



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**VLIV POVRCHOVÉHO OBALU NANOČÁSTIC
STŘÍBRA NA JEJICH PŮSOBENÍ V ROSTLINÁCH**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Renata Trajerová
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Renata Trajerová
Název práce	Vliv povrchového obalu nanočástic stříbra na jejich působení v rostlinách
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů; Katedra biofyziky
Vedoucí práce	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>Nanočástice stříbra patří v současné době mezi nejpoužívanější nanomateriály, což je spojeno se zvyšováním jejich obsahu v půdě a v odpadních vodách. Z tohoto důvodu rostlou obavy z jejich negativního působení na rostliny. Vliv stříbrných nanočástic na rostliny závisí na mnoha faktorech, mezi které patří i tzv. „surface coating“ neboli povrchový obal. Ten kromě stability nanočástic ovlivňuje i jejich působení na živé organismy. Tento efekt je prozatím málo prozkoumán u vyšších rostlin. Cílem práce bylo srovnání vlivu nanočástic stříbra s různým povrchovým obalem u vybraných rostlinných druhů, přičemž pozornost byla zaměřena na strukturu a funkci fotosyntetického aparátu, obsah pigmentů a hladinu malondialdehydu. Statisticky významné změny sledovaných parametrů indukující inhibici fotosyntetické funkce byly v případě hydroponického pěstování pozorovány zejména u ječmene jarního, zatímco u rostlin pěstovaných v MS médiu byla signifikantní inhibice u vojtěšky seté po aplikaci citrátového i glutathionového koloidu nanočástic stříbra. Výraznější poškození u huseníčku rolního pěstovaného v MS médiu nastalo při působení vyšší koncentrace glutathionového koloidu (G.AgNPs 5 mg/L). V porovnání s kontrolními roztoky vykazovaly citrátové nanočástice stříbra spíše pozitivní efekt, zatímco glutathionové spíše negativní dopad na fotochemii PSII.</p>
Klíčová slova	nanočástice stříbra, povrchový obal, fotosyntéza, pigmenty, malondialdehyd, huseníček rolní, vojtěška setá, ječmen jarní
Počet stran	79
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Renata Trajerová
Title of thesis	Influence of silver nanoparticle coating on their effect in plants
Type of thesis	Thesis
Department	Laboratory of Growth Regulators; Department of Biophysics
Supervisor	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	<p>Silver nanoparticles are currently among the most used nanomaterials, which is associated with an increase in their content in soil and wastewater. For this reason, concerns about their negative effects on plants are growing. The effect of silver nanoparticles on plants depends on many factors, including the so-called "surface coating". In addition to the stability of nanoparticles, this also affects their effect on living organisms. This effect is so far little studied in higher plants. The aim of the work was to compare the effect of silver nanoparticles with different surface coatings on selected plant species, while attention was focused on the structure and function of the photosynthetic apparatus, the content of pigments and the level of malondialdehyde. Statistically significant changes of measured parameters indicating inhibition of photosynthetic functions were observed especially in barley in the case of hydroponic cultivation, while in plants grown in MS medium there was a significant inhibition in alfalfa after the application of citrate and glutathione colloid of silver nanoparticles. More pronounced damage of arabidopsis grown in MS medium was caused by a higher concentration of glutathione colloid (G.AgNPs 5 mg/L). Compared to the control solutions, citrate silver nanoparticles showed a rather positive effect, while glutathione ones had a rather negative effect on PSII photochemistry.</p>
Keywords	silver nanoparticles, surface coating, photosynthesis, pigments, malondialdehyde, arabidopsis, barley, alfalfa
Number of pages	79
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Nejdříve bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Martině Špundové, Ph.D. za podnětné rady a odbornou pomoc, kterou mi poskytovala při zpracování mé diplomové práce, a za čas, který mi věnovala. Současně bych chtěla také poděkovat kolektivu oddělení za ochotu a pomoc zejména Mgr. Zuzaně Kučerové Ph.D., za všestrannou výpomoc a užitečné rady při přípravě experimentů a Mgr. Radkovi Ostruzzkovi za přípravu testovaných koloidů a RNDr. Tomáši Pluháčkovi, Ph.D., z katedry analytické chemie za stanovení obsahu stříbra v připravených koloidech nanočástic.

OBSAH

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	2
2.1 PŘÍPRAVA NANOČÁSTIC STŘÍBRA.....	2
2.1.1 Chemická syntéza.....	2
2.1.2 Fyzikální syntéza.....	3
2.1.3 Fotochemická syntéza.....	3
2.1.4 Biologická syntéza.....	4
2.2 POVRCHOVÝ OBAL.....	5
2.3 STABILITA NANOČÁSTIC STŘÍBRA V RŮZNÝCH TYPECH MÉDIÍ.....	6
2.4 TRANSPORT NANOČÁSTIC A JEJICH EFEKT NA RŮST A MORFOLOGII ROSTLIN.....	8
2.5 DOPAD NA FOTOSYNTÉZU.....	10
2.6 NAVOZENÍ OXIDATIVNÍHO STRESU A VLIV NA ANTIOXIDAČNÍ MECHANISMY.....	14
2.6.1 Antokyany.....	16
2.6.2 Malondialdehyd jako indikátor stresu.....	17
2.7 MOTIVACE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	18
3 MATERIÁL A METODY.....	19
3.1 Rostlinný materiál.....	19
3.2 Přístrojové vybavení.....	19
3.3 Použité chemikálie.....	19
3.4 Příprava rostlinného materiálu.....	20
3.4.1 Hydroponické pěstování.....	20
3.4.2 MS médium.....	21
3.5 Použité metody.....	22
3.5.1 Měření funkce fotosystému II fluorescenčním zobrazovacím systémem.....	22
3.5.1.1 Parametr F_v/F_M	22
3.5.1.2 Parametry chlorofylové fluorescence Φ_P , Φ_{NPQ} a Φ_f,d	22
3.5.1.3 Parametry NPQ a $1-q_P$	24
3.5.2 Stanovení obsahu malondialdehydu pomocí HPLC.....	24
3.5.3 Stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů v listech pomocí absorpční spektrofotometrie.....	25
3.6 Zpracování experimentálních dat.....	25
4 VÝSLEDKY.....	26
4.1 Experimenty založené na hydroponickém pěstování.....	26
4.1.1 huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.).....	26

4.1.1.1 kořeny.....	26
4.1.1.2 řapíky.....	32
4.1.2 ječmen jarní (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	36
4.1.2.1 kořeny.....	36
4.1.2.2. oddělené listy.....	42
4.1.3 vojtěška setá (<i>Medicago sativa</i> L.)	48
4.1.3.1 řapíky.....	48
4.2. Experimenty založené na pěstování v MS médiu.....	54
4.2.1 huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	54
4.2.1.1. kořeny.....	54
4.2.2 vojtěška setá (<i>Medicago sativa</i> L.)	60
4.2.2.1 kořeny.....	60
4.3. Stanovení hladiny fotosyntetických pigmentů při hydroponickém pěstování.....	64
4.3.1 huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	64
4.3.2 ječmen jarní (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	65
4.4 Stanovení hladiny malondialdehydu (MDA) při hydroponickém pěstování.....	66
4.4.1 huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.).....	66
4.4.2 ječmen jarní (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	66
5 DISKUZE.....	68
6 ZÁVĚR.....	72
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	73

SEZNAM ZKRATEK

3-PGA	3-fosfoglycerová kyselina
AgNO ₃	dusičnan stříbrný
AgNPs	nanočástice stříbra
CAT	katalasa
CMCTS	karboxymethylovaný chitosan
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
Cyt b6f	cytochrom b6f
F ₀	minimální intenzita chlorofylové fluorescence
F _d	feredoxin
Fluorcam	Fluorescenční zobrazovací systém
F _M	maximální intenzita chlorofylové fluorescence
F _v /F _M	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
G3P	glyceroaldehyd-3-fosfát
GA	arabská guma
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MDA	malondialdehyd
MS médium	Murashige a Skoog živné médium
NPQ	nefotochemické zhášení fluorescence
PC	plastocyanin
POD	peroxidasa
PQ	plastochinon
PS I	fotosystém I
PS II	fotosystém II
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidon
1-qP	excitační tlak na fotosystém II
RuBisCo	ribulóza-1,5bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
SDS	dodecylsulfát sodný
SOD	superoxiddismutasa
Φ _{f,d}	kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů
ΦNPQ	kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení
ΦP	efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Díky širokému rozvoji v nanotechnologickém průmyslu je výroba nanočástic na vrcholu své expanze. Její rozmach sahá do různorodých oblastí od zdravotnictví, strojírenství až po zemědělský průmysl. Nanočástice stříbra patří proto v současné době mezi nejpoužívanější nanomateriály, což je spojeno se zvyšováním jejich obsahu v půdě a v odpadních vodách. Z tohoto důvodu rostou obavy z jejich negativního působení na rostliny. Proto je nutné lépe porozumět jejich účinkům, které mohou vést k budoucím problémům.

Nanočástice mají řadu specifických charakteristik, díky kterým jsou nenahraditelné. Vyšší produkce vede k většímu uvolňování do okolního prostředí. Jedná se o nanočástice těžkých kovů, mezi které patří zejména stříbro. Účinek nanočástic stříbra je ovlivněn hlavně jejich vlastnostmi. Od velikosti, koncentrace přes náboj nanočástic, ale také i povrchovým obalem nebo expozičním prostředím (hydroponie, médium).

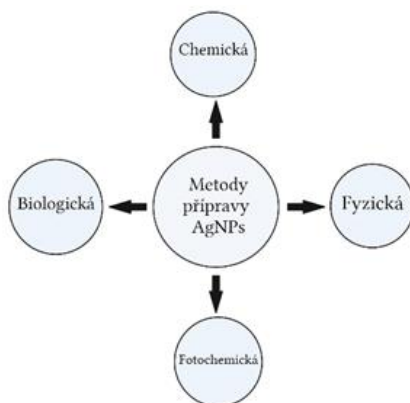
Fotosyntéza je jeden z nejdůležitějších procesů hrající významnou roli v přírodě. Při účinku nanočástic stříbra na rostliny dochází k řadě změn ve fotosyntetickém aparátu rostlin. Série experimentů potvrdily změny ve fotosyntetických parametrech i v obsahu fotosyntetických pigmentů, které mají úlohu zejména při absorpci světelné energie.

Cílem teoretické části diplomové práce bylo vypracování literární rešerše týkající se nanočástic stříbra, se zaměřením na vliv povrchového obalu nanočástic na rostliny při hydroponické aplikaci a aplikaci v Murashige a Skoog médiu. V experimentální části bylo cílem srovnat účinek stříbrných nanočástic o vybraných povrchových obalech při aplikaci na kořeny a řapíky/oddělené listy huseníčku rolního, ječmene jarního a vojtěšky seté se zaměřením na změny fotosyntetických parametrů a stanovení obsahu pigmentů metodou absorpční spektrofotometrie a malondialdehydu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Jako pozitivní kontrola byl v experimentech použit roztok dusičnanu stříbrného.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 PŘÍPRAVA NANOČÁSTIC STŘÍBRA

Díky vědeckým pokrokům, které byly provedeny, se v současné době nabízí široká škála možností výroby nanočástic stříbra (Haider a Kang, 2015). Existuje řada typů příprav, mezi které se řadí chemická, fyzikální, fotochemická nebo biologická metoda. Každá z těchto metod nese své klady i zápory. Různé metody příprav nanočástic stříbra jsou spjaty s problémy, mezi které se řadí cena, stabilita nanočástic či definovaná velikost a distribuce.



Obr. 1: Schématické znázornění jednotlivých typů příprav nanočástic stříbra. Upraveno z Haider a Kang (2015)

2.1.1 Chemická metoda

Chemická příprava nanočástic stříbra je široce využívanou metodou díky snadné přípravě v roztoku (Yu a Zhou, 2013). Řadou výzkumníků byla využita polyolová metoda, která spočívala v přípravě monodisperzních stříbrných nanokostek redukcí dusičnanu stříbrného s ethylenglykolem za pomoci polymeru polyvinylpyrrolidonu (PVP). Tento způsob přípravy nabízel kontrolu nad velikostí a tvarem nanočástic, které závisely na molárním poměru dusičnanu stříbrného a PVP. Ethylenglykol sloužil zároveň jako rozpouštědlo a redukční činidlo. Modifikací polyolové metody za použití prekurzorové injekce byly připraveny nanočástice o rozměrech menších nebo rovných 20 nm. Díky tomu došlo k dokonalé kontrole nad předem definovanou velikostí nanočástic (Kim et al., 2006). Další metoda přípravy byla založena na dusičnanu stříbrném, oleylaminu a kapalném parafínu. Oleylaminparafín byl zásadní látkou v řízení teploty, neboť ta hrála klíčovou roli v determinaci velikosti částic (Chen et al., 2007). Později byla vědci Mukherji a Agnihotri provedena syntéza s využitím dusičnanu stříbrného jako prekurzoru a látek tetrahydroboritanu sodného a citronanu sodného, které sloužily jako redukční i stabilizační činidlo. Existuje řada různých způsobů přípravy nanočástic stříbra, základem je však dbát

na tyto základní faktory: prekursor stříbra, redukční a stabilizační činidlo (Agnihotri et al., 2014).

2.1.2 Fyzikální metoda

Mimo již zmíněné chemické způsoby přípravy nanočástic stříbra existují fyzikální metody, zahrnující techniky odpařování a kondenzace. Avšak jako každá metoda nese i řadu nevýhod, mezi které se řadí vysoká energetická a časová náročnost. Zavedením alternativních technik by došlo k ovlivnění zmíněných problémů (Haider et al., 2015).

Jednou z takových technik je metoda tepelného rozkladu, při níž dochází k redukci dusičnanu stříbrného a oleátu sodného (sodná sůl kyseliny oleové) ve vodném roztoku. Jakmile teplota dosahovala 290 °C, začaly se postupně formovat monodisperzní nanokrystaly stříbra (Lee a Kang, 2004). Kromě tepelného rozkladu byla pro přípravu nanočástic použita metoda založená na keramickém tepelném systému, který udržoval konstantní množství tepla pro odpaření prekursoru. Jednalo se o tzv. techniku obloukového výboje se stříbrnými elektrodami ponořenými v deionizované vodě (Tien et al., 2008). S postupným vývojem se rozvinula jedinečné technika, která umožnila syntézu nanočástic o rozměrech menších než 5 nm. Příprava byla založena na přímém rozprašování kovu do kapalného média. Tato alternativní metoda by sice snížila časovou náročnost procesu, ale vyžadovala by vyšší náklady.

2.1.3 Fotochemická syntéza

Počátky objevu fotochemické metody sahají až do 18. století, kdy bylo zjištěno, že některé soli stříbra působením světelných paprsků mění své zbarvení, tmavnou. Díky vědeckému pokroku se fotochemická syntéza rozvinula do rozměrů, kdy umožňuje přípravu definovaných kovových nanočástic a nanomateriálů. Foto-indukovanou přípravu nanočástic stříbra lze rozlišit na dva přístupy: fotofyzikální a fotochemickou techniku (Sakamoto et al., 2009).

Fotochemická metoda je založena na redukci kovových iontů s využitím fotochemických meziproductů jako jsou excitované molekuly nebo radikály (Sakamoto et al., 2009). Jednou z příprav AgNPs je fotoaktivační metoda založena na UV záření a vodném roztoku Tritonu-100, který sloužil jako redukční a stabilizační činidlo nanočástic a současně i jako surfaktant, tedy povrchově aktivní látka napomáhající lepší distribuci nanočástic o definované velikosti a zvýšením povrchového napětí mezi rozhraním rozpouštědla a nanočásticemi (Kumar Ghosh et al., 2003). Jiný způsob přípravy byl použit skupinou vědců Huang a kol. (2008) je založený na působení UV záření na alkalický

vodný roztok s obsahem dusičnanu stříbrného a karboxymethylovaného chitosanu (CMCTS). CMCTS sloužilo jako redukční činidlo se schopností stabilizace syntetizovaných nanočástic dosahující rozměrů menších než 10 nm. Později byla zavedena modifikovaná fotochemická metoda, jenž spočívala na přímé redukci dusičnanu stříbrného s použitím laserového zdroje schopného emitovat záření v infračervené oblasti (Balan et al., 2012).

Mezi hlavní přednosti, které tato metoda nabízí, patří vysoká čistota a snadnost procedury (Sakamoto et al., 2009).

2.1.4 Biologická syntéza

Metody, které byly zmíněny a popsány výše, jsou založeny na třech základních složkách: na soli, nejčastěji se jednalo o dusičnan stříbrný, na redukčním činidle (ethylenglykol) a na stabilizační látce, zajišťující kontrolu růstu nanočástic s případným zamezením jejich agregace. U biologické syntézy jsou využívána redukční a stabilizační činidla z bakterií, hub, kvasinek či rostlin (Sintubin et al., 2012).

Jedním z organismů, který se využívá při biologické syntéze, je *Shewanella oneidensis*. Jedná se o typ bakterie, která je schopna redukovat kovy. Při jejím naočkování dusičnanem stříbrným dochází k postupné tvorbě malých nanočástic stříbra dosahujících rozměrů menších než 11 nm. Vzniklé nanočástice jsou hydrofilní a stabilní s velkým povrchem. Kromě zmíněných vlastností se syntéza vyznačuje jednoduchostí a ekonomicky šetrným přístupem v porovnání s chemickým typem syntézy (Suresh et al., 2010). Jiná studie namísto bakterie využila houbu *Trichoderma viride* pro extracelulární syntézu, jejíž prekurzorem byl dusičnan stříbrný. Velikost nanočástic se pohybovala v rozmezí od 5 do 40 nm (Fayaz et al., 2010). Následující syntéza byla založena na bakterii rodu *Bacillus*. Jednalo se o *Bacillus subtilis* s dusičnanem stříbrným. Vznikající nanočástice o rozměrech 5–15 nm byly pozorovány v tzv. periplazmatickém prostoru mezi vnější a vnitřní membránou bakterie (Pugazhenthiran et al., 2009). Kromě rodu *Bacillus* se nabízelo využití i rodu *Lactobacillus*. Druhy zmíněného rodu jsou schopny akumulovat i redukovat stříbrné ionty Ag^+ . Lokalizace a následná distribuce produkovaných nanočástic se odlišuje v závislosti na druhu. Nejmenší nanočástice o velikosti 11,2 nm byly produkovány druhem *L. fermentum*. Významným faktorem byla hodnota pH, která ovlivnila rychlost redukce (Sintubin et al., 2009).

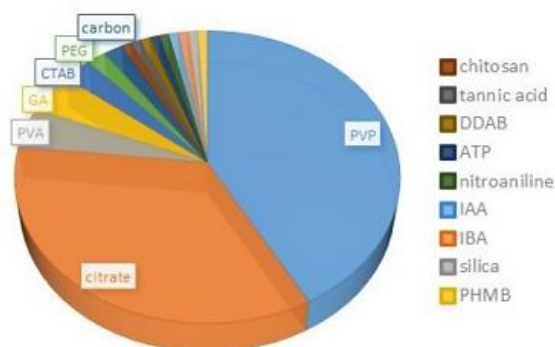
Stručně řečeno biologická syntéza nabízí řadu předností, oproti jiným způsobům výroby nanočástic stříbra, ať už fyzikální či chemické. Je šetrná k životnímu prostředí a

ekonomicky dostupná. Redukce probíhající v příslušném organismu byla kratší a vystavena okolní teplotě a tlaku. Při syntéze hrála hlavní roli buněčná stěna mikroorganismu, která byla záporně nabitá a reagovala s kladně nabitými kovovými ionty, kdy docházelo k redukci kovových ionů (Thakkar et al., 2010).

2.2 POVRCHOVÝ OBAL

Nanočástice stříbra existují ve dvou formách, v bezobalové a s povrchovým obalem tzv. coatingem (Travan et al., 2009). Právě povrchová vrstva obalující jádro stříbrných nanočástic může zásadně ovlivnit jejich účinek na rostliny.

Mezi nejpoužívanější povrchové obaly patří citrát (karboxylové kyseliny), polymer polyvinylpyrolidon (PVP), polysacharidy (arabská guma GA) a různé typy surfaktantů jako je dodecylsulfát sodný (SDS) či cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB) (Levard et al., 2012).



Obr. 2: Typy povrchových obalů využívané při přípravě nanočástic stříbra. Převzato z Biba et al. (2021a).

Existují dva typy procesů vedoucí ke stabilizaci nanočástic. První možností je sférická stabilizace, jenž vzniká jako následek adsorpce polymeru na povrch nanočástice (Koczur et al., 2015). Druhou možností je elektrostatická stabilizace, která zahrnuje tvorbu povrchového náboje, většinou fyzikální adsorpcí nabitých látek na povrch nanočástice (Yu a Xie, 2012). Citrát patří mezi chelatační činidla je jedním z nejvíce používaných stabilizačních činidel. Má schopnost vázat kationty kovů, v našem případě nanočástic stříbra. Vazbou dochází ke zvýšení negativního náboje na povrchu AgNPs (Chinnapongse et al., 2011).

Aglomerace je jedním z podstatných faktorů ovlivňujících biologickou dostupnost. Důsledkem je tvorba větších částic vedoucí k oxidaci elementárního stříbra (Ag^0) na stříbrné ionty (Ag^+) s následnou změnou reaktivity AgNPs (Behra et al., 2013). Řada provedených studií po uvolnění AgNPs do životního prostředí zaznamenala biotransformační reakce, od oxidativního rozpuštění kyslíkem přes interakci se sulfidy či

chloridy (Levard et al., 2012). Zmíněné faktory mohou mít výrazný dopad na chování AgNPs a tím ovlivnit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti (Tkalec et al., 2019). Za účelem jejich zamezení jsou proto aplikována stabilizační činidla tvořící povrchový obal nanočástic (Levard et al., 2012).

Cytotoxicita nanočástic úzce souvisí s typem povrchového obalu (Traven et al., 2009). Mezi procesy, které hrají ústřední roli v toxickém působení nanočástic, patří narušení rovnováhy mezi tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a antioxidačními ochrannými mechanismy.

2.3 STABILITA NANOČÁSTIC STŘÍBRA V RŮZNÝCH TYPECH MÉDIÍ

Stabilita nanočástic v médiích závisí na pH média, iontové síle a na koncentraci rozpuštěných organických a anorganických látek (Maccuspie, 2011). Vlivem vzájemného působení AgNPs a jednotlivých složek obsažených v médiu je možný vznik aglomerace (Akter et al., 2018), k níž mají vysokou tendenci zejména AgNPs v důsledku jejich velké povrchové vrstvy (Bae et al., 2013). Mimo jiné, redukce Ag^+ iontů z AgNPs vede ke vzniku druhotných částic s odlišnými vlastnostmi (Azodi et al., 2016).

Stabilita AgNPs závisí do značné míry na typu média a expoziční době (Biba et al., 2021b). Bylo potvrzeno, že AgNPs bez povrchového obalu o menších rozměrech jsou rozpouštěny s vyšší rychlostí a dochází i k uvolňování Ag^+ iontů v médiu (Muraleetharan et al., 2019). Experimenty na vybraných rostlinách, zvláště u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) potvrdily zvýšenou aglomeraci u AgNPs bez povrchového obalu (0,2 – 1 mg/L) při pěstování rostlin v Hoaglandově médiu (Nair a Chung, 2014a). Aglomerace AgNPs (1 - 10 $\mu\text{mol/L}$) byla zaznamenána i u zelených řas (*Chlamydomonas reinhardtii*) pěstovaných ve specifickém médiu s vyšším obsahem soli, která je běžně používaná pro jejich růst (Dewez a Oukarroum, 2012). Nanočástice stříbra bez povrchového obalu nesou záporný náboj, důsledkem funkčních skupin (hydroxy, oxo nebo sulfo) na povrchu. Díky tomu dochází k jejich stabilizaci v deionizované vodě. Nicméně v médiu nebo v půdě dochází k interakci přítomných iontů, snížení odpudivých sil, díky čemuž dochází k jejich aglomeraci (Levard et al., 2012). Vyšší stabilita je dosažena povrchovým obalem, který sníží energii na povrchu nanočástic a zamezí tak interakci s okolními látkami, důsledkem čehož dochází ke snížení aglomerace (Kvítek et al., 2012).

Nanočástice stříbra s citrátovým povrchovým obalem, které se běžně používají pro studium u rostlin i řas nevykazovaly žádné abnormální změny ve vodním prostředí u

vybraných rostlin (Pokhrel a Dubey, 2013). Nicméně signifikantní změny byly zaznamenány ve studii s tabákem virginským (*Nicotiana tabacum*) u sférických AgNPs (100 μM). Během měření došlo ke snížení jejich hydrodynamického průměru, což značí zmenšení nanočástic v důsledku disociace Ag^+ iontů, vlivem které došlo i ke snížení záporného zeta potenciálu způsobenému poklesem negativního náboje na citrátovém povrchu nanočástic (Peharec Štefanić et al., 2019). Sérií provedených experimentů bylo prokázáno, že AgNPs s citrátovým obalem mají tendenci být vysoce nestabilní v médiích různého typu jež se vyznačují velkou iontovou silou. Zvláště v polotekutých i tuhých typech médií, kdy došlo ke zvýšení hydrodynamického průměru, které odráží aglomeraci AgNPs (Štefanić et al., 2021). Kromě změny hydrodynamického průměru došlo i ke snížení hodnoty záporného zeta potenciálu (z -16 mV na -12 mV) (Li et al., 2018). Přidáním polymeru jako je phytigel do MS média došlo ke snížení oxidace AgNPs, díky čemuž došlo k jejich stabilizaci (Biba et al. 2021a).

Stejné chování jako u AgNPs s citrátovým obalem byly pozorovány u pozitivně nabitých AgNPs – CTAB. Při pěstování cibule kuchyňské (*Allium cepa*) ve vodě se nanočástice chovaly bez zjevných modifikací, zatímco v tekutém MS médiu došlo k prudké aglomeraci (Cvjetko et al., 2017).

Díky své schopnosti stabilizace prostřednictvím sterického odpuzování mezi polymerními nanočásticemi je PVP povrchový obal jeden z nejvíce rozšířených a používaných (Biba et al., 2020). Je využíván nejen v nanotoxikologických studiích u rostlin ale i u řas. Jeho vysoká stabilita byla potvrzena jak ve vodě, tak i v různých typech živných médií (Cvjetko et al., 2017). Studie autorů Yang a kol. (2019) podrobila AgNPs-PVP vlivu různých faktorů v médiích, která jsou běžně používána pro pěstování rýže seté (*Oryza sativa*). Zjistili, že chloridové ionty, které hrají důležitou roli v transportu a akumulaci nanočástic stříbra i stříbrných iontů, zvýšily stabilitu AgNPs – PVP v médiu zvýšením negativního náboje nanočástic, vedoucím k větší disperzi.

Při srovnání chování nanočástic s citrátovým, PVP a CTAB obalem v MS médiu při pěstování huseníčku rolního (*Nicotiana tabacum*) bylo zjištěno, že nejmenší aglomerace nastala u nanočástic stříbra s PVP obalem oproti AgNPs-citrát a CTAB. Rovněž došlo k poklesu záporné hodnoty zeta potenciálu (Peharec Štefanić et al., 2021). Fyzikálně-chemické vlastnosti studovaných nanočástic stříbra hrají velmi důležitou roli v reakci na dané prostředí. Je proto nezbytné získat hlubší znalosti, neboť různé podmínky, kterým jsou AgNPs vystaveny, mohou ovlivnit jejich velikost, tvar a povrchový náboj (Pem et al. 2021).

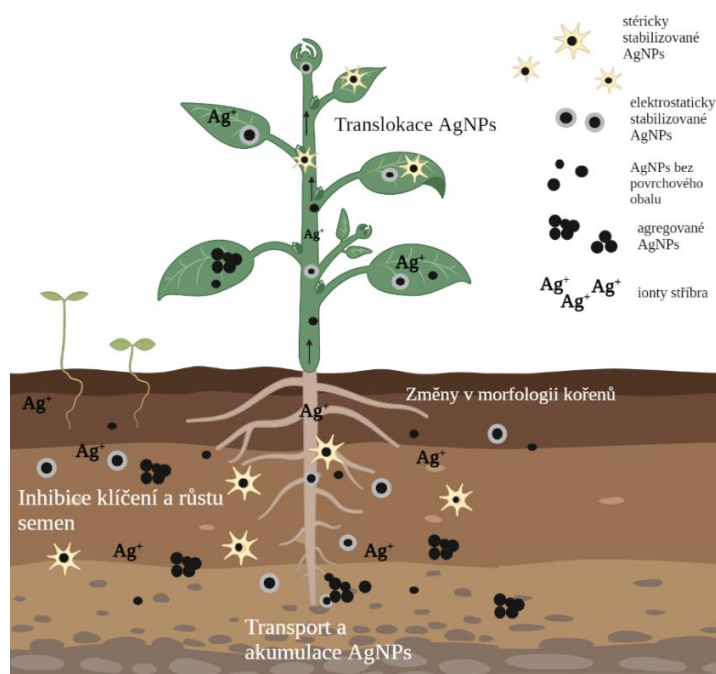
2.4 TRANSPORT NANOČÁSTIC A JEJICH EFEKT NA RŮST A MORFOLOGII ROSTLIN

Klíčení je první a esenciální fází ve vývoji rostlin, která může být ovlivněna řadou vnějších faktorů, mezi které patří i vliv nanočástic stříbra. Jeho účinkem dochází k ovlivnění metabolických dějů, které zasahují do procesu klíčení a růstu rostlin (Szóllósi et al., 2020; Tymoszuk, 2021). Dosavadní studie poukazují jak na pozitivní, tak i negativní dopad AgNPs. Nicméně samotný účinek závisí na druhu rostliny, metodě expozice a specifických vlastnostech nanočástic (Tkalec et al., 2019). Vývojové stádium, ve kterém se rostlina nachází, je dalším z faktorů ovlivňujících působení AgNPs. Pokud jsou nanočástice absorbovány kořeny semenáčků či plně vyvinutých rostlin, jsou transportovány cévními pletivy ze stonku do listů, kde vedou k vážnému poškození (Yan a Chen, 2019). Bylo pozorováno, že vliv stříbrných nanočástic na klíčení a růst rostlin se liší podle typu jejich povrchového obalu.

V publikaci Pokhrel a Dubey (2013) byla zjištěna inhibice klíčení semen kukuřice a zelí, zatímco inhibice růstu kořenů byla zaznamenána pouze u zelí. Závěrem práce bylo, že semena menších rozměrů s větším povrchem byla citlivější na účinek AgNPs. V jiné práci bylo zkoumáno klíčení u tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) pod vlivem citrátových nanočástic v rozmezí koncentrací 25–150 μM v MS médiu. Bylo zjištěno, že při nižší koncentraci došlo k pozitivnímu dopadu na proces klíčení, zatímco při vyšší koncentraci naopak k jeho inhibici (Biba et al., 2021a). Podobný účinek byl registrován i u rajčete setého (*Lycopersicon esculentum*), kdy došlo k inhibici růstu kořenů při všech studovaných koncentracích (Song et al., 2013). Vyjma dopadu na klíčení a růst kořenů byly popsány změny u růstu fazole mungo (*Phaseolus radiatus*) a prosa velkého (*Sorghum bicolor*). Akumulované nanočástice stříbra s citrátovým obalem vedly k zahnědnutí kořenové tkáně s nekrózou po expozici v MS médiu o koncentraci 40 mg/L (Lee et al., 2012).

Vedle citrátových nanočástic jsou široce využívané stericky stabilizované nanočástice stříbra s PVP obalem. Jejich dopad na rostliny především na klíčení a raný růst může být nepříznivý. Tento účinek byl zaznamenán na kořenech cibule kuchyňské (*Allium cepa*) při hydroponickém pěstování s přidavkem nanočástic o koncentraci 100 mg/L, kdy došlo k omezení klíčení a prodlužování kořene (Scherer et al., 2019). Naopak protichůdný dopad AgNPs – PVP byl sledován u huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) ve studii Wang a kol. (2020), kdy nanočástice stříbra, které byly lokalizovány v buněčné stěně a v mezibuněčných prostorách, přispívaly k růstu kořenů, avšak pouze při nižších koncentracích do 60 mg/L. Vyšší koncentrace (100–300 mg/L) měly protichůdný účinek.

Signifikantní známky chlorózy byly zaznamenány u závitky tečkované (*Landoltia punctata*) při aplikaci nanočástic stříbra s povrchovým PVA obalem (Lalau et al., 2020). Podobný efekt byl rovněž popsán u rýže seté (*Oryza sativa*) v růstovém médiu s koncentrací NPs (60 $\mu\text{g/mL}$). Nanočástice stříbra s PVA obalem penetrovaly přes buněčnou stěnu a měly negativní vliv na růst kořenů a buněčnou morfolonii. Současně došlo i k poklesu hmotnosti rostlin (Vannini et al., 2013). Rovněž při aplikaci AgNPs – GA na semenáčky jílku mnohokvětého (*Lolium multiflorum*) o koncentraci 40 mg/L došlo k inhibici růstu a poškození epidermis, které vyústilo v oslabení růstu kořenového vlášení. Tyto důsledky byly vysvětleny vysokou koncentrací nanočástic v kořenech i ve výhoncích sazenic. Mimo to, nedošlo k poklesu toxického efektu ani po přidání cysteinu, který váže stříbrné ionty. Naopak efekt testovaných nanočástic vykazoval daleko vyšší toxicitu než ionty stříbra aplikované o stejné koncentraci (Yin et al., 2011).



