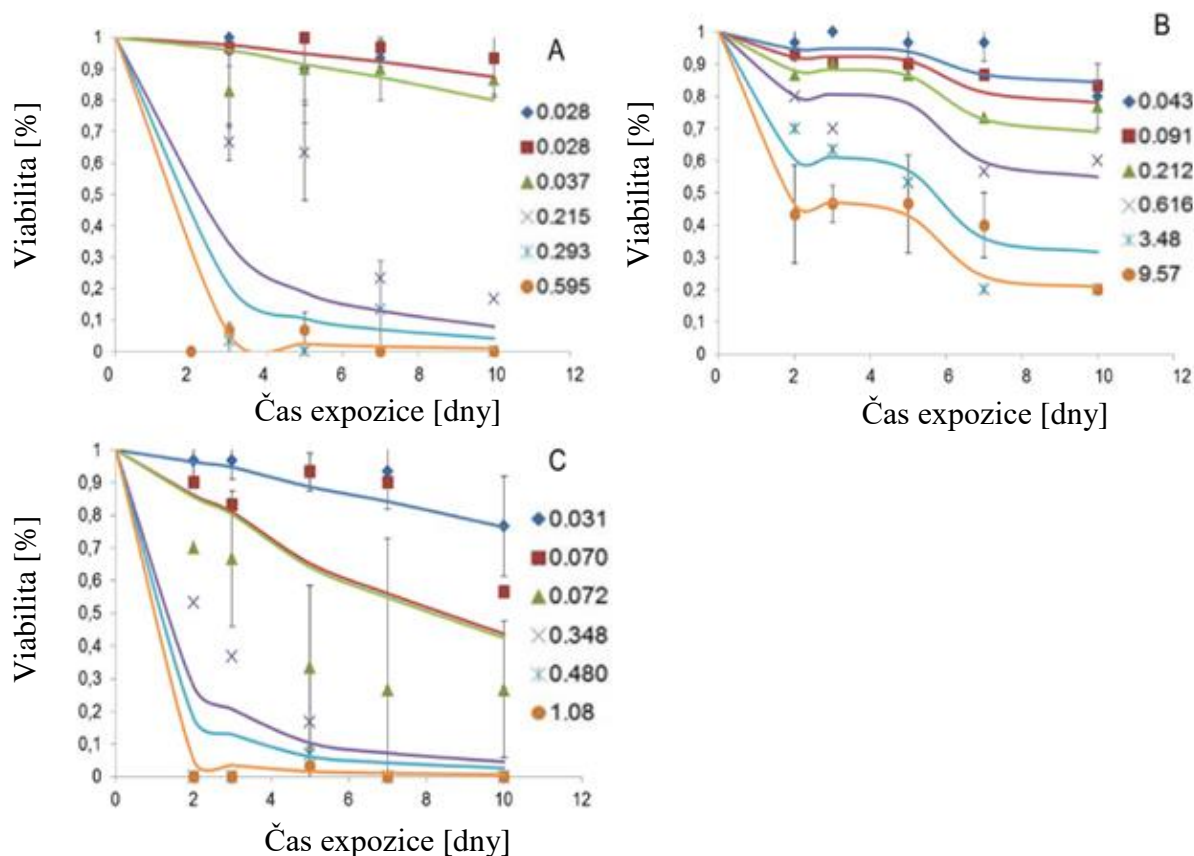
V práci Topuz a kol. (2015) hodnotili a porovnávali ekotoxické účinky dvou typů nanočástic stříbra (AgNPs-Cit a AgNPs-PVP) a AgNO₃ (pozitivní kontrola kvantifikující účinky Ag⁺ iontů) na roupici druhu *Enchytraeus crypticus*. Oba testované typy AgNPs měly dle poskytovatele nominální velikost 25 nm. Testy ekotoxicity byly v této práci prováděny v inertním křemenném písku (zbaveného reziduí na bázi organického uhlíku). Expoziční médium bylo připravováno smísením 20 g předupraveného křemenného písku s 6 mL roztoku testované látky o zvolené koncentraci obsahující navíc specifické koncentrace základních monovalentních a divalentních iontů (0,2 mM Ca²⁺, 0,05 mM Mg²⁺, 2,0 mM Na⁺ a 0,078 mM K⁺). Na základě výsledků předběžných experimentů autoři zvolili pro každý typ testované látky 6 koncentrací zásobních roztoků (testované koncentrace Ag jsou v této práci vyjadřovány v koncentracích zásobních roztoků použitých k přípravě expozičního média). Ekotoxické účinky AgNO₃ byly testovány při následujících koncentracích zásobních roztoků: 0,5; 1; 2; 4; 8 a 16 mg Ag/L. Oba použité typy AgNPs byly testovány při koncentracích zásobních roztoků 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25 a 50 mg Ag/L. Posuzovanými parametry byly v této studii zvoleny viabilita (převrácená hodnota mortality) a bioakumulace Ag v testovacích organismech v čase. Pro účely stanovení těchto ekotoxikologických parametrů bylo vybráno 5 odlišných časových bodů (2., 3., 5., 7. a 10. den). Výsledky jsou v této studii vyjadřovány dvojím způsobem. Buď jsou vztahovány k původním koncentracím testované látky v zásobním roztoku, který byl použit pro přípravu expozičního média nebo jsou vztahovány k naměřeným koncentracím Ag ve vodné fázi expozičního média. Pro lepší interpretaci výsledků jsou v **tab. 5** uvedeny koncentrace Ag (mg/L), které byly naměřeny ve vodné fázi expozičního média po dvou a sedmi dnech expozice. Zvýrazněné hodnoty byly v této práci použity pro vyjadřování stanovených parametrů (bioakumulace a viabilita).

Tabulka 5 – Průměrné koncentrace Ag (mg/L; ± standardní odchylka, počet měření $n = 3$) naměřené po dvou a sedmi dnech ve vodné fázi expozičního média; všechny roztoky byly před analýzou filtrovány přes membránu s velikostí pórů 0,45 μm ; ZR – zásobní roztok použitý pro přípravu expozičního média [37]

AgNO₃			
ZR	Den 2	Den 7	Průměr
0,50	0,016 ±0,003	0,040 ±0,005	0,028
1,00	0,044 ±0,002	0,012 ±0,001	0,028
2,00	0,038 ±0,003	0,035 ±0,006	0,037
4,00	0,237 ±0,050	0,192 ±0,012	0,215
8,00	0,317 ±0,080	0,296 ±0,068	0,293
16,00	0,620 ±0,083	0,569 ±0,108	0,595
AgNPs-Cit			
ZR	Den 2	Den 7	Průměr
1,56	0,047 ±0,005	0,039 ±0,003	0,043
3,13	0,099 ±0,055	0,082 ±0,045	0,091
6,25	0,194 ±0,018	0,230 ±0,089	0,212
12,50	0,654 ±0,051	0,577 ±0,182	0,616
25,00	3,36 ±0,456	3,60 ±1,09	3,480
50,00	9,74 ±1,17	9,40 ±1,39	9,570
AgNPs-PVP			
ZR	Den 2	Den 7	Průměr
1,56	0,033 ±0,004	0,028 ±0,008	0,031
3,13	0,081 ±0,016	0,058 ±0,013	0,070
6,25	0,078 ±0,008	0,065 ±0,028	0,072
12,50	0,370 ±0,025	0,325 ±0,034	0,348
25,00	0,403 ±0,086	0,557 ±0,168	0,480
50,00	1,07 ±0,059	1,08 ±0,269	1,080

Po desetidenní expozici byly hodnoty LC₅₀ (vztaženo ke koncentracím Ag v zásobních roztocích použitých pro přípravu expozičního média) u testovaných látek 1,53 mg Ag/L (AgNO₃); 15,9 mg Ag/L (AgNPs-Cit) a 3,37 mg Ag/L (AgNPs-PVP). Hodnoty LC₅₀ (vztaženo ke koncentracím Ag ve vodné fázi expozičního média) poklesly během desetidenní expozice u AgNPs-Cit z hodnoty 7,43 mg Ag/L (naměřeno po dvou dnech expozice) na 0,88 mg Ag/L (naměřeno po deseti dnech expozice) a u AgNPs-PVP z hodnoty 0,2 mg Ag/L na 0,06 mg Ag/L. U AgNO₃ klesla hodnota LC₅₀ po desetidenní expozici z 0,15 mg Ag/L na 0,07 mg Ag/L. S narůstajícím časem a expoziční koncentrací docházelo u modelových organismů k poklesu viability (resp. narůstala mortalita). U nejvyšších tří koncentrací (vztaženo ke koncentracím Ag ve vodné fázi expozičního média)

AgNO₃ (0,215–0,595 mg Ag/L) a AgNPs-PVP (0,348–1,08 mg Ag/L) bylo u viability (resp. mortality) dosaženo ustáleného stavu po 7 dnech expozice, kdežto u nižších koncentrací bylo tohoto stavu dosaženo až 10. den expozice. U AgNPs-Cit bylo u všech testovaných koncentrací dosaženo ustáleného stavu po 7 dnech expozice (**obr. 21**).



Obrázek 21 – Časová závislost viability [%] modelových organismů (*Enchytraeus crypticus*) exponovaných různým koncentracím AgNO₃ (A), AgNPs-Cit (B) a AgNPs-PVP (C); expoziční koncentrace jsou v těchto grafech vyjadřovány jako koncentrace Ag (mg Ag/L), které byly naměřeny ve vodné fázi expozičního média (zvýrazněné hodnoty v **tab. 5**) [37]

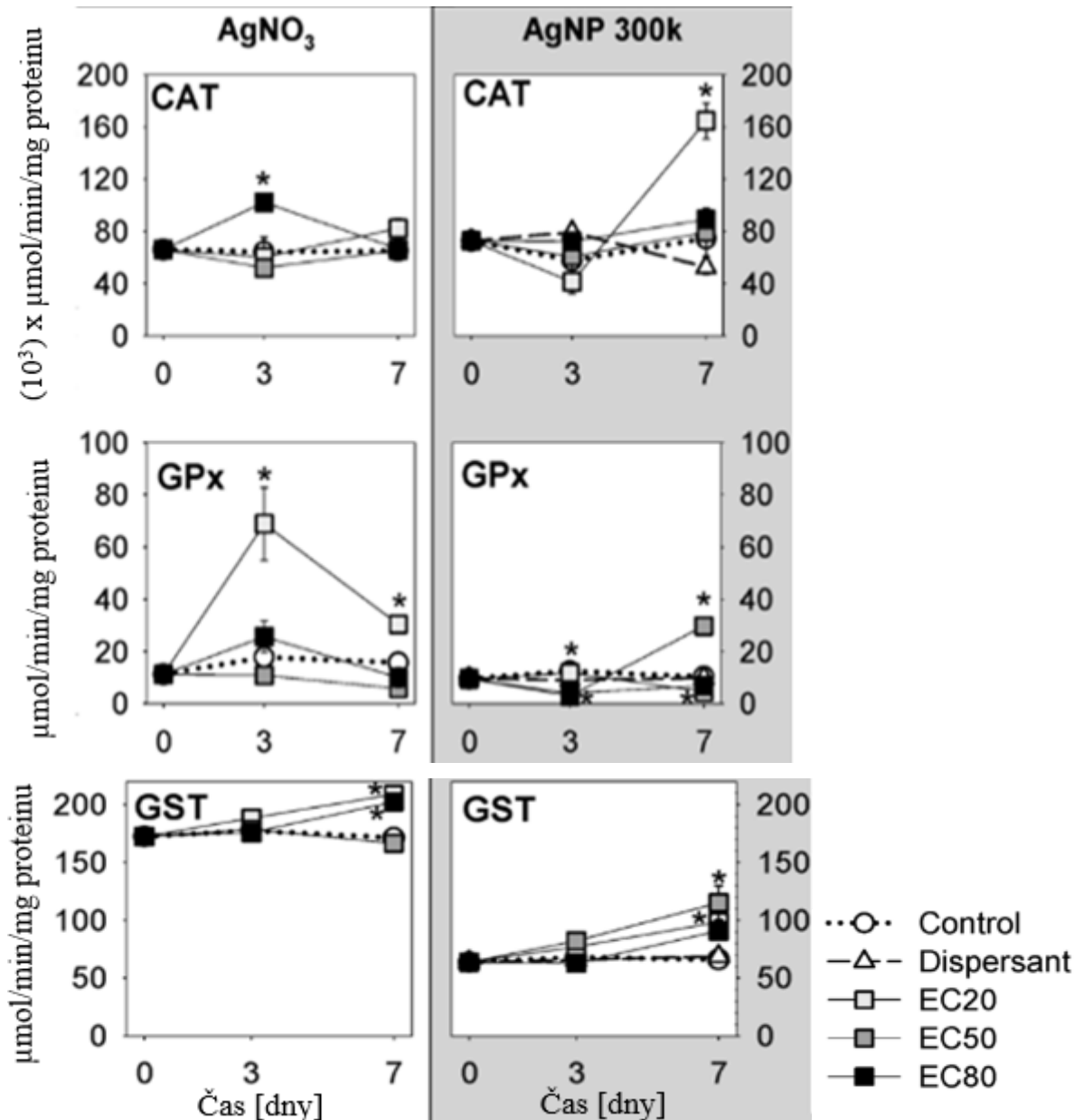
Expoziční koncentrace a čas byly zásadními parametry, které ovlivňovaly příjem Ag z AgNO₃ a obou typů AgNPs. Koncentrace Ag ve tkáních testovacích organismů dosahovaly ustáleného stavu po sedmi dnech expozice. U nejvyšších dvou koncentrací AgNO₃ (0,293 a 0,595 mg Ag/L) a AgNPs-PVP (0,48 a 1,08 mg Ag/L) nebyla získána žádná data vztahující se k bioakumulaci Ag v testovacích organismech, neboť u těchto koncentrací všechny modelové organismy uhynuly. Nejvyšší naměřené koncentrace Ag v exponovaných organismech byly 28,1 mg Ag/kg u AgNO₃ (naměřeno po sedmi dnech expozice koncentrací 0,215 mg Ag/L), 125 mg Ag/kg u AgNPs-Cit (naměřeno po deseti dnech expozice koncentrací 9,57 mg Ag/L) a 77,5 mg Ag/kg u AgNPs-PVP (naměřeno po pěti dnech expozice koncentrací 0,348 mg Ag/L).

