



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**DETEKCE LUMINISCENČNÍCH NANOČÁSTIC V
ROSTLINÁCH LASEROVOU SPEKTROSKOPIÍ**

DETECTION OF LUMINESCENT NANOPARTICLES IN PLANTS BY LASER SPECTROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Sára Střítežská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Pavlína Modlitbová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1624/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Sára Střítežská**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Pavlína Modlitbová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Detekce luminiscenčních nanočástic v rostlinách laserovou spektroskopií

Zadání diplomové práce:

V teoretické části bude sepsána literární rešerše zabývající se metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu, instrumentací metody, a bude doplněna přehledem aktuální literatury k analýze rostlin právě touto metodou.

V experimentální části bude provedena série LIBS experimentů vedoucích k sestavení 2D map prvkového rozložení vybraných kontaminantů v modelových rostlinách.

Termín odevzdání diplomové práce: 28.5.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Sára Střítežská
student(ka)

Ing. Pavlína Modlitbová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá vyhodnocením toxicity a bioakumulace foton-upkonverzních nanočástic (UCNPs) v modelové rostlině kukuřici seté (*Zea mays*). V této práci byly testovány lanthanoidy dopované UCNPs lišící se složením nebo velikostí a to ve třech různých koncentracích. Jako pozitivní kontrola byla použita směs odpovídajících chloridů. Expozice probíhala hydroponicky po dobu 168 hodin. Toxicita byla vyhodnocena na základě čtyř makroskopických toxikologických endpointů (mortalita, délka podzemní části rostliny, délka nadzemní části rostliny a délka celé rostliny). Prostorové rozložení prvků yttria, ytterbia, erbia a gadolinia v modelové rostlině bylo stanoveno metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu s prostorovým rozlišením 100 a 26 μm . Distribuce UCNPs v rostlinách byla dále stanovena metodou foton-upkonverzního mikroskenování s prostorovým rozlišením 40 μm . V práci byla diskutována stabilita UCNPs v průběhu a po ukončení expozice rostlin.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with evaluation of toxicity and bioaccumulation of photon-upconversion nanoparticles (UCNPs) in model plant maize (*Zea mays*). Lanthanide-doped UCNPs with different composition and size were tested in three different concentrations in this work. The exposure took place for 168 hours. Toxicity was assessed based on four macroscopic toxicological endpoints (mortality, the length of belowground part of the plants, the length of aboveground part of the plants and whole plants length). Spatial distribution of elements yttrium, ytterbium, erbium and gadolinium in model plants was determined using laser induced breakdown spectroscopy with spatial resolution of 100 μm and 26 μm . Distribution of UCNPs in plants was further studied with photon-upconversion microscanning with spatial resolution of 40 μm . Stability of UCNPs during and after the plant exposure was also discussed in this thesis.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bioakumulace, erbium, foton-upkonverzní nanočástice, gadolinium, kukuřice setá, spektroskopie laserem buzeného plazmatu, toxicita, ytterbium, yttrium

KEYWORDS

Bioaccumulation, erbium, photon-upconversion nanoparticles, gadolinium, maize, laser induced breakdown spectroscopy, toxicity, ytterbium, yttrium

STŘÍTEŽSKÁ, Sára. *Detekce luminiscenčních nanočástic v rostlinách laserovou spektroskopii*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/133030>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Pavlína Modlitbová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
Bc. Sára Střítežská

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své vedoucí Ing. Pavlíně Modlitbové, Ph.D. za cenné rady, vstřícný přístup a čas, který mi věnovala. Za hodnotné připomínky bych ráda poděkovala i Ing. Davidu Prochazkovi, Ph.D. a vedoucímu skupiny laserové spektroskopie doc. Ing. Pavlu Pořízkovi, Ph.D. Dále děkuji Ing. Antonínu Hlaváčkovi, Ph.D. za syntézu foton-upkonverzních nanočástic a poskytnutí prostor pro jejich analýzu, a Mgr. Lucii Šimoníkové a doc. Mgr. Karlu Novotnému, Ph.D. za umožnění měření na ICP-OES. V neposlední řadě srdečně děkuji své rodině za neutuchající trpělivost a podporu nejen při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	Spektroskopie laserem buzeného plazmatu	7
2.1.1	Princip metody LIBS	7
2.1.2	Výhody a nevýhody metody LIBS	10
2.1.3	Instrumentace	11
2.1.4	Prvkové mapování	13
2.2	Optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem	16
2.3	Foton-upkonverzní nanočástice	16
2.3.1	Fotonová upkonverze	16
2.3.2	Syntéza a složení UCNPs	18
2.3.3	Vlastnosti a využití UCNPs	19
2.3.4	Foton-upkonverzní mikroskenování	19
2.3.5	Měření velikosti nanočástic	20
2.4	Ekotoxikologie	21
2.4.1	Testy ekotoxicity na rostlinách	22
2.4.2	Toxicita kovů vzácných zemin	23
2.4.3	Toxicita foton-upkonverzních nanočástic	24
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	26
3.1	Studium rostlin metodou LIBS	26
3.2	Další analytické metody prostorově rozlišené analýzy rostlin	33
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1	Použité chemikálie	34
4.2	Použité přístroje a software	34
4.2.1	Přístroje	34
4.2.2	Software	35
4.3	Test toxicity	35
4.3.1	Testované látky	35
4.3.2	Naklíčení semen	37
4.3.3	Expozice rostlin	38
4.4	Foton-upkonverzní mikroskenování	40
4.5	Měření prostorového rozložení kontaminantů metodou LIBS	40
4.5.1	Optimalizace parametrů měření	40
4.5.2	Analýza rostlin kukuřice seté	41
4.6	Měření prostorového rozložení kontaminantů metodou μ LIBS	42
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
5.1	Vlastnosti disperzí a roztoků	43
5.2	Výsledky testu toxicity	48
5.3	Prostorově rozlišená analýza	52
5.3.1	Optimalizace parametrů měření	52
5.3.2	Prostorově rozlišená analýza rostlin	56
6	ZÁVĚR	71
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	72
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	80

1 ÚVOD

Rostliny tvoří nedílnou součást životního prostředí. Na jejich schopnosti výroby kyslíku je závislý veškerý život a na fungování ekosystému se podílí i jako součást potravního řetězce. Kvalita a životaschopnost rostlin se odvíjí od složení půdy, vzduchu a vody, se kterými jsou v kontaktu. Proto je nesmírně důležité znát vliv jednotlivých prvků a sloučenin na rostliny, ale i posuzovat toxicitu nově vznikajících materiálů. Příkladem takového nového a dynamicky se rozvíjejícího materiálu jsou foton-upkonverzní nanočástice (UCNPs, z anglického Photon-Upconversion Nanoparticles) [1].

Na rozdíl od jiných fluorescenčních nanočástic fungují UCNPs na principu tzv. upkonverze – po sekvenční absorpci několika nízkoenergetických fotonů vyžáří jeden vysokoenergetický foton. Uplatnění nachází UCNPs v mnoha odvětvích lidské činnosti. Díky budící vlnové délce v infračervené (IR, z anglického Infrared) oblasti nezpůsobují poškození biologických tkání a jsou vhodné pro využití v medicíně. Ze stejného důvodu mají potenciál i v energetice, kde by mohly zvyšovat účinnost solárních článků převedením IR záření na vyšší energii. Mezi jejich přednostmi patří především dlouhotrvající a barevně nastavitelná luminiscence. S jejich rozšířením se zvyšuje i riziko průniku do životního prostředí, a je proto nutné zabývat se vlivem UCNPs na různé živé organismy. Modelový organismus byl zvolen z trofické řady producentů. Konkrétně byla jako modelová rostlina pro tuto práci zvolena kukuřice setá (*Zea mays*), což je zemědělská plodina rozšířená do téměř všech částí světa a běžně využívaná v testech toxicity.

Znalost příjmu, translokace a míst bioakumulace vybraného kontaminantu v organismu je klíčová pro pochopení jeho toxického účinku. Pro analýzu rostlin je nutné využívat metodu schopnou analyzovat poměrně velké vzorky s dobrým prostorovým rozlišením. Vhodná je metoda spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS, z anglického Laser Induced Breakdown Spectroscopy), což je optická emisní metoda prvkové analýzy. Vyznačuje se především rychlostí a ekonomickou dostupností. Dokáže analyzovat vzorky o velikosti v řádu cm^2 s prostorovým rozlišením v nižších desítkách mikrometrů. Metoda foton-upkonverzního skenování je schopná detekovat přímo UCNPs na základě jejich fotonové upkonverze. Oproti tomu metoda LIBS nedokáže rozlišit formu detekovaných prvků, pouze jejich přítomnost. Obě metody se tedy vhodně doplňují.