Obr. 3: Transport nanočástic stříbra s povrchovým obalem a bez povrchového obalu v rostlinách a jejich dopad na růst a morfolonii. Upraveno z Biba et al. (2022).

Doposud pouze několik studií bylo zaměřeno na porovnání účinku nanočástic stříbra o různých povrchových obalech ve snaze prokázat specifický dopad jednotlivých stabilizačních činidel (Biba et al., 2021b). Práce Pereira a kol. (2018) se soustředila na srovnání vlivu nanočástic stříbra s PVP a citrátovým obalem na okřehek malý (*Lemna minor*). Bylo shledáno, že oba studované obaly nanočástic vedly k poškození, ačkoliv jejich mechanismus se lišil. Zatímco účinek AgNPs – PVP vedl k potlačení růstu, citrátové AgNPs způsobily chlorózu rostlin.

Jiná studie se soustředila na AgNPs s PVP a CTAB obalem spolu s AgNO₃ (25– 100 μM) efektem na sazenice tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) pěstovaném v MS médiu. Provedené experimenty byly soustředěny na dopad na klíčení, růst kořenů a hmotnost rostlin. Nižší koncentrace AgNPs – PVP (25 μM) vedla k pozitivnímu vlivu na růst kořenů, zatímco vyšší koncentrace AgNPs-PVP (50 a 100 μM) způsobila inhibici růstu. Účinek AgNPs – PVP způsobil poškození ve sledovaných koncentracích, zatímco dopad AgNPs – CTAB vedl k výraznému toxickému dopadu na rostliny tabáku, dokonce i ve srovnání s AgNO₃. Přidáním cysteinu, který váže stříbrné ionty, došlo ke zmírnění toxického účinku AgNPs-PVP, což naznačuje, že negativní dopad byl způsoben především uvolňováním stříbrných iontů. Naopak účinek AgNPs – CTAB nebyl zmírněn, ani po přidání cysteinu. To svědčí o faktu, že toxicita byla vyvolaná samotným povrchovým CTAB obalem (Biba et al., 2020).

Doposud provedené experimenty vedly k závěru, že efekt nanočástic stříbra na rostliny, zahrnující zejména klíčení semen, růst a vývoj závisí do značné míry na specifických parametrech jak nanočástic stříbra (typ povrchového obalu, koncentrace), tak i testovaných rostlin (druh, vývojové stádium, pěstební podmínky) (Tkalec et al., 2019). Vliv nanočástic stříbra na klíčení a růst rostlin byl převážně negativní, což bylo pravděpodobně způsobeno intenzivním dopadem na kořeny. Avšak pozitivní vliv byl rovněž prokázán.

2.5 DOPAD NA FOTOSYNTÉZU

Fotosyntéza je jedním ze zásadních procesů na Zemi probíhající u rostlin, řas a cyanobakterií. Je nedílnou součástí životaschopnosti a růstu organismů, kdy dochází k přeměně světelné energie na energii chemickou. Samotný proces fotosyntézy je velmi citlivý na vnější faktory, mezi které se řadí sucho, teplo, salinita nebo těžké kovy. Právě tyto činitele jsou schopny vyvolat stres u rostlin a nepříznivě ovlivnit jejich vitalitu (Murchie a Lawson, 2013). Zásadním fotosyntetickým pigmentem je chlorofyl, jehož hlavní funkcí je záchyt světelné energie. Množství chlorofylu hraje podstatnou roli ve fotosyntéze rostlin (Richardson et al., 2002).

Energie absorbovaná molekulami chlorofylu je využita třemi způsoby, které si navzájem konkurují. Jedná se o fotochemickou cestu, přeměnu na teplo a fluorescenci. Výtěžek fluorescence chlorofylu nabízí cenné informace o efektivitě fotochemie. Ze změn chlorofylové fluorescenční kinetiky lze získat informace o struktuře a funkci fotosyntetického aparátu. Podrobnější informace jsou zjištěny z odvozených fluorescenčních parametrů (Strasser, 2004).

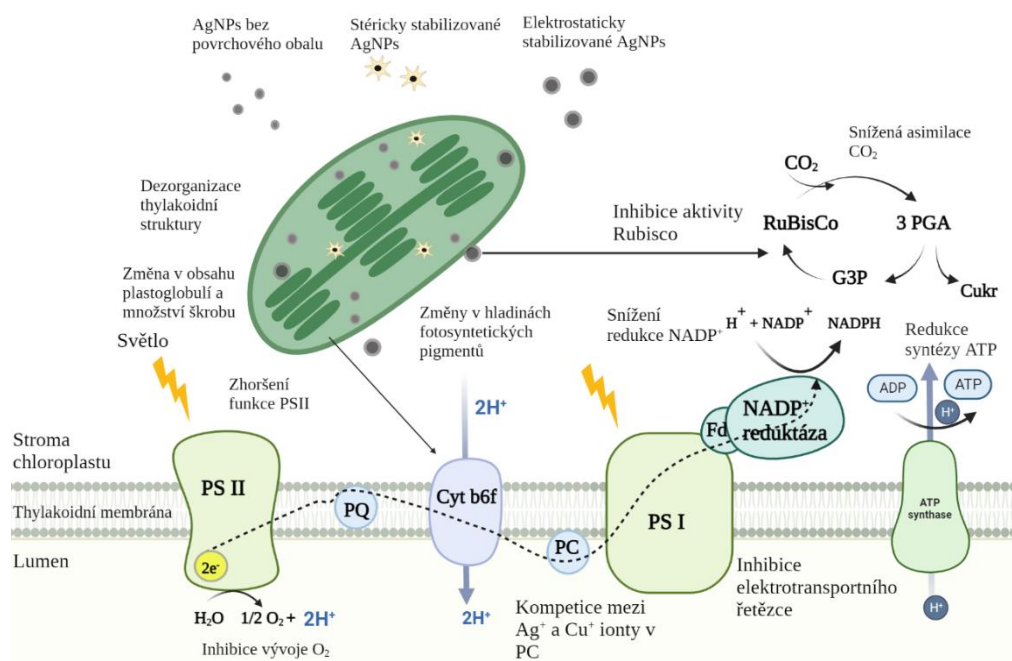
Pokles hladiny chlorofylu při účinku nanočástic stříbra byl zaznamenán celou řadou provedených studií týkajících se vodních, kulturních i modelových rostlin. Při působení AgNPs (1 a 2,5 mg/L) na kořeny huseníčku rolního při hydroponickém pěstování po dobu 3 dnů došlo k významnému poklesu hladiny chlorofylu (Ke et al., 2018). Těžké kovy svým účinkem dokážou snadno inhibovat syntézu i hladinu chlorofylu (Li et al., 2018).

Řada autorů studovala fytotoxicitu nanočástic stříbra pomocí různých fluorescenčních parametrů. Jedním z nich byl parametr F_v/F_m , neboli maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (PSII). Díky němu je možné zjistit s jakou účinností je absorbovaná světelná energie využita v reakčním centru PSII (Krause a Weis, 1991). Experimenty, které byly zaměřeny na zmíněný parametr, zjistily jeho pokles u série studovaných rostlin právě při účinku AgNPs (Tripathi Shweta et al. 2017).

Data o toxickém efektu AgNPs byla prvotně shromážděna u vybraných druhů fotosyntetických řas. U *Chlamydomonas reinhardtii* došlo během několika hodin expozice nanočásticím stříbra bez povrchového obalu o koncentraci v rozmezí 801-879 nM k inhibici PSII (Navarro et al., 2008). Výzkumníci Dewez a Oukarroum (2012) studovali dopad nanočástic stříbra na strukturu fotosyntetického aparátu a zjistili poškození struktury reakčního centra PSII. Mimo jiné došlo i ke změnám u komplexu vyvíjejícího kyslík a k inhibici elektronového transportu. Tyto změny byly detekovány u *Chlamydomonas reinhardtii* při expozici AgNPs (5 a 10 $\mu\text{mol/L}$) po dobu 6 hodin. Hodnota nefotochemického zhášení poklesla, což indikovalo potlačení ochranných mechanismů, které nebylo možné aktivovat.

Dříve zmíněný výzkum autorů Ke a kol. (2018) kromě měření hladiny chlorofylu studoval i změny parametru F_v/F_m u huseníčku rolního. Toxický účinek AgNPs (1 a 2,5 mg/L) při hydroponickém pěstování vedl k jeho poklesu, což svědčí o schopnosti nanočástic stříbra inhibovat účinnost fotosyntézy. Inhibice nastala jak účinkem AgNPs, tak i Ag^+ iontů, avšak negativnější dopad byl zaznamenán u AgNPs. Vyvolaná inhibice korelovala s dopadem na kořeny rostlin, které jsou centrálním místem, kde probíhá prvotní interakce s nanočásticemi. To je jedna z možných příčin, která vedla k poškození kořenů a k ovlivnění biologických pochodů, jako je fotosyntéza (Jin et al., 2017; Li et al., 2018). Potlačení růstu kořenů bylo zaznamenáno i u huseníčku rolního pěstováno v MS médiu po dobu 7 dnů při působení AgNPs (0,5 a 3 mg/L). Účinkem nanočástic došlo k silnému inhibičnímu efektu na kořeny, ale pouze u vyšší použité koncentrace v porovnání s efektem Ag^+ iontů. Kromě potlačení růstu kořenového vlášení došlo i k poklesu růstu nových kořenů. Mimo jiné přítomnost nanočástic stříbra byla detekovaná i v listech rostlin.

Účinkem AgNPs i Ag^+ došlo ke změně vnitřní struktury listů, zejména zmenšení jejich buněk. Nanočástice stříbra způsobily plošší tvar chloroplastů, užší grana a větší vzdálenost mezi thylakoidními membránami. Rovněž došlo i ke zvýšení množství osmiofilních globulí i denzních částic. Denzní částice detekované v listech byly důkazem, že nanočástice stříbra byly absorbovány kořeny a transportovány až do listů (Qian et al., 2013). V listech tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) došlo účinkem AgNPs s citrátovým obalem k ovlivnění struktur chloroplastů. Při porovnání s kontrolními rostlinami byly pozorované chloroplasty menších rozměrů, zatímco thylakoidní systém zůstal nezměněn (Cvjetko et al., 2018). Strukturální změny chloroplastů byly vyvolány kromě nejen zmíněnými citrátovými nanočásticemi, ale i nanočásticemi s obaly PVP a CTAB (Peharec Štefanić et al., 2021).



Obr. 4: Strukturální a funkční změny ve fotosyntetickém aparátu u rostlin a řas při účinku nanočástic stříbra s různými povrchovými obaly. RuBisCo – ribulóza-1,5bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa, 3-PGA – 3-fosfoglycerová kyselina, G3P – glyceroaldehyd-3-fosfát, PS – fotosystém, PQ – plastochinon, Cyt b6f – cytochrom b6f, PC – plastocyanin, Fd – feredoxin. Upraveno z Biba et al. (2022).

Přestože fytoxicita způsobená účinkem nanočástic stříbra není dostatečně prozkoumaná a pochopená, doposud nasbíraná data naznačují, že AgNPs mohou v rostlinách disociovat na Ag^+ (Tkalec et al., 2019), které mohou nahradit Cu^+ v plastocyaninech, což vede k narušení funkce elektrotransportního řetězce a tvorby i rovnováhy ROS. Mimo jiné mohou Ag^+ reagovat s thiolovou skupinou enzymů a narušit biosyntézu chlorofylu (Jansson a Hansson 2008; Xu et al., 2010).

Poškození funkce fotosyntetického aparátu může vést i k poklesu asimilace oxidu uhličitého. Tyto změny byly zaznamenány u bobu obecného (*Vicia faba*) při vlivu AgNPs – PVP ve vodném roztoku (100 mg/L) (Falco et al., 2020). Stejný dopad byl sledován i u lociky salátové (*Lactuca sativa*) při vlivu nanočástic stříbra o různých povrchových obalech (citrát, PVP, PEG polyethylenglykol) a koncentracích (1–15 mg/L) po dobu 9 dnů v Hoaglandově roztoku (Torrent et al., 2020) nebo u rýže seté (*Oryza sativa*) působením nanočástic stříbra bez povrchového obalu (Abbas et al., 2019). U rajčete jedlého (*Lycopersicon esculentum*) při účinku AgNPs – PEG byla naměřena nižší hladina chlorofylu a narušená asimilace CO₂. (Das et al., 2018). Poškození asimilace CO₂ mohlo být způsobeno sníženou aktivitou RubisCo, neboť právě tento enzym hrající nezbytnou roli ve fotosyntéze je velmi citlivý na vliv stříbrných iontů (Jiang et al., 2017).

Studie, jež vedl Peharec Štefanić (2021) byla zaměřená na porovnání účinku nanočástic stříbra o vybraných povrchových obalech na rostliny tabáku v MS médiu. Jednalo se o obal citrátový, PVP a CTAB, použity byly nanočástice o koncentraci 25, 50 a 100 µM. Nejmenší poškození bylo zjištěno na rostlinách, které byly vystaveny účinku citrátových nanočástic. Na druhou stranu efekt nanočástic s PVP a CTAB obalem vedl k výraznějšímu poklesu hladiny chlorofylu i xantofylů spojenému s inhibicí účinnosti fotosyntézy. Menší efekt citrátových nanočástic stříbra mohl pocházet z jejich rychlé schopnosti aglomerace, čímž došlo k ovlivnění biologické dostupnosti. Naopak díky pozitivnímu náboji a delší dostupnosti nanočástic s PVP a CTAB obalem byl dopad na rostliny toxičtější. Vlivem citrátových nanočástic došlo i ke zvýšení hladiny xantofylů a parametru NPQ. Tyto změny souvisely s inhibicí fotochemických reakcí, nadměrnou excitací a ochranou PSII (Gondikas et al., 2012).

Nicméně dopad nanočástic stříbra na rostliny není pouze negativní. Stimulační účinek na fotosyntetický aparát a zvýšená hladina chlorofylu byla nalezena u pískavice řecké seno (*Trigonella foenugraecum*) po účinku nanočástic stříbra s citrátovým obalem (Sadak, 2019), stejně tak u hořčice hnědé (*Brassica juncea*) (Sharma et al., 2012a). Totožný efekt byl zaznamenán i u vanilky a cukrové třtiny, které byly ošetřeny AgNPs – PVP (Spinoso-Castillo et al., 2017; Bello-Bello et al., 2017). Ačkoliv zvýšená hladina chlorofylu byla zaznamenána u semenáčků tabáku, účinnost fotosyntézy zůstala nezměněna (Biba et al., 2021a).

Na základě dostupných dat, lze konstatovat, že účinkem AgNPs dochází ke snížení obsahu fotosyntetických pigmentů, inhibicí fotochemických reakcí a asimilací oxidu uhličitého (Biba et al., 2022). Toxický dopad na studované druhy rostlin byl ovlivněn jak

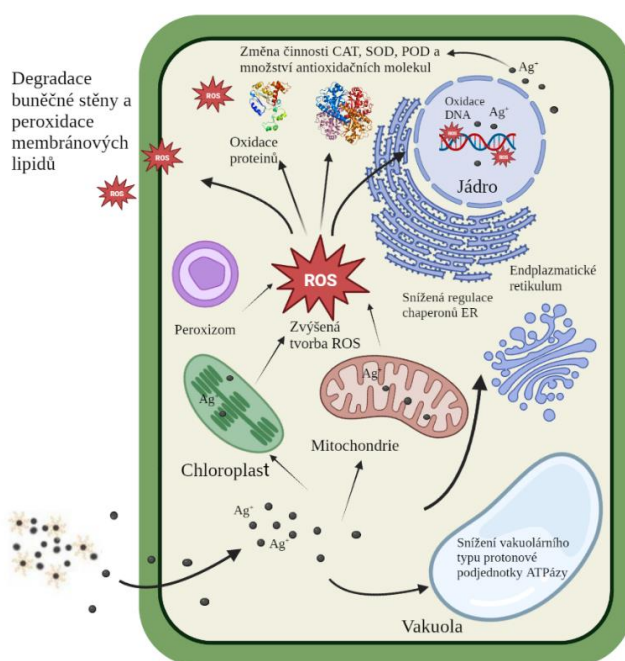
typem povrchového obalu nanočástic stříbra, tak druhem rostliny, vývojovým stádiem a pěstebními podmínkami.

2.6 NAVOZENÍ OXIDATIVNÍHO STRESU A VLIV NA ANTIOXIDAČNÍ MECHANISMY

Oxidační stres je stav, kdy je narušena rovnováha mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku a schopností organismu tyto reaktivní formy odbourávat. Antioxidační systém tak zajišťuje ochranu buněk před oxidativním poškozením při působení, vnějších stresových faktorů (Asada a Takahashi 1987). Produkty redoxních reakcí jsou volné radikály a deriváty kyslíku, které jsou schopny inaktivovat enzymy, což vede k poškození jednotlivých buněčných složek. Důkazem, že rostlina byla vystavena nadměrnému stresu je zvýšená produkce kyslíkových derivátů, čímž dochází k narušení rovnováhy. Působením volných radikálů dochází k postupné peroxidaci lipidů a deesterifikaci mastných kyselin. Rostliny si však vyvinuly řadu obranných mechanismů, které dokážou vůči volným radikálům bojovat a zamezit tak jejich vlivu (Arora et al., 2002). Tvorba ROS je nicméně i běžnou součástí metabolických procesů u rostlin (Alscher et al., 1997).

Doposud provedené experimenty ukazují, že při působení kovových nanočástic dochází ke zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku a k interakci nanočástic s proteiny, lipidy a DNA, což způsobí poškození metabolických drah, destrukci buněk a navození buněčné smrti (Yang et al., 2017). Tvorba superoxidových radikálů a peroxidu vodíku byla podrobena zkoumání na cibuli kuchyňské (*Allium cepa*). Bylo zjištěno, že při vystavení kořenů účinku AgNPs o koncentraci 80 mg/L došlo ke zvýšení hladiny ROS již po dvou hodinách expozice (Panda et al., 2011). Studie autorů Cvjetko a kol. (2017) se zaměřila na vliv nanočástic stříbra s různým povrchovým obalem na kořeny cibule kuchyňské (*Allium cepa*). Jednalo se o AgNPs – PVP, jakožto jeden z nejčastějších povrchových obalů, AgNPs – CTAB a AgNPs – Citrát. Bylo zjištěno, že signifikantní zvýšení hladiny ROS nastalo především v případě povrchového obalu PVP a CTAB při koncentracích nanočástic 50, 75 a 100 μM ve srovnání s kontrolou. Nejméně zvýšená hladina ROS byla zjištěna po aplikaci citrátových nanočástic. Avšak, znatelnější změny hladiny ROS byly viditelné u rostlin po účinku dusičnanu stříbrném již při koncentraci 25 μM . Nanočástice stříbra měly nižší účinek v porovnání s AgNO_3 . To naznačuje, že toxicita nanočástic stříbra zřejmě nesouvisela s disociací Ag^+ iontů. To mohlo být dáno povrchovým obalem nanočástic, který je stabilizoval a zabránil disociaci, tudíž potlačil toxicitu s ní spojenou (Yasur a Rani, 2013).

Ke stejnému výsledku došla i studie huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) pod vlivem nanočástic o koncentraci v rozmezí 0,2 – 1 mg/L při hydroponickém pěstování v Hoaglandově živném roztoku (Nair a Chung, 2014a). U sazenic tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*), které byly vystaveny účinku AgNPs (100 μ M) s citrátovým obalem po dobu 30 dnů v MS, došlo k elevaci ROS, nicméně u AgNO₃ dosahoval obsah ROS vyšší hodnoty (Štefanić et al., 2018). Naopak vyšší hladina ROS byla zaznamenána po aplikaci AgNPs o koncentraci 10 a 20 mg/L bez povrchového obalu ve srovnání s AgNO₃ u bramboru obecného (*Solanum tuberosum*) (Bagherzadeh Homae a Ehsanpour, 2016).



Obr. 5: Efekt nanočástic stříbra s povrchovým obalem na rostlinnou buňku. ROS – reaktivní forma kyslíku, ER – endoplazmatické retikulum, CAT – katalasa, SOD – superoxididmutasa, POD – peroxidasa. Upraveno z Biba et al. (2022).

Hlavní úlohou antioxidačního aparátu je regulace nadměrné produkce a vylučování ROS při vystavení vlivu AgNPs v rostlinách (Yasur a Rani, 2013). V sóji luštinaté (*Glycine max*) byla prokázána zvýšená aktivita enzymů superoxididmutasy (SOD) a katalasy (CAT) po vystavení účinku AgNPs s citrátovým obalem. Zvýšená aktivita zmíněných enzymů vedla k poklesu obsahu peroxidu vodíku v rostlinách (Galazzi et al., 2019). Účinek AgNPs na tabák virginský (*Nicotiana tabacum*) vedl ke specifickým reakcím antioxidačních enzymů v závislosti na lokalizaci pletiva. Při expozici nízké koncentraci citrátových nanočástic stříbra došlo ke zvýšení aktivity enzymu CAT v kořenech, zatímco vyšší koncentrace nanočástic způsobila kromě zvýšení aktivity CAT i zvýšení aktivity peroxidasy (POD) v listech (Cvjetko et al., 2018).

Kromě zmíněných antioxidačních enzymů se při likvidaci ROS uplatňují i neenzymové antioxidační molekuly, mezi které se řadí prolin, glutathion (GSH) a karotenoidy. Jejich úloha spočívá v procesu detoxifikace rostlin (Hayat et al., 2012). Glutathion má schopnost vázat volné radikály (Lee et al., 2007) a sloužit jako substrát při tvorbě fytochelatinů (Ha et al., 1999). Karotenoidy dokážou regulovat hladinu ROS prostým zvýšením své koncentrace (Havaux, 2014). Avšak bylo zjištěno, že u rýže seté (*Oryza sativa*) při účinku AgNPs s citrátovým i PVP obalem došlo k poklesu hladiny karotenoidů, zatímco hladina prolinu byla zvýšena (Nair a Chung, 2014b). Tyto změny byly rovněž pozorovány i u pšenice seté (*Triticum vulgare*) (Karimi a Mohsenzadeh, 2017). Vlivem toxického efektu AgNPs došlo k narušení biosyntézy karotenoidů a k jejich celkovému poklesu v rostlinách (Romero et al., 2020). Naopak koncentrace prolinu byla ve srovnání s karotenoidy zvýšena. Prolin je označován jako osmolyt a chelátátor, který váže kovové částice. Díky tomu došlo ke snížení hladiny ROS (Szabados a Saviouré, 2009).

Doposud provedené studie jejichž hlavním zájmem byl vliv nanočástic stříbra zahrnoval široké spektrum specifických podmínek. Od různých koncentrací, typu povrchového obalu, přes pěstební prostředí až po různé rostlinné druhy. Ze získaných výsledků můžeme předpokládat, že právě AgNPs hromadící se v rostlinných buňkách vedou ke zvýšené produkci ROS. Ovšem, nelze s jistotou tvrdit, zda AgNPs indukují ROS přímou cestou nebo nepřímou díky stříbrným iontům (Tkalec et al., 2019).

2.6.1 Antokyany

Antokyany jsou rostlinné pigmenty patřící do skupiny flavonoidů. Flavonoidy se běžně vyskytují v listech, květech i pylech. Jedná se o sekundární metabolity lokalizované ve vakuole, kde se hromadí jako glykosidy. Mimo jiné se vyskytují i jako exsudát na povrchu listů (Viestra et al., 1982). Flavonoidy se vyznačují schopností lokalizovat, vychytávat a následně neutralizovat ROS dříve, než způsobí rozsáhlé poškození buněk (Løvdal et al., 2010). Při stresových podmínkách dochází k aktivaci flavonoidových genů zejména při vystavení stresu, mezi které se řadí sucho, poškození nebo toxicita kovů (Winkel-Shirley, 2002).

Vědci Nair a Chung (2014a) provedli studii, která byla založená na účinku stříbrných nanočástic na huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) v Hoaglandově živném roztoku. Při expozici AgNPs a AgNO₃ o koncentraci 0,2 mg/L nebyly zjištěny žádné signifikantní změny, avšak při vyšší koncentraci (0,5 a 1 mg/L) došlo k viditelnému nárůstu koncentrace

antokyanů. Zvýšená koncentrace antokyanů byla také naměřena u brukve zelné (*Brassica oleracea*) po aplikaci AgNPs o koncentraci 100 mg/L v MS médiu (Tymoszuk 2021).

Antokyany známé jako neenzymatické antioxidanty chrání rostliny před oxidativním stresem jako chelátátor kovů s cílem zamezit akumulaci ROS. Působením AgNPs na rostliny dochází k aktivaci ochranných mechanismů, které je možno pozorovat zvýšením hladiny antokyanů (Gill a Tuteja 2010, Carocho a Ferreira 2013).

2.6.2 Malondialdehyd jako indikátor stresu

Malondialdehyd (MDA) je jedním z finálních produktů při oxidační modifikaci lipidů způsobené narušením rovnováhy mezi vznikem a likvidací ROS. MDA se tedy používá jako indikátor oxidačního stresu u rostlin (Sharma et al., 2012b).

Změnami koncentrace MDA se zabývala studie Cvjetko et al. (2017), ve kterém byl zkoumán vliv nanočástic s odlišným typem povrchového obalu při expozici kořenů cibule kuchyňské. Bylo zjištěno, že AgNPs – CTAB o velikosti 5,6 nm způsobily zvýšení hladiny MDA, zatímco u AgNPs – Citrát o velikosti 60 nm a AgNPs – CTAB o rozměrech 9,4 nm takové změny zaznamenány nebyly. Toxicita byla ovlivněná především velikostí a koncentrací nanočástic. Nanočástice menších rozměrů vlivem snadnějšímu transportu způsobily vyšší toxicitu u rostlin (Silva et al., 2013). Účinek AgNPs mohl být ovlivněn i typem povrchového obalu, kdy CTAB obal byl kladně nabitý, zatímco buněčná membrána byla záporně nabitá. To umožnilo jednodušší transport, díky vzájemné elektrostatické interakci. Naproti tomu slabší dopad byl zaznamenán u nanočástic s citrátovým obalem, a to zřejmě díky jejich většímu rozměru a negativnímu povrchovému náboji (Šinko et al., 2014). Jiná studie zkoumala účinek nanočástic stříbra (100 μ M) s citrátovým obalem na semenáčky a dospělé rostliny tabáku. U semenáček byla naměřena zvýšená hladina MDA, zatímco u dospělých rostlin nebyla koncentrace MDA signifikantně zvýšena v kořenech a ani v listech. Toto zjištění vedlo k závěru, že efekt nanočástic stříbra je ovlivněn i vývojovým stádiem rostliny (Cvjetko et al., 2018; Štefanić et al., 2018)

Řada studií srovnávala i dopad toxického účinku na rostliny mezi dusičnanem stříbrným a nanočásticemi stříbra. Zjistily, že vyšší hladina stresu byla naměřena u rostlin, které byly vystaveny vlivu dusičnanu stříbrného. Toto zjištění znamená, že stříbrné ionty (Ag^+) mohou mít vyšší toxicitu než nanočástice stříbra, avšak toxicita nanočástic stříbra nemusí být dána pouze disociací Ag^+ . V dalších provedených experimentech byly výsledky nejednoznačné (Cvjetko et al., 2018; Štefanić et al., 2018). Když Galazzi et al. (2019) provedli studii zaměřenou rovněž na efekt dusičnanu stříbrného a nanočástic stříbra na

transformované (tolerance vůči herbicidům) a netransformované rostliny sóji luštinaté, zjistili, že během expozice, která trvala čtrnáct dní, došlo ke zvýšení koncentrace MDA u obou genotypů rostlin. Avšak u netransformovaných rostlin, které neměly toleranci vůči herbicidům, byla hladina pozorovatelně vyšší u dusičnanu stříbrného než u nanočástic stříbra, zatímco u transformovaného genotypu sóji byla hladina zvýšena při aplikaci obou studovaných látek.

2.7 MOTIVACE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Dnešní doba nabízí díky rozvinutým nanotechnologiím širokou poptávku po produktech, jež jsou složeny z komponentů, které jsou tvořeny z nanočástic stříbra. Jejich výroba a spotřeba proto nese vysoké riziko možného úniku do vnějšího prostředí a narušení biologických pochodů v ekosystému. Proto tato práce navazovala na předchozí studii, která se zabývala srovnáním účinku nanočástic stříbra u různých druhů rostlin. Závěrem práce bylo, že po šestidenním působení nanočástic stříbra o citrátovém povrchovém obalu (13 mg/L) v hydroponických podmínkách nebyly u ječmene jarního zaznamenány žádné signifikantní změny ve studovaných fotosyntetických parametrech, naopak významné změny byly sledovány u kořenů tabáku virginském (Trajerová, 2021). Díky této práci byly získány prvotní zkušenosti s aplikací AgNPs na modelové rostliny a následně bylo možné navázat podrobnějším studiem vlivu AgNPs s různým povrchovým obalem při aplikaci v hydroponii a v MS médiu.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Rostlinný materiál

Nanočástice stříbra o vybraných povrchových obalech byly aplikovány na huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L., ekotyp Col-0), ječmen jarní (*Hordeum vulgare* L., cv. Bojos) a vojtěšku setou (*Medicago sativa* L., cv. Morava) metodou hydroponického pěstování a pěstování v MS médiu.

Pro řízené pěstování rostlin byla využita fytokomora (Snijders Scientific, Nizozemí). Pěstební podmínky zahrnovaly teplotu 21 °C (16 hodin světlo/8 hodin tma), ozáření byla 100 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (50 %). Výjimkou byl huseníček rolní, který byl pěstován při teplotě ve fytokomoře 22 °C/20 °C a krátkém dni (8 hodin světlo/16 hodin tma), ozáření 100 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Relativní vlhkost vzduchu byla ve všech případech 60 %. Po aplikaci AgNPs nebo během ní byly rostliny inkubovány ve fytokomoře za stejných podmínek, za jakých byly pěstovány (s výjimkou teploty u huseníčku, kdy byla použita teplota 20 °C).

Stáří vybraných rostlinných druhů u hydroponických experimentů (před aplikací roztoků) bylo u huseníčku rolního 5 týdnů, u ječmene jarního 1 týden a u vojtěšky seté 3 týdny. Rostliny v MS médiu byly podrobeny měření ve stáří okolo 4 týdnů. Hydroponické experimenty byly provedeny v březnu – červenci 2022 a experimenty s MS médiem byly provedeny v červenci – prosinci (2022).

3.2 Přístrojové vybavení

- Autokláv 2340M (Tuttnauer, USA)
- Centrifuga Sigma 3-30K (Sartorius, Německo)
- Dvoupaprskový spektrometr UV550 (Thermo Spectronic, Rochester, USA)
- Fluorescenční zobrazovací systém FluorCam FC 800-0 (PSI, Drásov, ČR)
- Fytokomora (Snijders Scientific Microclima 1750, Nizozemí)
- Hlubokomrazicí box Cryocube F440 (Eppendorf, Německo)
- Inkubátor/třepačka (Grant-Bio, Velká Británie)
- Laminární box biohazard (Faster, Ferrara)
- Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.3 Použité chemikálie

- Deionizovaná voda (dH_2O)
- Dusičnan stříbrný (AgNO_3) (20 mg/L)

- Nanočástice stříbra s citrátovým povrchovým obalem (20 mg/L) a glutathionovým (18,8 mg/L) povrchovým obalem – připraveny a poskytnuty Mgr. Radkem Ostruzskou (KEF PřF UP), koncentrace stříbra byla stanovena RNDr. T. Pluháčkem, Ph.D. (ACH PřF UP)
- Citrát
- Glutathion
- Agar (Sigma-Aldrich, USA)
- Sacharóza (Lach-ner, Czech Republic)
- Murashige and Skoog basal salt mixture (MS) (Sigma-Aldrich, USA)
- Savo 20%
- Hydroxid sodný (NaOH) (Lach-ner, Czech Republic)
- Kyselina chloristá (HClO₄) (Lach-ner, Czech Republic)
- 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH) (Sigma-Aldrich, USA)
- Uhličitan hořečnatý (MgCO₃) (Sigma-Aldrich, USA)
- Aceton (80%) (VWR chemicals, USA)

3.4 Příprava rostlinného materiálu

3.4.1 Hydroponické pěstování

Rostlinné druhy, které byly vybrány pro experimenty byly napěstovány ve květináčích při definovaných podmínkách ve fyto komoře. Jakmile rostliny dosahovaly určeného stáří, byly poté přesazeny do mikrozku mávek (typ. Eppendorf) o různých objemech (objem byl zvolen podle toho, zda se jednalo o aplikaci na kořeny či na oddělené listy rostlin). Pro experimentální testování byly vybrány pouze reprezentativní rostliny bez viditelných známek poškození.

Rostliny, u kterých byla použita aplikace na kořeny, byly předchozí den vyjmuty z půdy, omyty od zeminy a nečistot a následně vloženy do mikrozku mávek (typ. Eppendorf) (5 mL) s deionizovanou vodou. Mikrozku mávky byly obaleny alobalem, s cílem zamezení přístupu světla na kořeny rostlin. Obdobný postup byl aplikován na oddělené listy, které byly za pomoci skalpele odděleny od rostliny. Následující den byly rostliny vloženy do mikrozku mávek (2 mL) s definovaným roztokem (deionizovaná voda (pH = 6), dusičnan stříbrný (pH = 6, 20 mg/L), citrátový (pH = 7) a glutathionový (pH = 9) kontrolní roztok, citrátový (pH = 7) a glutathionový (pH = 8) koloid nanočástic stříbra (18,8 mg/L).