Na základě výše uvedených výsledků autoři této práce dospěli k závěru, že toxicita AgNPs-PVP (vyjadřována na základě koncentrace Ag ve vodné fázi expozičního média) byla podobná toxicitě AgNO₃, zatímco AgNPs-Cit vykazovaly při porovnání s těmito dvěma formami Ag nižší toxicitu. To naznačuje, že toxicita AgNPs závisí na povrchové stabilizaci těchto částic, která následně může souviset s odlišnou adsorpcí těchto částic na pískovou matici použitého expozičního média [37].

V práci Ribeiro a kol. (2015) byly hodnoceny ekotoxické účinky AgNPs (AgNM300K) s využitím markerů oxidativního stresu na roupici druhu *Enchytraeus crypticus*. Použité AgNPs byly dle poskytovatele sférického tvaru, bez povrchové stabilizace a více než 99 % částic mělo přibližnou nominální velikost 15 nm. Rozměry uvedené poskytovatelem autoři ověřili pomocí TEM, která prokázala částice ve velikostním rozmezí 17 ±8 nm, přičemž zde byly přítomny i NPs menší než 5 nm. Jako biomarkery oxidativního stresu autoři této studie zvolili aktivitu enzymů katalázy (CAT), glutathion peroxidázy (GPx), glutathion reduktázy (GR) a glutathion-S-transferázy (GST) a hladiny celkového glutathionu (TG), metalothioneinu (MT) a lipidové peroxidace (LPO). Jako expoziční médium zde byla použita přírodní standardní půda LUFA 2.2. Zvolené testované koncentrace byly pro AgNO₃ 45, 60 a 96 mg Ag/kg suché váhy půdy a pro AgNPs 60, 170 a 225 mg Ag/kg suché váhy půdy. Samotný postup testu byl přejat z OECD směrnice č. 220 (Test na reprodukci roupic, 2004) s některými modifikacemi. Stručně lze postup testu shrnout následovně: každá testovací jednotka se skládala ze skleněné nádoby (Ø 4 cm, objem 45 mL) obsahující 20 g půdy s potravou (vlhké váhy) a specifickou koncentrací testovaného kontaminantu. Do každé testovací nádoby (opatřené perforovaným víkem) bylo umístěno 50 testovacích organismů. Testovací nádoby byly udržovány při teplotě 20 ±1 °C a fotoperiodě (16:8 hod). Pro každou testovanou koncentraci bylo provedeno 5 replik. Při dosažení vzorkovacích časů (0., 3. a 7. den) byly organismy z půdy opatrně sesbírány, opláchnuty vodou a převedeny do mikrozkuřavky, dále zváženy, zmrazeny v kapalném dusíku a skladovány při teplotě -80 °C do doby uskutečnění analýzy biochemických markerů.

Autoři na základě výsledků provedených experimentů učinili závěr, že AgNPs a AgNO₃ vyvolávají u modelového organismu (*Enchytraeus crypticus*) oxidativní stress odlišným způsobem. Například u AgNPs docházelo v porovnání s AgNO₃ ke zpožděnému zvýšení aktivity antioxidantních enzymů (CAT, GST, GPX), u kterých byla zaznamenána nejvyšší aktivita sedmý den vzorkování exponovaných roupic. Naproti tomu u AgNO₃ byla největší aktivita těchto enzymů zaznamenána během třetího dne expozice (**obr. 22**). Dalším rozdílem mezi těmito látkami bylo původní zvýšení hladin LPO následované stabilizací u organismů

exponovaných AgNO₃, zatímco u AgNPs bylo pozorováno po sedmi dnech expozice pouze mírné zvýšení hladin LPO. Hladiny MT byly zvýšeny pouze u organismů exponovaných AgNPs. Tyto rozdíly mohou odrážet opožděné účinky AgNPs (v porovnání s AgNO₃) v důsledku pomalejšího uvolňování Ag⁺ iontů z jejich povrchu [38].

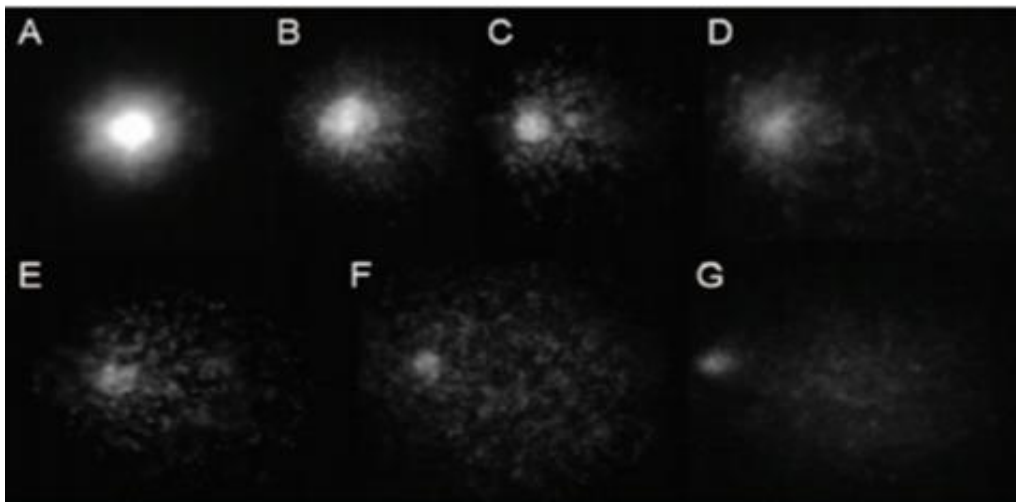


Obrázek 22 – Výsledky analýzy vybraných biochemických markerů oxidativního stresu u roupic exponovaných různým koncentracím AgNPs [expoziční koncentrace 60 (EC₂₀), 170 (EC₅₀) a 225 (EC₈₀) mg Ag/kg suché váhy půdy] a AgNO₃ [expoziční koncentrace 45 (EC₂₀), 60 (EC₅₀) a 96 (EC₈₀) mg Ag/kg suché váhy půdy]; vzorky pro tuto analýzu byly odebírány nultý, třetí a sedmý den expozice modelových organismů [38]

V práci Cong a kol. (2011) posuzovali ekotoxicitu sedimentů se specifickými koncentracemi nano (< 100 nm), mikro (2–3,5 μm) a iontové formy Ag (AgNO₃) na mnohoštětinatci druhu *Nereis diversicolor* (Nereidka různobarvá). Použité AgNPs-PVP

vykazovaly dle TEM polyedrický tvar s přibližnou velikostí v rozmezí 20–200 nm. Hydrodynamický průměr a zeta-potenciál byl měřen pomocí DLS u zásobního roztoku AgNPs-PVP o koncentraci 0,5 g Ag/L deionizované vody. Průměrná hodnota hydrodynamického průměru těchto částic byla 162 ± 4 nm a suspenze AgNPs byla na základě stanoveného zeta-potenciálu ($-49 \pm 0,75$ mV) velmi stabilní. Druhý typ částic Ag (mikro-forma) byl charakterizován pouze pomocí TEM, která odhalila polydisperzitu těchto částic s širokou velikostní distribucí od 8 nm až po 3 μ m. Modelové organismy (dospělci druhu *Nereis diversicolor* s přibližnou velikostí 5–7 cm) byly sesbírány v průběhu zimy 2009 (0–4 °C) a jara 2010 (4–6 °C) v Rosklide Fjord, Dánsko. Po přenesení do laboratoře byly tyto organismy umístěny do sedimentu, který byl odebrán na stejném místě jako modelové organismy. Odebraný sediment byl pro účely odstranění nežádoucích organismů nejprve přes noc lyofilizován při teplotě -50 °C, dále promyt a přefiltrován. Modelové organismy bylo dále nutné aklimatizovat na teplotu 15 °C. Zvolené expoziční koncentrace (pro všechny tři formy Ag) byly 0; 1; 5; 10; 25 a 50 μ g Ag/g suché váhy sedimentu. Stanovovanými parametry u odebraných vzorků modelových organismů po desetidenní expozici třem formám Ag byly poškození DNA (určováno pomocí kometového testu) a bioakumulace Ag. Poškození DNA bylo u modelových organismů vyšetřováno na coelomocytech. Bioakumulace Ag byla studována pomocí atomové absorpční spektrometrie s grafitovou pecí (GFAAS).

Autoři tohoto článku zjistili, že všechny formy Ag byly schopny vyvolat poškození DNA a že toto poškození bylo závislé na expoziční koncentraci a formě Ag. Významná genotoxicita byla při porovnání s kontrolní skupinou (neexponovaní jedinci) zaznamenána u nano a mikro formy Ag při koncentracích 25 a 50 μ g Ag/g suché váhy sedimentu a u iontové formy Ag (AgNO_3) při koncentraci 50 μ g Ag/g suché váhy sedimentu. Ze všech tří testovaných forem stříbra vykazovaly AgNPs nejvyšší genotoxicitu, přičemž nejnižší genotoxicita byla zaznamenána u iontové formy Ag. Výsledky kometového testu pro různé expoziční koncentrace AgNPs jsou uvedeny na **obr. 23**.



Obrázek 23 – Výsledky kometového testu poukazující na různý rozsah poškození DNA v coelomocytech modelového organismu (*Nereis diversicolor*) exponovaného různým koncentracím AgNPs; (A) kontrolní skupina s nepoškozenou DNA; (B-F) vzorky modelových organismů vystaveny zvyšující se koncentraci AgNPs (B – 1 µg/g suché váhy sedimentu; C – 5 µg/g suché váhy sedimentu; D – 10 µg/g suché váhy sedimentu; E – 25 µg/g suché váhy sedimentu; F – 50 µg/g suché váhy sedimentu); G – pozitivní kontrola (poškození DNA iniciováno pomocí UV záření) [39]

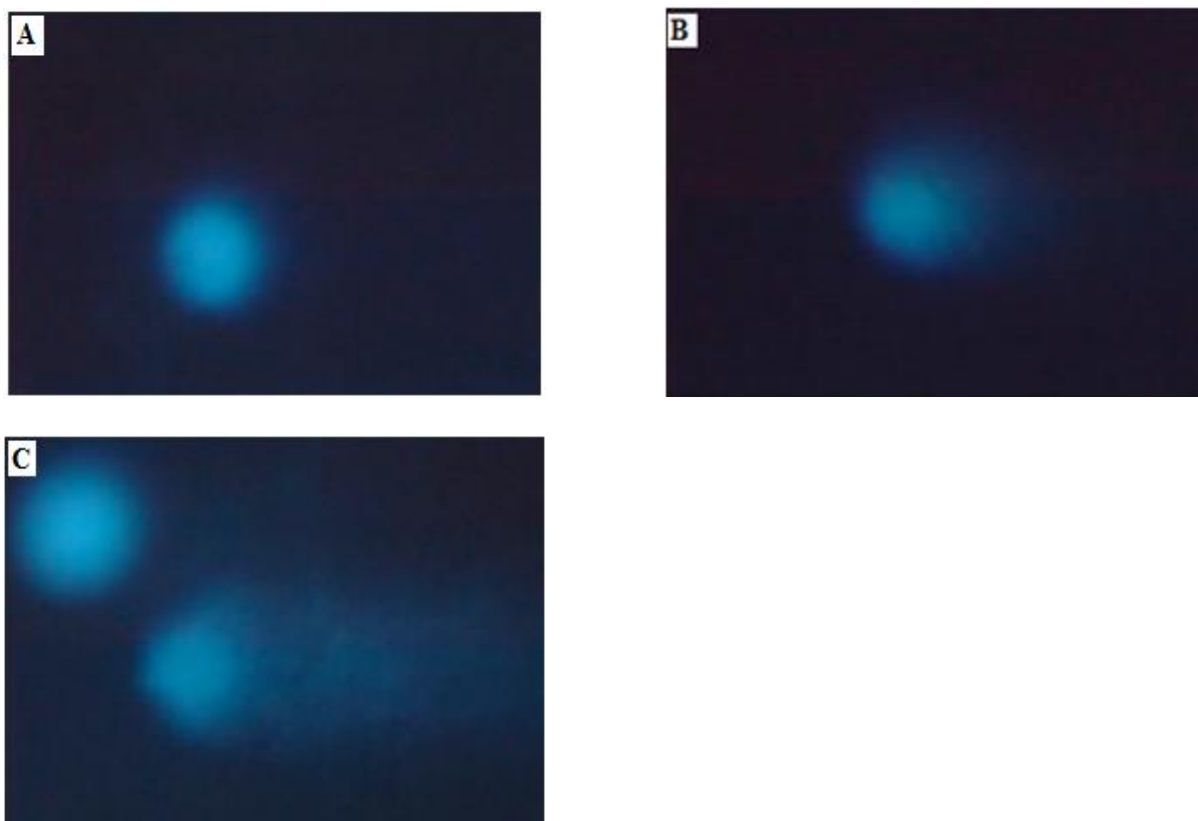
U všech tří forem testované látky byla rovněž zaznamenána bioakumulace Ag. U nejvyšší expoziční koncentrace (50 µg Ag/g suché váhy sedimentu) byly v tkáních modelových organismů stanoveny tyto koncentrace Ag: 8,56 ±6,63 µg Ag/g suché váhy organismu (AgNPs), 6,92 ±5,86 µg Ag/g suché váhy organismu (mikro-forma Ag) a 9,86 ±4,94 µg Ag/g suché váhy organismu (AgNO₃). Na základě analýzy koncentrací Ag ve tkáních modelových organismů autoři konstatují, že se jednotlivé testované formy Ag neliší v míře bioakumulace [39].

V práci Shoults-Wilson a kol. (2010) posuzovali vliv povrchové stabilizace AgNPs na jejich výslednou ekotoxicitu pro žížalu hnojní (*Eisenia fetida*). Žížaly byly v této studii exponovány AgNO₃ a AgNPs stabilizovaných pomocí PVP nebo kyseliny olejové (OA). Experiment byl prováděn podle standardizovaného postupu pro testování reprodukční toxicity na žížalách (OECD směrnice č. 222) v umělé půdní substrátu. Průměrná velikost testovaných AgNPs-PVP byla podle snímků pořízených TEM 56,35 ±1,16 nm a AgNPs-OA měly průměrnou velikost 50,60 ±1,02 nm. Zvolené testované koncentrace u AgNO₃ byly 10 a 100 mg Ag/kg suché hmotnosti půdy a u obou typů AgNPs 10, 100 a 1 000 mg Ag/kg suché hmotnosti půdy. Posuzovanými parametry v této studii byly růst, mortalita, bioakumulace a reprodukce.