Tato diplomová práce se zabývá vyhodnocením toxicity a bioakumulace lanthanoidy dopovaných UCNPs v modelové rostlině *Z. mays*. Byl studován vliv složení UCNPs ($\text{NaY}_{0,6}\text{Yb}_{0,2}\text{Er}_{0,2}\text{F}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$ a $\text{NaY}_{0,6}\text{Yb}_{0,2}\text{Gd}_{0,18}\text{Tm}_{0,02}\text{F}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$) a vliv velikosti UCNPs (hydrodynamický průměr nanočástic 25,9; 28,8 a 58,2 nm) na působení na rostlinu *Z. mays*. Testy toxicity jednotlivých druhů UCNPs byly doplněny o tzv. koexpoziční testy toxicity. Rostliny v nich byly exponovány směsí dvou druhů UCNPs současně. Jako pozitivní kontrola byla použita směs chloridů yttria, ytterbia, erbia, gadolinia a thulia.

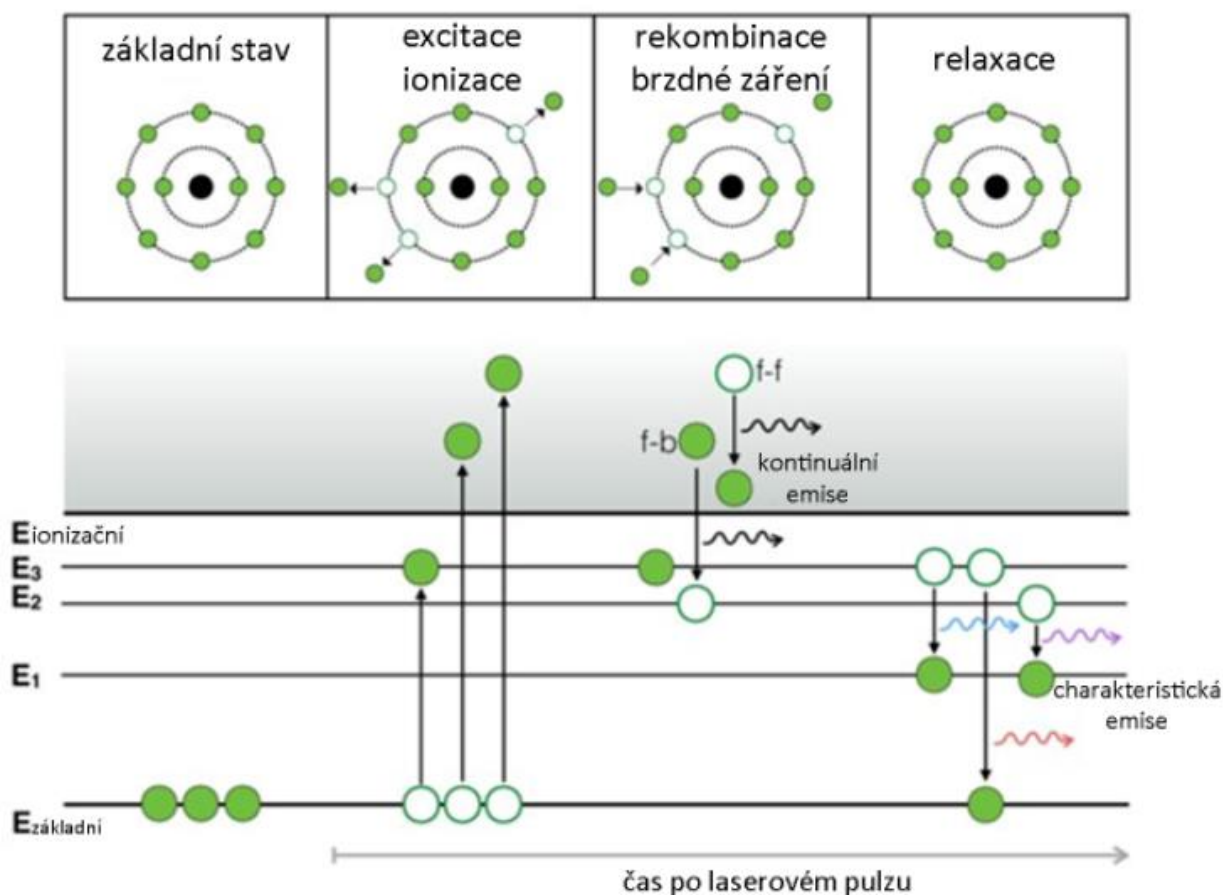
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Optická emisní metoda LIBS je metoda prvkové analýzy, která využívá vysokoenergetického laserového pulzu pro vypařování, atomizaci a excitaci vzorku [2].

2.1.1 Princip metody LIBS

Vysokoenergetický přesně zaměřený laserový pulz po dopadu na vzorek iniciuje řadu reakcí souhrnně se nazývajících laserová ablace, při nichž dojde ke generaci laserového plazmatu. Postupně dochází k odpaření malého objemu hmoty ze vzorku, jeho atomizaci, excitaci a ionizaci. Při přechodu zpět do základního stavu vyzáří částice v plazmatu elektromagnetické záření o charakteristické vlnové délce, podle kterého je možné stanovit přítomnost jednotlivých prvků. Procesy na atomární úrovni jsou znázorněny na Obrázku 1. Každý laserový pulz generuje jedno emisní spektrum [2]. Emisní spektrální čáry jednotlivých prvků jsou dohledatelné například v databázi NIST (National Institute of Standards and Technology) [3, 4].



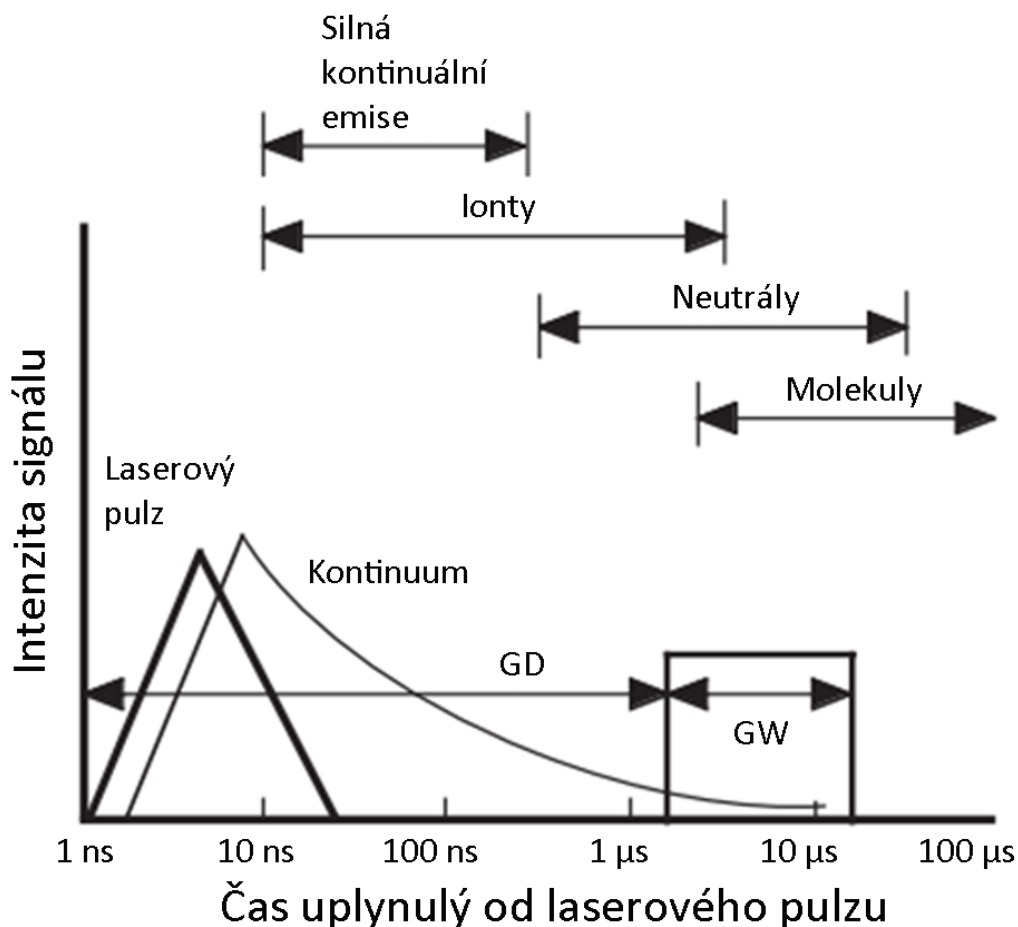
Obrázek 1: Schematické znázornění procesů probíhajících při laserové ablaci na atomární úrovni, převzato a upraveno [5]

Laserové plazma

Laserové plazma vzniká interakcí laserového pulzu se vzorkem. Jelikož je generováno pulzním laserem, výsledné spektrum je velmi proměnlivé v čase a v době mezi vznikem a zánikem prochází několika různými fázemi. Prvním stadiem v procesu laserové ablace je zahřátí povrchu vzorku a roztrhání chemických vazeb mezi atomy pevné či kapalné látky, v plynu pak dochází k optickému průrazu, neboli *breakdown*, po kterém metoda LIBS dostala své jméno. K těmto jevům dochází díky tomu, že vysokoenergetický laserový pulz je zaměřen na velmi malou plochu povrchu vzorku, čímž vzniká vysoká plošná hustota výkonu neboli iradiance. Samotná energie fotonů z laseru, která se pohybuje v rozmezí ultrafialové (UV, z anglického Ultraviolet) a IR oblasti elektromagnetického záření, není dostatečná na rozbití chemických vazeb, proces atomizace ale zahrnuje multifotonové procesy a lavinovou ionizaci. Prvním krokem je generace několika volných elektronů. Jejich energie se poté zvyšuje trojnými srážkami s fotony a neutrálními částicemi, a zvýšením rychlosti v elektrickém poli iontů nebo absorpcí fotonu. Se vzrůstající energií elektronů při srážkách dochází k ionizaci atomů, čímž se produkují další elektrony. Takto vzniká lavinová ionizace [2, 4].