Rostliny byly sledovány po dobu 10 dnů. Měření probíhalo před aplikací roztoků („0. den po aplikaci“, dpa) a následně 6 dpa a 10 dpa. Pro každou variantu bylo provedeno 6 opakování. Jako kontrolní roztok byla zvolena deionizovaná voda a pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (20 mg/L).

3.4.2 MS médium

Pro přípravu MS média bylo do zásobní lahve naváženo 2,15 g (MS basal salt mixture) směsi solí a 10 g sacharózy (Lach-ner, Czech Republic). Objem zásobní lahve byl doplněn deionizovanou vodou do celkového objemu 1 litru a promíchán do úplného rozpuštění všech složek. Do plastových krabiček, které sloužily pro růst rostlin bylo naváženo 0,64 g agaru (Sigma-Aldrich, USA). Připravené médium ze zásobní lahve bylo poté podle definovaného objemu postupně odměřeno odměrným válcem do krabiček, tak, aby vždy dosahovaly příslušné koncentrace. Krabičky obsahující agar a MS médium byly poté vysterilizovány na 25 minut při teplotě 121°C v autoklávu (Tuttnauer, USA). Referenční roztoky a nanočásticové koloidy byly přefiltrovány pomocí filtru a injekční stříkačky za účelem jejich přečištění. K vyautoklávovaným vzorkům o teplotě 55 °C bylo napipetováno definované množství příslušného roztoku (dusičnan stříbrný, citrátový a glutathionový kontrolní roztok, citrátový a glutathionový koloid nanočástic stříbra o koncentraci 1 a 5 mg/L. Jakmile došlo ke vzájemnému smísení složek a k ztuhnutí, tak bylo do jednotlivých krabiček zaseto vždy 5 vysterilizovaných semen (Savo 20%) daného rostlinného druhu. Krabičky byly zalepeny autoklávovací páskou a uloženy do fytokomory.



Obr. 6: Připravená média s obsahem studovaných citrátových a glutathionových nanočástic stříbra, kontrolních roztoků citrátu a glutathionu. Kontrolou bylo čisté MS médium a pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3).

3.5 Použité metody

3.5.1 Měření funkce fotosystému II fluorescenčním zobrazovacím systémem

Rostliny byly podrobeny řadám měření ve fluorescenčním zobrazovacím systému FluorCam FC 800-0 (PSI, Drásov, ČR), jehož cílem bylo zjištění specifických parametrů chlorofylové fluorescence při působení vybraných roztoků. Před každým měřením byly rostlinné vzorky zatemněny na 20 minut, aby došlo k jejich adaptaci na tmou. Během měření fluorescence byl nejprve změřen základní parametr F_V/F_M a poté bylo aplikováno červené aktinické světlo ($100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) po dobu 7 minut se sérií saturačních pulzů, které byly aplikovány po 3, 26, 49, 72, 95, 118, 141, 188, 235, 282, 352 a 422 sekundách po spuštění aktinického světla, během které došlo ke stanovení fluorescenčních parametrů Φ_P , Φ_{NPQ} a $\Phi_{f,d}$ (viz dále).

Po naměření fluorescenčních parametrů byly od rostlin odděleny kořeny, rostliny bez kořenů byly poté zváženy na analytických vahách, vloženy do mikrozkušavek, zamrazeny pomocí tekutého dusíku a uloženy do mrazicího boxu Cryocube F440 (Eppendorf, Německo) při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ pro následující analýzy. Veškeré vzorky byly fotograficky zdokumentovány.

3.5.1.1 Parametr F_V/F_M

Parametr F_V/F_M vyjadřuje maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ve stavu adaptovaném na tmou (Špundová et al., 2003). F_M je maximální intenzita chlorofylové měřené při aplikaci saturačního pulsu a F_0 je minimální intenzita fluorescence měřená pomocí velmi slabého měřicího světla. Nejvyšší hodnota u zdravé, nepoškozené rostliny se pohybuje okolo hodnoty 0,83. Naopak s poškozením tato hodnota postupně klesá.

$$\frac{F_V}{F_M} = \frac{(F_M - F_0)}{F_M}$$

3.5.1.2 Parametry chlorofylové fluorescence Φ_P , Φ_{NPQ} a $\Phi_{f,d}$.

Dalšími parametry chlorofylové fluorescence, které byly použity za účelem posouzení vlivu AgNPs na funkci fotosyntetického aparátu, byly parametry Φ_P , Φ_{NPQ} a $\Phi_{f,d}$. Ty byly měřeny během tzv. fluorescenční indukce chlorofylu, kdy je měřený rostlinný vzorek osvětlen aktinickým světlem a postupně tedy přechází ze stavu adaptovaného na tmou do stavu adaptovaného na světlo. Bylo použito červené aktinické světlo o intenzitě přibližně $100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a během 7 minut bylo postupně aplikováno 12 saturačních pulzů ($2000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Φ_P vyjadřuje efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (PSII) v průběhu adaptace vzorku na světlo a odráží, kolik absorbované světelné energie je následně využito ve fotosyntetických procesech. Je vypočítán jako:

$$\Phi_P = \frac{(Fm' - Ft)}{Fm'}$$

kde Fm' je maximální intenzita fluorescence vzorku osvětleného aktinickým světlem měřená pomocí saturačního pulsu a Ft je intenzita fluorescence v čase t aktinického světla. U standardních nestresovaných vzorků parametr Φ_P rychle narůstá, kdežto při stresu se jeho nárůst zpomaluje a Φ_P dosahuje nižší saturační hodnoty.

Φ_{NPQ} vyjadřuje kvantový výtěžek nefotochemického zhášení a je definovaný jako:

$$\Phi_{NPQ} = \frac{Ft}{Fm'} - \frac{Ft}{Fm}$$

U nestresovaných rostlin tento parametr zpravidla rapidně roste v první minutě po osvětlení a poté klesá. Jeho průběh je ale ovlivněn i dalšími faktory, mezi které patří intenzita použitého aktinického světla a světelné podmínky při růstu rostlin. Rostlina absorbuje velké množství energie, které hlavně na začátku osvětlení není využito ve fotosyntéze, a proto dochází k nárůstu nefotochemického zhášení, aby se zabránilo poškození fotosyntetického aparátu. Při plné aktivaci fotosyntézy ve stavu adaptovaném na světlo dochází k poklesu parametru Φ_{NPQ} . U mírně stresovaných rostlin je zpravidla zaznamenán pomalejší prvotní nárůst a vyšší saturační hodnota Φ_{NPQ} , zatímco při silném poškození je Φ_{NPQ} výrazně inhibován a naopak roste $\Phi_{f,d}$.

$\Phi_{f,d}$ vyjadřuje kvantový výtěžek bazálního nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu. Zvýšení jeho hodnot odráží výrazné poškození PSII. $\Phi_{f,d}$ se vypočte jako:

$$\Phi_{f,d} = \frac{Ft}{Fm}$$

Podíl zmíněných tří kvantových výtěžků vyjadřuje, jak je absorbovaná světelná energie využita ve fotosyntéze. Jejich součet dává číslo 1 (100 %) (Lazár, 2015). Nemění-li se hodnota Φ_P , není ovlivněna funkce PSII. Pokud klesá Φ_P a roste Φ_{NPQ} , jedná se o mírný stres, kdy $\Phi_{f,d}$ neroste. PSII není poškozen, ale absorbuje se více excitací, než kolik je jich využito ve fotosyntéze a tím se aktivují ochranné zhášecí procesy, což se projeví nárůstem Φ_{NPQ} . Při silném stresu, tedy silném poškození PSII, se prohlubuje pokles Φ_P a roste $\Phi_{f,d}$.

V práci jsou prezentovány hodnoty parametrů Φ_P , Φ_{NPQ} a $\Phi_{f,d}$ v ustáleném stavu adaptovaném na světlo, a to jednak formou sloupcových grafů (průměry a směrodatné odchylky), jednak formou koláčových (průměry) pro ilustrativnější zobrazení podílu jednotlivých kvantových výtěžků.

3.5.1.3 Parametry NPQ a 1 - qP

NPQ je definován jako nefotochemické zhášení fluorescence vycházející ze Stern-Volmerovy rovnice (Lazár, 2015; Bilger a Björkman, 1990). Je charakterizován jako indikátor nadbytečné excitační energie a odráží tepelnou disipaci excitační energie. Může sloužit jako indikátor stresu. NPQ bylo vypočítáno následovně:

$$NPQ = \frac{F_M - F'_M}{F'_M}$$

1 - qP je interpretován jako excitační tlak na PSII a odráží, nám do jaké míry je redukován plastochinonový pool. Čím je parametr bližší hodnotě 1, tím redukovánější je plastochinonový pool (PQ) a tedy jsou uzavřenější reakční centra PSII. Naopak pokud je parametr qP blízký hodnotě 1 (tedy 1 - qP se blíží 0), tak elektronový transportní řetězec za PSII funguje dobře. Tedy PQ pool je minimálně redukován a reakční centra jsou otevřená, protože elektrony velmi rychle procházejí dál v transportním řetězci. Parametr 1 - qP byl vypočítán následovně: (F'_0 je minimální fluorescence ve stavu adaptovaném na světlo)

$$1 - qP = 1 - \frac{F'_M - F_t}{F'_M - F'_0}$$

3.5.2 Stanovení obsahu malondialdehydu pomocí HPLC

Zamražené vzorky byly homogenizovány v třecí misce s tlučkem za pomoci deionizované vody. Zhomogenizovaný materiál byl přepipetován do mikrozkušavky (typ Eppendorf) o objemu 1,5 mL. Vzorek byl následně zcentrifugován při 6000 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Ze vzorku bylo odebráno 100 μ l supernatantu do nové mikrozkušavky, přidáno 20 μ l 6M hydroxidu sodného (NaOH) a následně byl vzorek zhomogenizován. Vzorek byl zahříván na termobloku na 60 °C po dobu 30 minut. V digestoři bylo následně ke vzorku přidáno 60 μ l kyseliny chloristé (HClO_4), poté byl vzorek zhomogenizován a centrifugován při 16000 g po dobu 10 minut při 4 °C. Po proběhlé centrifugaci bylo ze vzorku ihned odebráno 100 μ l supernatantu do nové zkumavky s 1 μ l 50 mM 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH). Připravený vzorek byl inkubován po dobu 30 minut ve tmě, než bylo zahájeno měření na HPLC po nástřiku 10 μ l vzorku. Pomocí HPLC došlo

k separaci a detekci MDA. Koncentrace MDA byla vyjádřena v jednotkách nmol/g čerstvé hmotnosti.

3.5.3 Stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů v listech pomocí absorpční spektrofotometrie

Rostlinné vzorky byly homogenizovány v třecí misce s tloučkem s přidavkem MgCO₃ a 2 mL 80% acetonu. Při práci byly vzorky udržovány na ledu. Zhomogenizovaný materiál byl centrifugován při 3600 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Ze vzorků byl odpipetován supernatant do skleněných zkumavek a případně byl ředěn 80% acetonem tak, aby se absorbance u vlnové délky 663,2 nm pohybovala v rozmezí hodnot 0,4 – 0,8. Rostlinný extrakt byl ze skleněných zkumavek přepipetován do skleněné květy ta vložena do spektrofotometru UV550 (Thermo Spectronic, Rochester, USA). Následně bylo provedeno spektrofotometrické stanovení absorbance při vlnových délkách 470 nm, 646,8 nm, 663,2 nm a 750 nm. Získaná data byla zpracována a vyhodnocena pomocí rovnic:

$$\text{Chlorofyl } a = \frac{(12,25 \cdot (A_{663,2} - A_{750}) - 2,79 \cdot (A_{646,8} - A_{750})) \cdot V}{m} \quad [\mu\text{g/g}]$$

$$\text{Chlorofyl } b = \frac{(21,5 \cdot (A_{646,8} - A_{750}) - 5,1 \cdot (A_{663,8} - A_{750})) \cdot V}{m} \quad [\mu\text{g/g}]$$

$$\text{Karotenoidy} = \frac{((1000 \cdot (A_{470} - A_{750}) - 1,82 \cdot (\text{chl } a) - 85,02 \cdot (\text{chl } b)) / 198) \cdot V}{m} \quad [\mu\text{g/g}]$$

3.6 Zpracování experimentálních dat

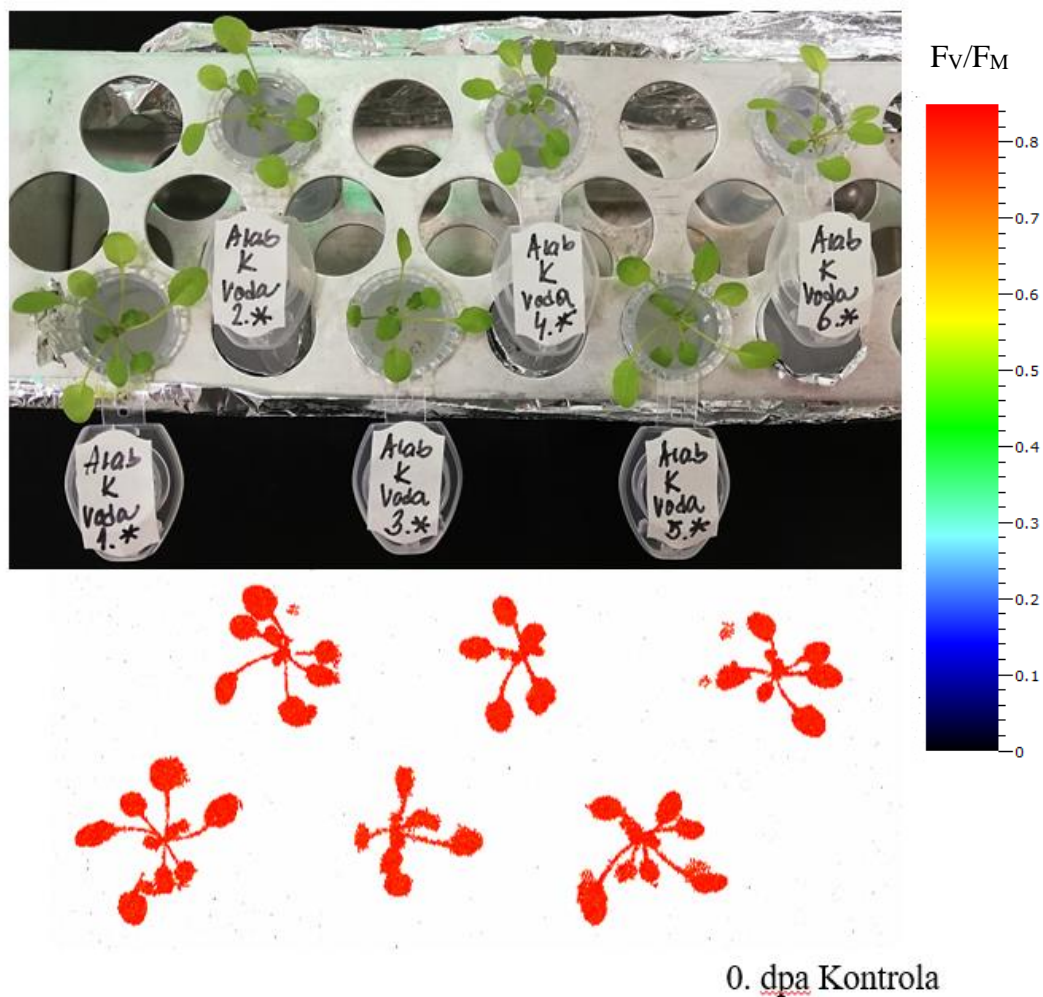
Ke statistickému vyhodnocení získaných dat byl použit program FluorCam (PSI, Drásov, ČR) a Microsoft Office Excel (MS Office, USA). Statistická významnost rozdílů mezi vybranými variantami vzorků byla zjištěna pomocí Studentova testu (t – test). V grafickém zpracování jsou statisticky významné rozdíly označeny nad jednotlivými sloupci. Rozdíly parametrů mezi kontrolou (deionizovaná voda nebo čisté médium) a dusičnanem stříbrným jsou označeny symbolem „-“, rozdíl varianty C.AgNPs proti variantě Citrát „+“ a G.AgNPs proti Glutathionu „*“ . Tři symboly označují statisticky významný rozdíl na hladině $P < 0,001$, dva symboly na hladině $P < 0,01$ a jeden symbol na hladině $P < 0,05$.

4 VÝSLEDKY

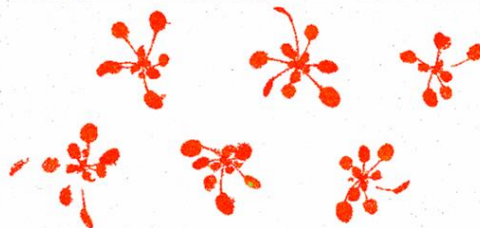
4.1 Experimenty založené na hydroponickém pěstování

4.1.1 huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L.)

4.1.1.1 kořeny



Obr. 7: Zobrazení parametru F_v/F_M u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. Rostliny 0. den po aplikaci (0 dpa) deionizované vody na kořeny rostlin. Rostliny byly staré 5 týdnů.



6. dpa Kontrola



Dusičnan stříbrný



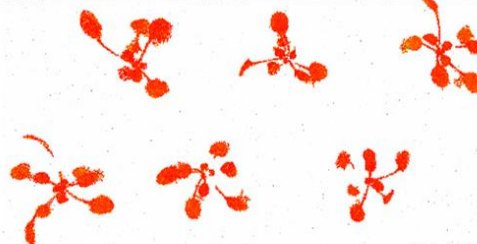
Citrát



C.AgNPs

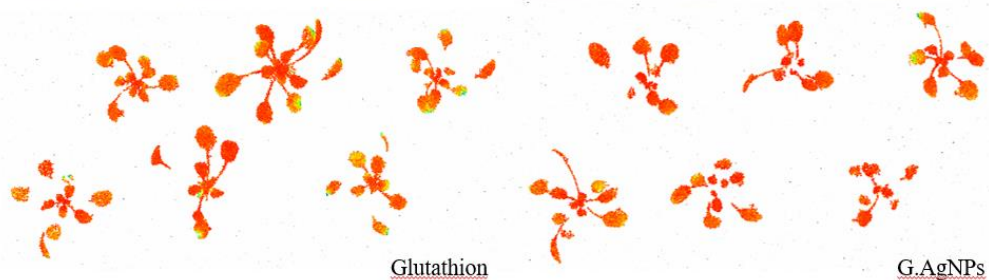
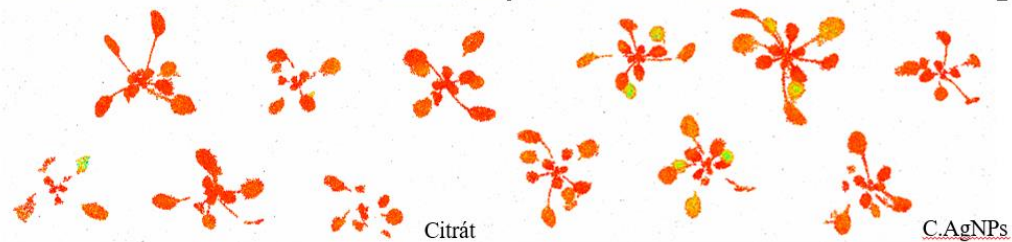
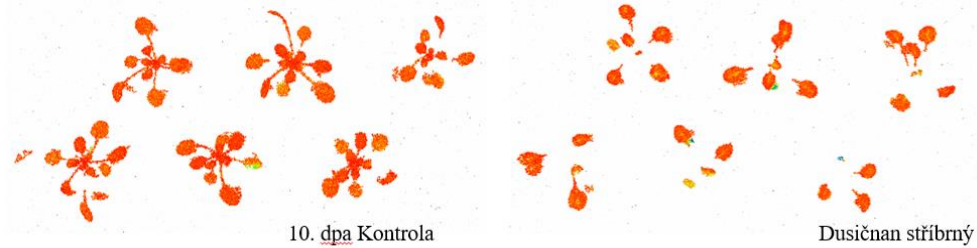


Glutathion

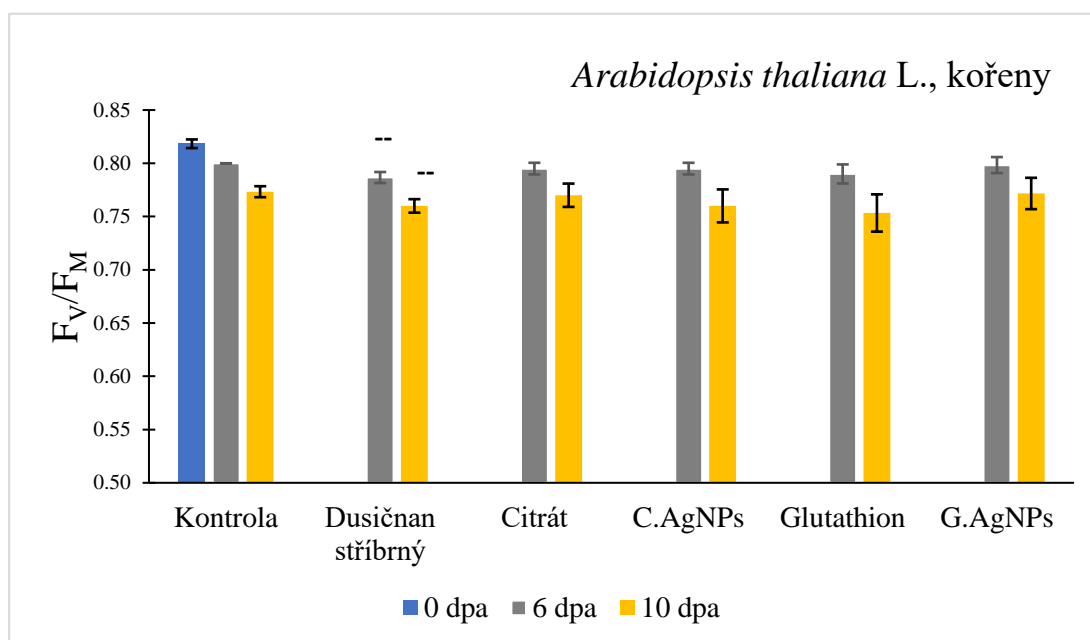


G.AgNPs

Obr. 8: Zobrazení parametru F_v/F_m u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. Rostliny 6. den po aplikaci (6 dpa), citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Rostliny byly staré 5 týdnů. Škála F_v/F_m je stejná jako v Obr. 7.

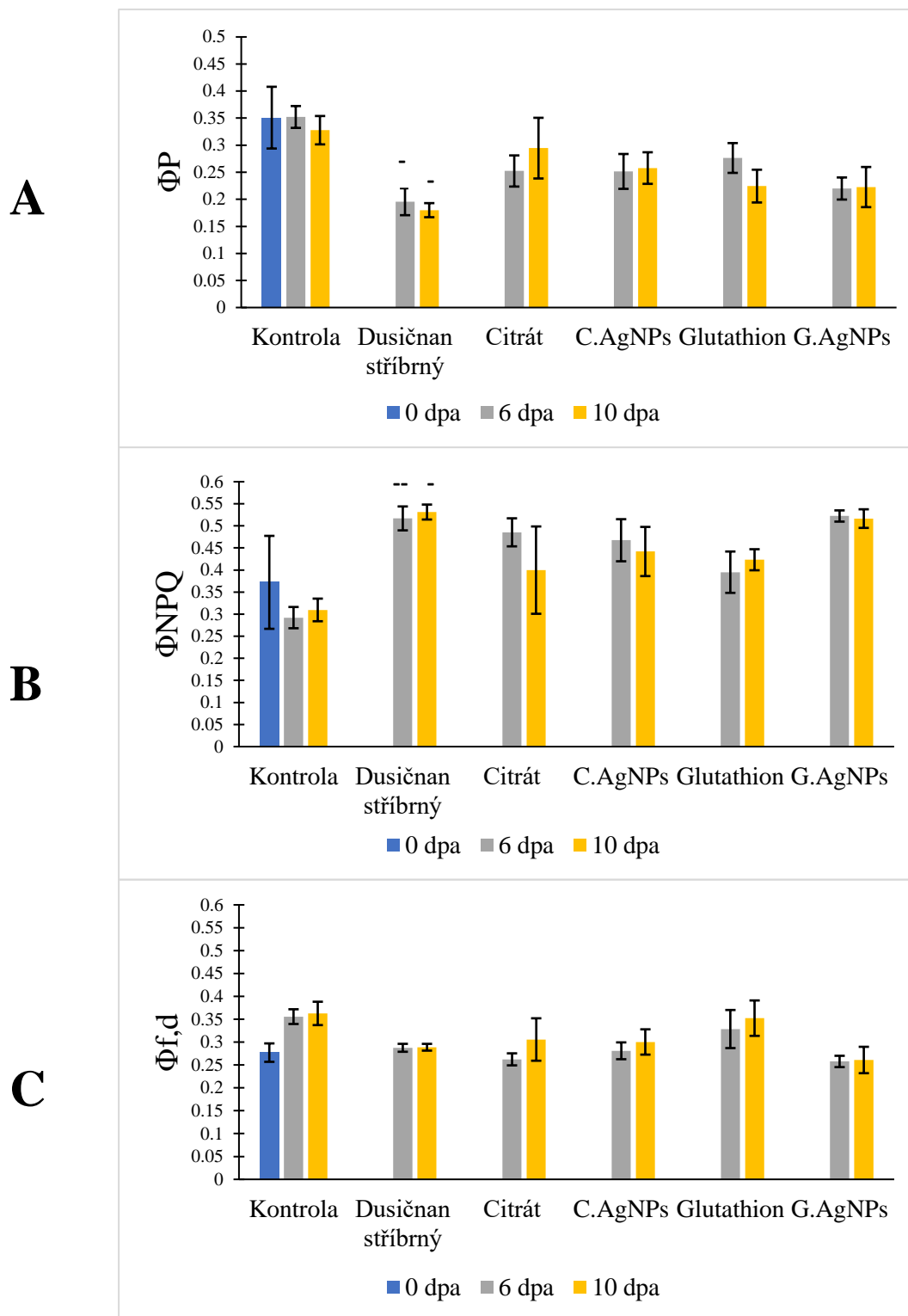


Obr. 9: Zobrazení parametru F_v/F_m u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. Rostliny 10. den po aplikaci (10 dpa) citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Rostliny byly staré 5 týdnů. Škála F_v/F_m je stejná jako v Obr. 7.



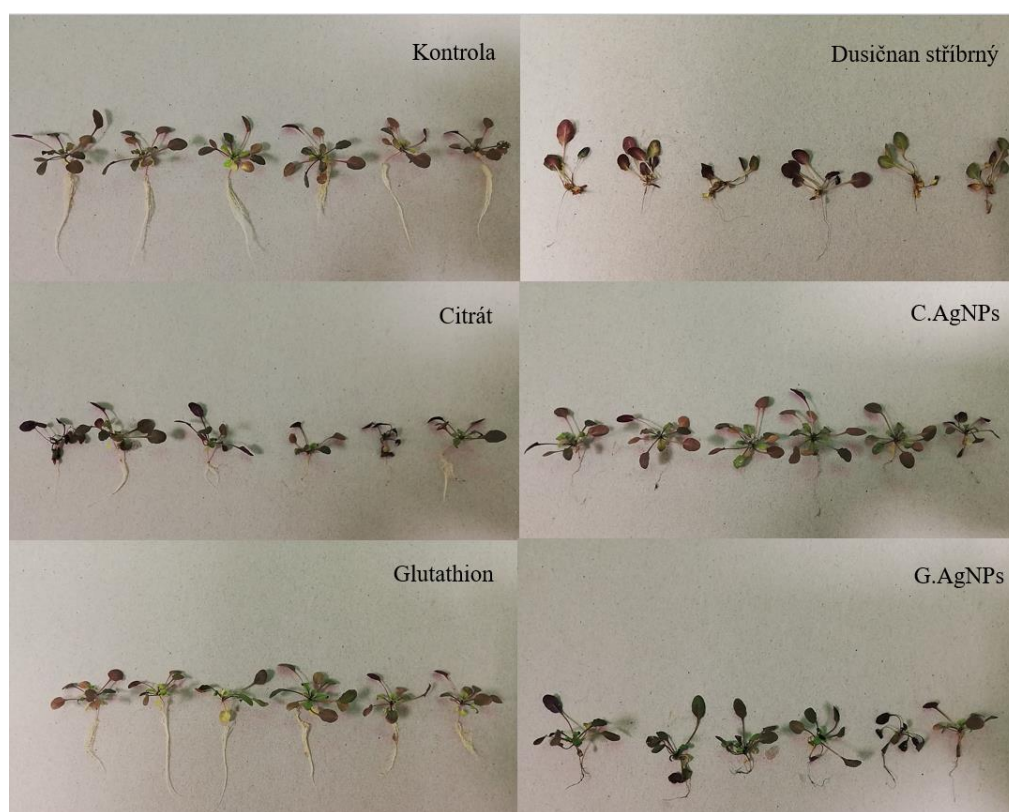
Obr. 10: Parametr F_V/F_M měřený na rostlinách huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 6$. Pomlčky (-) označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci (t-test). Rostliny byly staré 5 týdnů.

Vyjmutí rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) z květináčů s půdním substrátem a vložení jeho kořenů do deionizované vody způsobilo během desetidenního testování pokles parametru F_V/F_M (Obr. 7 - Obr. 10). U rostlin, které byly vystaveny vlivu citrátovému koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs) došlo k poklesu parametru F_V/F_M ve srovnání s citrátovou kontrolou (Obr. 10), což lze pozorovat i u snímků z Fluorcamu na jednotlivých listech u C.AgNPs (Obr. 8 – Obr. 9). Naopak u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs) došlo k mírnému nárůstu zkoumaného parametru v porovnání s glutathionovou kontrolou. Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán pouze v parametru F_V/F_M u dusičnanu stříbrného vůči kontrole. Žádné statisticky významné změny u studovaných koloidů (C.AgNPs a G.AgNPs) nenastaly. Na jednotlivých rostlinách byla zaznamenána chloróza a fialové zbarvení listů. Jedná se o zvýšení množství antokyanů v důsledku vystavení stresovým podnětům (Obr. 8 - Obr. 9).



Obr. 11: A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (Φ_P), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení (Φ_{NPQ}), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ($\Phi_{f,d}$) na konci fluorescenční indukce u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Pomlčky (-) označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci (t-test). Rostliny byly staré 5 týdnů.