Při posuzování růstu a mortality bylo zjištěno, že téměř všichni exponovaní jedinci (u všech forem Ag) přežili a při porovnání s kontrolní skupinou nebyly zaznamenány ani rozdíly v růstu. Mírné zvýšení v mortalitě bylo zaznamenáno pouze u AgNPs-PVP (koncentrace 10 mg Ag/kg suché hmotnosti půdy), kde byla na konci testu pozorována 15% mortalita, přičemž u dvou koncentrací, které jsou o řád až dva vyšší byla mortalita nižší. Jediný parametr, který byl v této práci výrazným způsobem ovlivněn, byla reprodukce, a to při koncentraci 1 000 mg Ag/kg suché hmotnosti půdy (u AgNPs-PVP i AgNPs-OA), kterou lze považovat za environmentálně irelevantní. Tato studie neprokázala u zvolených koncentrací obou typů AgNPs toxicitu vůči žížale druhu *Eisenia fetida*. Byla zaznamenána pouze mírná bioakumulace částic v tkáních a snížená schopnost reprodukce [40].

1.8.2 Vliv nanočásticstříbra na vodní bezobratlé organismy

V práci Gomes a kol. (2013) byly posuzovány genotoxické účinky AgNPs na slávku středomořskou (*Mytilus galloprovincialis*). Mušle byly exponovány dvěma formám Ag (AgNO₃ a AgNPs) při koncentraci 10 µg/L po dobu 15 dnů a během této expoziční periody byly pomocí kometového testu posuzovány genotoxické účinky na hemocytech. Použité AgNPs byly polydisperzní, sférického tvaru a velikost těchto částic byla dle poskytovatele < 100 nm. Přesná charakterizace rozměrů použitých AgNPs pomocí TEM v této práci chybí (je uveden pouze snímek pořízený TEM). Modelové organismy byly sesbírány v laguně Ria Formosa (jižní Portugalsko) a následně aklimatizovány po dobu sedmi dnů v přírodní mořské vodě za konstantní teploty a aerace. V rámci experimentu bylo 50 mušlí umístěno do 25 L akvária naplněného 20 L přírodní mořské vody se specifickou koncentrací AgNPs nebo Ag⁺ iontů (10 µg Ag/L mořské vody). Expoziční médium bylo z důvodu aglomerace AgNPs vyměňováno každých 12 hod. Pro účely stanovení míry poškození DNA pomocí kometového testu byly vzorky hemolymfy odebírány po 0, 3, 7 a 15 dnech expozice. Na základě zjištěných výsledků autoři dospěli k závěru, že AgNPs (stejně jako AgNO₃) způsobovaly u vybraného akvatického modelového organismu poškození DNA. Rozsah tohoto poškození byl závislý na době expozice. Ve výsledcích kometového testu se toto poškození projevilo vznikem tzv. ocasu komety, jak je patrné z **obr. 24**.



Obrázek 24 – Srovnání výsledků kometového testu; (A) kontrolní skupina, (B) vzorek modelového organismu exponovaný AgNPs, (C) vzorek modelového organismu exponovaný rozpustné formě Ag (AgNO_3) [41]

Z výše uvedených snímků kometového testu je zřejmé, že iontová forma Ag (AgNO_3) způsobovala závažnější poškození DNA než AgNPs [41].

V práci Asghari a kol. (2012) byla hodnocena ekotoxicita tří typů AgNPs (2 typy v koloidní formě a jeden typ v práškové formě) a AgNO_3 pro hrotnatku velkou (*Daphnia magna*). První typ nanočástic (AgNPs1) byl dle poskytovatele ve formě koloidu o koncentraci 20 000 mg AgNPs/L, přičemž tyto částice byly sférického tvaru s velikostí 5–25 nm. Druhý typ nanočástic (AgNPs2) byl rovněž v koloidní formě a koncentrace tohoto koloidu byla 4 000 mg AgNPs/L. Tyto nanočástice byly dle poskytovatele sférického tvaru s průměrnou velikostí 16,6 nm. Třetí typ nanočástic (AgNPs3) byl ve formě prášku a podle informací poskytnutých výrobcem se jednalo o nanočástice sférického tvaru s průměrnou velikostí 20 nm. Test akutní toxicity byl v této práci realizován podle OECD směrnice č. 202 (*Daphnia* Sp. Test akutní imobilizace) a byl proveden v aerovaném M4 médiu se specifickými koncentracemi testovaných látek, které bylo každých 24 hod vyměňováno z důvodů potlačení aglomerace a poklesu koncentrace testované látky. Testované koncentrace jsou uvedeny v **tab. 6**.

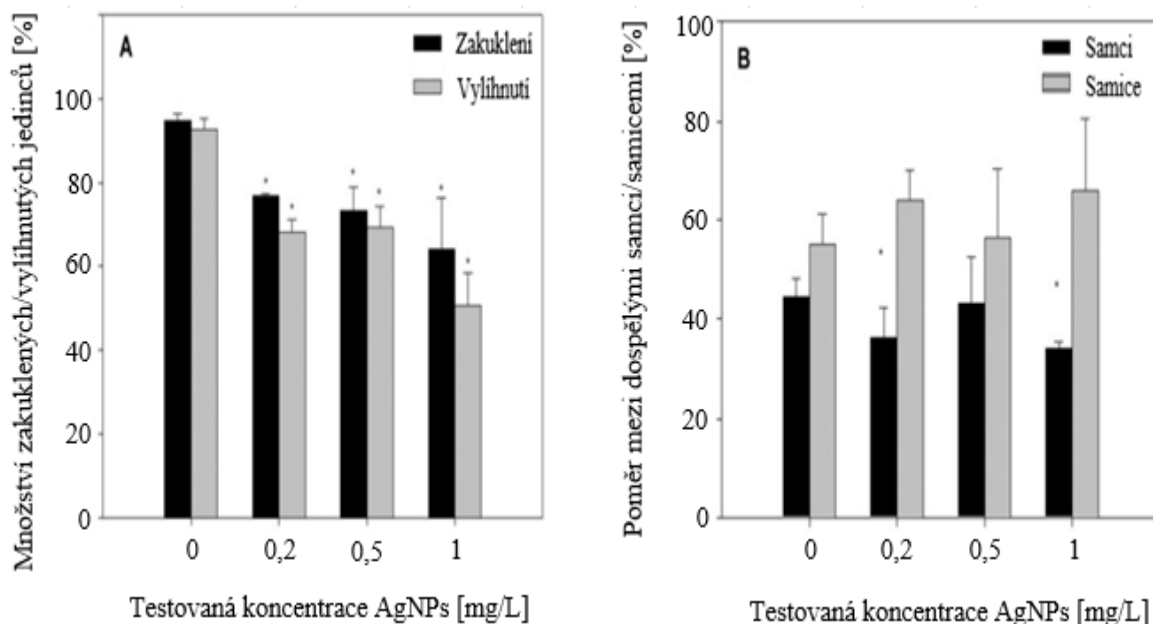
Tabulka 6 – Expoziční koncentrace testovaných látek použité v akutním imobilizačním testu dafnií [42]

Typ testované látky	Koncentrace [mg/L]									
AgNPs1	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,01
AgNPs2	0,001	0,0012	0,0015	0,0017	0,002	0,0022	0,0025	0,0027	0,003	0,0032
AgNPs3	0,1	0,125	0,150	0,175	0,2	0,225	0,25	0,275	0,3	0,32
AgNO ₃	0,001	0,0012	0,0015	0,0018	0,0021	0,0024	0,0027	0,0029	0,0032	0,0034

Autoři článku zjistili, že nejnižší koncentrace, které způsobily u modelového organismu po 48 hod expozici 100% mortalitu, byly 0,006 mg/L (AgNPs1), 0,00325 mg/L (AgNPs2), 0,275 mg/L (AgNPs3) a 0,0032 mg/L (AgNO₃). Nejvyšší koncentrace, které u exponovaných organismů nevyvolaly žádnou mortalitu, byly 0,002 mg/L (AgNPs1), 0,001 mg/L (AgNPs2), 0,1 mg/L (AgNPs3) a 0,0015 mg/L (AgNO₃). Průměrné hodnoty EC₅₀ pro imobilizaci exponovaných organismů byly 0,004 mg/L (AgNPs1), 0,002 mg/L (AgNPs2), 0,187 mg/L (AgNPs3) a 0,0023 mg/L (AgNO₃). Uvedené výsledky naznačují, že AgNPs3 (prášková forma) suspendované v expozičním médiu vykazovaly menší toxicitu než AgNPs1 a AgNPs2 (koloidní forma), přičemž toxicita koloidní formy AgNPs (AgNPs1 a AgNPs2) byla blízká toxicitě AgNO₃ [42].

V práci Nair a kol. (2011) byly posuzovány eko- a genotoxicita AgNPs na larvách vodního pakomára *Chironomus riparius*. Použité AgNPs (koloidní forma) měly dle poskytovatele velikost < 100 nm (koncentrace zásobního roztoku koloidu zde uvedená není). V rámci testu akutní toxicity byly tyto larvy vystaveny působení AgNPs při koncentraci 0,5; 1; 2 a 4 mg/L expozičního média po dobu 24 hod. Pro posuzování chronických účinků AgNPs byly použity koncentrace 0,2; 0,5 a 1 mg/L, přičemž tento experiment probíhal po dobu 25 dnů. U chronicky exponovaných jedinců byla rovněž posuzována pomocí kometového testu míra poškození DNA. Poškození DNA bylo na rozdíl od akutní toxicity AgNPs posuzováno u adultních jedinců (čtvrté vývojové stádium – imago). Testované AgNPs byly v použitém expozičním médiu charakterizovány pomocí TEM a DLS (při jaké koncentraci zde uvedeno bohužel není). Dle TEM byly AgNPs v expozičním médiu přítomny jako diskrétní částice bez přítomnosti aglomerátů. Podle DLS se hydrodynamický průměr AgNPs v použitém expozičním médiu pohyboval v rozmezí 40–70 nm, přičemž majoritní frakce těchto částic měla hydrodynamický průměr 50 nm. Autoři tohoto článku zjistili, že AgNPs při zvolených expozičních koncentracích nevykazovaly vliv na mortalitu při akutní, ani chronické expozici. V rámci chronické expozice však bylo zjištěno, že při koncentraci AgNPs 1 mg/L došlo v porovnání s kontrolní skupinou k poklesu počtu jedinců, kteří se zakuklili na 64 %. Dalším

zjištěním bylo, že dospělosti dosáhlo vždy více samicích jedinců než samčích (**obr. 25**). AgNPs rovněž ovlivňovaly schopnost reprodukce. Pomocí kometového testu bylo zjištěno, že u exponovaných organismů docházelo rovněž k poškození DNA a aktivaci popř. inaktivaci různých genů [43].



Obrázek 25 – Vývojové parametry zaznamenané u pakomára *Chironomus riparius* po 25 denní expozici AgNPs [43]

Závěrem lze konstatovat, že každý autor používá pro studium ekotoxicity AgNPs jiné modelové organismy vodních bezobratlých živočichů a porovnávat ekotoxické účinky mezi jednotlivými druhy těchto organismů je prakticky nemožné, protože každý organismus vykazuje odlišnou citlivost vůči AgNPs v závislosti na trofické úrovni, kterou zastupuje. Další faktory, které významným způsobem ovlivňují výsledky těchto testů, jsou rozměry použitých AgNPs, dále jejich povrchová stabilizace a použité expoziční médium.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Chov testovacích organismů (roupice druhu *Enchytraeus crypticus*), ekotoxikologické testy a veškeré experimenty týkající se této práce byly realizovány v laboratořích Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice. Cílem této práce bylo ověření možnosti provedení testů ekotoxicity AgNPs popř. Ag@Ag₂S-NPs v agaru na roupici druhu *Enchytraeus crypticus*. Klíčovou úlohou zvoleného expozičního média (agar) bylo (za předpokladu vhodného postupu přípravy) potlačení možné aglomerace testovaných NPs a jejich homogenní distribuce v celém objemu testovací jednotky. Roupice byly zvoleny jako modelový organismus zejména z důvodů jejich vysoké ekologické relevance, snadného chovu a poměrně nízkých nároků na potravu a potřebný prostor. AgNPs byly zvoleny jako testované NPs z důvodu jejich vysokého aplikačního potenciálu (např. textilní, potravinářský a zdravotnický průmysl) a Ag@Ag₂S-NPs z důvodu vysoké ekologické relevance s ohledem na environmentální transformace.

2.1 Chov testovacích organismů (roupice *Enchytraeus crypticus*)

Roupice použité k založení chovu byly získány z Centra pro výzkum toxických látek v prostředí (RECETOX, Brno). Chov byl v rámci této práce realizován v plastových Petriho miskách s ventilací (90 x 15 mm), které byly naplněny 50 mL chovného agaru (2% agar). Chovné médium bylo připravováno z agaru v práškové formě (Bacto-Agar, BD), deionizované vody a z vodných roztoků solí (0,1 M NaHCO₃; 0,01 M KCl; 0,2 M CaCl₂; 0,1 M MgSO₄). V následujícím odstavci je stručně popsán postup přípravy chovného média.

Do kádinky o objemu 400 mL byla převedena navážka 4 g agaru, ke které bylo následně přidáno 193 mL deionizované vody (objem přidané vody byl z důvodu odpařování během sterilizace v tlakovém hrnci mírně navýšen), 1,5 mL roztoku NaHCO₃, 1,6 mL roztoku KCl, 2 mL roztoku CaCl₂·2H₂O a 2 mL roztoku MgSO₄. Kádinka s takto připravenou směsí byla přikryta hliníkovou fólií a umístěna do tlakového hrnce (Barazzoni 5 It 22 cm) s teplotou nastavenou na 120 °C. Po 30 min od dosažení požadované teploty v tlakovém hrnci (120 °C) byl sterilizovaný agar za horka rozléván do připravených Petriho misek v digestoři, která byla z důvodu prevence možné kontaminace vyřena důkladně ethanolem. pH připraveného agaru by se mělo pohybovat v rozmezí hodnot 7–7,5. Po zchladnutí agaru byly roupice do tohoto média převedeny jemnou manipulací pomocí štětečku. Chovné misky byly umístěny v termostatované skříni (WTW TS 606 CZ/4 – Var) při teplotě 20 °C ve tmě. Roupice byly krmeny dvakrát týdně na jemno namletými sterilizovanými ovesnými vločkami a přesazovány

do nově připraveného agaru každý měsíc. Jednou týdně byl chov kvůli riziku kontaminace (např. roztoči) kontrolován pod optickým mikroskopem.