Po optickém průrazu dochází k expanzi plazmatu do všech směrů, v počátku má expanze rychlost $10^5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Tato expanze není prostorově rovnoměrná, ale je rychlejší ve směru, odkud přichází laserový paprsek, protože v tomto směru do plazmatu vstupuje největší množství energie. Výsledkem je tvar připomínající hrušku. Prudká expanze plazmatu je provázená stlačováním okolní atmosféry do rázové vlny, která se projeví hlasitým prasknutím. V průběhu expanze emituje plazma do svého okolí užitečné záření [2, 4].

V prvopočátcích plazmatu převládá emise kontinuálního bílého světla, jehož intenzita se v závislosti na vlnové délce významně nemění. Emise bílého světla je způsobena zářením vznikajícím při rekombinaci volných elektronů a iontů v plazmatu, a brzděním zářením (tzv. Bremsstrahlung), což je elektromagnetické záření produkované při náhlém zpomalení nabitých částic (nejčastěji elektronů) procházejících hmotou v blízkosti silného elektrického pole atomového jádra [2, 6]. Je-li signál zaznamenáván po celou dobu života plazmatu, není možné detekovat emisi ze stopových prvků vzorku. Z tohoto důvodu jsou LIBS měření časově omezená na dobu po vyhasnutí brzděného záření, čehož se dosáhne zpožděným spuštěním detektoru. Proto je nutné před měřením optimalizovat tzv. dobu zpoždění detektoru (GD, z anglického Gate Delay) a současně i integrační dobu (GW, z anglického Gate Width), což je doba, po kterou se spektrum snímá. Bílé světlo v plazmatu nemá dlouhou životnost, takže, v době kdy vyhasíná, se atomární signál často teprve objevuje. V té chvíli se drasticky zlepší poměr signálu k pozadí a zmenší se i rozšíření čar, protože se snižuje elektronová hustota plazmatu. Z částic se nejdříve v plazmatu objevují ionty, poté neutrální atomy a nakonec při nižší teplotě i molekuly. Změna složení plazmatu v čase je schematicky znázorněna na Obrázku 2 [2, 4].

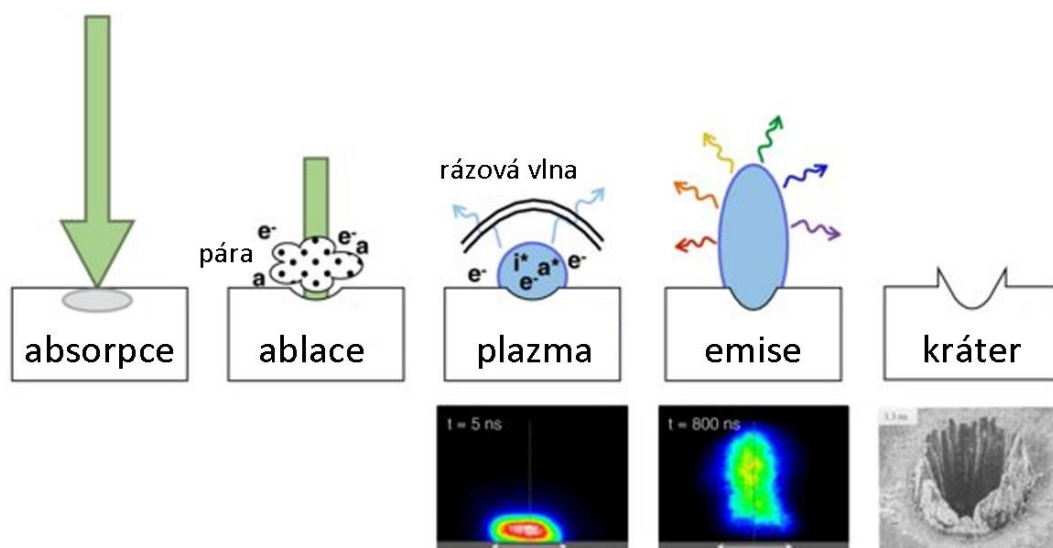


Obrázek 2: Složení plazmatu v závislosti na čase, převzato a upraveno [2]

Typická teplota plazmatu po iniciaci se pohybuje v řádu desítek tisíc stupňů Celsia. Teplota v rámci plazmatu je heterogenní. Při průchodu fotonů chladnějšími vnějšími vrstvami plazmatu dochází k samoabsorbci. Jak se postupně snižuje energie jednotlivých složek plazmatu, plazma chladne a zaniká. Energie z plazmatu uniká v podobě záření a tepla, uvnitř plazmatu se pak ionty a elektrony rekombinují na neutrální atomy nebo molekuly. V místě interakce laseru se vzorkem zůstane ablační kráter. Celý proces interakce laserového pulzu se vzorkem je znázorněn na Obrázku 3. Průběh laserové ablace ovlivňuje mnoho vnějších faktorů, jako je tlak, vlnová délka laseru, doba trvání a energie laserového pulzu, měřicí atmosféra nebo odrazivost povrchu vzorku [3].

Metoda LIBS má obecně limity detekce v jednotkách ppm. Lepší citlivosti se dá dosáhnout například zvýšením teploty nebo doby života plazmatu. Jednou z cest, jak toho dosáhnout je použití tzv. dvoupulzního uspořádání (DP LIBS, z anglického Double Pulse LIBS). Při dvoupulzní konfiguraci se s časovým odstupem využívají dva laserové pulzy. Dvě nejobvyklejší geometrické konfigurace laserových pulzů jsou kolineární, kdy oba pulzy dopadají kolmo na vzorek, nebo ortogonální, kdy jeden laserový pulz dopadá kolmo na vzorek a druhý je veden rovnoběžně s jeho povrchem, a tedy v pravém úhlu oproti prvnímu laserovému pulzu [4]. Zvýšení signálu se u DP LIBS dosahuje předablačním ohřevem prostředí a iniciací jiskry, nebo postablačním ohřevem plazmatu [7]. Tyto dva jevy mohou fungovat i současně, čehož se využívá v trojpulzním uspořádání [8].

laserový pulz



Obrázek 3: Schematická vizualizace jednotlivých fází interakce laseru s povrchem vzorku doplněná o fotografie z měření, převzato a upraveno [5]

Matriční efekt je nežádoucí jev v plazmatu, při kterém složení a vlastnosti matrice ovlivňují intenzitu signálu, přestože koncentrace sledovaného prvku zůstává stejná. Matriční efekt se dá rozdělit na dva základní typy: fyzikální a chemický. Fyzikální matriční efekt způsobuje různou intenzitu signálu ze stejného množství látky v závislosti na fyzikálních vlastnostech vzorku. I v případě, že se parametry ablačního laserového pulzu nezmění, množství ablatovaného prvku může být ovlivněno rozdíly ve vodivosti, skupenském teple vypařování, měrné tepelné kapacitě nebo absorpci záření. Ačkoli se dá skutečné množství prvku v matrici přepočítat pomocí poměru sledovaného prvku a matričního prvku o známé koncentraci, dá se tak učinit pouze za předpokladu, že tento poměr zůstane po celou dobu měření konstantní. Další možností kalibrace je analýza akustického signálu generovaného při ablaci. Chemický matriční efekt je pozorován v případě, že přítomnost jednoho prvku ovlivňuje emisní charakteristiky druhého prvku. Tím se výrazně komplikuje kalibrace. Vzájemný vliv prvků je možné kompenzovat v případě, že jsou známé koncentrace a efekty interference mezi oběma prvky. S měněním se složením i koncentrací jednotlivých prvků se tato korekce ještě více komplikuje [2].