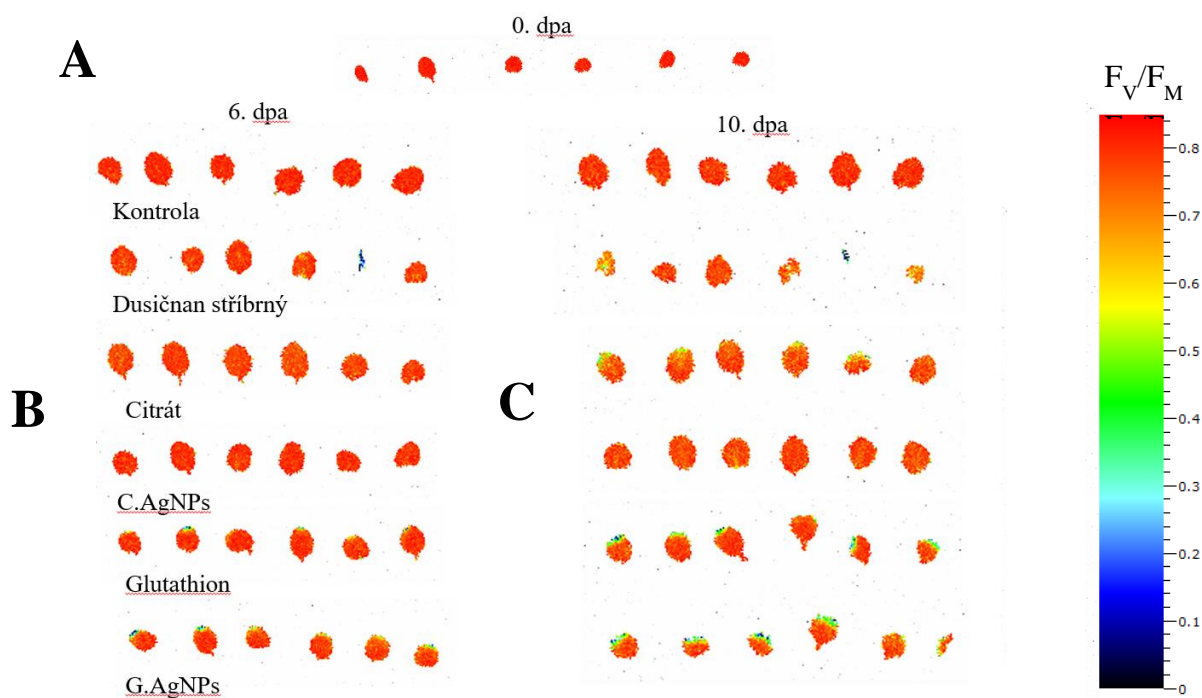
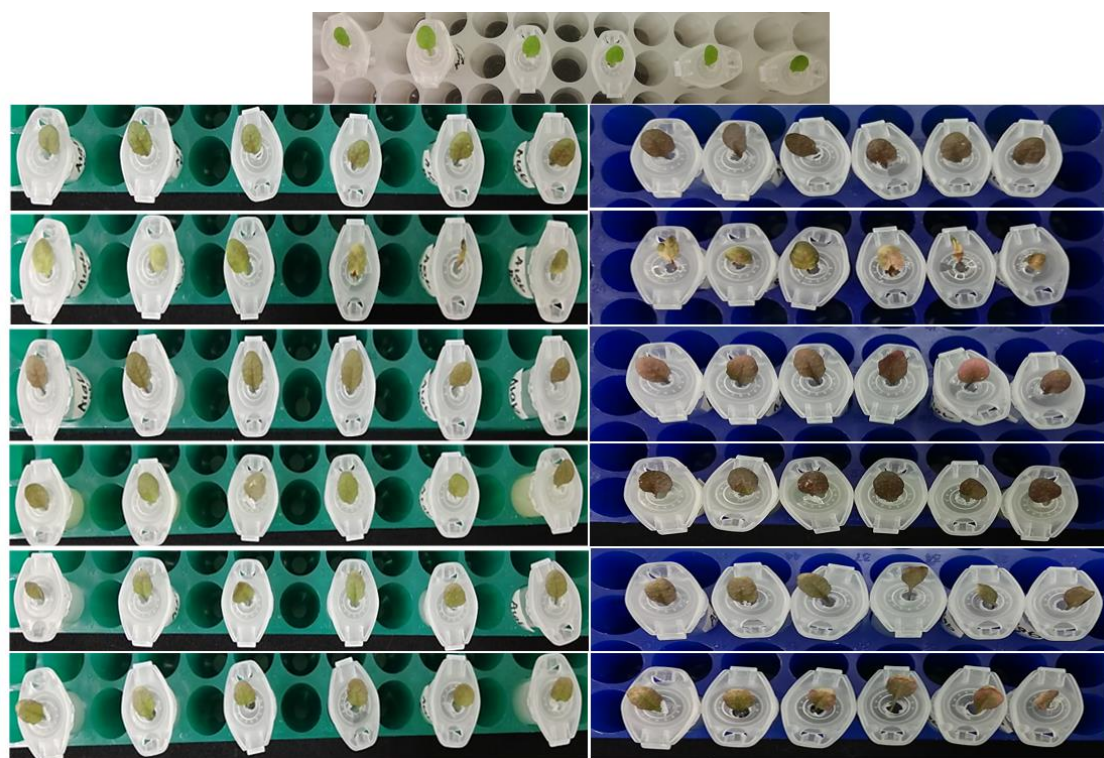
Během experimentálního testování bylo u kontrolních rostlin zjištěn mírný pokles hodnoty parametru ΦP a ΦNPQ , zatímco hodnota $\Phi f,d$ vzrostla (Obr. 11). Tyto změny odrážejí stav rostlin, kdy se jednalo o zhoršení fotochemické funkce PSII. Určité (i když statisticky nevýznamné) změny byly pozorovatelné u G.AgNPs ve srovnání s glutathionovou kontrolou, kdy hodnota ΦP a $\Phi f,d$ klesla, zatímco parametr ΦNPQ rostl. Jednalo se o aktivaci ochranných procesů s cílem zamezit výraznému poškození, které by negativně ovlivnilo schopnost funkce fotosyntetického aparátu. Žádné změny nebyly zaznamenány u C.AgNPs vůči kontrolnímu roztoku (Obr. 11). Rostliny pod vlivem dusičnanu stříbrného (pozitivní kontrola) vykazovaly silný pokles parametru ΦP a $\Phi f,d$, zatímco hodnota ΦNPQ byla zvýšena.



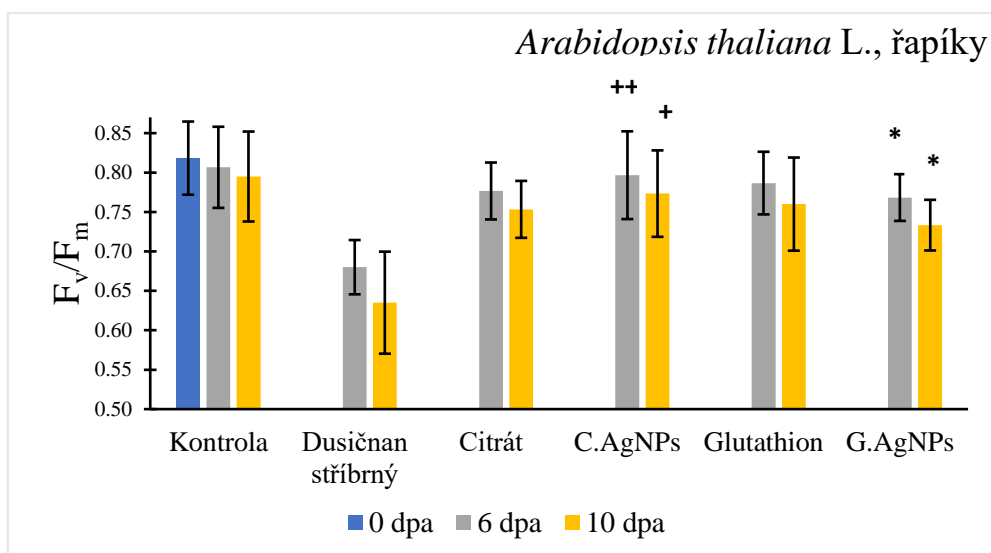
Obr. 12: Vizuální porovnání kořenů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) 10. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Rostliny byly staré 5 týdnů.

Při účinku vybraných roztoků na kořeny rostlin lze pozorovat určité změny. U rostlin po aplikaci citrátového koloidu nanočástic (C.AgNPs) došlo ke změně vzhledu a struktury kořenů, zejména se jednalo o hnědé zbarvení a zjemnění kořenového vlášení v porovnání s citrátovou kontrolou, u které tyto změny nebyly tak patrné. Totožný efekt byl viditelný i u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs) (Obr. 12).

4.1.1.2 řapíky

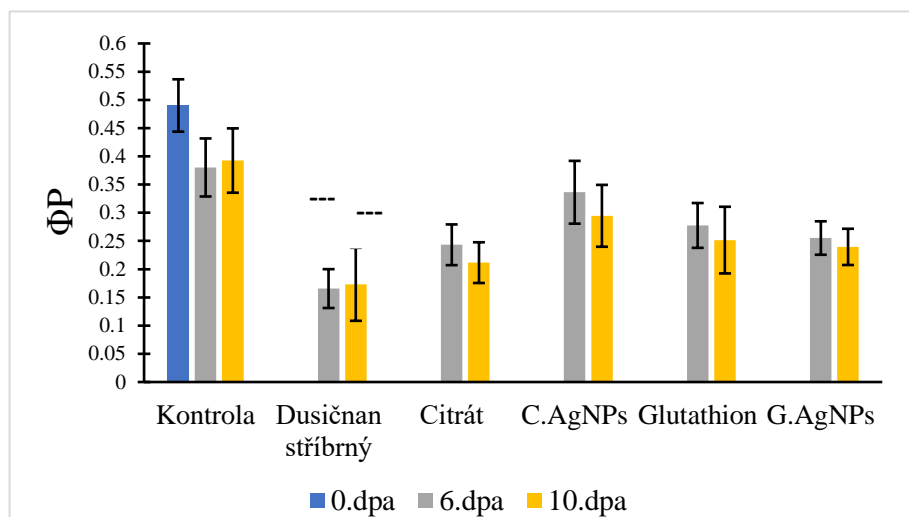
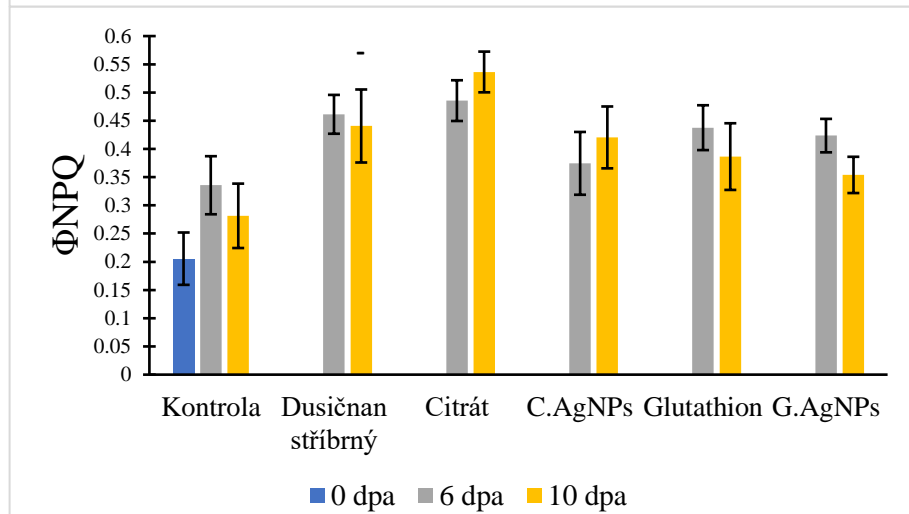
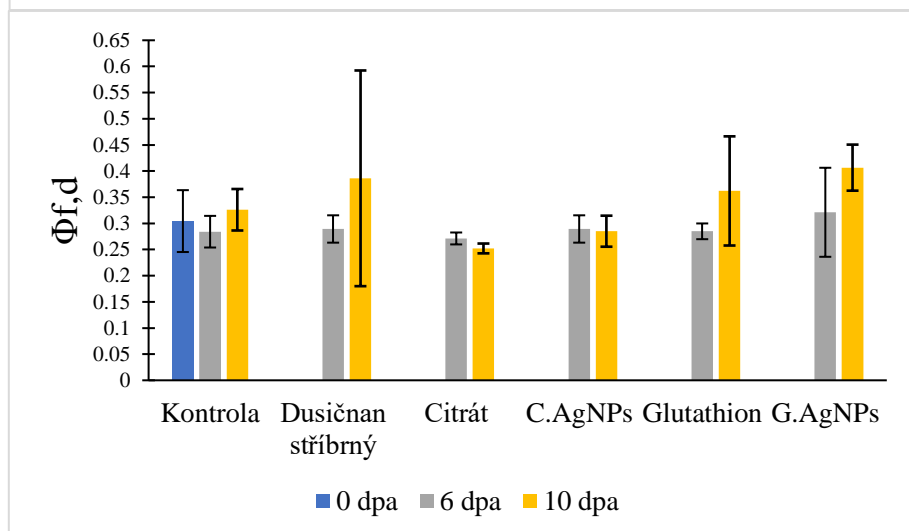


Obr. 13: Zobrazení parametru F_v/F_m na listech huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. A) Listy 0. den po aplikaci (0 dpa), B) Listy 6. den po aplikaci (6 dpa), C) listy 10. den po aplikaci (10 dpa) citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly řapíky ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Rostliny byly staré 5 týdnů.



Obr. 14: Parametr F_v/F_m měřený na rostlinách huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly řapíky ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 6$. Pluska (+) označují statisticky významný rozdíl varianty C.AgNPs proti variantě Citrát a hvězdičky (*) G.AgNPs proti Glutathionu příslušný den po aplikaci (t-test). Rostliny byly staré 5 týdnů.

Oddělení listů huseníčku rolního a vložení jejich řapíků do deionizované vody způsobilo během 10 dnů experimentálního měření mírný pokles parametru F_v/F_m (Obr. 14). Znatelný pokles byl u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs) ve srovnání s kontrolním roztokem glutathionu, zatímco u citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs) došlo ke slabému vzrůstu při srovnání s kontrolním roztokem citrátu (Obr. 14). Výrazný pokles parametru F_v/F_m byl zaznamenán u dusičnanu stříbrného (pozitivní kontrola). Poškození bylo vždy pozorováno od okraje listů zejména u G.AgNPs. U všech listů byla viditelná chloróza, zejména u dusičnanu stříbrného (Obr. 13).

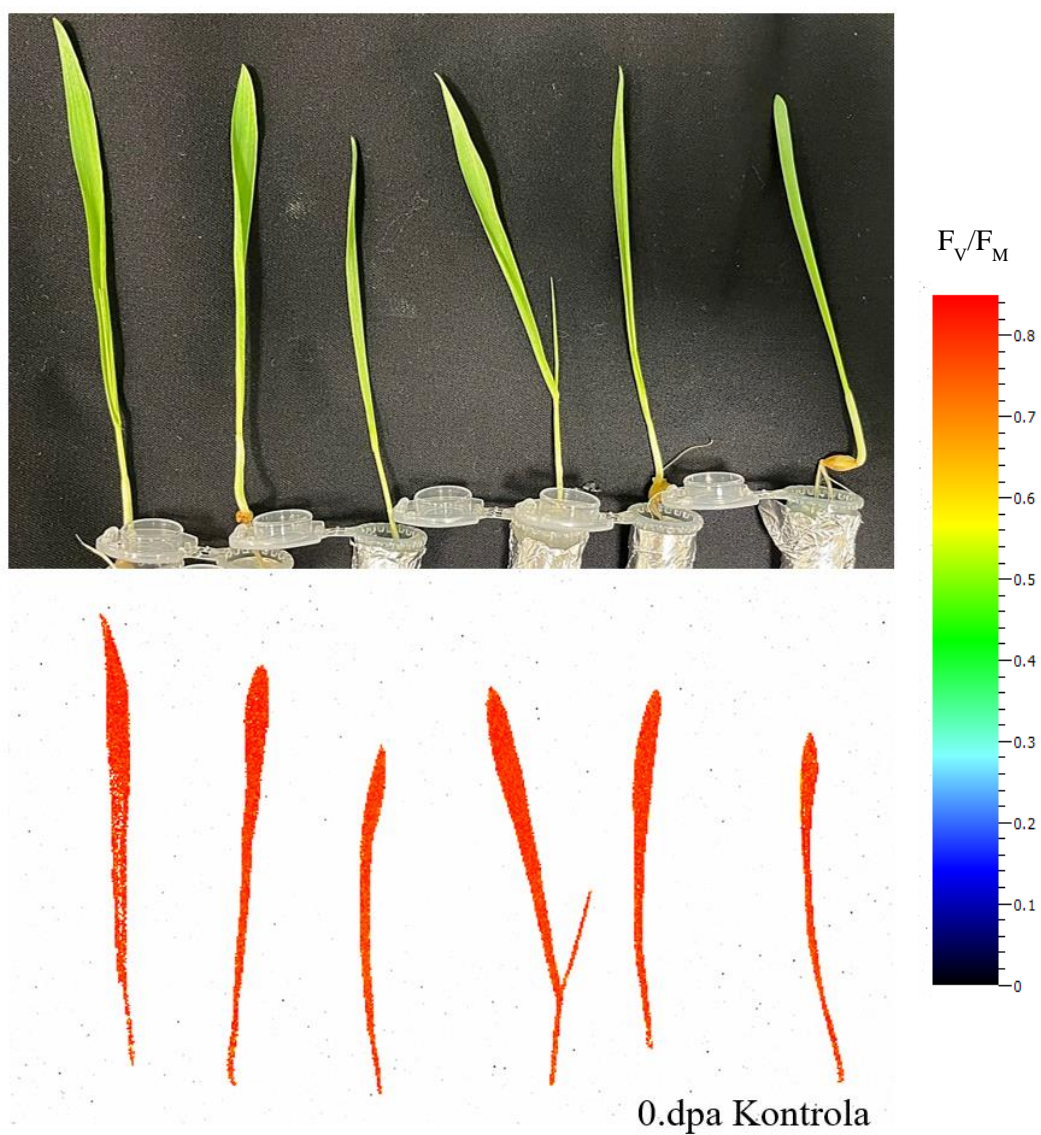
A**B****C**

Obr. 15: Parametry Φ_P , Φ_{NPQ} , $\Phi_{f,d}$ měřeny na rostlinách huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly řapíky ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Pomlčky (-) označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci (t-test). Rostliny byly staré 5 týdnů.

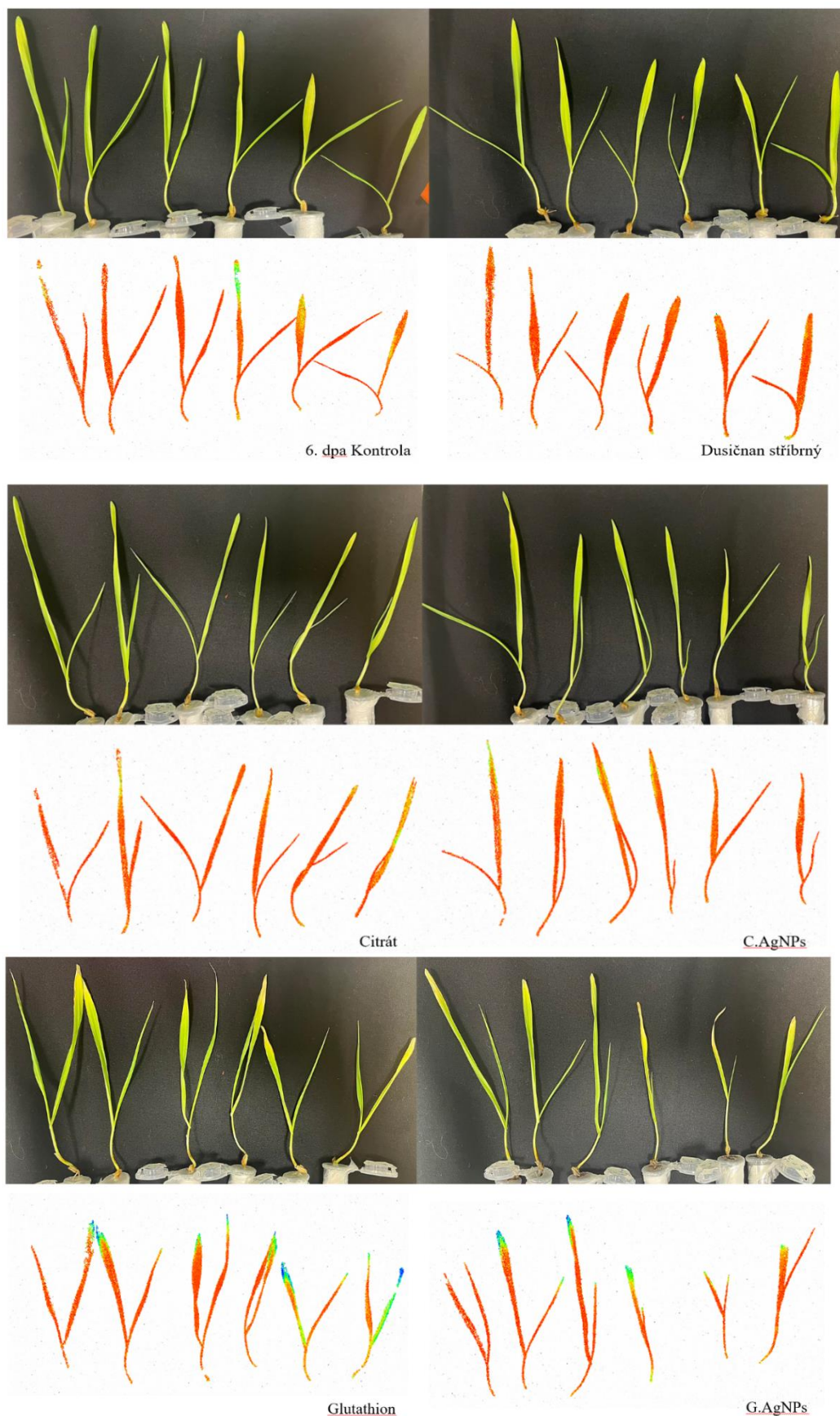
U kontrolních oddělených listů huseníčku rolního došlo během měření k mírném poklesu parametru Φ_P a zvýšení Φ_{NPQ} . Hodnota $\Phi_{f,d}$ nevykazovala téměř žádné změny. Zajímavé výsledky byly však viditelné u C.AgNPs ve srovnání s citrátovou kontrolou. Došlo k nárůstu parametru Φ_P , poklesu Φ_{NPQ} . Hodnota $\Phi_{f,d}$ byla beze změny (Obr. 15). Vyšší výtěžek fotochemie fotosystému II indikoval větší využití absorbované energie ve fotosyntéze, tedy funkce fotosyntetického aparátu nebyla poškozena, naopak byla zvýšena. Zatímco účinek G.AgNPs nevykazoval žádné změny parametrů Φ_P , Φ_{NPQ} a $\Phi_{f,d}$ ve srovnání s kontrolním roztokem (Obr. 15).

4.1.2 ječmen jarní (*Hordeum vulgare* L.)

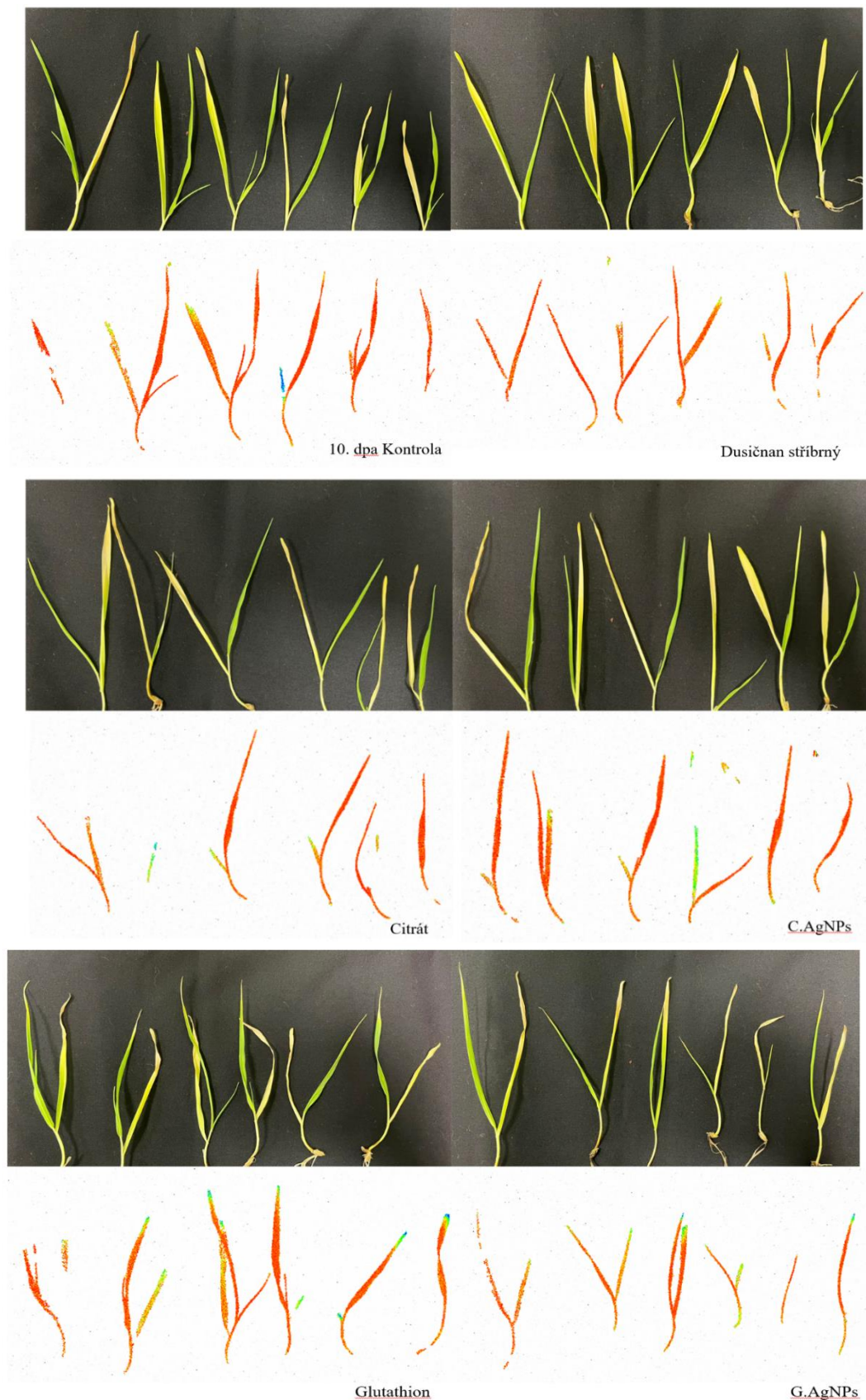
4.1.2.1 kořeny



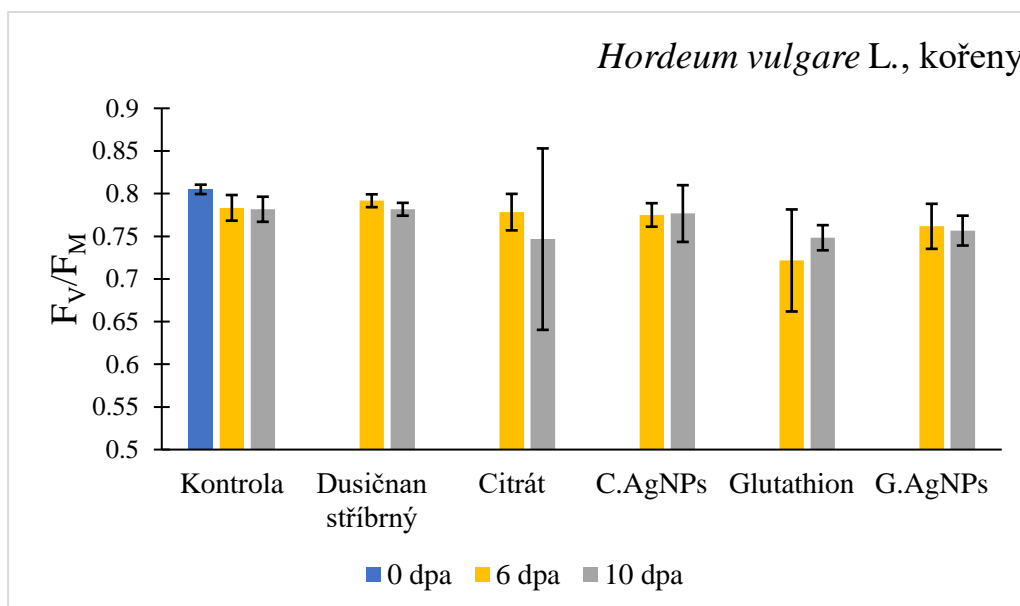
Obr. 16: Zobrazení parametru F_v/F_m u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. Rostliny 0. den po aplikaci (0 dpa) deionizované vody na kořeny rostlin. Rostliny byly staré 1 týden.



Obr. 17: Zobrazení parametru F_v/F_m u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. Rostliny 6. den po aplikaci (6 dpa) citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Rostliny byly staré 1 týden. Škála F_v/F_m je stejná jako v Obr. 16.

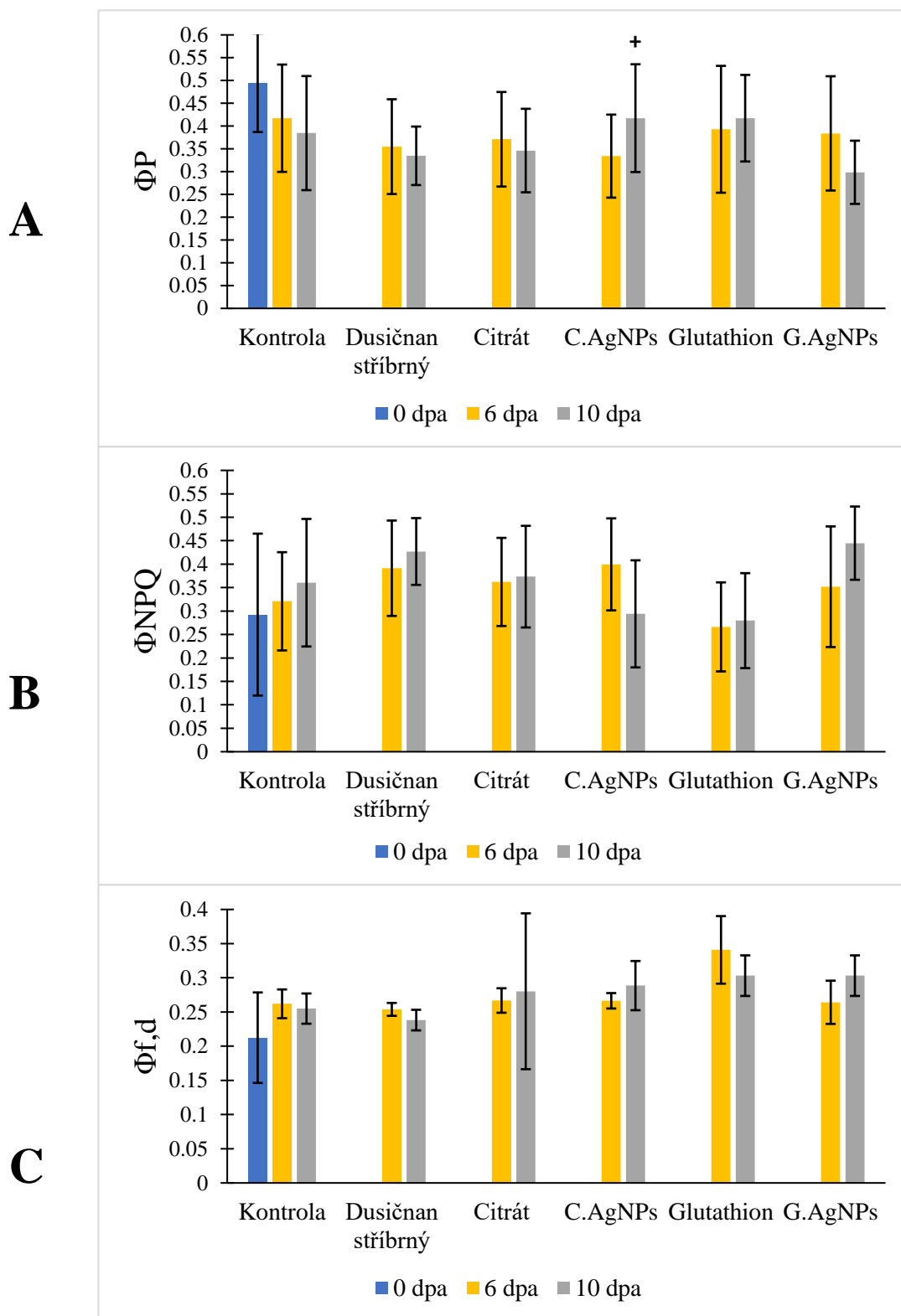


Obr. 18: Zobrazení parametru F_v/F_M u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. Rostliny 10. den po aplikaci (10 dpa) citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Rostliny byly staré 1 týden. Škála F_v/F_M je stejná jako v Obr. 16.



Obr. 19: Parametr F_v/F_M měřený u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 6$. Rostliny byly staré 1 týden.

U rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) nebyly pozorovány žádné signifikantní změny u kontrolních rostlin v parametru F_v/F_M . Studovaný parametr F_v/F_M nevykazoval žádný pokles jak u citrátového koloidu (C.AgNPs), tak i u glutathionového (G.AgNPs) koloidu nanočástic stříbra (Obr. 19), které byly zájmem měření. Nicméně šestého dne (6 dpa) bylo na listech možné sledovat mírné poškození vedoucí vždy od špičky listu, zejména u G.AgNPs a Glutathionu (Obr. 17 a Obr. 18), ale rozdíl v míře chlorózu mezi variantami nebyl zaznamenán.



Obr. 20: Parametry Φ_P , Φ_{NPQ} , $\Phi_{f,d}$ měřeny na rostlinách ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Pluska (+) označují statisticky významný rozdíl varianty C.AgNPs proti variantě Citrát (t-test). Rostliny byly staré 1 týden.