Pro testy ekotoxicity byli vybíráni dospělci (s viditelným opaskem a vajíčky) vždy v počtu dvacet jedinců na jednu testovací jednotku.

2.2 Design ekotoxikologických testů

Design ekotoxikologických testů byl inspirován prací Li a kol (2011). V této práci byly posuzovány akutní ekotoxické účinky ZnO-NPs na žížalách druhu *Eisenia fetida* za využití agaru jako expozičního média [13].

V našem případě byly testovací organismy vystaveny působení AgNPs popř. Ag@Ag₂S-NPs v agaru po dobu 96 hod. Posuzovaným parametrem byla procentuální úmrtnost testovacích organismů (mortalita) v porovnání s kontrolní skupinou. Testy ekotoxicity byly realizovány v plastových Petriho miskách (shodné s chovnými miskami), které byly naplněny 50 mL agaru (2%) se specifickou koncentrací testovaného kontaminantu. Každá z testovaných koncentrací, včetně kontrolní skupiny, byla vždy připravována ve třech replikách. Z důvodu potlačení možné aglomerace testovaných NPs byla k přípravě agaru použita pouze deionizovaná voda a Bacto-Agar (bez přídavku solí, jak je tomu v případě chovného agaru). Testovací jednotky byly během testu umístěny při teplotě 20 °C v termostatované skříni (WTW TS 606 CZ/4 – Var) ve tmě. Po uplynutí 96 hod byl vyhodnocován počet přeživších rouspic. Jedinci bez reakcí na mechanické stimuly byli považováni za mrtvé.

2.3 Testy ekotoxicity stříbrných iontů

Vlastnímu testování účinků obou typů NPs předcházelo zjišťování ekotoxicity rozpustné formy Ag. Z důvodu velmi dobré rozpustnosti ve vodě byl zvolen AgNO₃ (p.a., PENTA s.r.o.).

V rámci předběžného testu byly nejprve testovány koncentrace AgNO₃ odpovídající 2,4; 4,8; 9,6; 10 a 30 mg Ag/kg agaru. Další série testů byla provedena v koncentračním rozmezí v okolí hodnoty LC₅₀ odhadnuté na základě výsledků předběžného testu: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 0,8 a 1,0 mg Ag/kg agaru. Pro přípravu jedné testovací jednotky bylo třeba do Erlenmayerovy baňky převést 1 g agaru, 48 mL deionizované vody a 1 mL zásobního roztoku AgNO₃ specifické koncentrace potřebné k přípravě expozičního média o zvolené koncentraci. Tímto způsobem připravené směsi, včetně kontrolní skupiny bez přídavku testované látky, byly

na magnetických míchadlech zahřáty a udržovány při teplotě 85 ± 5 °C po dobu jedné hodiny. Po uplynutí jedné hodiny od dosažení požadované teploty byl agar za horka rozlíván do připravených Petriho misek. Z důvodu potlačení únikového chování testovacích organismů byl agar rozlíván i na víčka Petriho misek. Pro usnadnění pohybu testovacích organismů byly pomocí skalpelu v agaru po celém objemu vytvořeny vrypy. Výsledky těchto testů jsou uvedeny v kapitole 3.1.

2.4 Testy ekotoxicity dusičnanových iontů

Není důvod předpokládat, že by se na ekotoxicitě AgNO_3 významnou měrou podílely NO_3^- ionty, nicméně pro jistotu byl proveden test s NaNO_3 (p.a. PENTA s.r.o.). Ekotoxicita NO_3^- iontů byla posuzována při koncentraci NaNO_3 odpovídající 1 g NO_3^-/kg agaru. Tato koncentrace podstatně převyšuje obsah NO_3^- iontů během testů ekotoxicity AgNO_3 . Jestliže v tomto testu nebude zaznamenán vliv NO_3^- iontů na mortalitu testovacích organismů, nelze jej předpokládat ani u testů ekotoxicity Ag^+ iontů. Expoziční médium bylo připravováno shodným způsobem jako v případě testů ekotoxicity AgNO_3 . Výsledek tohoto testu je uveden v kapitole 3.2.

2.5 Testované nanočástice a jejich syntéza

Testované NPs byly syntetizovány Ing. Jakubem Opršalem podle postupů uvedených v jeho dizertační práci (2016, Univerzita Pardubice). Stručný postup syntézy obou typů testovaných NPs je uveden v kapitolách 2.5.1–2.5.2.

2.5.1 Syntéza nanočástic stříbra (AgNPs)

AgNPs byly připraveny modifikovaným Tollensovým procesem spočívajícím v redukci diaminstříbrného komplexu ($[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{NO}_3$) maltosou. Základní postup syntézy je shrnut v následujících řádcích.

V Erlenmayerově baňce o objemu 100 mL bylo smícháno 5 mL deionizované vody, 5 mL 10 mM roztoku dodecylsulfátu sodného (SDS), 10 mL 5 mM roztoku AgNO_3 , 10 mL 25 mM roztoku amoniaku, 10 mL 50 mM roztoku NaOH a 10 mL 50 mM roztoku monohydrátu D-(+)-maltosy (pro přípravu většího objemu zásobního roztoku AgNPs byly pouze navýšeny objemy výchozích látek při zachování jejich koncentrace a výše uvedených poměrů). Tato směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 30 min a vzniklý žluto-oranžový koloidní roztok byl následně pro účely odstranění supernatantu odstředován při relativní

centrifugační síle (RCF) 10 800 x g po dobu 30 min. Po uplynutí 30 min byly odstředěné NPs redispergovány v deionizované vodě. Postup promývání připravených AgNPs byl opakován z důvodu dokonalejšího odstranění supernatantu dvakrát [44]. Připravené AgNPs byly z důvodu možné fotodegradace uchovávány v tmavých lahvích .

2.5.2 Syntéza sulfidizovaných nanočástic stříbra (Ag@Ag₂S-NPs)

Postup sulfidace AgNPs byl inspirován prací Levard a kol. (2011) [45]. AgNPs byly sulfidovány pomocí 0,1 M roztoku Na₂S. Prvním krokem tohoto postupu byla příprava 1 M koloidní disperze AgNPs, která obsahovala 0,1 M NaNO₃ a 0,001 M SDS. NaNO₃ vystupuje v rámci této reakce jako elektrolyt umožňující přenos elektronů nezbytných pro průběh sulfidace. K takto připravené koloidní disperzi bylo následně za stálého míchání na magnetickém míchadle po kapkách přidáno 10 mL 0,1 M roztoku Na₂S a reakční směs byla do ukončení sulfidace míchána po dobu 24 hod. Po 24 hod byly sulfidizované AgNPs (Ag@Ag₂S-NPs) odstředěny při RCF 10 800 x g (30 min) a poté resuspendovány v deionizované vodě. Postup promývání byl opakován dvakrát [44].

2.6 Kvantifikace stříbra v připravených koloidech

Obsah stříbra v připravených koloidech (AgNPs a Ag@Ag₂S-NPs) byl kvantifikován metodou ICP-OES. 100 µL disperze NPs bylo smíseno s 400 µL koncentrované HNO₃ a takto připravená směs byla zahřívána v mikrovlnném mineralizačním zařízení Speedwave MWS-3+ (Berghof, Německo) po dobu 10 min při teplotě 230 °C a tlaku 130 bar. Po ukončení mikrovlnného rozkladu byly připravené vzorky naředěny 12 mL deionizované vody a obsah Ag byl stanoven s použitím ICP-OES (Integra XL2, GBC Austrálie). Výsledky těchto stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.

2.7 Charakterizace testovaných nanočástic

Oba typy testovaných NPs byly před započítím ekotoxikologických testů důkladně charakterizovány. Střední hydrodynamický průměr (D_H) a zeta-potenciál (ζ -potenciál) obou typů testovaných NPs byly měřeny na přístroji Zetasizer Zeta Plus (Brookhaven), pracujícím na principu dynamického rozptylu světla. Laser v tomto zařízení pracuje při vlnové délce 660 nm a jeho výkon je 35 mW. Hodnoty hydrodynamického průměru a zeta-potenciálu byly měřeny po dobu 30 s při deseti opakováních a jsou vyjadřovány jako průměrná hodnota z těchto deseti měření, včetně směrodatné odchylky (SD). D_H a ζ -potenciál byly proměřovány

po naředění zásobních roztoků primárních koloidů na koncentrace 100 (AgNPs) a 150 mg Ag/L (Ag@Ag₂S-NPs). Tato ředění byla zvolena s ohledem na maximální expoziční koncentrace v testech ekotoxicity.

Velikost testovaných NPs byla rovněž ověřována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu JSM-7500F (JEOL, Japonsko). Vzorky (zásobní roztoky primárních koloidů AgNPs a Ag@Ag₂S-NPs) pro toto měření byly nanесeny na mikroskopické sklíčko technikou odstředivého lití (spin coating) při odstředivé síle 90 x g. Tímto způsobem připravené vzorky byly následně za vakua vysušeny a pro účely zvýšení vodivosti povrchu vzorku pozlaceny. Vlastní měření probíhalo při urychlovacím napětí 5 kV.

Na snímcích pořízených SEM nebyly mezi testovanými NPs pozorovány výrazné rozdíly a tloušťku vrstvy Ag₂S v případě Ag@Ag₂S-NPs nebylo možné pomocí těchto snímků stanovit. Z těchto důvodů byla provedena XRD analýza s využitím difraktometru Bruker D8 (Bruker, Německo) vybaveného zdrojem CuK α záření. Příprava vzorků pro tuto analýzu spočívala v prostém nanесení malé kapky zásobního roztoku AgNPs popř. Ag@Ag₂S-NPs na mikroskopické sklíčko, přičemž tyto vzorky byly ponechány volně schnout v exsikátoru po dobu 4 dnů. Pro fázovou analýzu testovaných NPs byla na získaná data aplikována Rietveldova metoda, jejíž podstatou je optimalizace krystalické struktury pro nejlepší shodu mezi simulovanými a experimentálními záznamy [46]. Velikost krystalitů byla v případě Ag@Ag₂S-NPs stanovena pomocí Scherrerovy aproximace [47].

Topografie AgNPs a Ag@Ag₂S-NPs byla ověřována prostřednictvím mikroskopie atomárních sil (AFM) na přístroji Solver Pro M (NT-MDT, Rusko) pomocí sondy HA_NC (rezonanční frekvence 185 kHz, $k = 4.6 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$) v semikontaktním modu nastaveném na 40 % volné oscilace. Vzorky byly připraveny technikou odstředivého lití při odstředivé síle 15 x g na čerstvě připravený HOPG (vysoce orientovaný pyrolytický grafit) a za vakua vysušeny.

Výsledky charakterizace obou typů testovaných NPs jsou shrnuty v kapitole 3.4.

2.8 Chování testovaných nanočástic během přípravy expozičního média

Experimentálně bylo ověřováno, zdali má zahřívání koloidního roztoku AgNPs popř. Ag@Ag₂S-NPs vliv na tvorbu aglomerátů. K zahřívání dochází během přípravy expozičního média agar–AgNPs popř. agar–Ag@Ag₂S-NPs, kdy je koloidní roztok těchto částic přikápáván po dobu 15 min do agaru zahřátého na teplotu $85 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$. Tvorba aglomerátů je předpokládána především při vyšších koncentracích NPs v agaru. Pro oba typy testovaných NPs byly tedy připraveny vždy dva roztoky o maximální expoziční koncentraci (pro AgNPs

100 mg Ag/L; pro Ag@Ag₂S-NPs 150 mg Ag/L), přičemž jeden byl vždy zahříván na teplotu 85 ±5 °C po dobu 15 min a druhý nikoliv. Následně byl u těchto roztoků měřen hydrodynamický průměr částic na přístroji Zetasizer Zeta Plus (Brookhaven).

Po tomto experimentu byly stejné roztoky podrobeny centrifugaci při RCF 11 000 x g po dobu 99 min. Po uplynutí této doby bylo pomocí ICP-OES stanoveno množství uvolněných Ag⁺ iontů. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zdali během přípravy expozičního média nedochází vlivem zahřívání koloidních roztoků NPs k uvolňování významného množství Ag⁺ iontů. Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny v kapitole 3.5.

2.9 Testy ekotoxicity nanočástic stříbra (AgNPs)

Jelikož v odborné literatuře nebyly nalezeny žádné informace vztahující se k testům ekotoxicity AgNPs v agaru s využitím kroužkovců jako modelových organismů, bylo obtížné určit vhodné rozmezí koncentrací AgNPs pro stanovení hodnoty LC₅₀ v rámci testu akutní ekotoxicity. Na základě dřívějších zkušeností získaných při provádění daného typu testu na ZnO-NPs byl učiněn předpoklad, že hodnota LC₅₀ zjištěná v agaru bude výrazně nižší, než hodnota zjištěná v půdě a naopak vyšší než hodnota zjištěná při testech na vodních organismech. Pro pilotní experiment byla tedy nakonec zvolena koncentrace AgNPs odpovídající 50 mg Ag/kg agaru. Tato koncentrace byla zvolena s přihlédnutím k informacím dostupným v práci Coll a kol. (2016), o které je pojednáváno v teoretické části této diplomové práce (kapitola 1.7). Klíčovou informací pro rozhodování při volbě testované koncentrace AgNPs byla hodnota NOEC určená pro roupici druhu *Enchytraeus albidus*, která činila 100 mg Ag/kg půdy [36]. Protože během pilotního experimentu nebyla pozorována zvýšená mortalita testovacích organismů v porovnání s kontrolní skupinou, byl následně proveden experiment s dvojnásobnou koncentrací AgNPs – tedy 100 mg Ag/kg agaru.

Postup přípravy expozičního média spočíval v postupném přikapávání zásobního roztoku AgNPs specifické koncentrace do míchaného agaru zahřátého na teplotu 85 ±5 °C po dobu 15 min. Stručný postup přípravy expozičního média je shrnut v následujícím odstavci.