2.1.2 Výhody a nevýhody metody LIBS

Z ekonomického hlediska patří mezi hlavní výhody metody LIBS především cenová dostupnost, nenáročnost vybavení a snadná úprava laboratorní sestavy konkrétním potřebám daného měření. Z hlediska chemické analýzy je pak významná schopnost detekovat téměř všechny prvky z periodické tabulky, včetně lehkých prvků a halogenů, a možnost snímání více prvků současně. Další velkou výhodou této metody je možnost analýzy materiálů ve všech třech skupenstvích, tedy s minimální přípravou vzorku před samotným měřením. Tato skutečnost dále ústí v možnost měření *in situ* či na velkou vzdálenost – typicky může být měřicí sestava umístěna ve vzdálenosti několik metrů (obecně se uvádí vzdálenost až do 30 metrů) od analyzovaného vzorku. U pevných vzorků je dále umožněna jejich prostorová

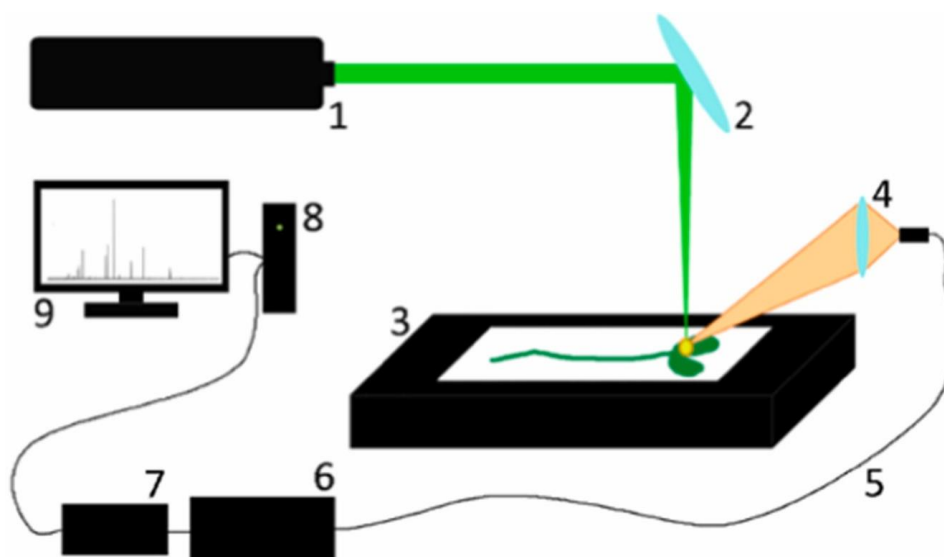
analýza: hloubkové profilování a mapování povrchu vzorku (tvorba 2D prvkových map). Kombinace těchto dvou postupů může vést k tvorbě 3D modelů [1, 9, 10].

Metoda LIBS však má i několik nedostatků, které její využití limitují. Jedná se především o výše popsany matriční efekt, který výrazně komplikuje kvantifikaci, a kvůli němuž se metoda LIBS v současné době používá především při semikvantitativní analýze. Dále se jedná o relativně vysoké limity detekce, které jsou oproti ostatním analytickým metodám poměrně silně závislé na vlastnostech vzorku. Vzhledem k použití vysokoenergetických laserů je kladen velký důraz na jejich zabezpečení v průběhu samotného měření tak, aby nedošlo k poškození zraku či zranění vysokým napětím, kterým jsou lasery napájeny. Riziko představuje i možný vznik toxických produktů [2].

Ačkoli nenáročná příprava vzorků představuje výraznou úsporu času, může tento přístup způsobit problémy se spolehlivostí analýzy. Jelikož se řada vzorků analyzuje v podstatě v nezměněném stavu, nedochází k jejich homogenizaci a výsledek měření metodou LIBS je nutno považovat pouze za vyjádření lokálního složení vzorku. Další problém může představovat nereprezentativní složení povrchové vrstvy vzorku, kde dochází k laserové ablaci. To může být případ například kovových slitin. Metoda je rovněž silně závislá na struktuře a hrubosti povrchu vzorku [2].

2.1.3 Instrumentace

Každá LIBS aparatura se skládá z několika základních komponent. První z nich je vysokoenergetický pulzní laser. Následuje zaměřovací optika, která zaměří laserový pulz na povrch vzorku. Kolize laserového paprsku se vzorkem způsobí vznik plazmatu a elektromagnetického záření, které se přes sběrnou optiku a případně i optické vlákno vede do spektrometru. Ve spektrometru dojde k rozdělení světla podle vlnové délky na mřížce, signál je detekován a následně míří do počítače. Schéma LIBS aparatury je uvedeno níže na Obrázku 4 [4, 11].



Obrázek 4: Schéma LIBS aparatury: (1) pulzní laser, (2) zaměřovací optika, (3) posuvný stůl s upevněným vzorkem, (4) sběrná optika, (5) optické vlákno, (6) spektrometr, (7) detektor, (8) počítač, (9) příklad LIBS spektra, převzato [11]

Laser

Vývoj metody LIBS byl navázán na vynález laseru. Ačkoli teoreticky byly lasery předpovězeny už na počátku 20. století, první funkční lasery byly světu představeny až v roce 1960. Pro metodu LIBS se nejčastěji používají pulzní nanosekundové pevnolátkové lasery typu Nd:YAG (yttrito-hlinitý granát dopovaný ionty neodymu) se základní vlnovou délkou 1064 nm. Za využití generátoru vyšších harmonických frekvencí lze však poměrně snadno dosáhnout i vlnových délek 532 nm, 355 nm, 266 nm a 213 nm, čímž se pokryje infračervená, viditelná i ultrafialová oblast elektromagnetického záření. Důležitými parametry laseru pro metodu LIBS jsou opakovací frekvence nebo kvalita laserového svazku, z praktického hlediska pak požadavky na chlazení a příkon elektrické energie, velikost a hmotnost laseru. Vliv na ablaci a velikost kráteru má kromě vlnové délky i energie a průměr laserového pulzu. Méně často se využívají i femtosekundové lasery, které sice umožňují větší kontrolu laserové ablace, ale za cenu nižší emise [2, 4, 12]

Zaměřovací a sběrná optika

V nejjednodušších sestavách je zaměření laserového paprsku zajištěno pouze čočkou, složitější systémy bývají vybaveny soustavou několika čoček nebo různými typy objektivů, které umožňují volbu průměru paprsku nebo zajistí jeho homogenizaci. Pro klasické uspořádání metody LIBS je ohnisková vzdálenost čočky v řádu několika centimetrů. Pro konfiguraci tzv. μ LIBS, která umožňuje při prvkovém mapování dosáhnout lepšího prostorového rozlišení (nižší desítky mikrometrů) tím, že vytváří menší krátery, se vždy používá objektiv mikroskopu s ohniskovou vzdáleností jen několika milimetrů. Tím se dosáhne lepšího zaostření a ablace menšího objemu materiálu [3, 16].

Transport signálu z plazmatu do spektrometru se dá provést několika způsoby. Nejjednodušší konfigurace sběrné optiky je opět použití jednoduché čočky, případně kombinace čočky a zrcadla s otvorem. Časté je i použití vláknové optiky, kdy je svazek optických vláken na straně vzorku opatřen objektivem a na straně spektrometru jsou vlákna rozpletena tak, aby veškeré záření bylo převedeno do štěrbině spektrometru [4].

Spektrometry a detektory

Důležitými vlastnostmi spektrometrů pro metodu LIBS jsou především rozlišovací schopnost, citlivost, rychlost snímání a rozsah vlnových délek. Dva nejpoužívanější typy spektrometrů pro metodu LIBS jsou Echelle a Czerny-Turner. Spektrometry typu Echelle mají široký spektrální rozsah, od UV po IR oblast, a proto jsou vhodné pro víceprvkovou analýzu. Mají však nižší citlivost a obvykle i pomalejší operační rychlost. Spektrometry typu Czerny-Turner mají naopak velmi vysokou citlivost a jsou rychlé. Jeden Czerny-Turner spektrometr je vybaven více mřížkami, takže se spektrální rozlišení dá upravit na míru požadované aplikaci. Jejich nevýhodou je úzké spektrální okno, široké jen několik desítek nanometrů, které limituje množství současně detekovaných prvků [12].

V kombinaci se spektrometry se jako detektory používají nejčastěji intenzifikovaná zařízení s vázanými náboji (ICCD, z anglického Intensified Charge-Coupled Device). Požadavky na detektory pro LIBS jsou především synchronizace s laserovými pulzy, rychlé zapínání a citlivost. Detektory začínají snímat spektra dle nastaveného GD a činí tak po dobu GW [4].

Další instrumentace

Aparatura LIBS může být doplněna o vzduchotěsnou interakční komoru s manipulátorem, který umožňuje prvkové mapování, a systém regulace tlaku. Tak se dají provádět měření nejen za různého tlaku, ale i v různém složení atmosféry [14].