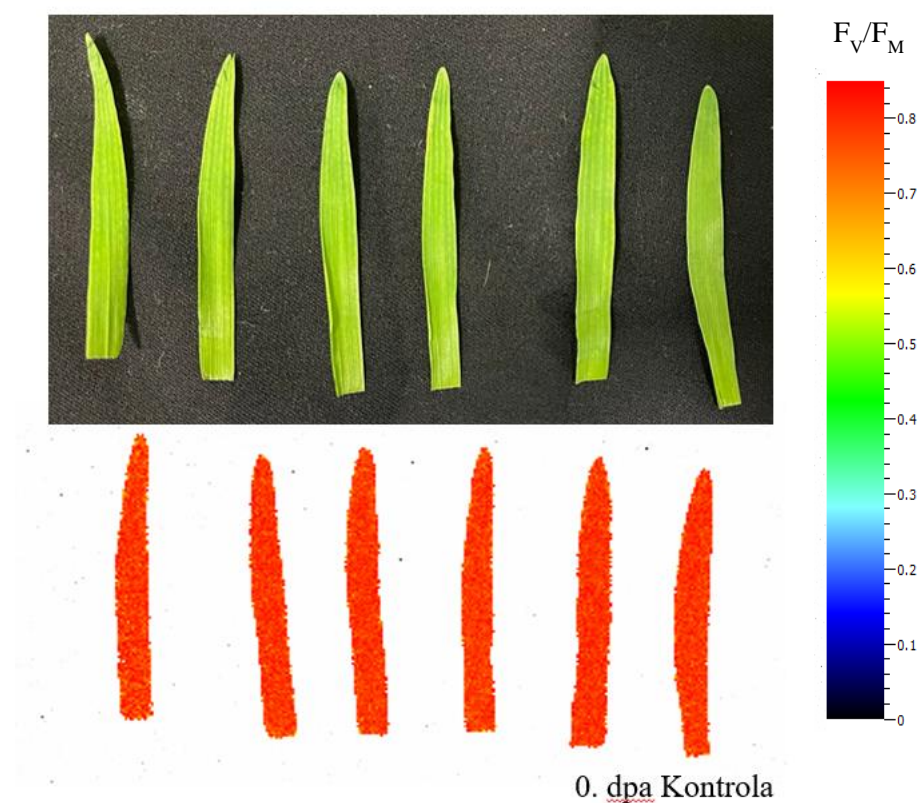
U kontrolních rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) došlo k mírnému poklesu parametru ΦP , zvýšení ΦNPQ a $\Phi f,d$ (Obr. 20). U glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs) poklesla hodnota ΦP i $\Phi f,d$ a zvýšil se parametr ΦNPQ ve srovnání s kontrolním roztokem glutathionu. Účinek G.AgNPs zřejmě způsobil aktivaci ochranných procesů, které zabránily rozsáhlejšímu poškození rostlin. Naopak efekt citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs) na rostliny nevedl k poklesu studovaných parametrů. Došlo naopak k nárůstu hodnoty ΦP v porovnání s kontrolním roztokem citrátu a poklesu ΦNPQ . Hodnota $\Phi f,d$ nevykazovala žádné změny (Obr. 20).



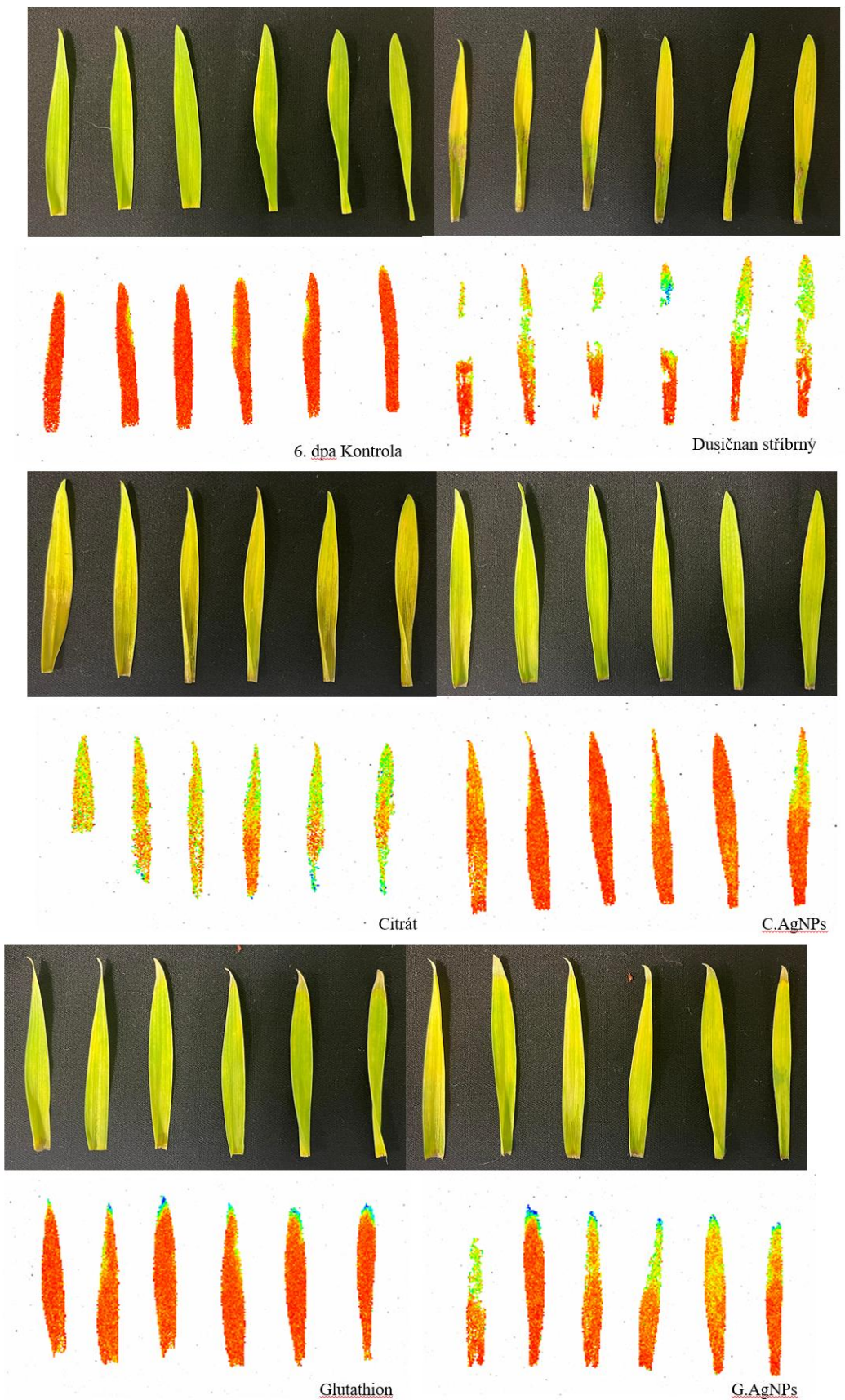
Obr. 21: Porovnání kořenů ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L) 10. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu, glutathionu na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Rostliny byly staré 1 týden.

Účinky citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs) i glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs) nevykazovaly žádné viditelné změny u kořenů ve srovnání s kontrolou roztoky (Obr. 21).

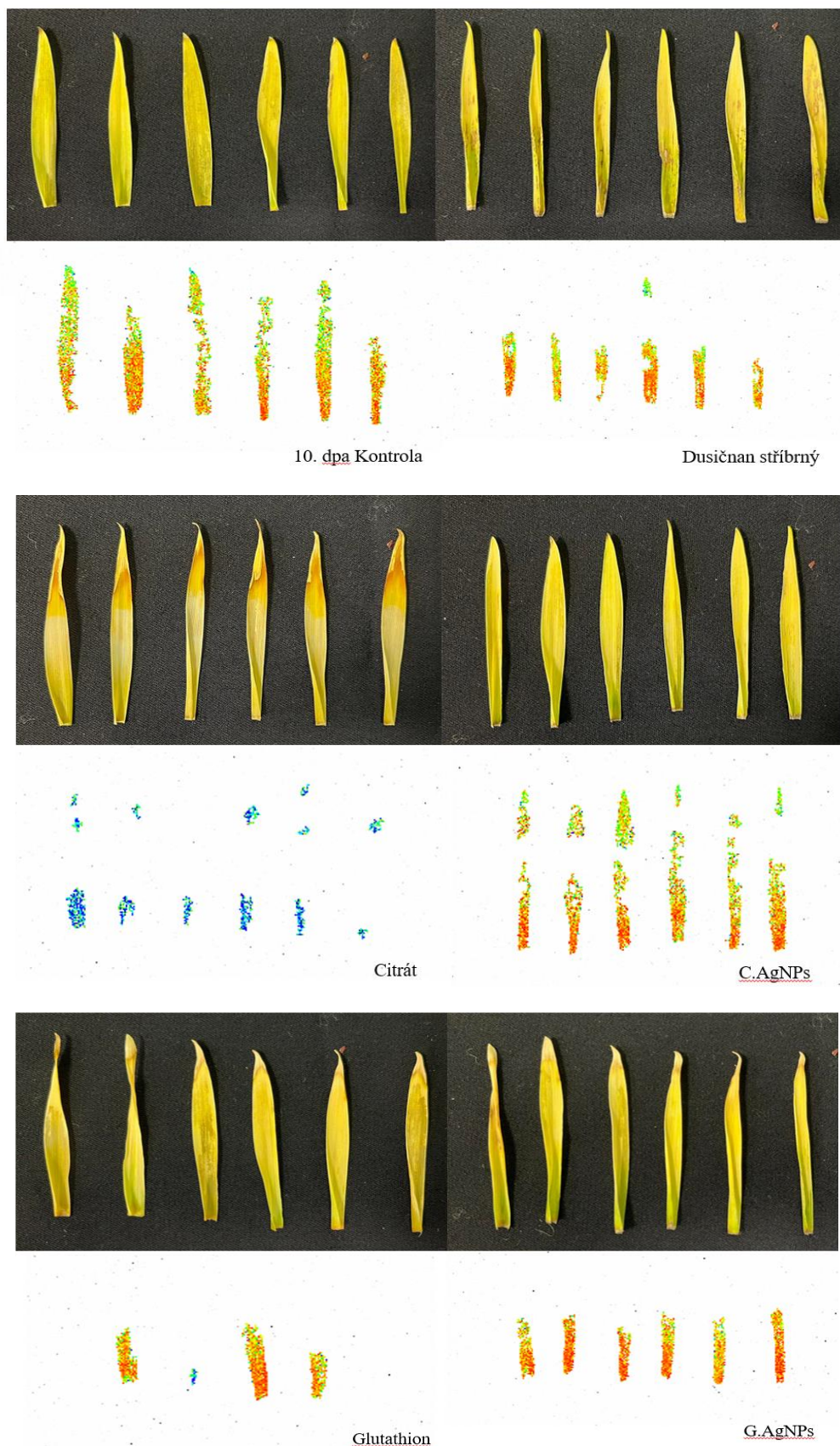
4.1.2.2 oddělené listy



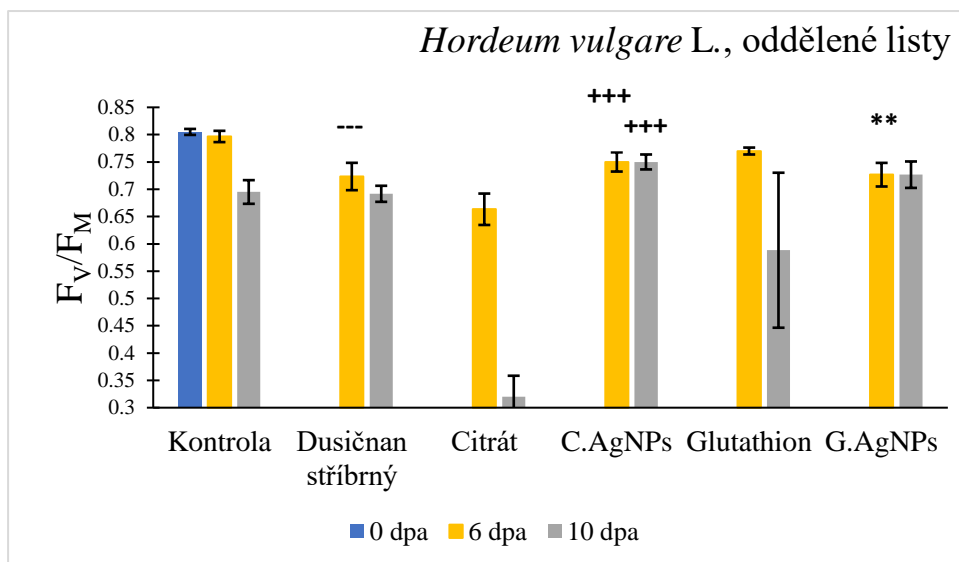
Obr. 22: Zobrazení parametru F_v/F_m u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. Listy 0. den po aplikaci (0 dpa) deionizované vody na listy rostlin. Rostliny byly staré 1 týden.



Obr. 23: Zobrazení parametru F_v/F_m u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. Rostliny 6. den po aplikaci (6 dpa), citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly listy ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Rostliny byly staré 1 týden. Škála F_v/F_m je stejná jako v Obr. 22.

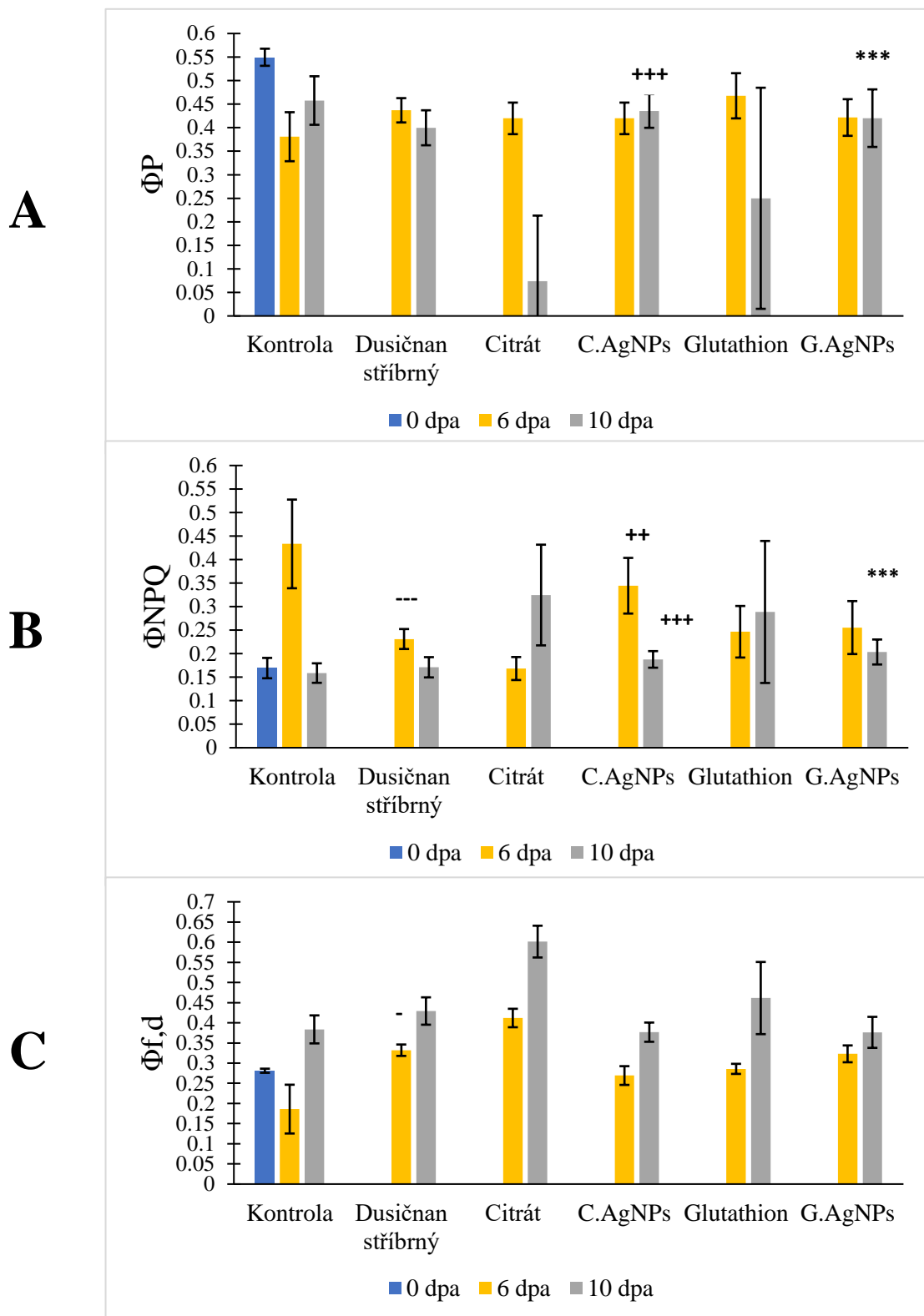


Obr. 24: Zobrazení parametru F_v/F_M u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. Rostliny 10. den po aplikaci (10 dpa) citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly listy ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Rostliny byly staré 1 týden. Škála F_v/F_M je stejná jako v Obr. 22.



Obr. 25: Parametr F_v/F_M měřený u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly řapíky ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 6$. Pomlčky (-) označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole, pluska (+) označují statisticky významný rozdíl varianty C.AgNPs proti variantě Citrát a hvězdičky (*) G.AgNPs proti Glutathionu příslušný den po aplikaci (t-test). Rostliny byly staré 1 týden.

Oddělené listy ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) vykazovaly mírný pokles v parametru F_v/F_M u kontroly (deionizovaná voda) (Obr. 22 a Obr. 25). Dopad citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs) i glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs) vykazoval statisticky významné změny u hodnoty F_v/F_M . Byl zaznamenán jejich signifikantní nárůst během 10. dne měření v porovnání s kontrolními roztoky citrátu a glutathionu (Obr. 25). Ačkoliv výrazný pokles byl sledován u kontrolního roztoku citrátu, kdy hodnota F_v/F_M klesla 10. dne měření z 0,83 na hodnotu 0,3 (Obr. 25). Znatelný pokles parametru byl rovněž pozorován u kontrolního roztoku glutathionu. Kontrolní roztoky tedy způsobily poškození listů, které vedlo k ovlivnění kvality měření a vyhodnocení výsledků (Obr. 24). Poškození listů bylo pozorováno i u C.AgNPs a G.AgNPs, které bylo vedeno vždy po okrajích listů, zatímco u dusičnanu stříbrného bylo poškození viditelné hlavně ve středu listu (Obr. 23 a Obr. 24).

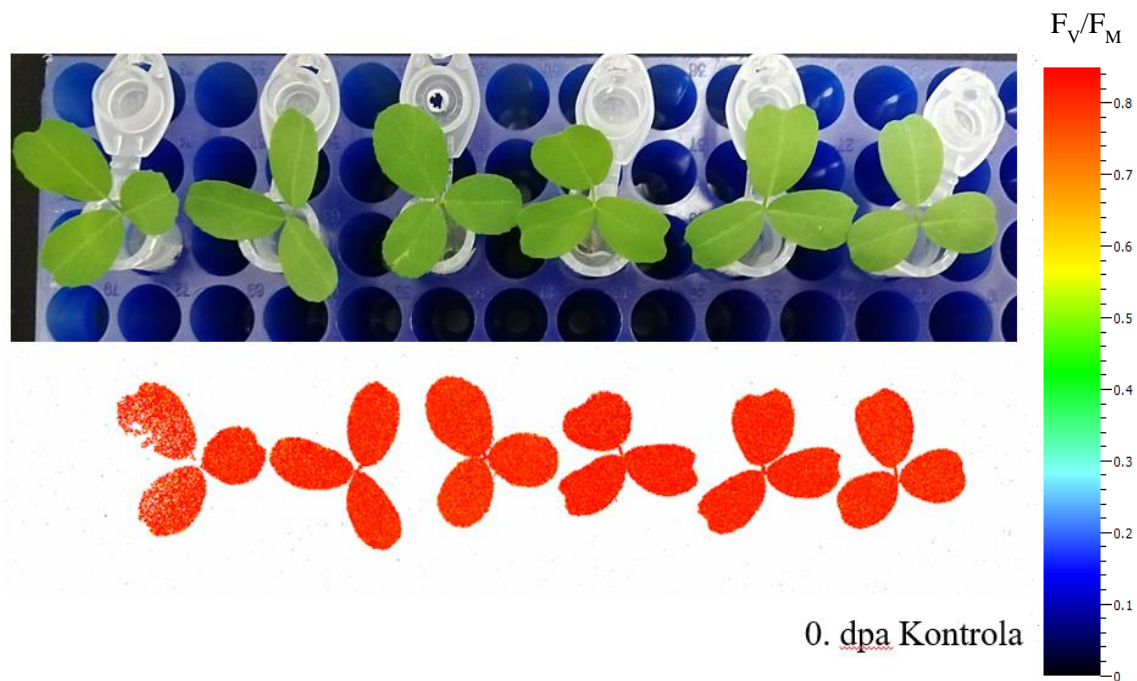


Obr. 26: Parametry Φ_P , Φ_{NPQ} , $\Phi_{f,d}$ měřeny na rostlinách ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly řapíky ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Pomlčky (-) označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole, pluska (+) označují statisticky významný rozdíl varianty C.AgNPs proti variantě Citrát a hvězdičky (*) G.AgNPs proti Glutathionu příslušný den po aplikaci (t-test). Rostliny byly staré 1 týden.

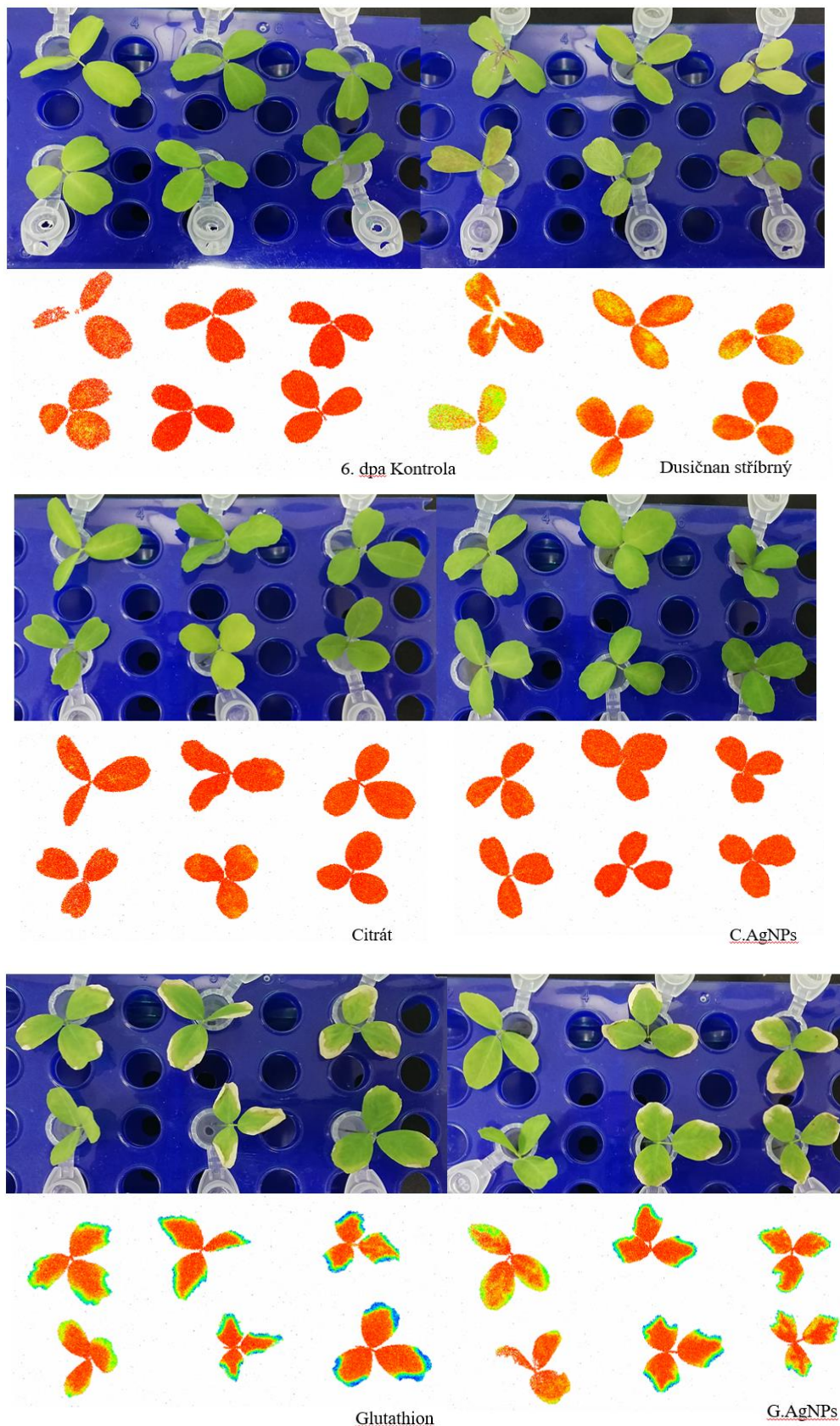
U kontrolních listů ječmene jarního došlo během desetidenního experimentu k poklesu parametru Φ_P , nárůstu Φ_{NPQ} a $\Phi_{f,d}$. Statisticky významné změny byly zaznamenány ve studovaných parametrech u citrátového (C.AgNPs) i glutathionového (G.AgNPs) koloidu nanočástic stříbra (Obr. 26) při srovnání s kontrolními roztoky. U citrátového koloidu nanočástic stříbra během 6. dne měření (C.AgNPs) došlo k signifikantnímu nárůstu Φ_{NPQ} a poklesu $\Phi_{f,d}$, hodnota Φ_P zůstala beze změny, zatímco 10. dne měření byla hodnota Φ_P signifikantně zvýšena, Φ_{NPQ} snížena a $\Phi_{f,d}$ pouze mírně zvýšena v porovnání s kontrolním roztokem citrátu. Podobné změny v parametrech Φ_P , Φ_{NPQ} i $\Phi_{f,d}$ byly pozorovány i u glutathionového koloidu nanočástic stříbra ve srovnání s kontrolním roztokem glutathionu během desetidenního měření (Obr. 26). Samotné kontrolní roztoky citrátu a glutathionu potlačily aktivaci ochranných procesů a způsobily poškození PSII. U dusičnanu stříbrného jako pozitivní kontroly došlo k slabému poklesu parametru Φ_P a Φ_{NPQ} , ale ke zvýšení $\Phi_{f,d}$.

4.1.3 vojtěška setá (*Medicago sativa* L.)

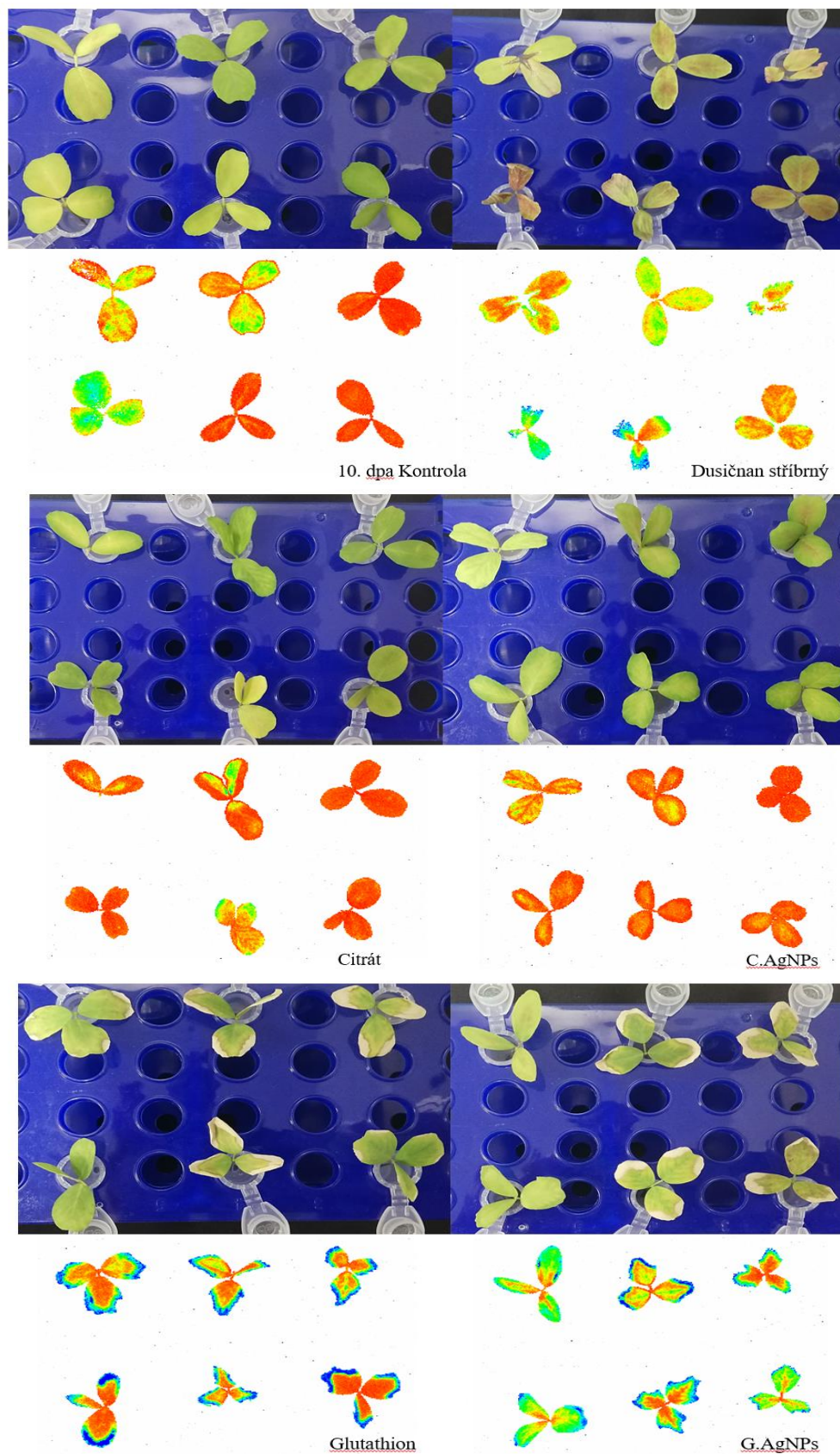
4.1.3.1 řapíky



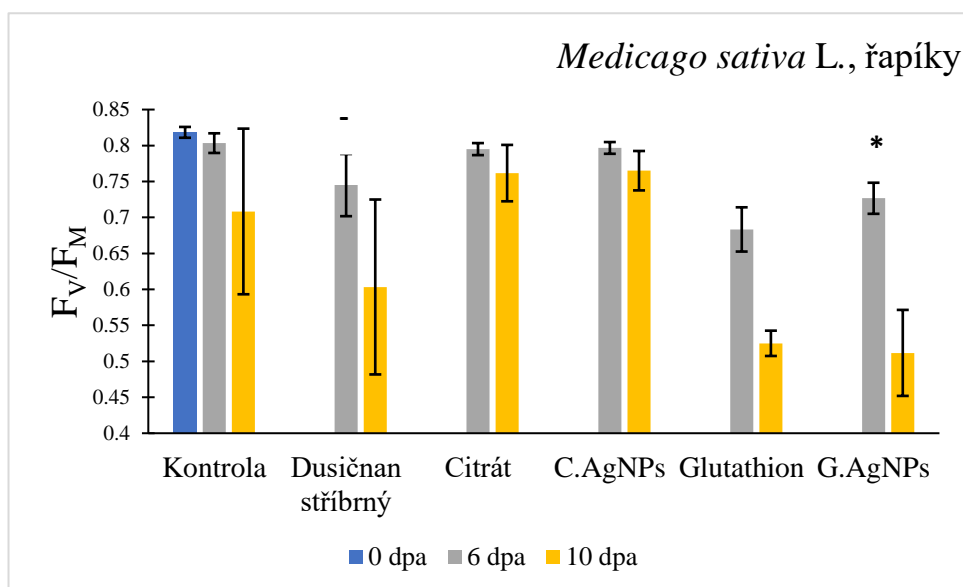
Obr. 27: Zobrazení parametru F_v/F_m u listů vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. Rostliny 0. den po aplikaci (0 dpa) deionizované vody na řapíky rostlin. Rostliny byly staré 3 týdny.



Obr. 28: Zobrazení parametru F_v/F_m u listů vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. Rostliny 6. den po aplikaci (6 dpa) citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly řapíky ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný. Rostliny byly staré 3 týdny. Škála F_v/F_m je stejná jako v Obr. 27.

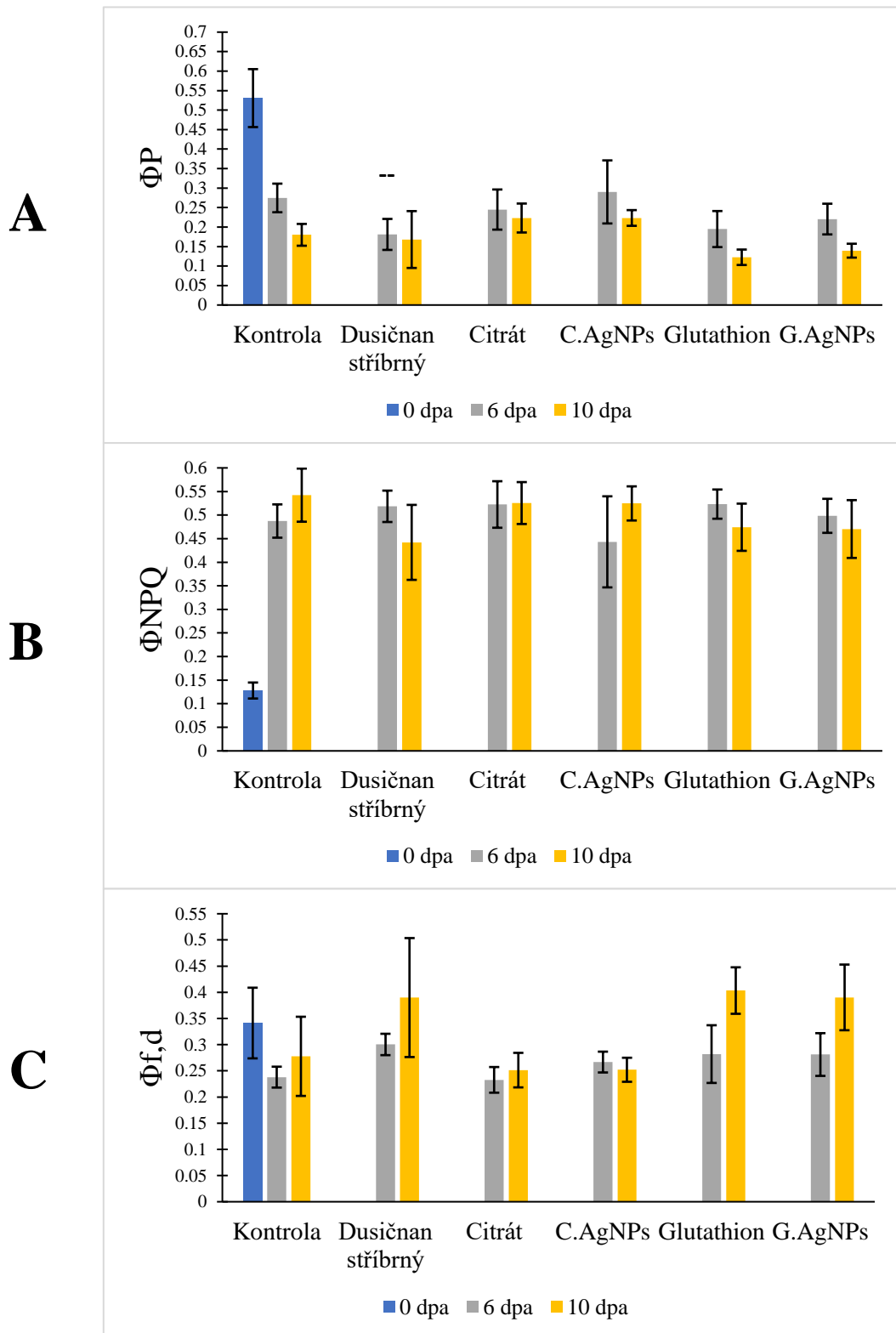


Obr. 29: Zobrazení parametru F_v/F_m u listů vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků. Rostliny 10. den po aplikaci (10 dpa) citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoku citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly řapíky ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný. Rostliny byly staré 3 týdny. Škála F_v/F_m je stejná jako v Obr. 27.