Pro přípravu jedné testovací jednotky bylo nutné do Erlenmayerovy baňky převést odpovídající množství agaru (1 g) a objem deionizované vody (19 mL), přičemž tato směs byla zahřáta na teplotu 85 ±5 °C. Po uplynutí 45 min od dosažení této teploty byla do agaru po kapkách přidávána vodná disperze AgNPs (30 mL) koncentrace potřebné pro přípravu expozičního média testované koncentrace. Postup rozlévání, vytvoření vrypů do expozičního média, stejně jako počet testovacích organismů (20 jedinců v jedné testovací jednotce) byly

shodné s testy ekotoxicity Ag^+ iontů (kapitola 2.3). Testy byly provedeny vždy ve třech replikách. Výsledky těchto testů jsou shrnuty v kapitole 3.6.

2.10 Testy ekotoxicity sulfidizovaných nanočástic stříbra ($\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$ -NPs)

Při posuzování ekotoxicity $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$ -NPs byl na základě výsledků testů s AgNPs proveden pouze test při koncentraci $\text{Ag}@\text{Ag}_2\text{S}$ -NPs odpovídající 150 mg Ag/kg agaru. Tento test byl proveden dvakrát při použití tří replik v každém z nich. Expoziční médium bylo připravováno obdobným způsobem jako v případě testů ekotoxicity AgNPs (kapitola 2.9). Výsledky těchto testů jsou uvedeny v kapitole 3.7.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Testy ekotoxicity stříbrných iontů

Výsledky testů ekotoxicity Ag^+ iontů pro roupiče jsou shrnuty v **tab. 7**.

Tabulka 7 – Mortalita testovacích organismů (*E. crypticus*) vůči kontrolní skupině [%] v závislosti na testované koncentraci rozpustné formy Ag (AgNO_3) – hodnoty průměru a SD vypočteny ze třech replik

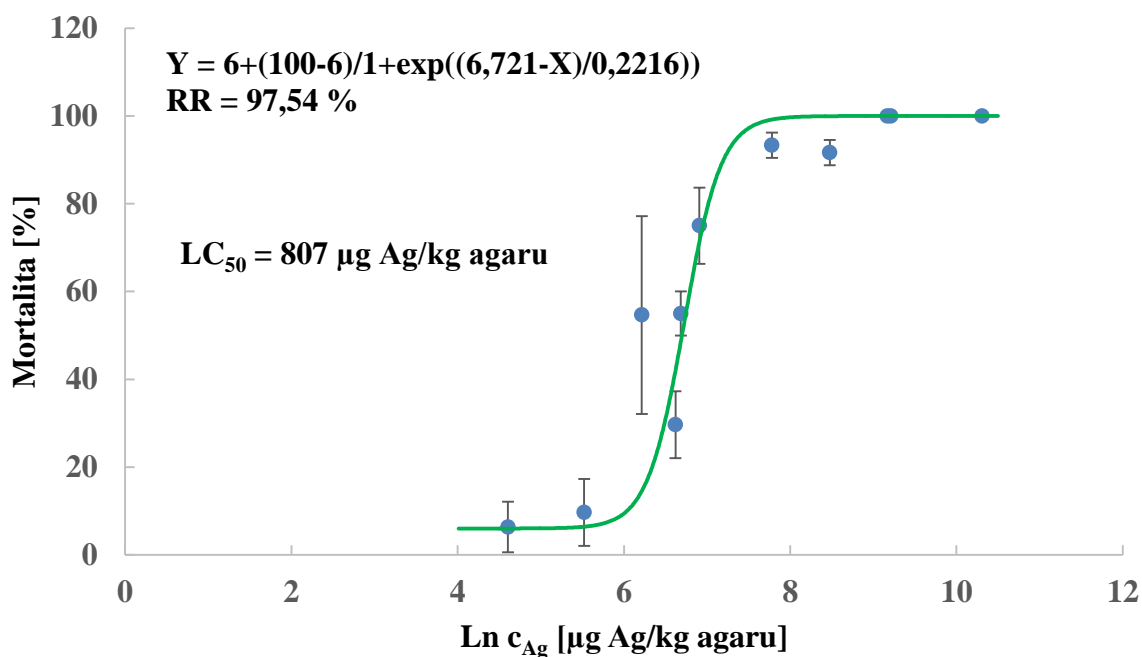
Testovaná koncentrace [mg Ag/kg agaru]	Průměrná mortalita [%] vůči kontrolní skupině	SD [%]
0,10	6,33	5,77
0,25	9,67	7,64
0,50	54,67	22,55
0,75	29,67	7,64
0,80	55,00	5,00
1,00	75,00	8,66
2,40	93,33	2,89
4,80	91,67	2,89
9,60	100,00	0,00
10,00	100,00	0,00
30,00	100,00	0,00

Hodnota LC_{50} byla vypočtena na základě výše uvedených dat s použitím nelineární regrese a Boltzmannova modelu:

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

Rovnice 1 – Boltzmannův model

kde y je procentuální úmrtnost vůči kontrolní skupině, x je \ln dávky Ag, parametr P_1 představuje inflexní bod (hodnota LC_{50}) a parametr P_2 směrnici křivky. Během testů byla v kontrolní skupině zaznamenána mírná úmrtnost nepřesahující 10 %, což obecně splňuje validační kritéria uváděná v mezinárodních směrnících určených pro testování ekotoxických účinků chemikálií na kroužkovicích (např. OECD 207, 220 a ISO 16387). S využitím výše uvedených dat byla sestrojena křivka dávka-účinek (**graf 1**). Vysoká hodnota regresního rabatu poukazuje na vhodnost použitého regresního modelu. S využitím získaných dat byla vypočtena pro *E. crypticus* hodnota LC_{50} 0,807 mg Ag/kg agaru.



Graf 1 – Křivka dávka-účinek pro *E. crypticus*, 96 hod expozice AgNO₃

V dostupné odborné literatuře je poměrně obtížné najít dostatek relevantních informací týkajících se akutní toxicity rozpustné formy stříbra pro půdní bezobratlé. Z tohoto důvodu budou v následujících odstavcích uvedeny výsledky vybraných studií vyšetřujících jak akutní, tak chronickou toxicitu rozpustné formy stříbra pro půdní bezobratlé.

Například v práci Topuz a kol. (2015) posuzovali ekotoxické účinky AgNO₃ na roupici druhu *Enchytraeus crypticus* s využitím předupraveného křemenného písku (zbaveného reziduí na bázi organického uhlíku) jako expozičního média. Hodnoty LC₅₀ pro dvoudenní a desetidenní expozici AgNO₃ (vztaženo ke koncentracím Ag ve vodné fázi expozičního média) byly v této práci 0,15 mg Ag/L (dvoudenní expozice) a 0,07 mg Ag/L (desetidenní expozice) [37]. V práci Bicho a kol. (2016) hodnotili ekotoxické účinky AgNO₃ rovněž na roupici druhu *Enchytraeus crypticus*, přičemž jako expoziční médium zde byla použita standardní přírodní půda LUFA 2.2. Hodnota LC₅₀ (třítydenní expozice) byla v této práci 75 mg Ag/kg suché váhy půdy [48]. V práci Kim a kol. (2012) testovali ekotoxicitu AgNO₃ na háďátku druhu *Caenorhabditis elegans* v tzv. NGM médiu (růstové médium pro kultivaci nematod na bázi agaru). Zde byla hodnota LC₅₀ (jednodenní expozice) 22 mg Ag/L NGM média [49]. V práci Diez-Ortiz a kol. (2015) posuzovali ekotoxicitu AgNO₃ na žížale druhu *Eisenia fetida* s využitím standardní přírodní půdy LUFA 2.2 jako expozičního média. Ekotoxické účinky AgNO₃ byly v této práci posuzovány v různých časových bodech (po 1, 9, 30 a 52 týdnech expozice). Zde uvedené hodnoty LC₅₀ byly 276 mg Ag/kg suché váhy půdy

(jednotýdenní expozice), 319 mg Ag/kg suché váhy půdy (devítitýdenní expozice), 682 mg Ag/kg suchá váhy půdy (třicetitýdenní expozice) a 722 mg Ag/kg suché váhy půdy (padesátidvoutýdenní expozice) [50]. V práci Kwak a kol. (2014) testovali ekotoxicitu AgNO₃ na žížale druhu *Eisenia andrei*. Jako expoziční médium zde autoři použili OECD uměle připravenou půdu. Hodnota LC₅₀ (sedmidenní expozice) byla v tomto případě 530 mg Ag/kg suché váhy půdy [51]. Pro lepší porovnání budou v následujícím odstavci uvedeny i výsledky vybraných studií, které byly realizovány v akvatickém prostředí.

Například v práci Williams a kol. (1990) posuzovali ekotoxicitu AgNO₃ na háďátku druhu *Caenorhabditis elegans* v tzv. K⁺ médiu (médium složené z deionizované a destilované vody se specifickou koncentrací Na⁺ a K⁺ iontů přidávaných ve formě NaCl a KCl). Hodnoty LC₅₀, stanovené opět v různých časových bodech byly 5 mg Ag/L expozičního média (jednodenní expozice), 2 mg Ag/L expozičního média (dvoudenní expozice), 1 mg Ag/L expozičního média (třídenní expozice) a 0,1 mg Ag/L expozičního média (čtyřdenní expozice). V této práci rovněž stojí za povšimnutí tabulka porovnávající ekotoxicitu rozpustné formy vybraných těžkých kovů (Hg, Cu, Be, Al, Pb, Zn, Cd a Sr) pro totožný organismus (*Caenorhabditis elegans*) v akvatickém prostředí (K⁺ médium) a v agaru. Z tabulky je jasné patrná mnohonásobně vyšší toxicita testovaných látek v akvatickém prostředí. Například u Hg²⁺ iontů (testováno ve formě HgCl₂) byla 24 hodinová hodnota LC₅₀ stanovena na 10 mg Hg/L expozičního média, kdežto u agaru byla tato hodnota desetinásobně vyšší (100 mg Hg/L agaru). U Cu²⁺ iontů (testováno ve formě CuCl₂·2H₂O) byla hodnota 24 hodinové LC₅₀ v akvatickém prostředí 22 mg Cu/L expozičního média, zatímco v agaru byla totožná hodnota stanovena na 170 mg Cu/L expozičního média [52]. V práci Kennedy a kol. (2010) hodnotili ekotoxicitu AgNO₃ na hrotnatce druhu *Daphnia magna* v rekonstituované vodě střední tvrdosti (obsah solí do 80 mg/L, vyjadřováno jako CaCO₃). Průměrná hodnota LC₅₀ (vztaženo k celkové koncentraci Ag v expozičním médiu) byla v této práci stanovena na 0,0012 mg Ag/L expozičního média (dvoudenní expozice) [53]. V práci Erickson a kol. (1998) rovněž posuzují ekotoxicitu AgNO₃ na hrotnatce druhu *Daphnia magna* s využitím dvou typů expozičního média (uměle připravená laboratorní voda a reálná voda odebraná z řeky Saint Louis). Oba typy použitých vod se významným způsobem lišily v jejich vlastnostech (např. rozdílné pH; tvrdost; alkalita; koncentrace Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, Cl⁻, SO₄²⁻ iontů a celkový obsah organického uhlíku). Hodnoty LC₅₀ (96 hodinová expozice) byly v této práci stanoveny na 0,00058 mg Ag/L (uměle připravená laboratorní voda) a 0,035 mg Ag/L (voda z řeky Saint Louis) [54]. Výše uvedené informace jsou v přehledné formě shrnuty v následující **tab. 8**.

Tabulka 8 – Hodnoty LC_{50} pro vybrané terestrické a akvatické organismy ($AgNO_3$); hodnota LC_{50} zjištěná v rámci této práce je zvýrazněna zelenou barvou

Terestrické prostředí

Testovací organismus	Doba expozice [dny]	LC_{50}	Zdroj
<i>Enchytraeus crypticus</i>	4	0,807 mg Ag/kg agaru	Vlastní
<i>Enchytraeus crypticus</i>	2	0,15 mg Ag/L vodné fáze expoz. média	[37]
	10	0,07 mg Ag/L vodné fáze expoz. média	
<i>Enchytraeus crypticus</i>	21	75 (66–84) mg Ag/kg suché váhy půdy	[48]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	1	22 (11–46) mg Ag/L NGM média	[49]
<i>Eisenia fetida</i>	7	276 mg Ag/kg suché váhy půdy	[50]
	63	319 (162–475) mg Ag/kg suché váhy půdy	
	210	682 mg Ag/kg suchá váhy půdy	
	365	722 (598–848) mg Ag/kg suché váhy půdy	
<i>Eisenia andrei</i>	7	530 (400–700) mg Ag/kg suché váhy půdy	[51]

Akvatické prostředí

Testovací organismus	Doba expozice [dny]	LC_{50}	Zdroj
<i>Caenorhabditis elegans</i>	1	5 (3–10) mg Ag/L K^+ média	[52]
	2	2 (1–10) mg Ag/L K^+ média	
	3	1 (1–7) mg Ag/L K^+ média	
	4	0,1 (0,01–4,98) mg Ag/L K^+ média	
<i>Daphnia magna</i>	2	0,0012 mg Ag/L expozičního média	[53]
<i>Daphnia magna</i>	4	0,00058 (0,00056–0,00061) mg Ag/L modelové vody	[54]
	4	0,035 (0,032–0,039) mg Ag/L reálné říční vody	

Na základě diskutovaných výsledků lze dospět k závěru, že ekotoxicita rozpustné formy stříbra významnou měrou závisí na typu použitého expozičního média a jeho fyzikálně-chemických parametrech. Například u háďátka druhu *Caenorhabditis elegans* byla ve výše citované práci Kim a kol. (2012) hodnota LC_{50} pro jednodenní expozici stanovena na 22 mg Ag/L NGM média [49], zatímco v práci Williams a kol. (1990), kde testovali ekotoxicitu rozpustné formy stříbra ve vodném prostředí, byla obdobná hodnota stanovena na 5 mg Ag/L K^+ média [52]. Na základě osobních poznatků a informací dostupných v odborné literatuře lze předpokládat, že ekotoxicita testovaných látek klesá v závislosti na typu použitého expozičního média následovně: **vodné prostředí > agar > půda**.