2.1.4 Prvkové mapování

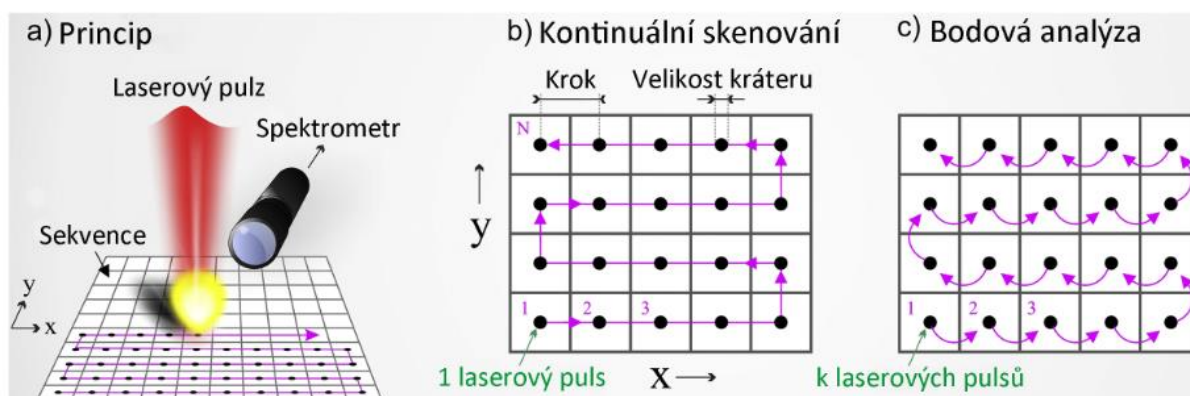
Princip prvkového mapování metodou LIBS

Mapování povrchu vzorků metodou LIBS je založeno na stejných fyzikálních principech, jako bodová analýza, liší se však postupem v průběhu měření. Ke generaci plazmatu postupně dochází v různých místech vzorku s daným pravidelným krokem, určujícím velikost prostorového rozlišení. Každému spektru jsou pak při zpracování přiřazeny souřadnice, proto je možné sestavit prvkovou mapu odpovídající povrchu vzorku. Prostorové rozlišení mapy je limitováno poškozením povrchu vzorku v okolí ablačního kráteru. Dojde-li k překryvu nového kráteru s oblastí ovlivněnou předchozím ablačním kráterem, snižuje se opakovatelnost měření [12].

Pro mapování metodou LIBS existují 2 základní módy: kontinuální a bodový. Při kontinuálním skenování, znázorněném v části b) na Obrázku 5 se vzorek plynule pohybuje v ose x , přičemž rychlost tohoto pohybu je synchronizována s frekvencí laserového pulzu. Bodová analýza, viz Obrázek 5 část c), probíhá tím způsobem, že se analyzuje konkrétní bod povrchu vzorku, následně se vzorek posune a po zastavení se analyzuje další bod. Tohle uspořádání umožňuje akumulaci signálu, realizaci hloubkového profilování a celkově získání 3D informace o prvkovém složení vzorku. Při kontinuálním skenování sice není možné využít akumulace signálu z jednoho bodu, protože vzorek je neustále v pohybu, ale tento mód umožňuje vyšší operační rychlost. Rovněž obvykle dosahuje i lepšího prostorového rozlišení, což je dáno právě použitím jediného laserového pulzu a poškozením menší oblasti povrchu vzorku [12].

Namísto pohybu laserovým paprskem využívá většina zařízení pro pohyb vzorku posuvný manipulátor. Tento přístup se volí, protože, je-li plazma stále na stejném místě vůči sběrné optice, je vyšší účinnost sběru signálu [12]. Při měření velkého povrchu vzorků s vysokou opakovací frekvencí laserového pulzu (až 1 kHz) není možné dosáhnout požadovaného výsledku s tradiční LIBS aparaturou a je nutné pohybovat laserovým paprskem. Tento způsob se hodí například při analýze minerálů a hornin v geochemii [15].

Prvkové mapování metodou LIBS se využívá v mnoha různých odvětvích: archeologie, geologie, katalýza, biologické aplikace, forenzní věda, metalurgie, analýza cementu a betonu nebo mineralogie [12, 13]. V biologických aplikacích se jedná o analýzu tvrdých (zuby, kosti) i měkkých (karcinomy, myší orgány) tkání, bakterií, řas a rostlin (makronutrienty, mikronutrienty, kontaminanty) [1, 13].



Obrázek 5: Grafické znázornění průběhu LIBS mapování při různém nastavení; a) Obecný princip mapování, b) kontinuální mód, c) bodový mód, převzato a upraveno [12]

Příprava vzorků pro prvkové mapování metodou LIBS

Ačkoli se jako častá výhoda metody LIBS uvádí, že není nutná úprava vzorků, pro prvkové mapování to úplně neplatí. Protože laserový paprsek musí být na vzorek dobře zaostřen, i tvrdé vzorky, které se dají snadno analyzovat, je třeba alespoň zbrousit, aby bylo dosaženo rovnhého povrchu. U biologických materiálů je pak příprava zcela klíčová, protože výrazně ovlivňuje kvalitu získaných dat. To platí i pro analýzu rostlin [1].

In situ analýza prostorového prvkového rozložení rostlinných vzorků byla doposud publikována pouze výjimečně [16]. Nejčastější postup přípravy rostlinných vzorků je jejich vysušení, vylisování a následné upevnění do epoxidové pryskyřice na podložní sklíčko. Tento způsob přípravy je sice častý, levný a nenáročný, ale umožňuje získat pouze omezené množství informací o lokalizaci vybraného analytu v rámci rostlinného vzorku. Přesnější lokalizace je pak možná v rámci analýzy příčných či podélných řezů rostlinných tkání [1, 17].

Další metody prvkového mapování

Zájem o prostorově rozlišenou prvkovou analýzu v odvětvích jako materiálové vědy nebo povrchová analýza vedl k velkému rozvoji různých analytických metod. Mezi nejvýznamnější patří laserová ablace s indukčně vázaným plazmatem a hmotnostně spektroskopickou detekcí (LA-ICP-MS, z anglického Laser-Ablation Inductively-Coupled Plasma Mass Spectroscopy). Stejně jako LIBS využívá i LA-ICP-MS využívá pro vzorkování laserovou ablaci s tím rozdílem, že ablatovaný materiál je transportován nosným plynem (nejčastěji argon, nebo směs argonu a helia) do indukčně vázaného plazmatu, kde dochází k jeho ionizaci. Ionty jsou následně rozděleny podle poměrů hmotnosti a náboje a detekovány v hmotnostním spektrometru. Běžně užívané prostorové rozlišení se pohybuje mezi 1–500 μm , ale dá se snížit až na 0,3 μm . Měření metodou LA-ICP-MS je velmi citlivé a poměrně nezávislé na matričním efektu, tudíž umožňuje kvantifikaci [1, 18, 19]. Pro mapování biologických tkání byla výjimečně již využita i laserová ablace s indukčně vázaným plazmatem a optickou emisní detekcí (LA-ICP-OES, z anglického Laser-Ablation Inductively-Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy), která funguje na podobném principu jako LA-ICP-MS s tím rozdílem, že k detekci prvků dochází za využití optické emisní spektroskopie. Tento způsob analýzy však není zdaleka rozšířený tolik jako LA-ICP-MS [1, 20].

Další rozšířenou metodou prvkového mapování je hmotnostní spektroskopie sekundárních iontů (SIMS, z anglického Secondary Ions Mass Spectroscopy), s jejíž pomocí je možné

dosáhnout výborného prostorového rozlišení, při speciálním nastavení dokonce až v řádu vyšších desítek nanometrů. Princip metody SIMS je založen na využití iontového svazku k odstranění několik vrstev atomů z povrchu vzorku. Při této interakci jsou uvolňovány tzv. sekundární ionty, které se dále analyzují v hmotnostním spektrometru. Pro měření je vyžadováno velmi vysoké vakuum a měření větší plochy povrchu vzorků je relativně pomalé. Metoda SIMS pro velmi malé vzorky umožňuje i sestavení 3D modelů. Významnou roli v analýze hraje příprava vzorků, problém představuje například vysoký obsah vody, takže se vzorky musí vysušit nebo zmrazit. Metoda SIMS se rovněž považuje za semikvantitativní, protože iontový svazek proniká pouze do hloubky 0,2–10 nm a signál je silně ovlivněn matričním efektem [1, 18, 19].

Další velká skupina analytických metod umožňující analýzu prvkového rozložení je založená na detekci nebo absorpci rentgenového záření. Metoda skenovací/transmisní elektronové mikroskopie s energiově disperzní rentgenovou spektroskopií (SEM/TEM-EDS, z anglického Scanning/Transmission Electron Microscopy with Energy Dispersive X-Ray Emission) je založená na detekci charakteristického rentgenového záření generovaného paprskem elektronů. Prostorové rozlišení SEM-EDS je závislé na použitém urychlovacím napětí elektronů a dosahuje 2–3 μm . Prostorové rozlišení TEM-EDS je dáno tloušťkou vzorku a průměrem elektronového svazku a umožňuje prvkové mapování až na subcelulární úrovni. Poměrně vysoké limity detekce obou metod jsou zapříčiněny přítomností vysokého pozadí danou kontinuálním brzdným zářením. Příprava vzorků vyžaduje nanesení tenké vrstvy uhlíku nebo jiného vodivého materiálu. Výhodou obou metod je současná detekce struktur vzorku, která vhodně doplňuje informace o prvkovém složení. Umožňují rovněž kvantifikaci prvků [1, 21].