Obr. 30: Parametr F_v/F_m měřený na rostlinách vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly řapíky ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 6$. Pomlčky (-) označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole a hvězdičky (*) G.AgNPs proti Glutathionu příslušný den po aplikaci (t-test). Rostliny byly staré 3 týdny.

Kontrolní oddělené listy vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) vykazovaly v průběhu desetidenního měření pokles hodnoty F_v/F_m (Obr. 30). Statisticky významné změny byly sledovány u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), kdy se hodnota F_v/F_m zvýšila v porovnání s glutathionovou kontrolou (Obr. 30). Naopak účinek u citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs) na rostliny nevedl ke změně hodnoty v parametru F_v/F_m . Mimo jiné s postupem dnů byly sledovány výrazné změny na listech (Obr. 27 – Obr. 29). Byla viditelná chloróza zejména 10. den u G.AgNPs a Glutathionu (Obr. 29), která byla vedena vždy od okraje listů do středu. Nekróza byla sledována pouze u dusičnanu stříbrného (pozitivní kontrola).



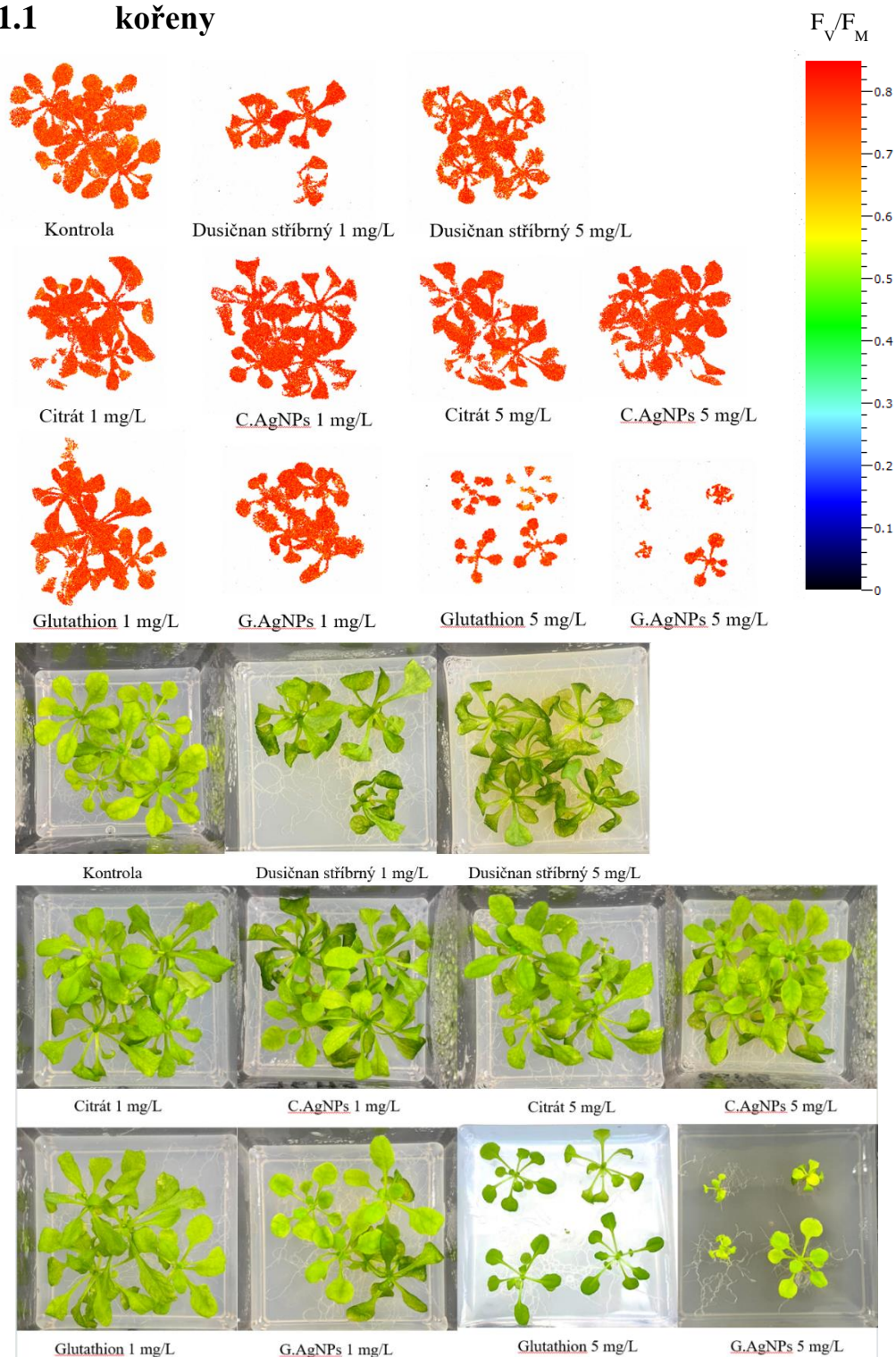
Obr. 31: Parametry Φ_P , Φ_{NPQ} , $\Phi_{f,d}$ měřeny na rostlinách vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs = 20 mg/L), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs = 18,8 mg/L), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly řapíky ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 6$. Pomlčky (-) označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci (t-test). Rostliny byly staré 3 týdny.

U kontrolních listů vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) byl zaznamenán pokles v parametru Φ_P a $\Phi_{f,d}$, zatímco hodnota Φ_{NPQ} vzrostla. Žádné významné změny ve studovaných parametrech (Φ_P , Φ_{NPQ} a $\Phi_{f,d}$) nebyly zaznamenány, jak u citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs) ve srovnání s kontrolním roztokem citrátu (Citrát), tak i u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs) oproti glutathionového roztoku (Obr. 31).

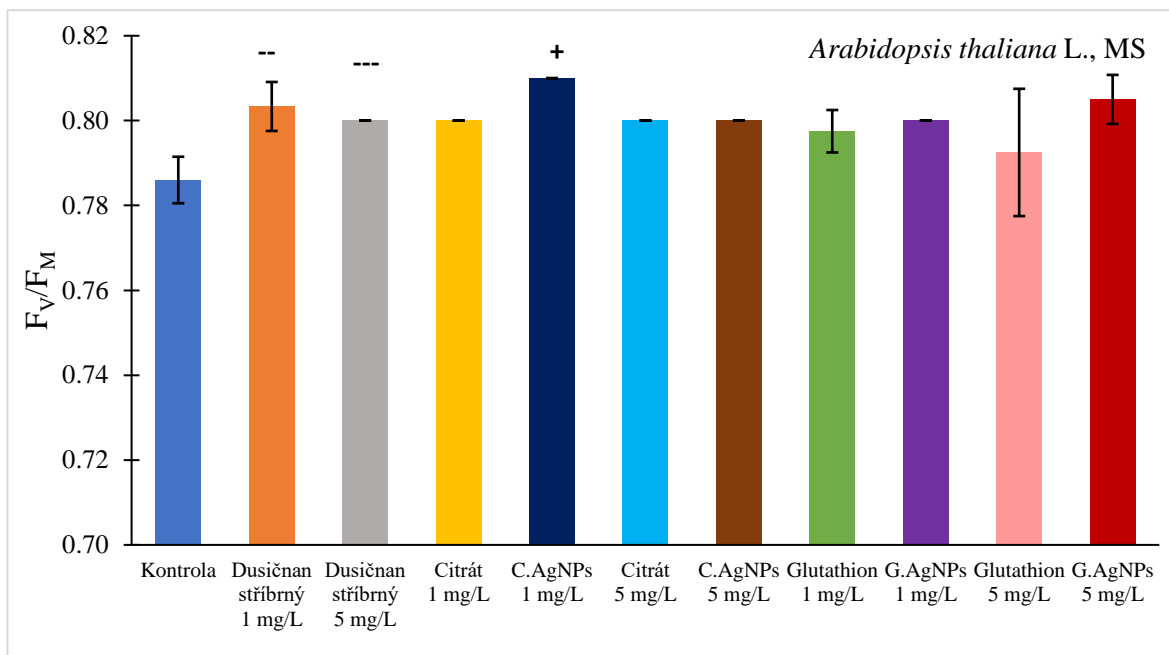
4.2 Experimenty založené na pěstování v MS médiu

4.2.1 huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L.)

4.2.1.1 kořeny

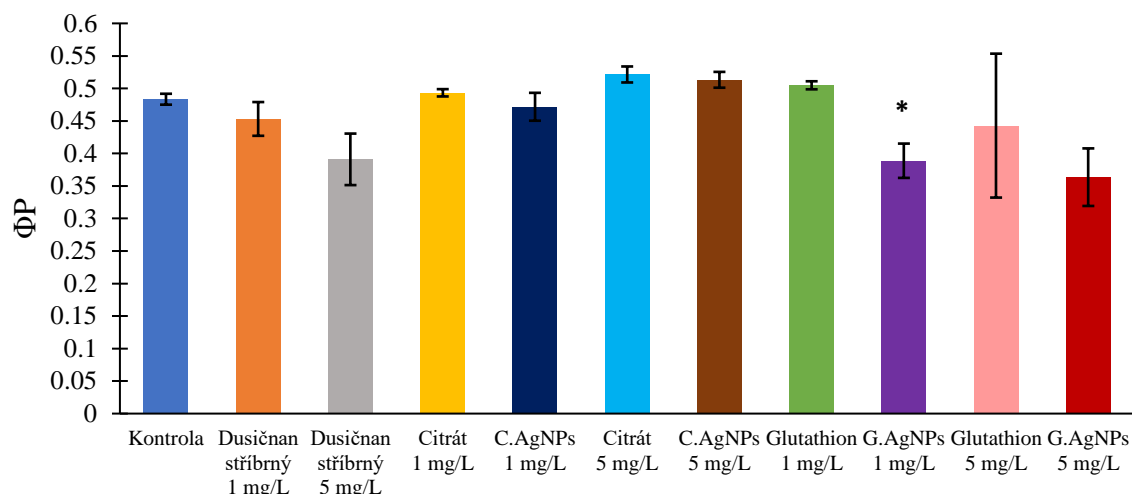
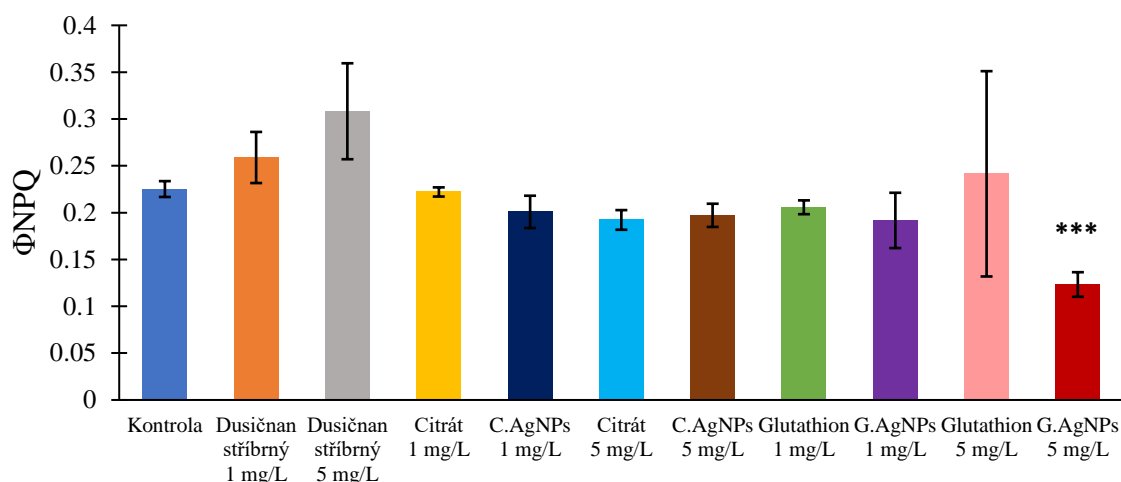
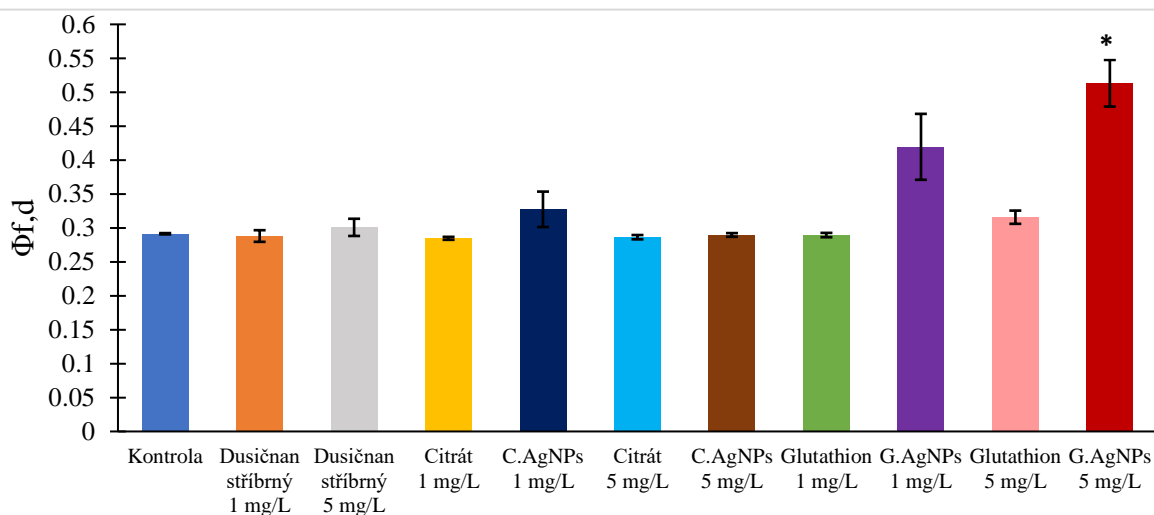


Obr. 32: Zobrazení parametru F_v/F_m u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny pěstovány v čistém MS médiu. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Rostliny byly staré 4 týdny.

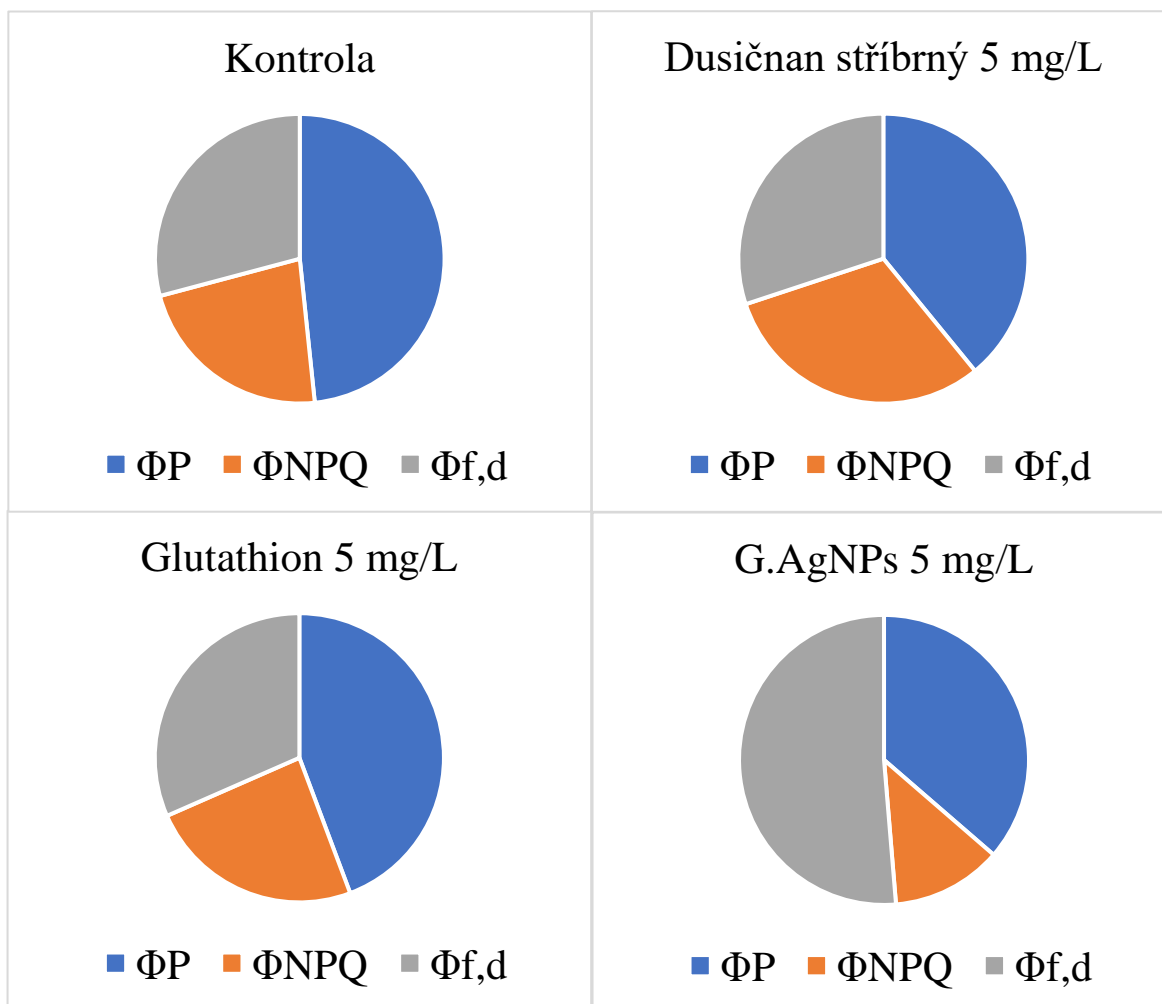


Obr. 33: Parametr F_v/F_M měřený na rostlinách huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny pěstovány v čistém MS médiu. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 4$. Pomlčky (-) označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole, pluska (+) označují statisticky významný rozdíl varianty C.AgNPs proti variantě Citrát příslušný den po aplikaci (t-test). Rostliny byly staré 4 týdny.

Rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) v čistém MS médiu vykazovaly mírně nižší hodnotu parametru F_v/F_M . Žádné změny nebyly sledovány u nanočástic stříbra C.AgNPs 5 mg/L a G.AgNPs 1 mg/L ve srovnání s kontrolními roztoky. Vliv citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs 1 mg/L) na rostliny vedl k statisticky významnému zvýšení parametru F_v/F_M ve srovnání s kontrolním roztokem citrátu (Citrát 1 mg/L). Mírný zvýšení bylo sledováno u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs 5 mg/L) oproti glutathionovému kontrolnímu roztoku (Glutathion 5 mg/L) (Obr. 33). U rostlin, které byly pěstovány v médiu s přidavkem roztoku či koloidu vykazovaly jejich listy morfologické změny. Zejména starší listy byly sklovité a tmavší barvy. Výrazné změny byly sledovány zejména u dusičnanu stříbrného (5 mg/L) a C.AgNPs (1 mg/L), zatímco u glutathionového koloidu a kontrolního roztoku (5 mg/L) tyto změny nenastaly. Domníváme se, že se jednalo o tzv. vitifikaci (Obr. 32), jejíž typickým znakem je hyperhydratace listů, což mohlo vysvětlit jejich sklovitý vzhled.

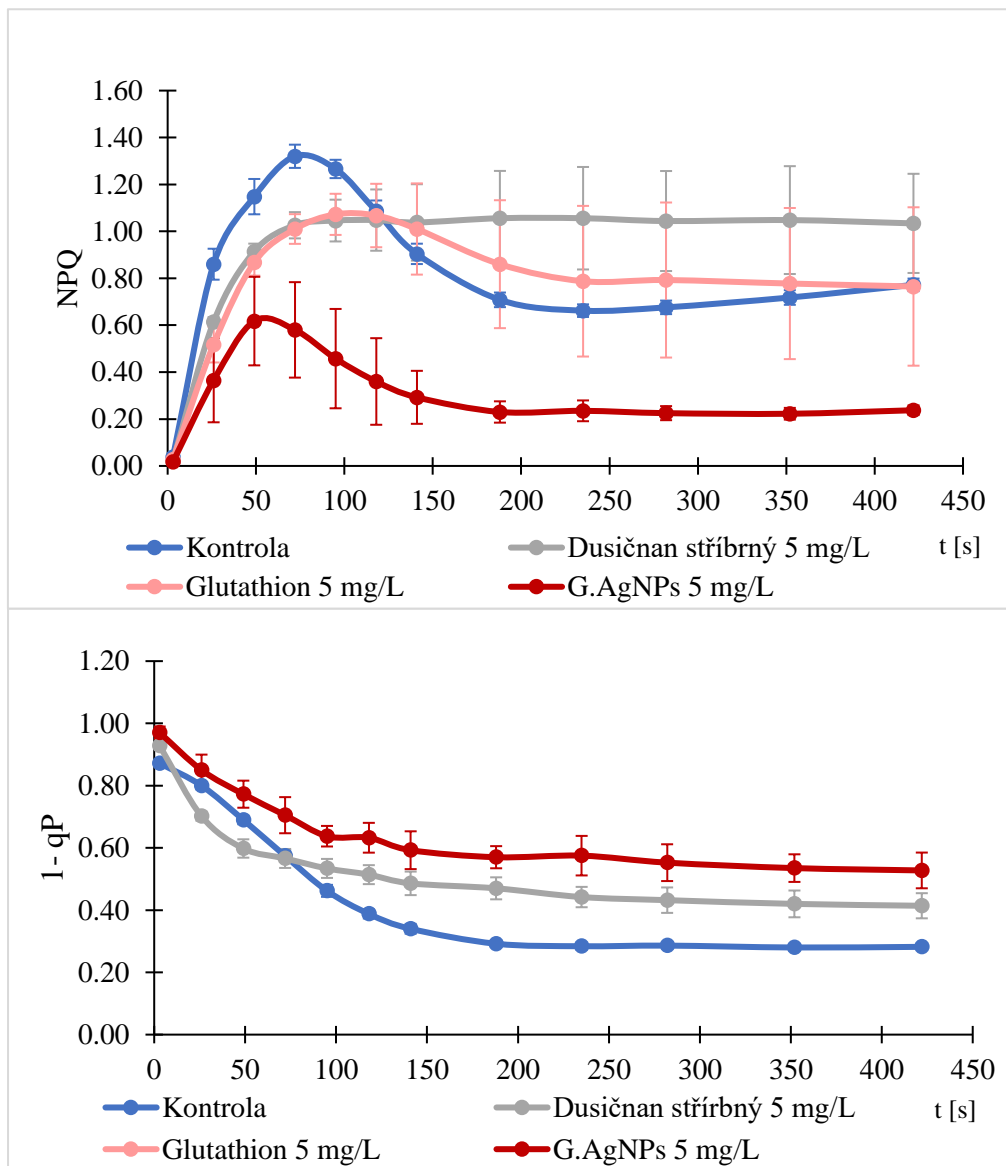
A**B****C**

Obr. 34: Parametry Φ_P (A), Φ_{NPQ} (B), $\Phi_{f,d}$ (C) měřeny na rostlinách huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny pěstovány v čistém MS médiu. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 4$. Hvězdičky (*) označují statisticky významný rozdíl varianty G.AgNPs proti Glutathionu příslušný den po aplikaci (t-test). Rostliny byly staré 4 týdny.



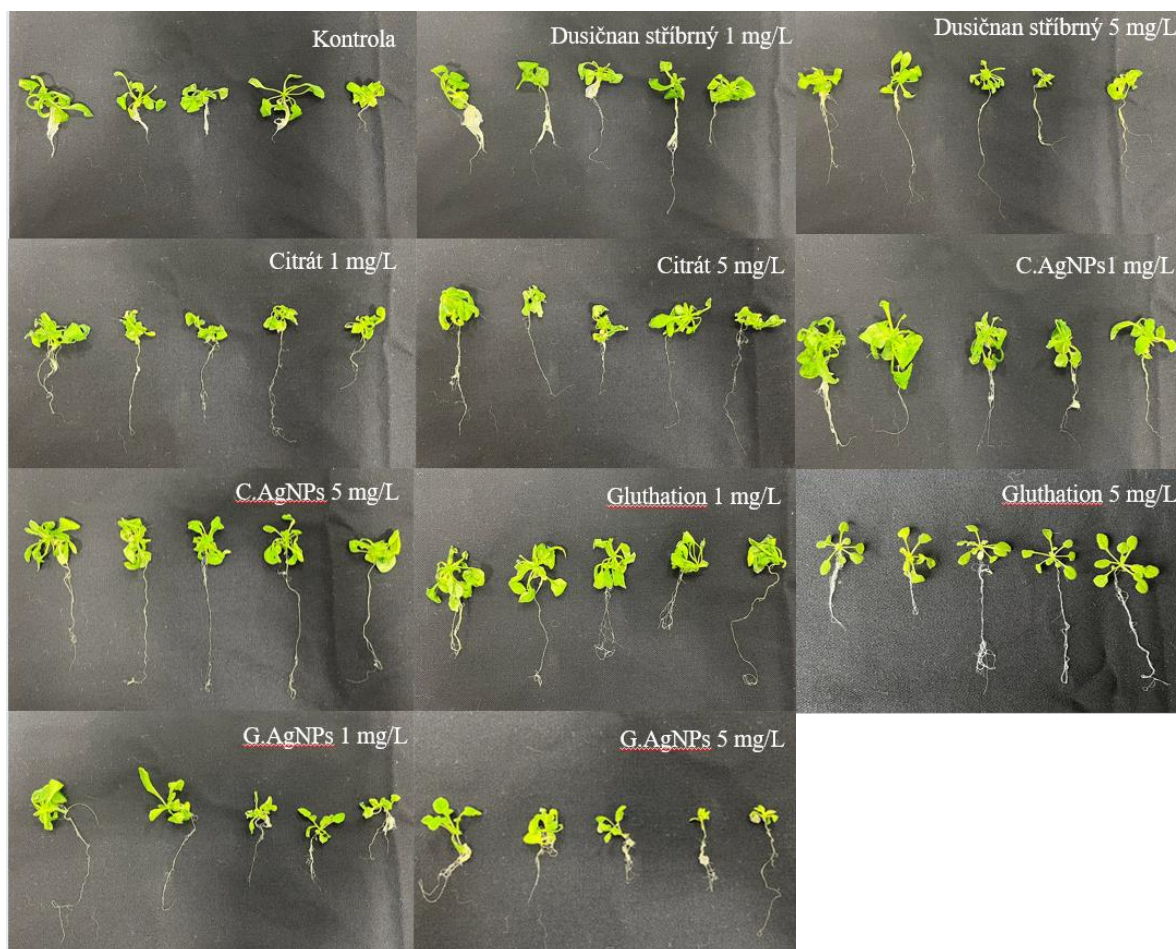
Obr. 35: Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L) po aplikaci glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), glutathionu na kořeny. Kontrolní rostliny byly pěstovány v čistém MS médiu. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení, $\Phi f,d$ - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.

Sledované parametry u huseníčku rolního pěstovaného v čistém MS médiu nevykazovaly žádné změny. Rovněž žádné změny nebyly zaznamenány u citrátových koloidů nanočástic stříbra (C.AgNPs 1 mg/L a C.AgNPs 5 mg/L) vůči kontrolním roztokům. Naopak pozorovatelné změny byly zaznamenány u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs 1 mg/L) při srovnání s kontrolním roztokem glutathionu (Glutathion 1 mg/L). Došlo k statisticky významnému poklesu ΦP a zvýšení $\Phi f,d$. Hodnota ΦNPQ zůstala beze změny (Obr. 34). K signifikantním změnám došlo zejména u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs 5 mg/L), kdy byl sledován pokles u parametru ΦP a ΦNPQ , ale zvýšení $\Phi f,d$ (Obr. 34) ve srovnání s kontrolním roztokem glutathionu. Takto výrazné změny nebyly zaznamenány ani u rostlin po účinku dusičnanem stříbrném jakožto pozitivní kontroly. Účinkem G.AgNPs došlo k narušení funkce fotosyntetického aparátu a inhibice fotochemie PSII pravděpodobně vedla ke zpomalení růstu rostlin. Zmíněné změny lze lépe pozorovat u koláčových grafů (Obr. 35).



Obr. 36: Parametr NPQ a 1-qP u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L) po aplikaci glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs) a glutathionu na kořeny. Kontrolní rostliny byly pěstovány v čistém MS médiu. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný.

Sledovaný parametr NPQ u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs 5 mg/L) vykazoval výrazný pokles hodnoty v průběhu času ve srovnání s kontrolním roztokem glutathionu. Tedy nanočástice stříbra o glutathionovém povrchovém obalu nezpůsobily zvýšení stresu u rostlin. Parametr 1-qP vykazoval pozorovatelné změny v čase po zapnutí aktinického světla u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs 5 mg/L) ve srovnání s glutathionovým kontrolním roztokem. Počáteční hodnota v čase 0 se blížila 1 a s postupem času se parametr ustálil na hodnotě 0,60. Pokud je parametr 1-qP roven 1, značí redukovanější plastochinonový pool a uzavřenější reakční centra PSII (Obr. 36). Tedy můžeme tvrdit, že G.AgNPs (5 mg/L) způsobil větší zavření reakčních center PSII.