3.2 Testy ekotoxicity dusičnanových iontů

Test NO_3^- iontů (1 g NO_3^- /kg agaru) vyšel dle předběžných předpokladů negativně (nebyl zaznamenán vliv na mortalitu testovacích organismů). Na základě tohoto výsledku lze dospět k závěru, že ani při nejvyšší testované koncentraci $AgNO_3$ (30 mg Ag/kg agaru), která odpovídá 17,2 mg NO_3^- /kg agaru, nelze předpokládat, že by se na výsledné ekotoxicitě podílely NO_3^- ionty. Z tohoto důvodu bude výsledek tohoto testu považován za výsledek konečný a není nutné se dále zabývat ekotoxicitou NO_3^- iontů, která je patrně velmi nízká.

3.3 Kvantifikace stříbra v připravených koloidech

Koncentrace zásobních roztoků, vyjádřené jako průměrné hodnoty získané ze tří stanovení, činily 348,2 mg Ag/L (AgNPs) a 215,8 mg Ag/L (Ag@Ag₂S-NPs).

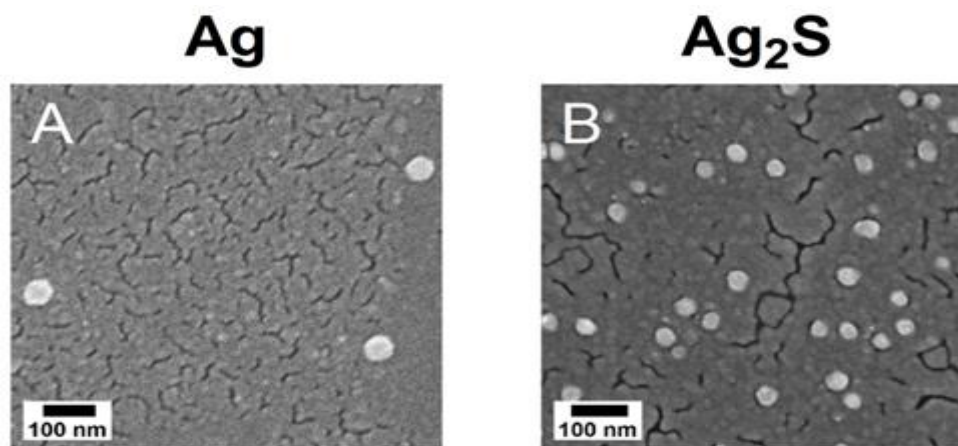
3.4 Charakterizace testovaných nanočástic

Hydrodynamické průměry a zeta-potenciály naměřené u připravených vzorků koloidních roztoků AgNPs (100 mg Ag/L) a Ag@Ag₂S-NPs (150 mg Ag/L) jsou uvedeny v **tab. 9**. Vzorek koloidního roztoku AgNPs, proměřený 15 min po jeho přípravě, vykazoval průměrnou hodnotu hydrodynamického průměru $48,5 \pm 0,6$ nm. U vzorku Ag@Ag₂S-NPs byla obdobná hodnota stanovena na $59,3 \pm 1,5$ nm. Zeta-potenciál byl negativní pro oba typy NPs, přičemž AgNPs vykazovaly vyšší agregační stabilitu.

Tabulka 9 – Hodnoty hydrodynamického průměru (D_H) a zeta-potenciálu (ζ -potenciál) naměřené u vzorků AgNPs (100 mg Ag/L) a Ag@Ag₂S-NPs (150 mg Ag/L); hodnoty D_H a ζ -potenciálu jsou vyjadřovány jako průměrná hodnota získaná z deseti opakování

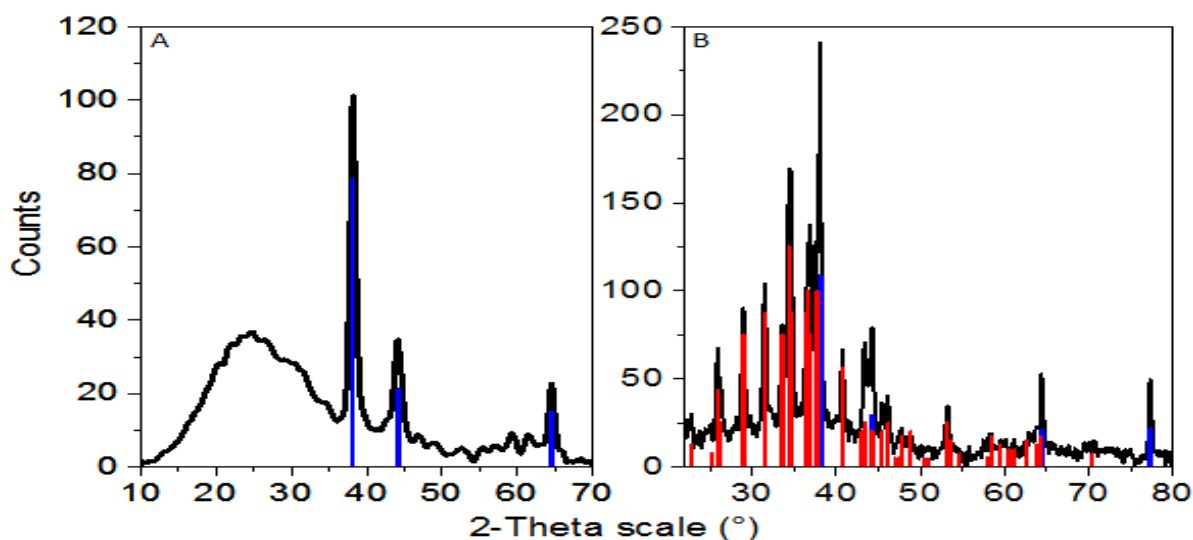
Nanočástice	D_H [nm]	SD	ζ -potenciál [mV]	SD
AgNPs	48,5	0,6	-22,6	5,63
Ag@Ag ₂ S-NPs	59,3	1,5	-11,67	1,35

Snímky obou typů testovaných NPs pořízené SEM jsou uvedeny na **obr. 26**. Na základě uvedených snímků lze konstatovat, že oba typy testovaných NPs mají přibližně stejnou velikost s průměrem pohybujícím se okolo 50 nm. Na snímcích nebyly mezi testovanými NPs pozorovány výrazné rozdíly ve velikosti, tvaru, tvorbě mostů (Ag₂S může mezi AgNPs vytvářet mosty) popř. aglomerátů a NPs byly rozptýleny na substrátu (mikroskopické sklíčko) homogenně.



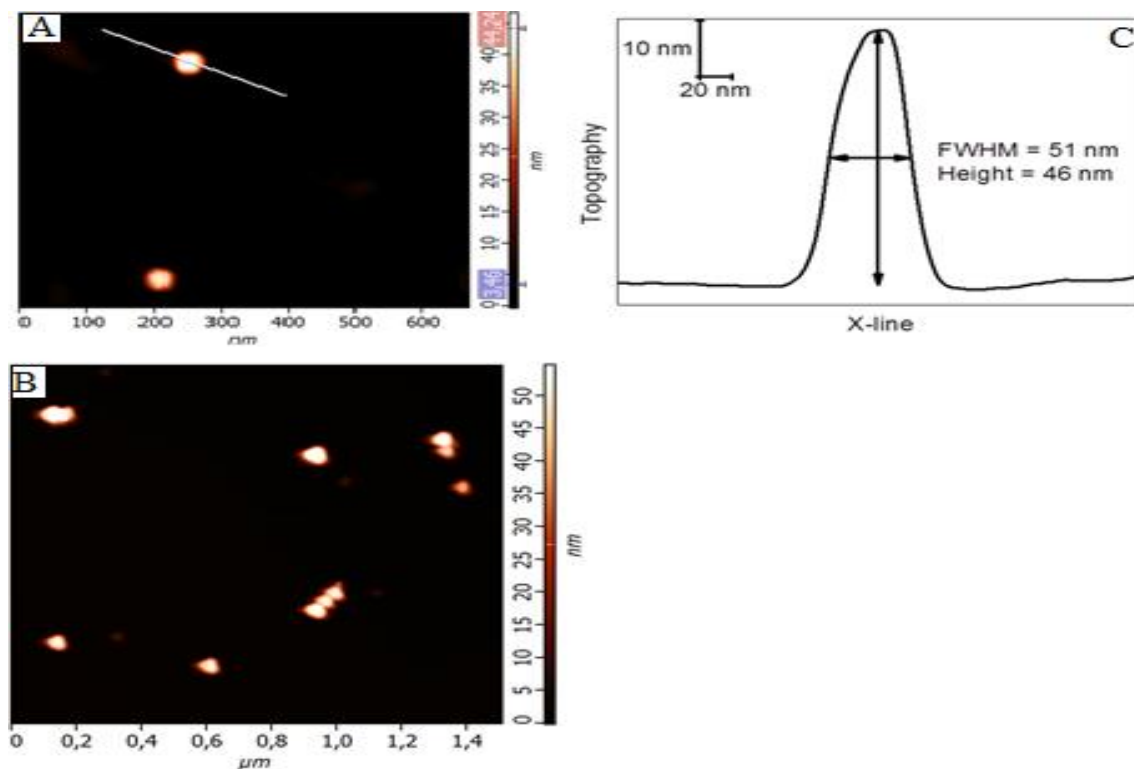
Obrázek 26 – SEM snímky AgNPs (A) a Ag@Ag₂S-NPs (B); měřítko (100 nm) je zobrazeno v levé dolní části obou snímků

Difrakční záznamy obou typů testovaných NPs jsou uvedeny na **obr. 27**. Na základě Rietveldovy analýzy získaných dat byla u AgNPs prokázána kubická struktura stříbra, zatímco u Ag@Ag₂S-NPs byla prokázána mimo kubické struktury stříbra (jádro) rovněž akantitová jednoklonná struktura v případě Ag₂S („slupka“). Z difrakčního záznamu Ag@Ag₂S-NPs byla pomocí Scherrerovy aproximace stanovena průměrná velikost jádra na 30,7 nm a průměrná velikost „slupky“ tvořené Ag₂S na 18 nm.



Obrázek 27 – Difrakční záznamy vzorků AgNPs (A) a Ag@Ag₂S-NPs (B); modrá linie představuje kubickou strukturu stříbra, červená linie představuje akantitovou jednoklonnou strukturu Ag₂S

Topografické snímky obou typů testovaných NPs pořízené pomocí AFM jsou uvedeny na **obr. 28a, b**. Oba typy testovaných NPs byly dle pořízených snímků sférického tvaru. Topografický profil jedné nanočástice stříbra s výškou 46 nm a průměrem 51 nm v polovině této výšky je uveden na **obr. 28c**. U Ag@Ag₂S-NPs byla stanovena výška ve velikostním rozmezí 45–55 nm s průměrem 55–65 nm v polovině jejich maximální výšky.



Obrázek 28 – Topografické snímky testovaných AgNPs (A) a Ag@Ag₂S-NPs (B) a topografický profil jedné nanočástice stříbra (C)

3.5 Chování testovaných nanočástic během přípravy expozičního média

V rámci doprovodných experimentů bylo zjištěno, že zahřívání koloidního roztoku AgNPs popř. Ag@Ag₂S-NPs na teplotu 85 ±5 °C po dobu 15 min (doba, po kterou jsou testované NPs zahřívány během přípravy expozičního média) nemá významný vliv na hodnotu hydrodynamického průměru částic. U nezahřívání roztoku AgNPs o koncentraci 100 mg Ag/L (maximální expoziční koncentrace u AgNPs) byla naměřena hodnota hydrodynamického průměru částic 48,5 ±0,6 nm, přičemž u zahřívání roztoku byla tato hodnota 49,6 ±0,4 nm. Podobného výsledku bylo dosaženo i u roztoku Ag@Ag₂S-NPs o koncentraci 150 mg Ag/L (maximální expoziční koncentrace u Ag@Ag₂S-NPs). U nezahřívání roztoku Ag@Ag₂S-NPs byla naměřena hodnota hydrodynamického průměru částic 59,3 ±1,5 nm a u zahřívání roztoku byla tato hodnota 61,9 ±2,7 nm. Výše uvedené výsledky jsou shrnuty v **tab. 10**.

Tabulka 10 – Hodnoty hydrodynamického průměru částic (D_H) naměřené u roztoků AgNPs (100 mg Ag/L) a Ag@Ag₂S-NPs (150 mg Ag/L) před a po zahřívání na teplotu 85 ±5 °C po dobu 15 min; hodnoty D_H jsou vyjadřovány jako průměrná hodnota získaná z deseti opakování

Nanočástice	Nezahřívání roztok		Zahřívání roztok	
	D_H [nm]	SD	D_H [nm]	SD
AgNPs	48,5	0,6	49,6	0,4
Ag@Ag ₂ S-NPs	59,3	1,5	61,9	2,7

Dále bylo experimentálně ověřováno, jaké množství Ag⁺ iontů se může uvolnit během přípravy expozičního média. Roztok AgNPs o koncentraci 100 mg Ag/L, který byl podroben zahřívání na teplotu 85 ±5 °C po dobu 15 min a následně centrifugován při odstředivé síle 11 000 x g (99 min), uvolnil 1,3 mg/L Ag⁺ iontů, což odpovídá 1,3 % původního množství Ag přítomného v takto zahřívání roztoku. U nezahřívání roztoku totožné koncentrace bylo množství uvolněných Ag⁺ iontů pod detekčním limitem použité analytické metody (< 0,01 mg Ag/L). Obdobným způsobem byla ověřována možnost uvolňování Ag⁺ iontů u roztoků Ag@Ag₂S-NPs o koncentraci 150 mg Ag/L. U obou roztoků (zahřívání a nezahřívání) bylo množství uvolněných Ag⁺ iontů v supernatantu pod detekčním limitem použité analytické metody (< 0,01 mg Ag/L). U roztoku Ag@Ag₂S-NPs se uvolňování Ag⁺ iontů z testovaných NPs nepředpokládá vzhledem k přítomnosti síry, která by měla s případně uvolněnými Ag⁺ ionty vytvářet Ag₂S.

3.6 Testy ekotoxicity nanočástic stříbra (AgNPs)

Výsledky obou provedených testů ekotoxicity AgNPs pro roupice jsou shrnuty v **tab. 11**.