Protony indukovaná rentgenová emise (PIXE, z anglického Proton-Induced X-Ray Emission) taktéž detekuje rentgenové záření charakteristické pro jednotlivé prvky. Rentgenové záření je indukováno svazkem iontů, nejčastěji protonů. Míra ionizace a produkce rentgenového záření stoupá s energií iontového paprsku a klesá se zvyšujícím se počtem elektronů v elektronovém obalu. Protony přichází o energii v důsledku Coulombických interakcí s elektrony. Měření probíhá ve vakuu na vzorcích s nanesenou tenkou vrstvou uhlíku. Maximální velikost jednodílné mapy je $2,5 \times 2,5 \text{ mm}$, při analýze většího povrchu se vzorek musí posouvat a výsledná mapa je mozaikou jednotlivých měření [1, 21].

Rentgenová fluorescenční mikroskopie (XRF, z anglického X-Ray Fluorescence) patří mezi synchrotronové techniky a využívá k excitaci svazek rentgenového záření. Excitují se elektrony z vnitřních elektronových hladin blízkých jádru. Vzniklou díru vzápětí zaplní jiný elektron z vnějšího obalu za vyzáření charakteristického fluorescenčního záření. Takto se dá zmapovat celá oblast vzorku a získat mapa prvkového rozložení, jejíž prostorové rozlišení může být v desítkách nanometrů a analyzovat se dají vzorky v řádu milimetrů. XRF umožňuje měření na vzduchu. Měřené vzorky se často suší, čímž se zlepšují limity detekce [1, 19, 21].

Rentgenová absorpční spektroskopie (XAS, z anglického X-Ray Absorption Spectroscopy) rovněž patří mezi synchrotronové techniky a přináší dodatečné informace o chemické struktuře vzorku. Ačkoli se XAS spektra získávají v průběhu jednoho měření, pro účely zpracování se dělí do dvou částí, z nichž každá přináší rozdílné informace. První z nich je spektroskopie blízké struktury rentgenové absorpční hrany (XANES, z anglického X-Ray

Absorption Near Edge Structure) a druhá je spektroskopie jemné struktury daleké části absorpční hrany (EXAFS, z anglického Extended X-Ray Absorption Fine Structure). Snáze měřitelnou metodou je XANES, který je ale náchylnější k chybnému výkladu. Metoda XANES je citlivá především na oxidační stavy prvků a elektronegativitu ligandů, EXAFS přináší informace o koordinačních vlastnostech jako mezijaderná vzdálenost nebo počet koordinačních atomů. Metody XAS a XRF se dají v rámci jednoho měření kombinovat [1, 19, 21].

2.2 Optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem

Metoda optické emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES, z anglického Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy) je založená na detekci záření emitovaného excitovanými atomy při návratu elektronů do základní hladiny. Kapalné vzorky jsou nejprve ve zmlžovacím zařízení rozprášeny na aerosol a poté pracovním plynem (nejčastěji argon) vedeny do indukčně vázaného plazmatu. Zde dojde k vysušení, vypařování, atomizaci, excitaci a případné ionizaci atomů. Charakteristické záření je ve spektrometru rozloženo na jednotlivé vlnové délky a v detektoru detekováno. Výhodami metody ICP-OES je především vysoká citlivost a selektivita, nízké limity detekce, možnost současného stanovení více prvků, možnost kvantifikace vzorků [22, 23].

2.3 Foton-upkonverzní nanočástice

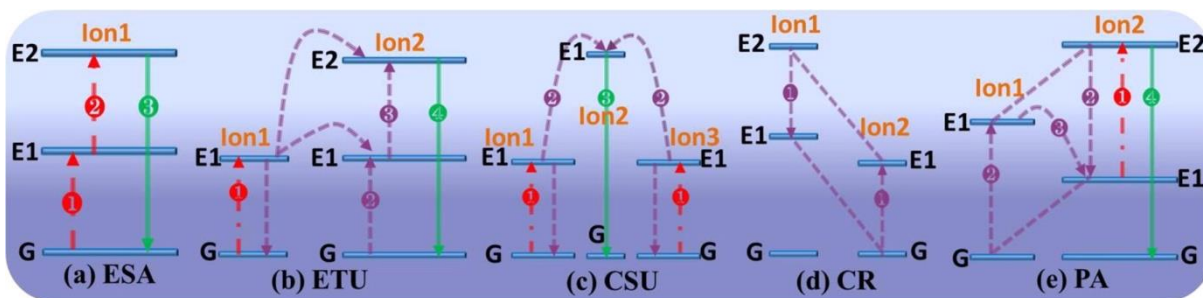
Foton-upkonverzní nanočástice (UCNPs, z anglického Upconversion Nanoparticles) jsou relativně nový, rychle se rozvíjející nanomateriál, kterému se převážně v posledním desetiletí dostává od vědecké komunity značné pozornosti. Mají velký potenciál rozšířit se do různých oblastí průmyslu i medicíny, kde by v budoucnu mohly nahradit tradičně využívaná fluorescenční barviva nebo kvantové tečky. Za svou oblíbenost vděčí UCNPs především unikátním optickým vlastnostem, jako je velmi stabilní, barevně nastavitelná a dlouhotrvající luminescence. S jejich rozšířením se však pojí i riziko průniku do životního prostředí, kde je nutné monitorovat jejich vliv na různé ekosystémy [24, 25].

2.3.1 Fotonová upkonverze

Fotonová upkonverze je jedním z jevů spadajících do tzv. nelineární optiky, která je definována závislostí optických vlastností materiálu na intenzitě excitačního záření. V případě fotonové upkonverze se jedná o absorpci elektromagnetického záření s vyššími vlnovými délkami, a tedy nízkou energií, z IR nebo blízké IR (NIR, z anglického Near IR) oblasti, a jeho přeměně na záření s nižší vlnovou délkou a větší energií, typicky do viditelné (VIS, z anglického Visible) nebo UV oblasti. K tomu může dojít díky sekvenční absorpci dvou nebo více nízkoenergetických fotonů a následnému vyzáření jednoho fotonu s vyšší energií. K tomu může docházet několika různými mechanismy. Při excitaci záření tedy dochází k Anti-Stokesově posunu [26]. K procesu fotonové upkonverze může v UCNPs docházet několika mechanismy, které se mohou vzájemně i kombinovat. Všechny popsané mechanismy fotonové upkonverze jsou schematicky znázorněny na Obrázku 6 [24].

- Absorpce v excitovaném stavu (ESA, z anglického Excited state Absorption) – ESA probíhá pouze na jediném iontu formou následné absorpce dvou fotonů a excitace až do druhé excitované hladiny. To je umožněno "žebříkovitou" strukturou energetických hladin iontu, kde je vzdálenost mezi základní, první excitovanou a druhou excitovanou energetickou hladinou stejná, což je typická vlastnost některých lanthanoidů, a rovněž dlouhotrvajícím prvním excitovaným stavem, který zvyšuje pravděpodobnost průběhu druhé excitace. Emise potom zpětně probíhá z druhé excitované hladiny. Pro tento mechanismus jsou vhodné ionty Er^{3+} , Ho^{3+} , Tm^{3+} a Nd^{3+} . Pro účinný průběh je také nutné zvolit vhodnou excitační vlnovou délku. Jelikož se jedná o proces na jednom iontu, není účinnost ESA závislá na koncentraci dopantu.
- Energetický transfer (ETU, z anglického Energy Transfer Upconversion) – ETU zahrnuje dva sousedící ionty. První z nich se nazývá senzibilizátor a při procesu je absorpcí fotonu excitován ze základního stavu do metastabilního prvního excitovaného stavu excitačním zářením. Při relaxaci odevzdá získanou energii do prvního excitovaného stavu sousedního iontu – aktivátoru. Tento proces se zopakuje dvakrát, aktivátor se excituje do druhé hladiny a následně vyzáří foton. Účinnost tohoto mechanismu závisí na vzdálenosti mezi oběma ionty, která je určena jejich koncentrací. Jako páry senzibilizátor/aktivátor jsou vhodné: $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$, $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$, $\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$.
- Společná senzibilizace (CSU, z anglického Cooperative Sensitization Upconversion) – CSU vyžaduje tři ionty, přičemž krajní ionty 1 a 3 jsou stejného typu. Ionty 1 a 3 jsou absorpcí fotonu oba současně excitovány do prvního excitovaného stavu a mohou naráz předat energii prostřednímu iontu číslo 2, čímž ho excitují do druhého excitovaného stavu. Prostřední iont při relaxaci do základního stavu excituje upkonvertovaný foton. Účinnost tohoto mechanismu je řádově nižší než oba výše zmíněné typy. Společná senzibilizace funguje pro páry: $\text{Yb}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$, $\text{Yb}^{3+}/\text{Eu}^{3+}$ a $\text{Yb}^{3+}/\text{Pr}^{3+}$.
- Křížová relaxace (CR, z anglického Cross Relaxation) – CR vyžaduje dva ionty stejného nebo různého typu. Dojde při ní k přenosu energie z druhého excitovaného stavu iontu 1 na iont 2 za současné excitace do první excitované hladiny. Oba ionty tedy skončí v první excitované hladině. Účinnost procesu opět závisí na vzdálenosti podílejících se iontů, a tedy na koncentraci dopantu. Mechanismus CR se využívá při fotonové lavině – dalším mechanismu fotonové upkonverze.
- Fotonová lavina (PA, z anglického Photon Avalanche) – PA je proces fotonové upkonverze probíhající až nad určitou pevně danou hranicí energie. Pod touto hranicí je intenzita luminiscence velmi nízká, při jejím překročení skokově naroste o několik řádů. Jedná se o kombinaci ESA a CR. Při PA dochází k cyklu, který odstartuje ESA na iontu 1, energie se následně předá iontu 2 v prvním excitovaném stavu, dojde tedy k excitaci na druhou hladinu. Poté přichází na řadu CR mezi ionty 1 a 2. Dojde k obsazení prvních excitovaných hladin obou iontů, poté ion 1 přenesou svoji energii na další ion 2, čímž dojde k obsazení jeho první excitované hladiny. Z jednoho iontu 2 v metastabilním stavu tímto procesem vzniknou dva, ze dvou čtyři, a tak dále.