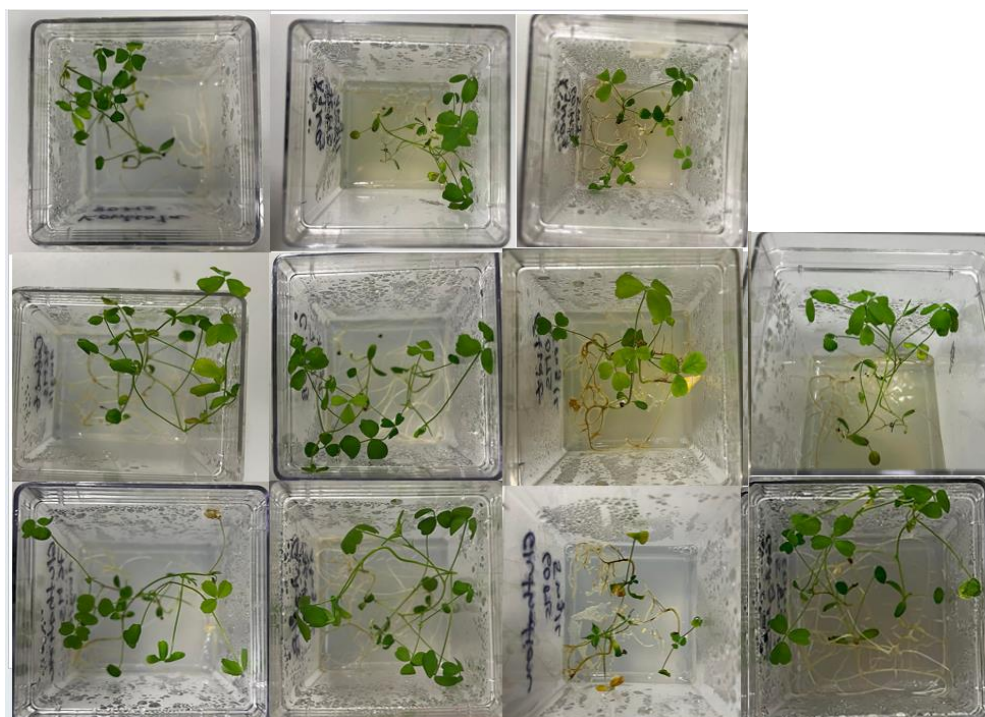
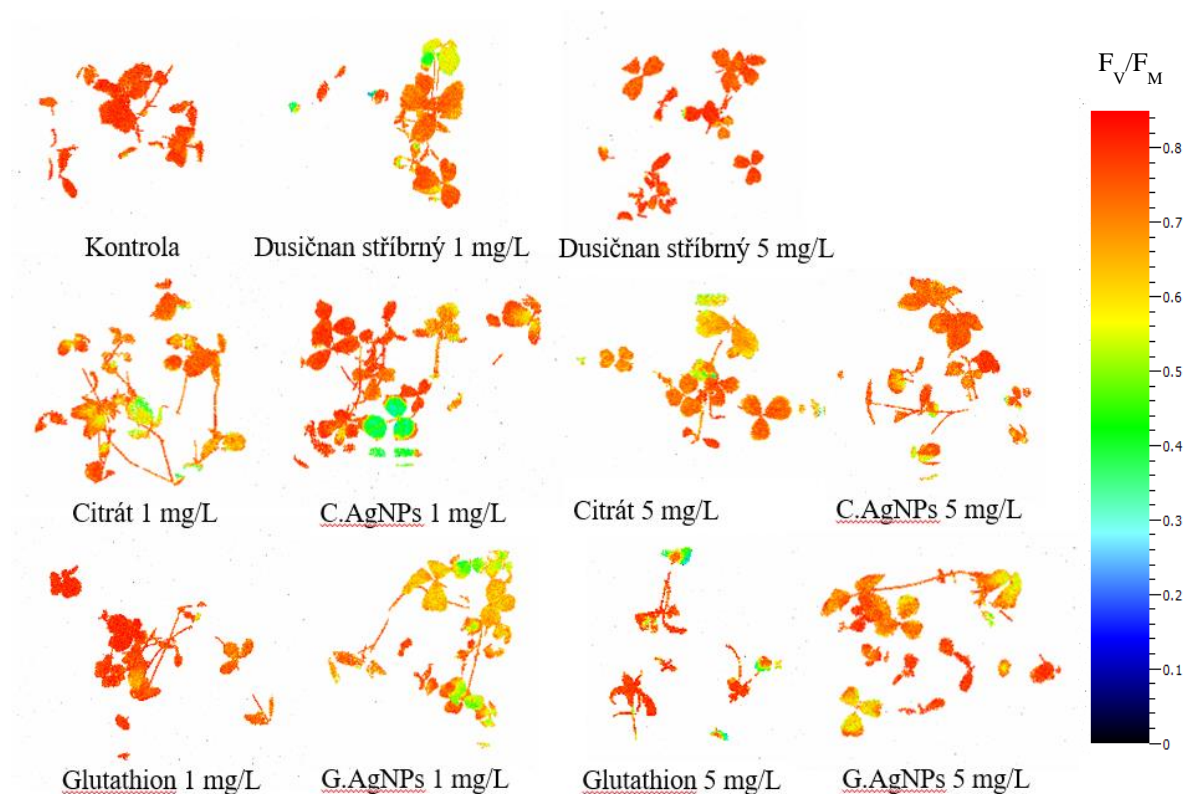


Obr. 37: Porovnání kořenů huseníčku rolníka po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny pěstovány v čistém MS médiu. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Rostliny byly staré 4 týdny.

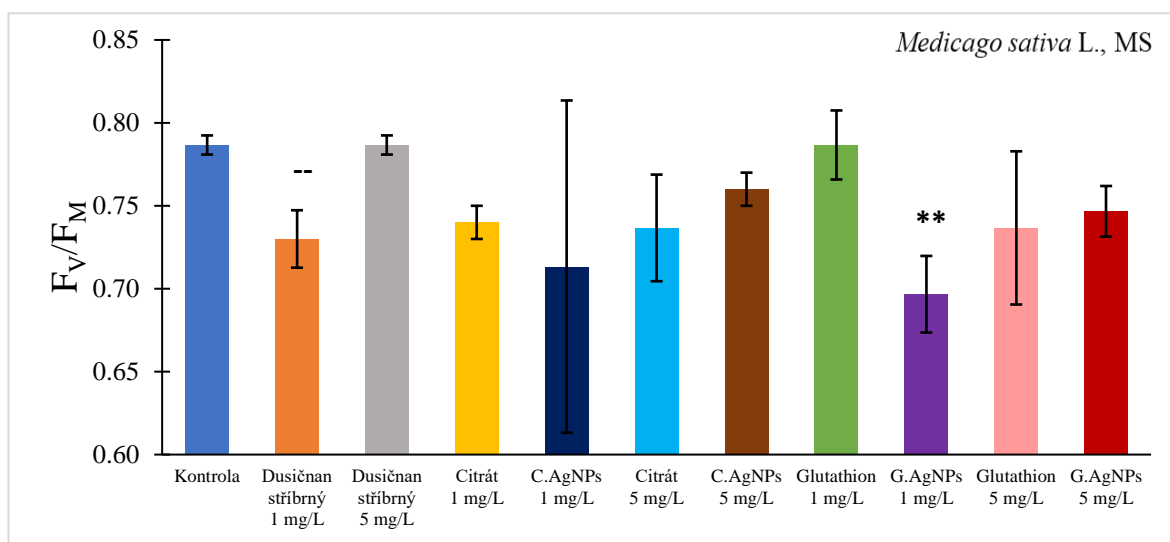
Kořeny huseníčku rolního po aplikaci studovaných roztoků nevykazovaly žádné výrazné morfologické změny. Pouze si lze povšimnout, že kořeny u kontrolního média (čisté MS médium) a dusičnanu stříbrného (1 mg/L) měly hustší kořenové vlášení, zatímco kořeny u studovaných koloidů měly kořeny jemné a vláknité (Obr. 37).

4.2.2 vojtěška setá (*Medicago sativa* L.)

4.2.2.1 kořeny

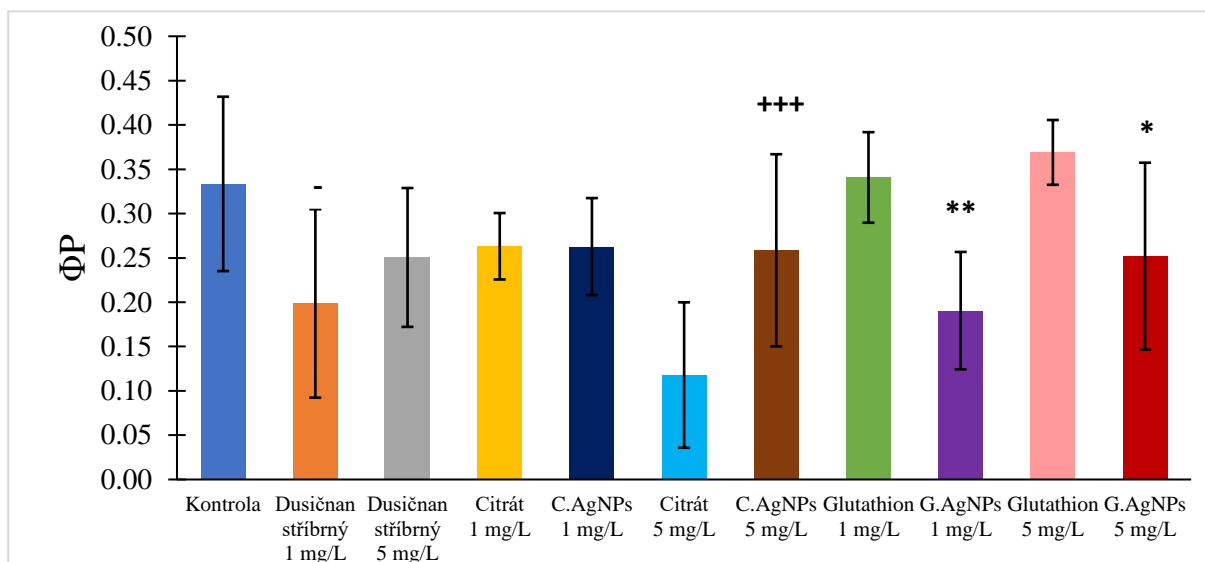
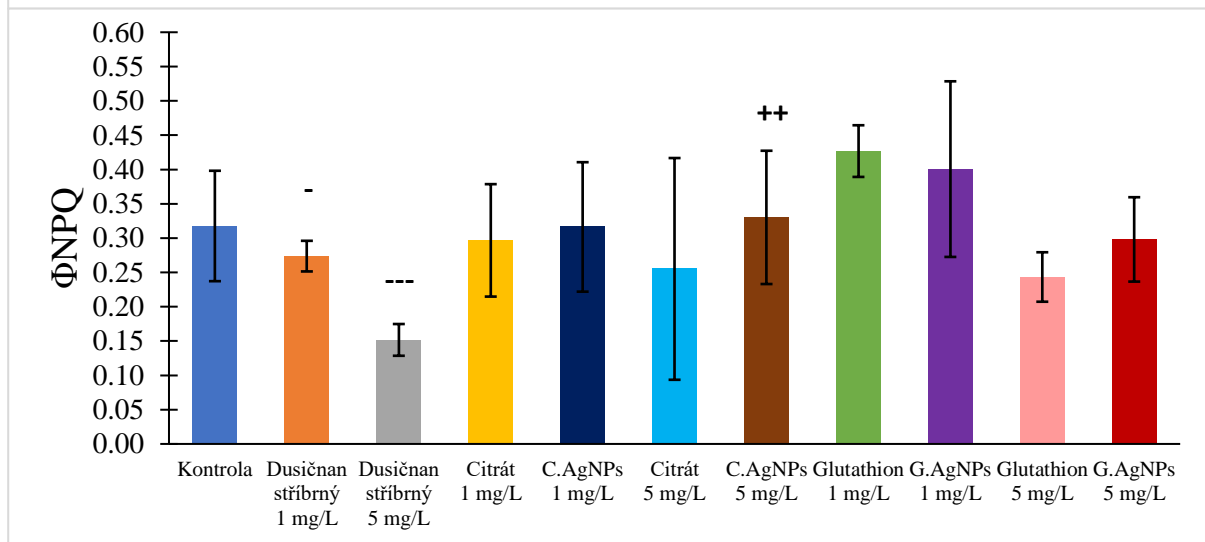
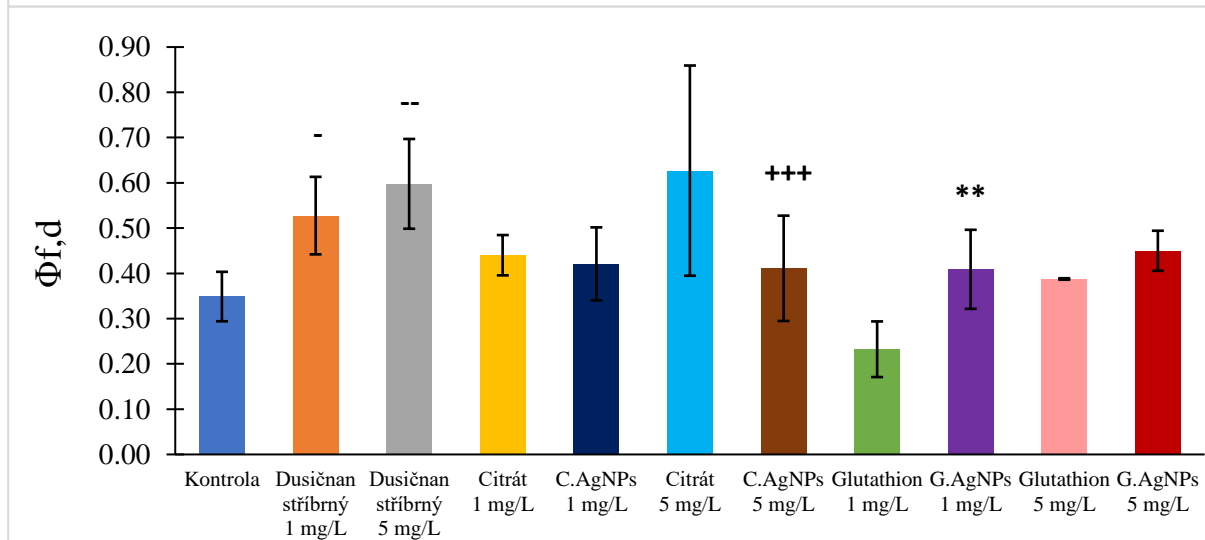


Obr. 38: Zobrazení parametru F_V/F_M u rostlin vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) s přiloženou fotografickou dokumentací rostlinných vzorků po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny pěstovány v čistém MS médiu. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný ($AgNO_3$). Stáří rostlin bylo 4 týdny.



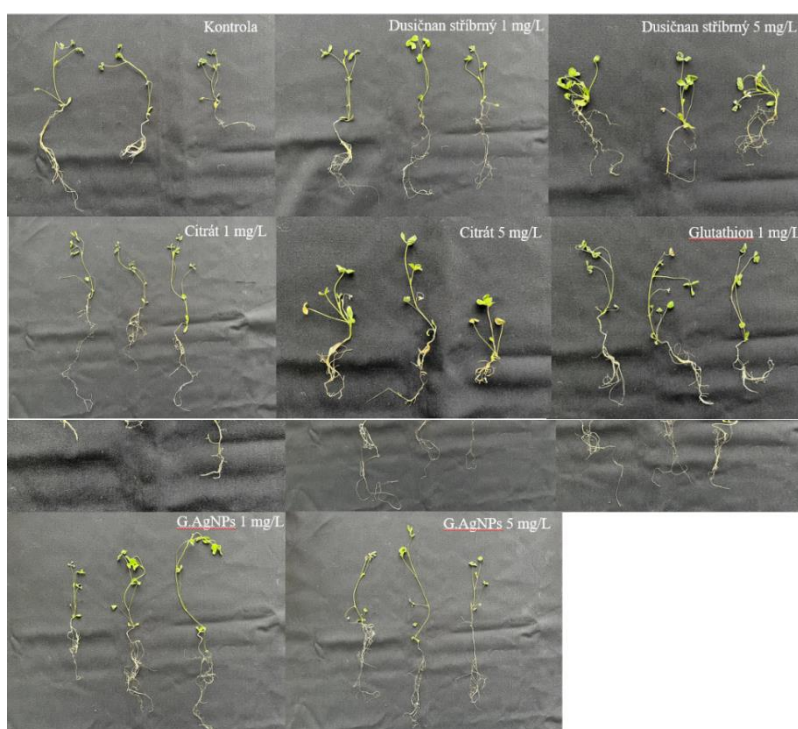
Obr. 39: Parametr F_v/F_M měřený na rostlinách vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny pěstovány v čistém MS médiu. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 3$. Pomlčky (-) označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole a hvězdičky (*) G.AgNPs proti Glutathionu příslušný den po aplikaci (t-test). Stáří rostlin bylo 4 týdny.

Kořeny vojtěšky seté po aplikaci vybraných roztoků v MS médiu vykazovaly signifikantní změny v parametru F_v/F_M . Zdravé, nepoškozené rostliny byly zaznamenány u kontrolní varianty (deionizovaná voda), ale u citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs 1 mg/L) byl pozorován pokles ve srovnání s kontrolním roztokem citrátu (Citrát 1 mg/L). Výraznější změny u parametru F_v/F_M byly zaznamenány u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs 1 mg/L) oproti glutathionové kontrole (Glutathion 1 mg/L), kdy pokles sledovaného parametru byl statisticky významný (Obr. 39). Pokles hodnoty F_v/F_M u zmíněných koloidů lze vidět i na snímcích z Fluorcamu (Obr. 38). U testovaných roztoků o koncentraci 5 mg/L (C.AgNPs a G.AgNPs) došlo k mírnému zvýšení hodnoty F_v/F_M (Obr. 39).

A**B****C**

Obr. 40: Parametry Φ_P (A), Φ_{NPQ} (B), $\Phi_{f,d}$ (C) měřeny na rostlinách vojtěšky seté (*Medicago sativa L.*) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), roztoků citrátu, glutathionu a $AgNO_3$ na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny pěstovány v čistém MS médiu. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 3$. Pomlčky (-) označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole, pluska (+) označují statisticky významný rozdíl varianty C.AgNPs proti variantě Citrát a hvězdičky (*) G.AgNPs proti Glutathionu příslušný den po aplikaci (t-test). Stáří rostlin bylo 4 týdny.

Rostliny účinkem citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs 1 mg/L) nejevily žádné pozorovatelné změny oproti citrátové kontrole, zatímco vliv glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs 1 mg/L) způsobil statisticky významný pokles ΦP a zvýšení $\Phi f, d$ ve srovnání s kontrolním roztokem glutathionu, hodnota ΦNPQ zůstala beze změny (Obr. 40). Účinek citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs 5 mg/L) způsobil statisticky významné zvýšení parametru ΦP i ΦNPQ a pokles $\Phi f, d$ při srovnání s kontrolním roztokem citrátu. Dopad účinku G.AgNPs (5 mg/L) na rostliny vedl k výraznému poklesu ΦP , zatímco hodnoty ΦNPQ i f, d byly pouze mírně zvýšeny ve srovnání s kontrolním roztokem glutathionu (Glutathion 5 mg/L) (Obr. 40).

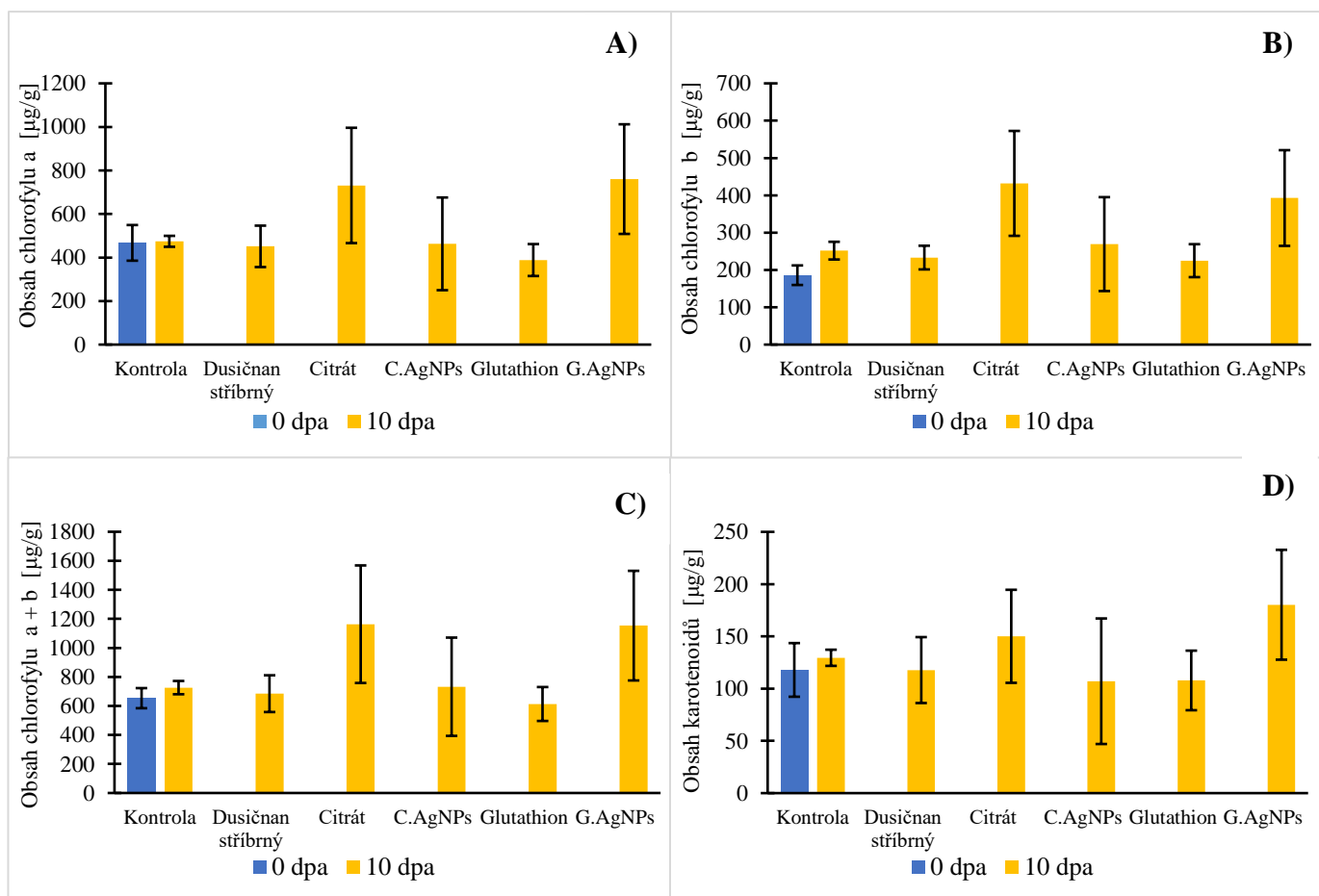


Obr. 41: Vizuální porovnání kořenů vojtěšky seté (*Medicago sativa* L) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), roztoků citrátu, glutathionu a $AgNO_3$ na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny pěstovány v čistém MS médiu. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný. Stáří rostlin bylo 4 týdny.

Kořeny vojtěšky seté po aplikaci studovaných roztoků vykazovaly specifické morfologické změny. U obou koncentrací (1 mg/L i 5 mg/L) citrátového (C.AgNPs) a glutathionového (G.AgNPs) koloidu nanočástic stříbra došlo ke změně hustoty kořenového vlášení. Kořeny měly jemnější a vláknitější strukturu oproti kontrolním roztokům (Obr. 41).

4.3 Stanovení hladiny fotosyntetických pigmentů při hydroponickém pěstování

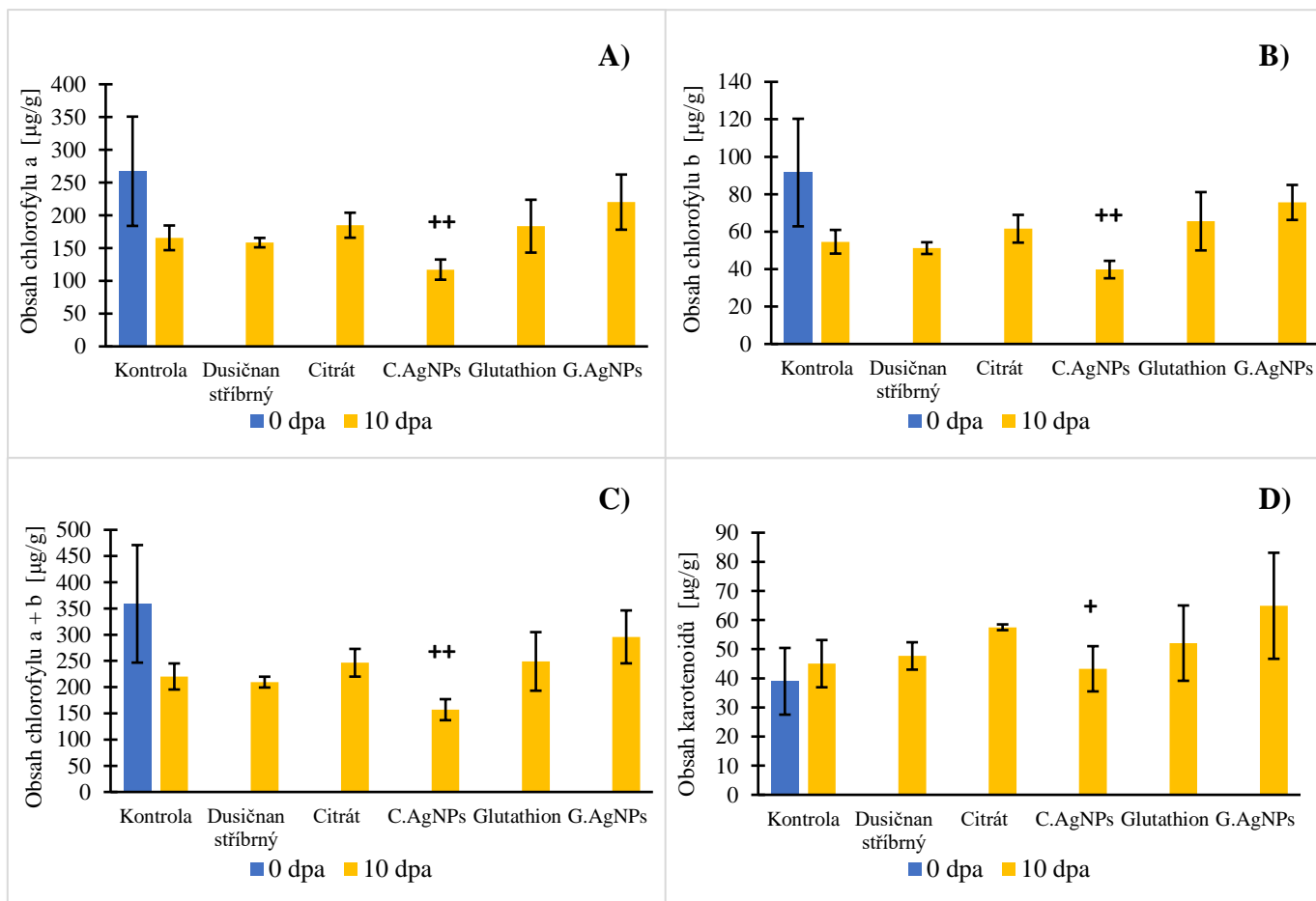
4.3.1 huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L.)



Obr. 44: Stanovení hladin pigmentů A) chlorofyl a, B) chlorofyl b, C) chlorofyl a + b, D) karotenoidů u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) při hydroponickém pěstování po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 3$. Stáří rostlin bylo 5 týdnů.

Zpracovaný extrakt z prýtu rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) nevykazoval žádné změny týkající se obsahu chlorofylu a karotenoidů u dusičnanu stříbrného (pozitivní kontrola) v porovnání s kontrolními vzorky (Obr. 44). Snížený obsah chlorofylu a karotenoidů byl zaznamenán u citrátového koloidu (C.AgNPs) oproti kontrolnímu roztoku citrátu, kde se množství pigmentů zvýšilo. Diametrální rozdíl byl však zaregistrován u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs) na rozdíl od glutathionového roztoku (Glutathion), kdy obsah pigmentů byl výrazně zvýšen u G.AgNPs (Obr. 44).

4.3.2 ječmen jarní (*Hordeum vulgare* L.)

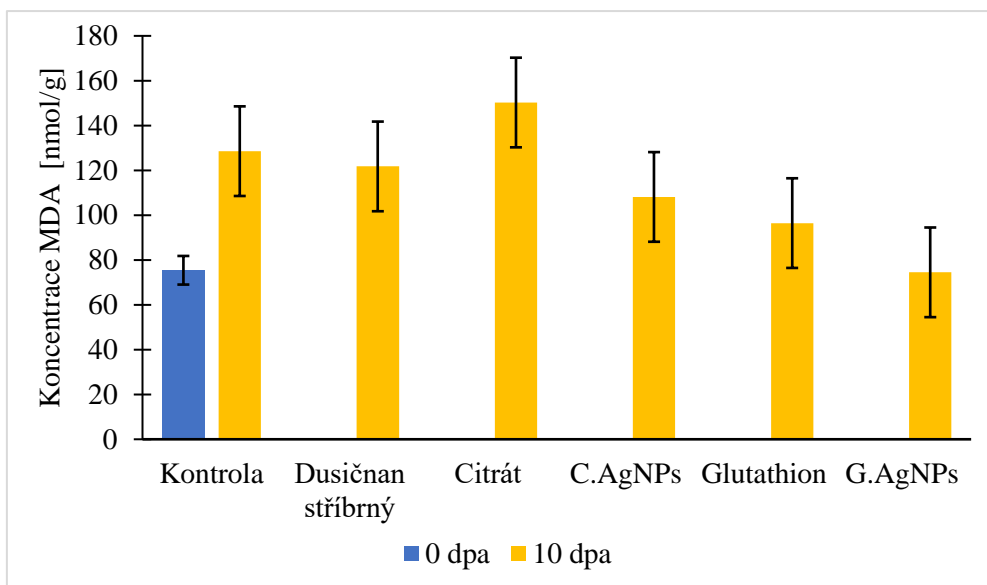


Obr. 45: Stanovení hladin pigmentů A) chlorofyl a, B) chlorofyl b, C) chlorofyl a + b, D) karotenoidů u ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) při hydroponickém pěstování po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 3$. Pluska (+) označují statisticky významný rozdíl varianty C.AgNPs proti variantě Citrát příslušný den po aplikaci (t-test). Stáří rostlin bylo 1 týden.

Extrakt získaný z ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) u kontrolních rostlin vykazoval během desetidenního měření pokles hladiny chlorofylu a i b, ale zvýšení hladiny karotenoidů. U dusičnanu stříbrného byly hladiny pigmentů srovnatelné s hladinou kontrolních vzorků 10. dne měření. U citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs) došlo k statisticky významnému poklesu obsahu jak chlorofylu a i b, tak i karotenoidů oproti kontrolnímu roztoku citrátu (Obr. 45). Nepatrné změny byly sledovány u glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), kde hodnota pigmentů mírně vzrostla vůči glutathionovému roztoku (Glutathion) (Obr. 45).

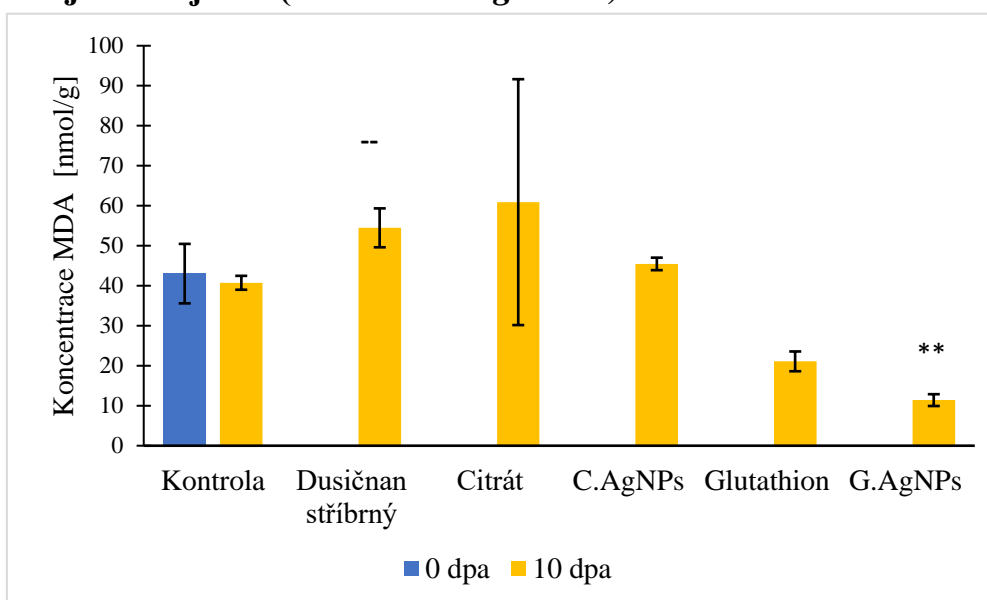
4.4 Stanovení hladiny malondialdehydu (MDA) při hydroponickém pěstování

4.4.1 huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L.)



Obr. 46: Stanovení koncentrace malondialdehydu u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) při hydroponickém pěstování po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 3$. Stáří rostlin bylo 5 týdnů.

4.4.2 ječmen jarní (*Hordeum vulgare* L.)



Obr. 47: Stanovení koncentrace malondialdehydu u ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) při hydroponickém pěstování po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (C.AgNPs), glutathionového koloidu nanočástic stříbra (G.AgNPs), roztoků citrátu a glutathionu. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Pozitivní kontrolou byl zvolen dusičnan stříbrný (AgNO_3). Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, $n = 3$. Pomlčky (-) označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole a hvězdičky (*) G.AgNPs proti Glutathionu příslušný den po aplikaci (t-test).

Detekovaná koncentrace malondialdehydu u huseníčku rolního při hydroponickém pěstování byla s postupem dnů zvýšena u kontrolních rostlin. Naopak účinkem citrátového koloidu nanočástic stříbra byl zaznamenán pokles hladina MDA při porovnání s kontrolním roztokem citrátu, stejné změny byly sledovány i u glutathionového koloidu nanočástic stříbra vůči kontrolnímu roztoku glutathionu (Obr. 46). Identické změny byly registrovány u ječmene jarního při hydroponickém pěstování, kdy hladiny MDA poklesla u citrátového koloidu i glutathionového koloidu ve srovnání s kontrolními roztoky (Obr. 47). Nanočástice stříbra tedy nezpůsobily zvýšení hladiny MDA, naopak ji snižovaly, takže zřejmě potlačily oxidativní poškození membrán.

5 DISKUZE

Dnešní doba nabízí díky rozvinutým nanotechnologiím širokou poptávku po produktech, jež jsou složeny z komponentů, které jsou tvořeny z nanočástic stříbra. Jejich výroba a spotřeba proto nese vysoké riziko možného úniku do vnějšího prostředí a narušení biologických pochodů v ekosystému. Proto tato práce navazovala na předchozí studii, která se zabývala srovnáním účinku nanočástic stříbra u různých druhů rostlin. Závěrem práce bylo, že po šestidenním působení nanočástic stříbra o citrátovém povrchovém obalu (13 mg/L) v hydroponických podmínkách nebyly u ječmene jarního zaznamenány žádné signifikantní změny ve studovaných fotosyntetických parametrech, naopak významné změny byly sledovány u kořenů tabáku virginském (Trajerová, 2021). Díky této práci byly získány prvotní zkušenosti s aplikací AgNPs na modelové rostliny a následně bylo možné navázat podrobnějším studiem vlivu AgNPs s různým povrchovým obalem při aplikaci v hydroponii a v MS médiu.