Tabulka 11 – Mortalita testovacích organismů (*E. crypticus*) vůči kontrolní skupině [%] v závislosti na testované koncentraci AgNPs – hodnoty průměru a SD vypočteny ze třech replik

Testovaná koncentrace [mg Ag/kg agaru]	Průměrná mortalita vůči kontrolní skupině [%]	SD [%]
50,00	5,00	0,00
100,00	11,67	5,77

V rámci testovaných koncentrací byla zaznamenána jen velmi slabá odezva modelových organismů. Při maximální testované expoziční koncentraci bylo dosaženo pouze 11,67% mortality. Na základě těchto informací lze učinit závěr, že ekotoxicita AgNPs je v použitém expozičním médiu mnohonásobně nižší, než jak je tomu v případě rozpustné formy stříbra (AgNO_3) a hodnota LC_{50} se nachází vysoko nad maximální testovanou expoziční koncentrací ($\text{LC}_{50} \gg 100$ mg Ag/kg agaru). Pro konstrukci křivky dávka-účinek v celém jejím rozsahu by bylo potřeba připravit mnohem koncentrovanější primární koloid, což se ani při použití koncentračních technik (centrifugace) nedařilo, jelikož při vyšších koncentracích primárních koloidů docházelo k nárůstu velikosti testovaných NPs v důsledku jejich aglomerace. V souladu s touto skutečností lze rovněž dospět k závěru, že takto koncipované testy využívající agar jako expoziční médium jsou vhodné spíše pro testování práškové formy NPs, u kterých jsme schopni dosáhnout vyšších expozičních koncentrací nebo je třeba navržený postup modifikovat pro testy chronické ekotoxicity s jinými endpointy (např. různé biochemické markery oxidativní stresu, reprodukce atd.), což vzhledem k nedostatečnému technickému vybavení laboratoří nebylo možné. V následujících odstavcích budou uvedeny výsledky vybraných studií vyšetřujících akutní a chronickou toxicitu AgNPs pro půdní bezobratlé.

V práci Bicho a kol. (2016) posuzovali ekotoxicitu AgNPs (NM300K, 17 ± 8 nm) na roupici druhu *Enchytraeus crypticus* v přírodní standardní půdě LUFA 2.2. Hodnota LC_{50} (třítýdenní expozice), uvedená v této práci, byla 657 mg Ag/kg suché váhy půdy [48]. V práci Gomes a kol. (2013) posuzovali ekotoxicitu AgNPs-PVP (velikost dle poskytovatele 30–50 nm; charakterizace pomocí TEM: 82 ± 2 nm; charakterizace pomocí DLS: 235 ± 4 nm) na roupici druhu *Enchytraeus albidus* s využitím OECD umělé půdy jako expozičního média. Autoři této práce nezaznamenali u testovaných AgNPs-PVP významný vliv

na mortalitu ani při nejvyšší testované expoziční koncentraci a hodnota LC₅₀ (šestitýdenní expozice) se nacházela vysoko nad 1 000 mg Ag/kg suché váhy půdy [55]. V práci Diez-Ortiz a kol. (2015) hodnotili ekotoxické účinky AgNPs (převážná část sférické částice ve velikostním rozmezí 50–80 nm) na žížale druhu *Eisenia fetida* s využitím přírodní standardní půdy LUFA 2.2 jako expozičního média. Hodnoty LC₅₀ byly v této práci stanoveny na >> 4 395 mg Ag/kg suché váhy půdy (pro jednotýdenní, devítitýdenní a třicetitýdenní expozici) a 4 504 mg Ag/kg suché váhy půdy (padesátidvoutýdenní expozice) [50]. V práci Kwak a kol. (2014) uvádí, že hodnota LC₅₀ (sedmidenní expozice) pro žížalu druhu *Eisenia andrei* se v OECD artificiální půdě u testovaných AgNPs-Cit (průměrná velikost částic dle poskytovatele 9,9 nm; hydrodynamický průměr částic stanoven autory této práce na 50,6 nm) nachází vysoko nad maximální testovanou expoziční koncentrací (LC₅₀ >> 2 000 mg Ag/kg suché váhy půdy) [51]. V práci Khalil a kol. (2016) testovali ekotoxicitu AgNPs (charakterizace pomocí TEM: 77,14 ±19,32 nm) na žížale druhu *Aporrectodea caliginosa* v OECD artificiálním půdním substrátu. Ani v této práci nebyl zaznamenán významný vliv expozice AgNPs na mortalitu testovacích organismů a hodnota LC₅₀ (čtyřdenní expozice) se opět nacházela vysoko nad 1 000 mg Ag/kg suché váhy půdy [56]. V práci Kim a kol. (2012) vyšetřovali ekotoxicitu AgNPs-Cit (hydrodynamický průměr částic 50,6 nm) na háďátku druhu *Caenorhabditis elegans* v již zmiňovaném médiu pro kultivaci nematod (NGM médium), které se svými vlastnostmi podobá agaru. Hodnota LC₅₀ (jednodenní expozice) byla v této práci stanovena na 55 mg Ag/L NGM média [49].

Stejně jako v případě kapitoly 3.3 (Testy ekotoxicity Ag⁺ iontů) budou i zde uvedeny výsledky vybraných studií vyšetřujících ekotoxicitu AgNPs v akvatickém prostředí. Z důvodu nedostatku dat vztahujících se k ekotoxicitě AgNPs pro půdní organismy ve vodním prostředí budou uvedeny pro představu alespoň výsledky vybraných studií vyšetřujících ekotoxicitu AgNPs pro akvatické organismy.

V práci Griffitt a kol. (2008) se zabývali ekotoxickými účinky AgNPs (velikost dle poskytovatele 30–50 nm; charakterize pomocí TEM: 26,6 ±8,8 nm) pro dánío pruhované (*Danio rerio*) a hrotnatku obecnou (*Daphnia pulex*). V této práci použité expoziční médium vykazovalo následující vlastnosti: koncentrace rozpuštěného kyslíku 8,5–8,9 mg/L; pH = 8,2 ±1; tvrdost 142 mg/L (vyjadřováno jako mg CaCO₃); vodivost 395 μS; koncentrace amoniaku nižší než 0,5 mg/L. Hodnoty LC₅₀, uvedené v této práci, byly pro *Danio rerio* 7,07 mg Ag/L (dvoudenní expozice) a pro *Daphnia pulex* 0,04 mg Ag/L (dvoudenní expozice) [57]. V práci Zhao a kol. (2011) posuzují ekotoxicitu AgNPs (charakterizace pomocí TEM: 20 nm; charakterizace pomocí DLS: 40–50 nm) na hrotnatce druhu *Daphnia*

magna, přičemž jako expoziční médium zde používají tzv. M7 médium (artifciální voda obsahující specifické koncentrace CaCl_2 , MgSO_4 , K_2HPO_4 , NaNO_3 , NaHCO_3 , Na_2SiO_3 , H_3BO_3 , KCl a KH_2PO_4). V rámci dvoudenní expozice nebyl pozorován vliv AgNPs na mortalitu testovacích organismů ani při maximální testované koncentraci (0,5 mg Ag/L), tudíž i hodnota LC_{50} se v tomto případě nachází vysoko nad touto koncentrací [58]. Výše uvedené hodnoty LC_{50} jsou shrnuty v následující **tab. 12**.

Tabulka 12 – Hodnoty LC_{50} pro vybrané terestrické a akvatické organismy (AgNPs); hodnota LC_{50} zjištěná v rámci této práce je zvýrazněna zelenou barvou

Terestrické prostředí

Testovací organismus	Doba expozice [dny]	LC_{50}	Zdroj
<i>Enchytraeus crypticus</i>	4	>> 100 mg Ag/kg agaru	Vlastní
<i>Enchytraeus crypticus</i>	21	657 (578–735) mg Ag/kg suché váhy půdy AgNPs: 17 ±8 nm	[48]
<i>Enchytraeus albidus</i>	42	>> 1 000 mg Ag/kg suché váhy půdy AgNPs-PVP: 30–50 nm	[55]
<i>Eisenia fetida</i>	7	>> 4 395 mg Ag/kg suché váhy půdy	[50]
	63	>> 4 395 mg Ag/kg suché váhy půdy	
	210	>> 4 395 mg Ag/kg suché váhy půdy	
	365	4 504 (1 342–7 666) mg Ag/kg suché váhy půdy AgNPs: 50–80 nm	
<i>Eisenia andrei</i>	7	>> 2 000 mg Ag/kg suché váhy půdy AgNPs-Cit: 9,9 nm (dle poskytovatele)	[51]
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	4	>> 1 000 mg Ag/kg suché váhy půdy AgNPs: 77,14 ±19,32 nm (TEM)	[56]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	1	55 (29–105) mg Ag/L NGM média AgNPs-Cit: 50,6 nm (DLS)	[49]

Akvatické prostředí

Testovací organismus	Doba expozice [dny]	LC_{50}	Zdroj
<i>Danio rerio</i>	2	7,07 (6,04–8,28) mg Ag/L	[57]
<i>Daphnia pulex</i>	2	0,04 (0,03–0,05) mg Ag/L AgNPs: 30–50 nm (dle poskytovatele)	
<i>Daphnia magna</i>	2	>> 0,5 mg Ag/L AgNPs: 20 nm (TEM); 40–50 nm (DLS)	[58]

Na základě výše uvedených dat a výsledků provedených testů ekotoxicity AgNPs lze učinit závěr, že akutní ekotoxicita těchto částic není s ohledem na jejich environmentálně relevantní koncentrace v půdách významná a účelnější by bylo použití citlivějších ekotoxikologických endpointů (např. reprodukce, biochemické markery oxidativního stresu, poškození DNA atd.).

V případě dalšího výzkumu v této oblasti by bylo vhodné provést porovnání ekotoxicity různých druhů NPs v odlišných typech půd (např. OECD uměle vytvořená půda a přírodní standardní půda LUFA 2.2.) a v agaru. Toto porovnání by mohlo s využitím vhodného matematického modelování umožnit vyvinout rychlou metodu pro stanovení a přepočítání akutní toxicity testovaných NPs v agaru na různá expoziční média.

3.7 Testy ekotoxicity sulfidovaných nanočástic stříbra (Ag@Ag₂S-NPs)

Výsledky obou provedených testů ekotoxicity Ag@Ag₂S-NPs pro roupiče jsou shrnuty v **tab. 13**.

Tabulka 13 – Mortalita testovacích organismů (*E. crypticus*) vůči kontrolní skupině [%] zaznamenaná po 96 hod expoziční Ag@Ag₂S-NPs v agaru (koncentrace 150 mg Ag/kg agaru) – hodnoty průměru a SD vypočteny ze třech replik

Testovaná koncentrace [mg Ag/kg agaru]	Průměrná mortalita vůči kontrolní skupině [%]	SD [%]
150	3,33	5,77
150	5,00	8,66

Z uvedených výsledků je patrné, že při koncentraci 150 mg Ag/kg agaru bylo v rámci dvou provedených testů (každý test tři repliky) dosaženo maximální průměrné mortality 5 %, přičemž tato mortalita nemusí být důsledkem expozice testovacích organismů Ag@Ag₂S-NPs, nýbrž jejich špatnou fyzickou kondicí. Vzhledem k výsledkům těchto testů nebyly realizovány testy s vyššími koncentracemi, neboť se jedná o environmentálně irelevantní koncentrace a připravit expoziční médium s vyššími koncentracemi by bylo s ohledem na koncentraci zásobního roztoku Ag@Ag₂S-NPs obtížně proveditelné. Hodnota LC₅₀ se nachází v tomto případě vysoko nad zvolenou testovanou koncentrací (LC₅₀ >> 150 mg Ag/kg agaru). V současné době nejsou k dispozici data vztahující se k ekotoxicitě Ag@Ag₂S-NPs pro půdní bezobratlé. V kapitole 1.6 je pojednáváno o vlivu sulfidace AgNPs na jejich výslednou ekotoxicitu, přičemž jsou zde u obou typů testovaných NPs (AgNPs a Ag@Ag₂S-NP) porovnány hodnoty LC₅₀ pro různé organismy.

4 ZÁVĚR

Cílem této práce byly testy akutní ekotoxicity dvou typů NPs (AgNPs a Ag@Ag₂S-NPs) na vybraném modelovém organismu (*Enchytraeus crypticus*) v gelovém kultivačním prostředí (agar), jehož klíčovou úlohou bylo potlačení možné aglomerace testovaných NPs a jejich homogenní distribuce v celém objemu testovací jednotky. Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že použití agaru jako expozičního média v testech akutní ekotoxicity NPs je v případě zvoleného modelového organismu možné. V současnosti existují pouze další dvě studie vyšetřující ekotoxicitu NPs v agaru s využitím kroužkovců jako modelových organismů. Jedná se o práce Li a kol. (2011) [13] a Hrdá a kol. (2016) [14], přičemž v obou případech byly posuzovány ekotoxické účinky ZnO-NPs. Z tohoto důvodu by bylo vhodné v rámci budoucího výzkumu provést další testy s různými nanomateriály, které by vhodnost daného postupu podpořily či vyvrátily.

Při testování ekotoxicity rozpustné formy stříbra (testováno ve formě AgNO₃) byla zaznamenána silná odezva modelových organismů, kde 100% mortality bylo dosaženo již při koncentraci 9,6 mg Ag/kg agaru a hodnota LC₅₀ byla stanovena na 0,807 mg Ag/kg agaru. Při testování ekotoxicity NO₃⁻ iontů (testováno ve formě NaNO₃) nebyl zaznamenán vliv na mortalitu testovacích organismů až při koncentraci 1 g NO₃⁻/kg agaru, tudíž ekotoxické účinky AgNO₃ byly způsobeny výhradně expozicí modelových organismů Ag⁺ iontům.

U obou typů testovaných NPs byla pozorována jen velmi slabá odezva modelových organismů. Při testování ekotoxicity AgNPs byla při maximální zvolené expoziční koncentraci (100 mg Ag/kg agaru) zaznamenána pouze 11,67% mortalita. V případě Ag@Ag₂S-NPs bylo při zvolené expoziční koncentraci (150 mg Ag/kg agaru) dosaženo maximální mortality 5 %. Pro získání hodnot LC₅₀ pro oba typy testovaných NPs by bylo potřeba připravit mnohem koncentrovanější primární koloid, což se ani při použití koncentračních technik (centrifugace) nedařilo, jelikož při vyšších koncentracích primárních koloidů docházelo k nárůstu průměrné hodnoty velikosti částic, ale i k zásadní změně distribuce velikostí částic. Z těchto důvodů rovněž nebylo možné vhodným způsobem posoudit a kvantifikovat vliv vybrané povrchové modifikace AgNPs (sulfidace) na jejich výslednou ekotoxicitu. Na základě uvedených dat lze dospět k závěru, že takto koncipované testy využívající agar jako expoziční médium jsou vhodné spíše pro testování práškové formy NPs, u kterých jsme schopni dosáhnout vyšších expozičních koncentrací nebo je třeba

navržený postup modifikovat pro testy chronické ekotoxicity s citlivějšími endpointy (např. různé biochemické markery oxidativní stresu, reprodukce atd.).