Mechanismus PA je snadno rozpoznatelný, jelikož než dojde k emisi viditelného záření, uplyne doba v řádu několika sekund [24].

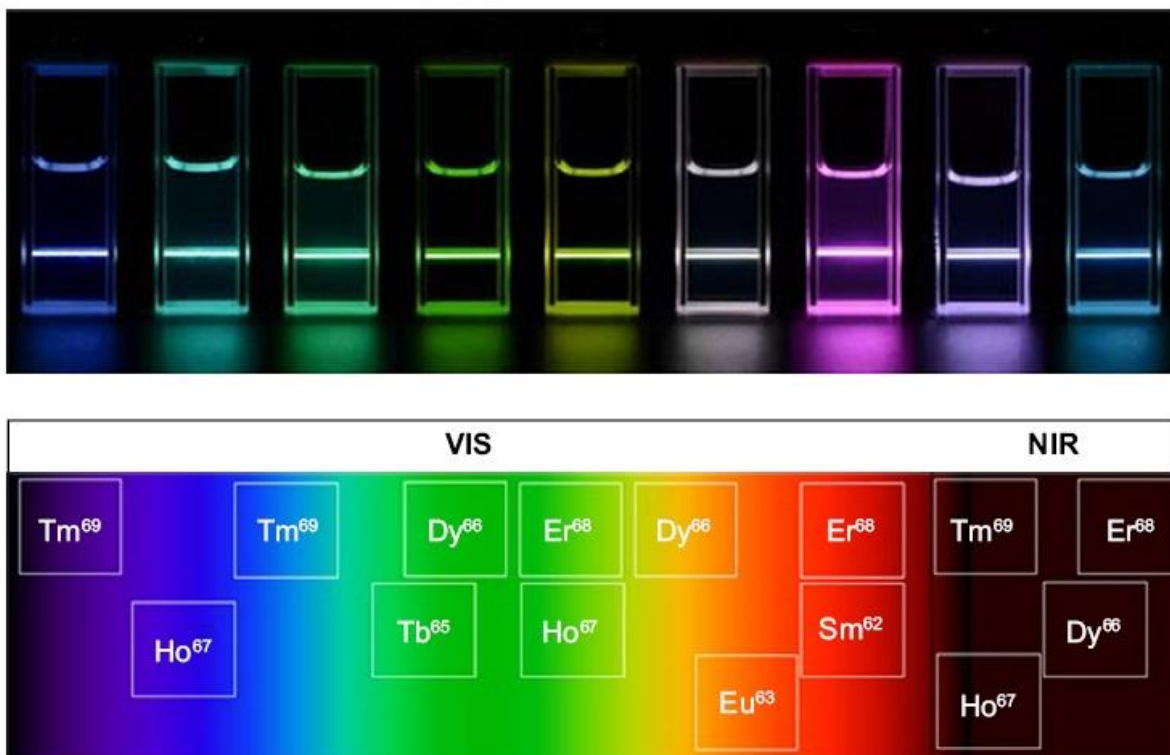


Obrázek 6: Schematické znázornění mechanismů fotonové upkonverze, (a) absorpce v excitovaném stavu, (b) energetický transfer, (c) společná senzibilizace, (d) křížová relaxace, (e) fotonová lavina, převzato [24]

2.3.2 Syntéza a složení UCNPs

Lanthanoidy dopované foton-upkonverzní nanočástice jsou systémy o velikosti menší než 100 nm s unikátními luminiscenčními vlastnostmi. Obecně se skládají ze tří složek. První složkou je matrice, která materiálu poskytuje foton-upkonverzní optické vlastnosti včetně účinnosti a emisního profilu. Druhou složkou je senzibilizátor, který je snadno excitován excitačním zářením, a poslední složkou je aktivátor, který tvoří centrum luminiscence foton-upkonverzní nanočástice. Senzibilizátor i aktivátor jsou do mřížky přidávány jako dopanty v koncentracích mezi dvěma (aktivátor) a dvaceti (senzibilizátor) molárními procenty. Jako senzibilizátor se nejčastěji používá Yb^{3+} díky jednoduché struktuře svých energetických hladin. Ionty Er^{3+} , Tm^{3+} a Ho^{3+} zase mají žebříkovitou strukturu energetických hladin a využívají se proto často jako aktivátory. Jako mřížka se nejčastěji užívá NaYF_4 , protože má vysokou chemickou stabilitu a nízkou energii fononů [27]. Za pomoci vhodného výběru dopantů lze dosáhnout různě barevné luminiscence, viz Obrázek 7 [28].

Pro syntézu UCNPs se využívá řada metod, kupříkladu koprecipitace, termální dekompozice, solvotermální syntéza nebo mikrovlnná syntéza. Obecně se však ke kontrole růstu, tvaru a velikosti při všech přístupech využívají hydrofobní ligandy. Jelikož se hydrofobní ligandy nemohou rozpouštět ve vodě, nejsou tyto UCNPs biokompatibilní, a proto se přistupuje k různým povrchovým úpravám. Hydrofilního povrchu je možné dosáhnout interakcí či oxidací ligandů, záměnou ligandů, nebo depozicí po jednotlivých vrstvách. Přítomnost funkčních skupin na povrchu UCNPs navíc umožňuje navázání dalších biomolekul [28].



Obrázek 7: Barva disperzí UCNPů v závislosti na přidaných dopantech, převzato [28]

2.3.3 Vlastnosti a využití UCNPů

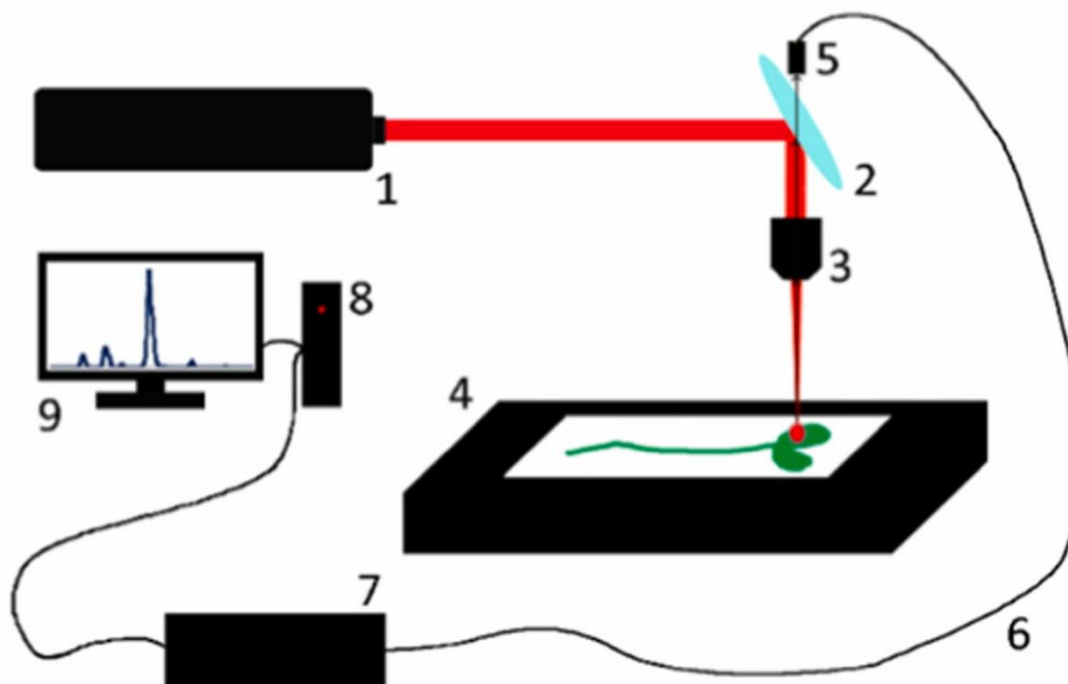
Foton-upkonverzní nanočástice jsou vhodné pro využití v medicíně a dalších biologických aplikacích především díky své vysoké účinnosti, vícebarevné emisi, velmi nízké autofluorescenci, vysoké citlivosti, nízké interferenci pozadí a dobré hloubkové prostupnosti tkání. Za tu UCNPů vděčí své excitační vlnové délce v IR oblasti elektromagnetického záření, která spadá do tzv. optického transparentního okna biologických tkání, které se nachází v rozmezí 700–1100 nm. Díky velkému anti-Stokesovu posunu se snadno odliší excitační a emisní záření. Výhodou UCNPů je, že nepodléhají vysvícení a svítí kontinuálně. Navíc díky využití budícího světla s vyšší vlnovou délkou nezpůsobují poškození tkání a neobsahují žádné pro lidi toxické prvky [24, 29–31]. Dají se využívat při *in vivo* zobrazování různých živých organismů [32], nebo i v technologických aplikacích jako solární články nebo optické senzory [30].