Desetidenní působení nanočástic stříbra s různými povrchovými obaly (C.AgNPs 20 mg/L a G.AgNPs 18,8 mg/L) neovlivnilo fotosyntetické parametry hydroponicky pěstovaného huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.). Žádný významný efekt na sledované parametry nebyl zaznamenán, pouze u dusičnanu stříbrného byly naměřeny statisticky významné rozdíly (Obr. 10 a Obr. 11). Hnědé zbarvení a zjemnění kořenového vlášení bylo zaznamenáno u obou typů AgNPs (Obr. 12). Můžeme předpokládat, že tedy nedocházelo ke vstupu AgNPs do listů a ani případné poškození kořenů nebylo natolik velké, aby byly ovlivněny fotosyntetické procesy v listech. Důvodem neovlivnění rostlin mohla být relativně nízká koncentrace, nicméně v literatuře byl efekt zaznamenán i při použití koncentrace nižší. Práce Ke a kol. (2018), která byla založena na hydroponickém pěstování huseníčku rolního o koncentraci 1 a 2,5 mg/L AgNPs, pozorovala kromě snížení hladin parametrů chlorofylové fluorescence (F_v/F_m) a viditelných žlutých skvrn na povrchu listů značících chlorózu i změny v hladinách pigmentů, pokles hladiny chlorofylu, a naopak zvýšení hladiny antokyanů. Fialovění listů bylo v našem případě detekováno u všech testovaných variant (Obr. 8 a Obr. 9). Zvýšený obsah antokyanů byl rovněž naměřen v práci Nair a Chung (2014a) u huseníčku rolního při hydroponickém pěstování s AgNPs o koncentraci 0,5 a 1 mg/L. Nicméně fialovění listů bylo v našem případě zřejmě způsobeno spíše transferem rostlin ze substrátu do hydroponie a nesouviselo tedy s aplikací nanočástic. Snížený obsah hladiny chlorofylu a karotenoidů byl naměřen u C.AgNPs ve srovnání s kontrolním roztokem citrátu, zatímco u G.AgNPs byla hladina pigmentů naopak zvýšena (Obr. 44). Nárůst obsahu MDA značí nárůst oxidativního poškození membrán

v rostlinách, který byl zjištěn téměř u všech variant, také svědčil o tom, že přechod rostlin do hydroponie pro ně představoval určitý stres. Oproti příslušným kontrolním roztokům přítomnost nanočástic snížila obsah MDA (Obr. 46), takže můžeme předpokládat, že AgNPs potlačily peroxidaci membránových lipidů, měly tedy ochranný vliv na membrány. Zvýšená hladina MDA byla naopak zaznamenána u sóji luštinaté působením C.AgNPs (50 mg/kg) (Galazzi et al., 2019). Je možné, že námi použitá koncentrace AgNPs byla příliš nízká na to, aby hladinu MDA zvýšila.

Při aplikaci studovaných roztoků na listy huseníčku byl zaznamenán u dusičnanu stříbrného negativní efekt na maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII. C.AgNPs měly mírný protektivní účinek na fotosyntetickou funkci, o čemž vypovídá vyšší výtěžek fotochemie PSII. Nicméně to stejné nelze tvrdit při účinku G.AgNPs. Jejich mírný negativní účinek, jak naznačuje pokles parametru F_V/F_M (Obr. 14), mohl narušit fungování fotosyntetického aparátu.

Při pěstování ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) účinek obou studovaných typů nanočástic nezpůsobil změny fotosyntetických parametrů. Změny nebyly zaznamenány ani u dusičnanu stříbrného, jakožto pozitivní kontroly (Obr. 19 a Obr. 20). Významný pokles obsahu pigmentů byl sledován u C.AgNPs, zatímco u G.AgNPs byla jejich hladina naopak zvýšena (Obr. 45). Výrazný pokles hladiny MDA byl zaznamenán u obou typů nanočástic, zejména u G.AgNPs vůči kontrolnímu roztoku desátého dne měření (Obr. 47). Tedy můžeme tvrdit, že aplikace nanočástic ani u ječmene nezpůsobila oxidativní poškození membrán. Práce Fayez a kol. (2017), která byla rovněž zaměřena na studium toxického účinku AgNPs (0,5 a 1 mM) v půdním substrátu po dobu třech týdnů, zjistila inhibici klíčení semen u ječmene, později i známky chlorózy viditelné zejména na špičce a bázi listů. Hladina chlorofylu i karotenoidů byla snížena, zatímco hladina MDA byla naopak zvýšena účinkem AgNPs. To, že v našem případě nebyl na rozdíl od citované práce zaznamenán negativní efekt nanočástic na rostliny, by mohlo souviset s odlišnými pěstebními podmínkami a s dobou aplikace AgNPs.

Výrazně negativní efekt byl zaznamenán u dusičnanu stříbrného působícího na oddělené listy ječmene zejména 6. dne měření. Pozitivní efekt byl zaznamenán u C.AgNPs 6. i 10. den, zatímco kontrolní roztok citrátu měl na listy negativní účinek. Nicméně u G.AgNPs došlo během 6. dne měření ke zhoršení fotosyntetických parametrů vůči kontrolnímu roztoku, nicméně 10. dne bylo sledováno naopak zlepšení funkce PSII (Obr. 25 a Obr. 26). Tyto změny mohly být způsobeny postupnou agregací nanočástic v hydroponickém prostředí.

Oddělené listy vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) vykazovaly pouze významný nárůst u maximálního kvantového výtěžku PSII po expozici G.AgNPs (18,8 mg/L), zatímco pokles byl zaznamenán u dusičnanu stříbrného (Obr. 30). Po desetidenním působení glutathionového koloidu i roztoku (G.AgNPs i Glutathion) byla na povrchu listů viditelná chloróza, která byla vedena vždy od okraje do středu listu (Obr. 29). Nekróza byla sledována pouze u pozitivní kontroly dusičnanu stříbrného. V práci Stegemeier a kol. (2015) byl studován efekt AgNPs-PVP v hydroponickém prostředí o koncentraci 3 mg/L na vojtěšce. Bylo zjištěno, že nanočástice se akumulovaly převážně v kořenech, a tedy minimální množství nanočástic bylo transportováno do výhonků. Žádné změny ve výhoncích nebyly zaznamenány, stejně jako v našem případě u C.AgNPs.

V případě aplikace AgNPs v hydroponickém prostředí docházelo s největší pravděpodobností k jejich agregaci v koloidu, což mohlo ovlivnit jejich dostupnost a následné působení na rostliny. Z tohoto důvodu byly v následujících experimentech nanočástice aplikovány v MS médiu.

U huseníčku rolního pěstovaného v MS médiu byl u maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII zjištěn pozitivní dopad dusičnanu stříbrného (1 mg/L a 5 mg/L) a C.AgNPs (1 mg/L) vůči kontrolnímu roztoku (Obr. 33). Glutathionové nanočástice stříbra obou koncentrací měly významný negativní dopad na fotochemii PSII ve stavu adaptovaném na světlo, kdy nižší hodnota Φ_P a současně nárůst $\Phi_{f,d}$ svědčily o poškození fotosyntetického aparátu vedoucím k inhibici funkce PSII a elektronového transportu (Obr. 34). Ačkoliv dusičnan stříbrný (5 mg/L) způsobil podobný pokles parametru Φ_P jako G.AgNPs, na rozdíl od G.AgNPs byl tento pokles spojen s nárůstem Φ_{NPQ} (Obr. 35). To znamená, že zatímco G.AgNPs způsobily poškození fotosyntetického aparátu, dusičnan aktivoval ochranné procesy, které tomuto poškození zabránily. Mimo jiné aplikace G.AgNPs způsobila vyšší míru redukce plastochinonového poolu a uzavření reakčních center PSII (Obr. 36).

Při pěstování rostlin huseníčku v uzavřených boxech s MS médiem došlo ke strukturální změně listů. Jednalo se o vitifikaci, která je charakteristická typickými sklovitými listy (Obr. 32). Můžeme předpokládat, že příčinou této anomálie byla nadměrná hydratace (hyperhydratace), zhoršená funkce průduchů a snížená pevnost pletiv (Ziv, 1991). Účinkem nanočástic došlo ke zjemnění kořenového vlášení rostlin pěstovaných v MS médiu (Obr. 37). Dopad AgNPs u huseníčku rolního pěstovaného v MS médiu po dobu 7 dnů sledovala rovněž práce Qian a kol. (2013): aplikace AgNPs (3 mg/L) měla silný inhibiční efekt na růst kořenů. Došlo k poklesu hladiny chlorofylu, přičemž AgNPs byly

detekovány i v listech rostlin. Toxický efekt AgNPs byl potvrzen zvýšenou koncentrací antokyanů, které jsou spojovány s působením stresových faktorů. V uvedené studii byly použity AgNPs bez povrchového obalu, tedy silný inhibiční efekt mohl být dán nepřítomností stabilizačního povrchového obalu.

U vojtěšky seté pěstované v MS médiu byl problém s heterogenitou a s malým počtem rostlin, které bylo obtížné napěstovat. Z tohoto důvodu nebyly získané výsledky zcela spolehlivé. Nicméně, získaná data opět poukazují na pozitivní vliv C.AgNPs (5 mg/L) na rostliny, zatímco obě použité koncentrace G.AgNPs způsobily narušení funkce PSII (Obr. 39 a Obr. 40). Vliv koloidů na kořeny vojtěšky vedl ke změně hustoty kořenového vlášení. Kořeny vykazovaly známky jemnější a vláknitější struktury oproti kontrolním roztokům (Obr. 41).

Výsledky našich experimentů tedy opakovaně ukázaly negativní efekt nanočástic stříbra s glutathionovým povrchovým obalem, a to zejména v případě rostlin pěstovaných v MS médiu. Jejich účinek vedl k narušení funkce PSII, nicméně hladina fotosyntetických pigmentů byly naopak zvýšena a koncentrace MDA snížena. Podobné změny v obsahu pigmentů a MDA byly pozorovány i při vystavení rostlin účinku nanočástic stříbra s citrátovým povrchovým obalem, avšak jejich dopad nebyl tak výrazný. V námi provedených experimentech měly citrátové nanočástice spíše pozitivní vliv na funkci PSII. Stimulační účinek na PSII a zvýšení hladiny chlorofylu bylo nalezeno i u pískavice řecké seno (*Trigonella foenum-graecum*) po aplikaci nanočástic stříbra s citrátovým obalem (Sadak, 2019), stejně tak i u hořčice hnědé (*Brassica juncea*) (Sharma et al., 2012a).

Studie, které se zabývaly účinkem nanočásticím stříbra s glutathionovým povrchovým obalem, byly zatím provedeny pouze na různých typech bakterií, nikoliv na rostlinách. Naše výsledky tedy nebylo možné přímo porovnat. Práce Tanglietti a kol. (2012) studovala antimikrobiální účinek AgNPs s glutathionovým povrchovým obalem na *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. U *E. coli* došlo k pronikání nanočástic do cytoplazmy, což vedlo k poškození organel a destrukci buněk. U *S. aureus* nebyl toxický dopad tak intenzivní vzhledem k silné peptidoglykanové vrstvě.

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo porovnání účinku stříbrných nanočástic s citrátovým a glutathionovým povrchovým obalem na rostliny různých druhů a při různém způsobu aplikace. Mezi vybrané rostlinné druhy patřil huseníček rolní, ječmen jarní a vojtěška setá. Dopad nanočástic stříbra na rostliny byl studován při expozici kořenů a řapíků/oddělených listů v hydroponickém prostředí a při pěstování v MS médiu. Pro srovnání účinku byla zvolena deionizovaná voda (v hydroponických podmínkách) a čisté MS médium, pozitivní kontrolou byl dusičnan stříbrný. Vliv AgNPs byl posuzován na základě srovnání s příslušným (citrátovým a glutathionovým) roztokem. Efekt byl sledován pomocí změn v parametrech chlorofylové fluorescence odrážejících fungování primárních fotosyntetických reakcí, ve vybraných případech byl rovněž stanovován obsah fotosyntetických pigmentů a hladina malondialdehydu.

Hydroponické experimenty na testovaných rostlinách vedly ke zjištění, že připravené nanočástice stříbra o citrátovém i glutathionovém povrchovém obalu nevedly k silnému negativnímu účinku. Detekována byla inhibice růstu a zahnědnutí kořenového vlášení s viditelnou chlorózou na listech, zvýšení množství antokyanů a mírné narušení funkce PSII. Hladina pigmentů byla po účinku citrátových nanočástic snížena, zatímco po aplikaci glutathionových zvýšena. Hladina MDA byla u obou typů koloidů snížena. Nejvýraznější změny fotosyntetických parametrů byly pozorovány při aplikaci AgNPs na oddělené listy ječmene, při aplikaci na kořeny ječmene a u vojtěšky a huseníčku byly změny minimální. Předpokládáme, že obecně slabý účinek nanočástic v hydroponické aplikaci mohl souviset s jejich agregací v tekutém prostředí.

Dopad nanočástic stříbra v MS médiu byl studován na huseníčku rolním a vojtěšce seté. Výrazný negativní vliv na fotosyntetické parametry byl zjištěn zejména v případě glutathionových nanočástic obou koncentrací. Citrátové nanočástice vykazovaly spíše pozitivní vliv na rostliny u fotosyntetických parametrů.

Je důležité podotknout, že tato diplomová práce byla pokračováním bakalářské práce zabývající se obdobným problémem. Ve studiu dopadu nanočástic stříbra na rostliny je nezbytné pokračovat, neboť hlubší informace mohou vést k vyřešení této problematiky. Při dalším studiu této problematiky by mohla být pozornost zaměřena na další typy povrchových obalů nanočástic o různých koncentracích, dále by se mohla rozšířit expoziční prostředí a doba působení nanočástic. Zajímavé by dále mohlo být zahrnutí dalších rostlinných druhů a různých vývojových stádií rostlin.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abbas Q., Liu G., Yousaf B., Ali M.U., Ullah H., Ahmed R. (2019) Effects of biochar on uptake, acquisition and translocation of silver nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) in relation to growth, photosynthetic traits and nutrients displacement. *Environmental Pollution*, **250**, 728-736.

Agnihotri S., Mukherji S., Mukherji S. (2014) Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *The Royal Society of Chemistry Advances*, **4**, 3974-3983.

Akter M., Sikder M.T., Rahman M.M., et al. (2018) A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*, **9**, 1-16.

Alscher R. G., Donahue J.L., Cramer C.L. (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*, **100**, 224-233.

Arora, A., Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, **82**, 1227–1238.

Asada K., Takahashi M. (1987) Production and Scavenging of Active Oxygen in Chloroplasts,. In: *Photoinhibition* (Kyle, D.J., Osmond, C.B., Arntzen, C.J., eds.), Elsevier, Amsterdam, 227-287.

Azodi M., Sultan Y., Ghoshal A. (2016) Dissolution behavior of silver nanoparticles and formation of secondary silver nanoparticles in municipal wastewater by single-particle ICP-MS. *Environmental Science & Technology*, **50**, 13318-13327.

Bae E., Lee B.C., Kim Y., Choi K., Yi J. (2013) Effect of agglomeration of silver nanoparticles on nanotoxicity depression. *Korean Journal of Chemical Engineering*, **30**, 364-368.

Bagherzadeh Homae, M. a Ehsanpour A.A. (2016) Silver nanoparticles and silver ions: Oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L.) grown in vitro. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, **57**, 544-553.

Balan L., Schneider R., Turck C., Lougnot D., Morlet-Savary F. (2012) Photogenerating silver nanoparticles and polymer nanocomposites by direct activation in the near infrared. *Journal of Nanomaterials*, **2012**, 512579.

Behra R., Sigg L., Clift M.J.D., Herzog F., Minghetti M., Johnston B., Petri-Fink A., Rothen-Rutishauser B. (2013) Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. *Journal of The Royal Society Interface*, **10**, 20130396.

Bello-Bello J. J., Chavez-Santoscoy R.A., Lecona-Guzmán C.A., Bogdanchikova N., Salinas-Ruiz J., Gómez-Merino F.C., Pestryakov A. (2017) Hormetic response by silver nanoparticles on in vitro multiplication of sugarcane (*Saccharum* spp. Cv. Mex 69-290) Using a Temporary Immersion System. *Dose-Response*, **15**.

Biba R., Košpić K., Komazec B., et al. (2022) Surface coating-modulated phytotoxic responses of silver nanoparticles in plants and freshwater green algae. *Nanomaterials*, **12**, 24.

Biba R., Matić D., Lyons D.M., et al. (2020) Coating-dependent effects of silver nanoparticles on tobacco seed germination and early growth. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 3441.

Biba R., Peharec Štefanić P., Cvjetko P., Tkalec M., Balen B. (2021b) Silver nanoparticles phytotoxicity mechanisms,. In: *Silver Nanomaterials for Agri-Food Applications*. (Abd-Elsalam K.A. ed.), Elsevier, Amsterdam, Nizozemsko, 317-356.

Biba R., Tkalec M., Cvjetko P., Peharec Štefanić P., Šikić S., Pavoković D., Balen B. (2021a) Silver nanoparticles affect germination and photosynthesis in tobacco seedlings. *Acta Botanica Croatica*, **80**, 1–11.

- Bilger W. a Björkman O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*, **25**, 173-185.
- Carocho M., Ferreira I C.F.R. (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, **51**, 15-25.
- Cvjetko P, Zovko M., Štefanić P.P., et al. (2018) Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. *Environmental Science and Pollution Research*, **25**, 5590-5602.
- Cvjetko P., Milošić A., Domijan A.M., et al. (2017) Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **137**, 18-28.
- Das P., Barua S., Sarkar S., et al. (2018) Mechanism of toxicity and transformation of silver nanoparticles: Inclusive assessment in earthworm-microbe-soil-plant system. *Geoderma*, **314**, 73-84.
- Dewez D. a Oukarroum A (2012) Silver nanoparticles toxicity effect on photosystem II photochemistry of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* treated in light and dark conditions. *Toxicological & Environmental Chemistry*, **94**, 1536-1546.
- Falco W. F., Scherer M.D., Oliveira S.L., Wender H., Colbeck I., Lawson T, Caires A.R.L. (2020) Phytotoxicity of silver nanoparticles on *Vicia faba*: Evaluation of particle size effects on photosynthetic performance and leaf gas exchange. *Science of The Total Environment*, **701**, 134816.
- Fayaz A.M., Balaji K., Girilal M., Yadav R., Kalaichelvan P.T., Venketesan R. (2010) Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **6**, 103-109.
- Fayez K. A., El-deeb B. A., Mostafa N.Y. (2017) Toxicity of biosynthetic silver nanoparticles on the growth, cell ultrastructure and physiological activities of barley plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, **39**, 155.
- Galazzi R. M., Lopes Júnior C.A., De Lima T.B., Gozzo F.C., Arruda M.A.Z. (2019) Evaluation of some effects on plant metabolism through proteins and enzymes in transgenic and non-transgenic soybeans after cultivation with silver nanoparticles. *Journal of Proteomics*, **191**, 88-106.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**, 909-930.
- Gondikas A. P., Morris A., Reinsch B.C., Marinakos S.M., Lowry G.V., Hsu-Kim H. (2012) Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: Implications for particle surface chemistry, aggregation, Dissolution, and silver speciation. *Environmental Science & Technology*, **46**, 7037-7045.
- Ha S. B., Smith A. P., Howden R., Dietrich, W. M., Bugg S., O'connell M. J., Goldsbrough P.B., Cobbett C.S. (1999) Phytochelatase synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Cell*, **11**, 1153-1163.
- Haider A., Kang I.K. (2015), Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: A Comprehensive Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015, 165257.
- Havaux M. (2014) Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*, **79**, 597-606.
- Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Ahmad A. (2012) Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior*, **7**, 1456-1466.

- Huang L., Zhai M.L., Long D.W., Peng J., Xu L., Wu G.Z, Li J.Q, Wei G.S. (2008) UV-induced synthesis, characterization and formation mechanism of silver nanoparticles in alkalic carboxymethylated chitosan solution. *Journal of Nanoparticle Research*, **10**, 1193-1202.
- Chen M., Feng Y.G., Wang X., Li T.C., Zhang J.Y., Qian D.J. (2007) Silver nanoparticles capped by oleylamine: Formation, growth, and self-organization. *Langmuir*, **23**, 5296-5304.
- Chinnapongse S. L., Maccuspie R.I., Hackley V.A. (2011) Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters. *Science of The Total Environment*, **409**, 2443-2450.
- Jansson H. a Hansson Ö. (2008) Competitive inhibition of electron donation to photosystem 1 by metal-substituted plastocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1777**, 1116-1121.
- Jiang H. S., Yin L.Y, Ren N.N., et al. (2017) Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology*, **11**, 157-167.
- Jin Y., Fan X., Li X., Zhang Z., Sun L., Fu Z., Lavoie M., Pan X., Qian H. (2017) Distinct physiological and molecular responses in *Arabidopsis thaliana* exposed to aluminum oxide nanoparticles and ionic aluminum. *Environmental Pollution*, **228**, 517-527.
- Karimi J., Mohsenzadeh S. (2017) Physiological effects of silver nanoparticles and silver nitrate toxicity in *Triticum aestivum*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, **41**, 111-120.
- Ke M., Qu Q., Peijnenburg W.J.G.M., et al. (2018) Phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions to *Arabidopsis thaliana* as revealed by analysis of molecular responses and of metabolic pathways. *Science of The Total Environment*, **644**, 1070-1079.
- Kim D., Jeong S., Moon J. (2006) Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection. *Nanotechnology*, **17**, 4019-4024.
- Koczkur K. M., Mourdikoudi S., Polavarapu L., Skrabalak S.E. (2015) Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Transactions*, **44**, 17883-17905.
- Krause G. H. a Weis E. (1991) Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**, 313-349.
- Kumar Ghosh S., Kundu S., Mandal M., Nath S., Pal T. (2003) Studies on the evolution of silver nanoparticles in micelle by UV-photoactivation. *Journal of Nanoparticle Research*, **5**, 577-587.
- Kvítek L., Panáček A., Soukupová J., Kolář M., Večeřová R., Prucek R., Holecová M., Zbořil R. (2008) Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *The Journal of Physical Chemistry C*, **112**, 5825-5834.
- Lalau C. M., Simioni C., Vicentini D.S., Ouriques L.C., Mohedano R.A., Puerari R.C., Matias W.G. (2020) Toxicological effects of AgNPs on duckweed (*Landoltia punctata*). *Science of The Total Environment*, **710**, 136318.
- Lazár D. (2015) Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology*, **175**, 131-147.
- Lee D. K., Kang Y.S. (2004) Synthesis of silver nanocrystallites by a new thermal decomposition method and their characterization. *ETRI Journal*, **26**, 252-256.
- Lee S., Pagoria D., Raigrodski A., Geurtsen W. (2007) Effects of combinations of ROS scavengers on oxidative DNA damage caused by visible-light-activated camphorquinone/N,N-dimethyl-p-toluidine. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **83B**, 391-399.
- Lee W. M., Kwak J.I., An Y.J. (2012) Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere*, **86**, 491-499.

- Levard C, Hotze E.M., Lowry G.V., Brown G.E. (2012) Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity. *Environmental Science & Technology*, **46**, 6900-6914.
- Li X., Ke M., Zhang M., et al. (2018) The interactive effects of diclofop-methyl and silver nanoparticles on *Arabidopsis thaliana*: Growth, photosynthesis and antioxidant system. *Environmental Pollution*, **232**, 212-219.
- Løvdaal T., Olsen K.M., Slimestad R., Verheul M., Lillo C. (2010) Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry*, **71**, 605-613.
- Maccuspie R. I. (2011) Colloidal stability of silver nanoparticles in biologically relevant conditions. *Journal of Nanoparticle Research*, **13**, 2893-2908.
- Muraleetharan V., Mantaj J., Swedrowska M., Vilasaliu D. (2019) Nanoparticle modification in biological media: implications for oral nanomedicines. *RSC Advances*, **9**, 40487-40497.
- Murchie E.H. a T. Lawson. (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 3983-3998.
- Nair P. M. G. a Chung I. M. (2014a) Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Science and Pollution Research*, **21**, 8858-8869.
- Nair P. M. G. a Chung I. M. (2014b) Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, **112**, 105-113.
- Navarro E., Piccapietra F., Wagner B. et al., (2008) Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, **42**, 8959-8964.
- Panda K. K., Achary V. M. M., Krishnaveni R., Padhi B.K., Sarangi S.N., Sahu S.N. Panda B.B. (2011) In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicology in Vitro*, **25**, 1097-1105.
- Peharec Štefanić P., Jarnević M., Cvjetko P., et al. (2019) Comparative proteomic study of phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions on tobacco plants. *Environmental Science and Pollution Research*, **26**, 22529-22550.
- Peharec Štefanić., Košpić P.K., Lyons D.M., Jurković L., Balen B., Tkalec M. (2021) Phytotoxicity of silver nanoparticles on tobacco plants: Evaluation of Coating Effects on Photosynthetic Performance and Chloroplast Ultrastructure. *Nanomaterials*, **11**, 744.
- Pem B., Ćurlin M., Domazet Jurašin D., et al. (2021) Fate and transformation of silver nanoparticles in different biological conditions. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **12**, 665-679.
- Pereira S. P.P., Jesus F., Aguiar S., De Oliveira R., Fernandes M., Ranville J., Nogueira A.J.A. (2018) Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*: Surface coating and exposure period-related effects. *Science of The Total Environment*, **618**, 1389-1399.
- Pokhrel L. R. a Dubey B. (2013). Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Science of The Total Environment*, **452-453**, 321-332.
- Pugazhenthiran N., Anandan S., Kathiravan G., Udaya-prakash N.K., Crawford S., Ashokkumar M. (2009) Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus* sp. *Journal of Nanoparticle Research*, **11**, 1811-1815.
- Qian H., Peng X., Han X., Ren J., Sun L., Fu Z. (2013) Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences*, **25**, 1947-1956.

- Richardson A. D., Duigan S.P., Berlyn G.P. (2002) An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, **153**, 185-194.
- Romero N., Visentini F.F., Márquez V.E., Santiago L.G., Castro G.R., Gagneten A.M. (2020) Physiological and morphological responses of green microalgae *Chlorella vulgaris* to silver nanoparticles. *Environmental Research*, **189**, 109857.
- Sadak M. S. (2019) Impact of silver nanoparticles on plant growth, some biochemical aspects, and yield of fenugreek plant (*Trigonella foenum-graecum*). *Bulletin of the National Research Centre*, **43**, 38.
- Sakamoto M., Fujistuka M., Majima T. (2009) Light as a construction tool of metal nanoparticles: Synthesis and mechanism. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **10**, 33-56.
- Sharma P., Bhatt D., Zaidi M. G. H., Saradhi P.P., Khanna P. K., Arora S. (2012a) Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **167**, 2225-2233.
- Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessaraki M. (2012b) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, **2012**, 1-26.
- Scherer M. D., Sposito J.C.V., Falco W.F., et al. (2019) Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of *Allium cepa* roots: A close analysis of particle size dependence. *Science of The Total Environment*, **660**, 459-467.
- Silva T., Pokhrel L.R., Dubey B., Tolaymat T.M., Maier K.J., Liu X. (2014) Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: Comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. *Science of The Total Environment*, **468-469**, 968-976.
- Sintubin L., De Windt W., Dick J., Mast J., Van Der Ha D., Verstraete W., Boon N. (2009) Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **84**, 741-749.
- Sintubin L., Verstraete W., Boon N. (2012) Biologically produced nanosilver: Current state and future perspectives. *Biotechnology and Bioengineering*, **109**, 2422-2436.
- Song U., Jun H., Waldman B., Roh J., Kim Y., Yi J., Lee E.J. (2013) Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **93**, 60-67.
- Spinoso-Castillo J. L., Chavez-Santoscoy R. A., Bogdanchikova N., Pérez-sato J. A., Morales-Ramos V, Bello-Bello J.J. (2017) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **129**, 195-207.
- Stegemeier J. P., Schwab F., Colman B.P. et al. (2015) Speciation matters: bioavailability of silver and silver sulfide nanoparticles to alfalfa (*Medicago sativa*). *Environmental Science & Technology*, **49**, 8451-8460.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. (2004) Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis.*, (G.C. Papageorgiou, Govindjee, eds.), Springer, Dordrecht, 321-362.
- Suresh A. K., Pelletier D.A., Wang W., Moon J.W., Gu B., Mortensen N.P., Allison D.P., Joy D. C., Phelps T. J., Doktycz M. J. (2010) Silver nanocrystallites: biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. *Environmental Science & Technology*, **44**, 5210-5215.

- Szabados L. a Savouré A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, **15**, 89-97.
- Szőllősi R., Molnár Á., Kondak S, Kolbert Z. (2020) Dual effect of nanomaterials on germination and seedling growth: stimulation vs. phytotoxicity. *Plants*, **9**, 1745.
- Šinko G., Vinković Vrček I., Goessler W., Leitinger G., Dijanošić A., Miljanić S. (2014) Alteration of cholinesterase activity as possible mechanism of silver nanoparticle toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, **21**, 1391-1400.
- Špundová M., Popelková H., Ilík P., Skotnica J., Novotný R., Nauš J. (2003) Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology*, **160**, 1051-1058.
- Štefanić P. P., Cvjetko P., Biba R., et al. (2018) Physiological, ultrastructural and proteomic responses of tobacco seedlings exposed to silver nanoparticles and silver nitrate. *Chemosphere*, **209**, 640-653.
- Taglietti A., Diaz Fernandez Y.A., Amato E., et al. (2012) antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Langmuir*, **28**, 8140-8148.
- Thakkar K. N., Mhatre S.S., Parikh R.Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **6**, 257-262.
- Tien D.C., Tseng K.H., Liao C. Y., Huang C. H., Tsung T.T. (2008) Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method. *Journal of Alloys and Compounds*, **463**, 408-411.
- Tkalec M., Peharec Štefanić P., Balen B. (2019) Phytotoxicity of silver nanoparticles and defence mechanisms,. In: *Analysis, fate, and toxicity of engineered nanomaterials in plants*. (Kumar Verma S., Kumar Das A. eds.), Elsevier, Amsterdam, Nizozemsko, 145-198.
- Torrent L., Iglesias M., Marguí E., et al. (2020) Uptake, translocation and ligand of silver in *Lactuca sativa* exposed to silver nanoparticles of different size, coatings and concentration. *Journal of Hazardous Materials*, **384**, 121201.
- Trajerová R. (2021) *Srovnání účinku nanočástic stříbra u různých druhů rostlin*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc. Česká republika.
- Travan A., Pelillo C., Donati I., et al. (2009) Non-cytotoxic silver nanoparticle-polysaccharide nanocomposites with antimicrobial activity, *Biomacromolecules*, **10**, 1429-1435.
- Tripathi Shweta D. K., Singh S., et al. (2017) An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, **110**, 2-12.
- Tymoszuk A. (2021) Silver nanoparticles effects on in vitro germination, growth, and biochemical activity of tomato, radish, and kale seedlings. *Materials*, **14**, 5340.
- Vannini C., Domingo G., Onelli E., Prinsi B., Marsoni M., Espen L., Bracale M., Wang T. (2013) Morphological and proteomic responses of *eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *PLoS ONE*, **8**, 68752.
- Vierstra R. D., John T.R., Poff K.L. (1982) Kaempferol 3-O-galactoside, 7-O-rhamnoside is the major green fluorescing compound in the epidermis of *Vicia faba*. *Plant Physiology*, **69**, 522-525.
- Wang L., Sun J., Lin L., Fu Y., Alenius H., Lindsey K., Chen C. (2020) Silver nanoparticles regulate *Arabidopsis* root growth by concentration-dependent modification of reactive oxygen species accumulation and cell division. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **190**, 110072.
- Winkel-Shirley B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 218-223.

- Xu Q.S., Hu J.Z., Xie K.B., Yang H.Y., Du K.H., Shi G.X. (2010) Accumulation and acute toxicity of silver in *Potamogeton crispus* L. *Journal of Hazardous Materials*, **173**, 186-193.
- Yan A. a Chen Z. (2019) Impacts of silver nanoparticles on plants: a focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 1003.
- Yang J., Cao W., Rui Y. (2017) Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms. *Journal of Plant Interactions*, **12**, 158-169.
- Yang Q., Shan W., Hu L., et al. (2019) Uptake and transformation of silver nanoparticles and ions by rice plants revealed by dual stable isotope tracing. *Environmental Science & Technology*, **53**, 625-633.
- Yasur J. a Rani. P.U. (2013) Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environmental Science and Pollution Research*, **20**, 8636-8648.
- Yin L., Cheng Y, Espinasse B., et al. (2011) More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science & Technology*, **45**, 2360-2367.
- Yu J. a Zhou X. (2013) Synthesis of dendritic silver nanoparticles and their applications as SERS substrates. *Advances in Materials Science and Engineering* **2013**, 1-4.
- Yu W. a Xie H. (2012) A Review on nanofluids: preparation, stability mechanisms, and applications. *Journal of Nanomaterials*, **2012**, 1-17.
- Ziv M. (1991) Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: *Micropropagation – Technology and Application* (Debergh P. C. a Zimmerman R.H., eds.), Springer Netherlands, 45-69.