Dále bylo experimentálně zjištěno, že zahřívání koloidních roztoků testovaných NPs na teplotu 85 ± 5 °C po dobu 15 min během přípravy expozičního média významným způsobem neovlivňuje průměrnou velikost testovaných NPs, včetně jejich velikostní distribuce. Experimentálně bylo rovněž zjištěno, že během přípravy expozičního média agar–AgNPs popř. agar–Ag₂S–NPs nedocházelo vlivem zahřívání koloidních roztoků testovaných NPs k uvolňování významného množství Ag⁺ iontů, které by mělo zásadní vliv na mortalitu testovacích organismů. Zahřívání roztok AgNPs (85 ± 5 °C) o koncentraci 100 mg Ag/L sice uvolnil 1,3 mg/L Ag⁺ iontů, což by byla vzhledem k provedeným testům ekotoxicity Ag⁺ iontů smrtelná koncentrace pro všechny testovací organismy, nicméně v testech s těmito NPs nebyl zaznamenán výrazný vliv na mortalitu testovacích organismů. Z tohoto důvodu lze předpokládat, že v agaru dochází k menší míře uvolňování kovových iontů z testovaných NPs než ve vodných roztocích těchto částic.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V. a Dusinska, M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2014, 8(3), s. 233-278.
- [2] Klaine, S. J., Alvarez, P. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Mahendra, S., McLaughlin, M. J. a Lead, J. R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008, Sv. 27(9), stránky 1825-1851.
- [3] Navarro, E., Baun, A., Behra, R., B. Hartmann, N., Filser, J., Miao, A., Quigg, A., Santschi, P. H. a Sigg, L. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 2008, 17(5), s. 372-386.
- [4] Kahru, A., Dubourguier, H. C., Blinova, I., Ivask, A. a Kasemets, K. Biotests and biosensors for ecotoxicology of metal oxide nanoparticles: a minireview. *Sensors*, 2008, 8(8), s. 5153-5170.
- [5] ČR, Ministerstvo zdravotnictví. *Český lékopis 2009 (a doplňky 2010, 2011 a 2012)*. Grada Publishing, a.s., Praha, 2009, s. 3968. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [6] Renn, D. W. Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *Industrial & engineering chemistry product research and development*, 1984, 23(1), s. 17-21.
- [7] Trivedi, T. J., Srivastava, D. N., Rogers, R. D. a Kumar, A. Agarose processing in protic and mixed protic–aprotic ionic liquids: Dissolution, regeneration and high conductivity, high strength ionogels. *Green Chemistry*, 2012, 14(10), s. 2831-2839.
- [8] Sambrook, J. and Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001. ISBN 978-0-87869577-4.
- [9] Phillips, G. O. a Williams, P. A. *Handbook of Hydrocolloids (Second edition)*. CRC Press, New York, 2009, s. 91-94. ISBN-9781845694142.
- [10] Rowe, R. C., Sheskey, P. J., a Owen, S. C. *Handbook of Pharmaceutical Excipients (Sixth edition)*. RPS Publishing, Washington, 2009, s. 888. ISBN 978-0-85369-792-3.
- [11] Lee, W. M., An, Y. J., Yoon, H. a Kweon, H. S. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum*

- aestivum): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental toxicology and chemistry*, 2008, 27(9), s. 1915-1921.
- [12] Baek, Y. W. a An, Y. J. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to Escherichia coli, Bacillus subtilis, and Streptococcus aureus. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(8), s. 1603-1608.
- [13] Li, L. Z., Zhou, D. M., Peijnenburg, W. J., van Gestel, C. A., Jin, S. Y., Wang, Y. J. a Wang, P. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, Eisenia fetida and subcellular fractionation of Zn. *Environment International*, 2011, 37(6), s. 1098-1104.
- [14] Hrdá, K., Opršal, J., Knotek, P., Pouzar, M. a Vlček, M. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to the annelid Enchytraeus crypticus in agar-based exposure media. *Chemical Papers*, 2016, 70(11), s. 1512-1520.
- [15] Cui, D., Zhang, P., Ma, Y., He, X., Li, Y., Zhang, J., Zhao, Y. a Zhang, Z. Effect of cerium oxide nanoparticles on asparagus lettuce cultured in an agar medium. *Environmental Science: Nano*, 2014, 1(5), s. 459-465.
- [16] Rhim, J. W., Wang, L. F. a Hong, S. I. Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 2013, 33(2), s. 327-335.
- [17] Alves, P. R. L. a Cardoso, E. J. B. N. Overview of the Standard Methods for Soil Ecotoxicology Testing. *INVERTEBRATES-EXPERIMENTAL MODELS IN TOXICITY SCREENING*, 2016, 35.
- [18] Römbke, J. Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review: The 7th international symposium on earthworm ecology·Cardiff·Wales·2002. *Pedobiologia*, 2003, 47(5-6), s. 607-616.
- [19] Kobetičová, K. *Laboratorní testy toxicity s roupicemi*. Brno, 2007. 48 s. Rigorózní práce. Masarykova univerzita.
- [20] Bezchlebová, J. *Ekotoxikologie půdních bezobratlých: žížaly, roupice, chvostoskoci*. Brno, 2007. 65 s. Disertační práce. Masarykova univerzita.
- [21] Römbke, J. Enchytraeus albidus (Enchytraeidae, Oligochaeta) as a test organism in terrestrial laboratory systems. *Biological Monitoring of Exposure and the Response at the Subcellular Level to Toxic Substances*, 1989, 13, s. 402-405.

- [22] Internetové stránky VŠCHT Praha. *Test únikového chování s roupicemi druhu Enchytraeus albidus nebo Enchytraeus crypticus*. 2014 [Online] [Citace: 12. Leden 2017.] https://old.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/15%20bTest%20%C3%BAnikov%C3%A9ho%20c%20hov%C3%A1n%C3%AD%20_roupice_2014.pdf
- [23] Boraschi, D. a Duschl, A. *Nanoparticles and the immune system: safety and effects*. Academic Press, 2013, s. 91-98. ISBN 978-0-12-408085-0.
- [24] Scott-Fordsmand, J. J., Krogh, P. H., Schaefer, M. a Johansen, A. The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to Eisenia veneta earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(3), s. 616-619.
- [25] Handy, R. D., Cornelis, G., Fernandes, T., Tsyusko, O., Decho, A., Sabo-Attwood, T., Metcalfe, C., Steevens, J. A., Klaine, S. J., Koelmans, A. A. a Horne, N. Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: practical experiences and recommendations from the bench. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, 31(1), s. 15-31.
- [26] Chen, X. a Schluesener, H. J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology letters*, 2008, 176(1), s. 1-12.
- [27] Dadosh, T. Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size. *Materials letters*, 2009, 63(26), s. 2236-2238.
- [28] Bankar, A., Joshi, B., Kumar, A. R. a Zinjarde, S. Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of silver nanoparticles. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 2010, 368(1), s. 58-63.
- [29] Hartemann, P., Hoet, P., Proykova, A., Fernandes, T., Baun, A., De Jong, W., Filser, J., Hensten, A., Kneuer, C., Maillard, J., Norppa, H., Scheringer, M. a Wijnhoven, S. Nanosilver: Safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. *Materials Today*, 2015, 18(3), s. 122-123.
- [30] Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V. a Brown Jr, G. E. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental science & technology*, 2012, 46(13), s. 6900-6914.
- [31] Lowry, G. V., Gregory, K. B., Apte, S. C. a Lead, J. R. Transformations of nanomaterials in the environment. *Environmental science & technology*, 2012, 46(13), s. 6893-6899.
- [32] Levard, C., Hotze, E. M., Colman, B. P., Dale, A. L., Truong, L., Yang, X. Y., Bone, A. J., Brown Jr., G. E., Tanguay, R. L., Di Giulio, R. T., Bernhardt, E. S., Meyer, J. N., Wiesner,

- M. R. a Lowry, G. V. Sulfidation of silver nanoparticles: natural antidote to their toxicity. *Environmental science & technology*, 2013, 47(23), s. 13440-13448.
- [33] Reinsch, B. C., Levard, C., Li, Z., Ma, R., Wise, A., Gregory, K. B., Brown Jr, G. E. a Lowry, G. V. Sulfidation of silver nanoparticles decreases *Escherichia coli* growth inhibition. *Environmental science & technology*, 2012, 46(13), s. 6992-7000.
- [34] Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W. a Nowack, B. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental science & technology*, 2009, 43(24), s. 9216-9222.
- [35] Sun, T. Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K. a Nowack, B. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental Pollution*, 2014, 185, s. 69-76.
- [36] Coll, C., Notter, D., Gottschalk, F., Sun, T., Som, C. a Nowack, B. Probabilistic environmental risk assessment of five nanomaterials (nano-TiO₂, nano-Ag, nano-ZnO, CNT, and fullerenes). *Nanotoxicology*, 2016, 10(4), s. 436-444.
- [37] Topuz, E. a van Gestel, C. A. Toxicokinetics and toxicodynamics of differently coated silver nanoparticles and silver nitrate in *Enchytraeus crypticus* upon aqueous exposure in an inert sand medium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2015, 34(12), s. 2816-2823.
- [38] Ribeiro, M. J., Maria, V. L., Scott-Fordsmand, J. J. a Amorim, M. J. Oxidative stress mechanisms caused by Ag nanoparticles (NM300K) are different from those of AgNO₃: Effects in the soil invertebrate *Enchytraeus Crypticus*. *International journal of environmental research and public health*, 2015, 12(8), s. 9589-9602.
- [39] Cong, Y., Banta, G. T., Selck, H., Berhanu, D., Valsami-Jones, E. a Forbes, V. E. Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron-and ionic-Ag in the polychaete, *Nereis diversicolor*. *Aquatic toxicology*, 2011, 105(3), s. 403-411.
- [40] Shoults-Wilson, W. A., Reinsch, B. C., Tsyusko, O. V., Bertsch, P. M., Lowry, G. V. a Unrine, J. M. Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms (*Eisenia fetida*). *Nanotoxicology*, 2011, 5(3), s. 432-444.
- [41] Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A. C., Cravo, A., a Bebianno, M. J. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine environmental research*, 2013, 84, s. 51-59.

- [42] Asghari, S., Johari, S. A., Lee, J. H., Kim, Y. S., Jeon, Y. B., Choi, H. J., Moon, M. C. a Yu, J. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *Journal of Nanobiotechnology*, 2012, 10(1), s. 14.
- [43] Nair, P. M. G., Park, S. Y., Lee, S. W. a Choi, J. Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1), s. 31-37.
- [44] Opršal, J. *Vliv fyzikálně-chemických vlastností nanomateriálů a expozičních médií na výsledky testů ekotoxicity*. Pardubice, 2016. 143 s. Disertační práce. Univerzita Pardubice.
- [45] Levard, C., Reinsch, B. C., Michel, F. M., Oumahi, C., Lowry, G. V. a Brown Jr, G. E. Sulfidation processes of PVP-coated silver nanoparticles in aqueous solution: impact on dissolution rate. *Environmental science & technology*, 2011, 45(12), s. 5260-5266.
- [46] Rietveld, H. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. *Journal of applied Crystallography*, 1969, 2(2), s. 65-71.
- [47] Langford, J. I. a Wilson, A. J. C. Scherrer after sixty years: a survey and some new results in the determination of crystallite size. *Journal of Applied Crystallography*, 1978, 11(2), s. 102-113.
- [48] Bicho, R. C., Ribeiro, T., Rodrigues, N. P., Scott-Fordsmand, J. J. a Amorim, M. J. Effects of Ag nanomaterials (NM300K) and Ag salt (AgNO_3) can be discriminated in a full life cycle long term test with *Enchytraeus crypticus*. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 318, s. 608-614.
- [49] Kim, S. W., Nam, S. H. a An, Y. J. Interaction of silver nanoparticles with biological surfaces of *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2012, 77, s. 64-70.
- [50] Diez-Ortiz, M., Lahive, E., George, S., Ter Schure, A., Van Gestel, C. A., Jurkschat, K., Svendsen, C. a Spurgeon, D. J. Short-term soil bioassays may not reveal the full toxicity potential for nanomaterials; bioavailability and toxicity of silver ions (AgNO_3) and silver nanoparticles to earthworm *Eisenia fetida* in long-term aged soils. *Environmental Pollution*, 2015, 203, s. 191-198.
- [51] Kwak, J. I., Lee, W. M., Kim, S. W. a An, Y. J. Interaction of citrate-coated silver nanoparticles with earthworm coelomic fluid and related cytotoxicity in *Eisenia andrei*. *Journal of Applied Toxicology*, 2014, 34(11), s. 1145-1154.

- [52] Williams, P. L. a Dusenbery, D. B. Aquatic toxicity testing using the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Environmental toxicology and chemistry*, 1990, 9(10), s. 1285-1290.
- [53] Kennedy, A. J., Hull, M. S., Bednar, A. J., Goss, J. D., Gunter, J. C., Bouldin, J. L., Vikesland, P. J. a Steevens, J. A. Fractionating nanosilver: importance for determining toxicity to aquatic test organisms. *Environmental science & technology*, 2010, 44(24), s. 9571-9577.
- [54] Erickson, R. J., Brooke, L. T., Kahl, M. D., Venter, F. V., Harting, S. L., Markee, T. P. a Spehar, R. L. Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms. *Environmental toxicology and chemistry*, 1998, 17(4), s. 572-578.
- [55] Gomes, S. I., Soares, A. M., Scott-Fordsmand, J. J. a Amorim, M. J. Mechanisms of response to silver nanoparticles on *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta): survival, reproduction and gene expression profile. *Journal of hazardous materials*, 2013, 254, s. 336-344.
- [56] Khalil, A. M. Physiological and genotoxic responses of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* exposed to sublethal concentrations of AgNPs. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 2016, 74, s. 8-15.
- [57] Griffitt, R. J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J. C. a Barber, D. S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(9), s. 1972-1978.
- [58] Zhao, C. M. a Wang, W. X. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011, 30(4), s. 885-892.