2.3.4 Foton-upkonverzní mikroskenování

Většina analytických technik zaznamenávajících luminiscenci materiálu pracuje s budící vlnovou délkou v ultrafialové nebo viditelné oblasti. Pro excitaci UCNPů je potřeba sekvenční absorpce fotonů z infračervené oblasti, proto se běžné techniky nedají použít. Pro snímání malých vzorků, např. sledování buněk a buněčných procesů *in vitro*, se používá skenovací laserová mikroskopie. Pro snímání vzorků *in vivo* a mapování větších vzorků biologických tkání je možné rovněž využít skenovací laserovou mikroskopii s tím, že se rozšíří průměr laserového paprsku. Tato úprava sice sníží excitační hustotu, obvykle je však stále dostačující pro detekci UCNPů [31].

Novější přístup k mapování makroskopických vzorků využívá foton-upkonverzní mikroskenování. To nabízí citlivější analýzu, jelikož se snaží, na rozdíl od skenovacího

mikroskopu, zaměřit laser na co nejmenší plochu. Ve stejný čas je možné detekovat vybrané nanočástice již od počtu dvou tisíc [31]. Foton-upkonverzní mikroskener byl například použit k detekci UCNPs v rostlinách [11, 25]. Typické uspořádání foton-upkonverzního mikroskeneru je znázorněno na Obrázku 8. Skládá se z kontinuálního pevnolátkového laseru o vlnové délce 980 nm, zaměřovací a sběrné optiky, objektivu mikroskopu, dichroického zrcadla, optického vlákna, vedoucího signál do spektrometru, a počítače [11].



Obrázek 8: Schéma foton-upkonverzního mikroskeneru (1) laser a zaměřovací optika, (2) dichroické zrcadlo, (3) objektiv mikroskopu, (4) držák na vzorek se vzorkem, (5) sběrná optika, (6) optické vlákno, (7) spektrometr, (8) počítač, (9) příklad foton-upkonverzního spektra, převzato [11]

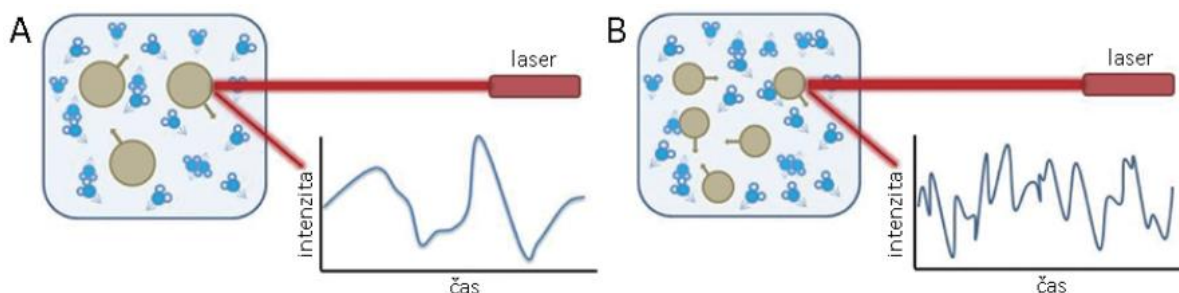
2.3.5 Měření velikosti nanočástic

Pro měření velikosti a tvaru nanočástic se dá využít celá řada metod. Disperze nanočástic se mohou analyzovat v kapalině metodami využívajícími rozptyl záření o vlnové délce srovnatelné s velikostí nanočástic. Jedná se o metody maloúhlého rozptylu neutronů a rentgenového záření. Dalšími možnostmi jsou jednočásticové ICP-OES, frakcionace tokem v poli nebo pak tzv. hydrodynamické metody. Ty se vyznačují přímým měřením hydrodynamických veličin, jakou jsou translační nebo rotační difuzní koeficienty. Mezi hydrodynamické metody patří Ramanova spektroskopie, řada fluorescenčních technik nebo metoda dynamického rozptylu světla (DLS, z anglického Dynamic Light Scattering). Velikost, a dokonce i tvar nanočástic, je také možné určit tak, že se disperze vysuší a nanočástice jsou analyzovány metodami elektronové mikroskopie (SEM, TEM). Tento přístup sice dokáže určit velikost i tvar nanočástic, vysušením ale může dojít ke změnám v systému, takže výsledky nemusí reflektovat realitu chování nanočástic v kapalně fázi [33, 34]. Další možností je využití mikroskopie atomárních sil, při které jsou nanočástice

adsorbovány z disperze, z tenké vrstvy, nebo deponovány ultracentrifugací na měřený povrch [35].

Metoda DLS je neinvazivní, nedestruktivní a cenově dostupná technika, která určuje velikost částic na základě měření jejich Brownova pohybu, což je náhodný pohyb způsobený srážkami s částicemi okolního rozpouštědla. Brownův pohyb je závislý na teplotě a viskozitě rozpouštědla a platí, že čím větší částice, tím pomalejší bude její Brownův pohyb. Měření je nutno provádět za konstantní teploty, aby v kapalině nedocházelo ke vzniku proudů. Pro kvalitní měření velikosti částic metodou DLS je klíčová také příprava vzorku, protože výsledky měření může silně ovlivnit například prach nebo bubliny v kapalině [34, 36, 37].

Brownův pohyb je zaznamenáván pomocí fluktuací intenzity rozptýleného světla okolo průměrné hodnoty. Jako zdroj světla se využívá laser. Při srážce laseru s analyzovanými částicemi dojde k Rayleighovu rozptylu světla. Klíčová je rychlost fluktuace intenzity signálu rozptýleného světla, která se mění s rychlostí pohybu, a tedy i velikostí rozptýlených částic podléhajících Brownovu pohybu. Níže na Obrázku 9 je graficky znázorněný rozdíl pro velké a malé částice [34, 38].



Obrázek 9: Schematické znázornění fluktuace intenzity rozptýleného světla pro (A) větší částice v kapalině, (B) menší částice v kapalině, převzato a upraveno [38]

2.4 Ekotoxikologie

Toxikologie je věda zabývající se účinky škodlivých látek na živé organismy a ekosystémy, mechanismem těchto účinků a množstvím, při nichž se projeví. Jak řekl Paracelsus, který je považovaný za zakladatele tohoto oboru: "Všechny sloučeniny jsou jedy. Neexistuje sloučenina, která by jedem nebyla. Rozdíl mezi lékem a jedem tvoří dávka." [39].

Ekotoxikologie se zabývá studiem vlivu škodlivých látek na životní prostředí. Jako vědní obor je kombinací ekologie a toxikologie a její úlohou je nejen studium toxických vlivů na všech úrovních životního prostředí, ale i využití získaných poznatků pro jeho ochranu. Historicky první použití termínu ekotoxikologie se datuje do roku 1969, kdy ji René Truhaut, definoval jako: "studium nepříznivých účinků chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společenstva" [39].

V přírodních ekosystémech se nachází velké množství rozmanitých živých organismů. Jelikož toxicita látek závisí na četných faktorech, jako je metabolismus organismu, způsob vstupu látky do organismu, opakování dávky apod., přistupuje ekotoxikologie k měření toxicity pomocí přímého testování druhů, přičemž dávkování i způsob měření jsou různé podle druhu sledovaného organismu. Oproti ekologii studuje působení životního prostředí

nepřirozených látek a nadměrných fyzikálních stresorů, jako jsou například záření nebo hluk [39].

Základním pojmem ekotoxikologie je ekotoxicita, což je vlastnost látek, které mají nepříznivý účinek na životní prostředí způsobený bioakumulací nebo toxickým působením na biotické systémy. Ekotoxicita se stanovuje pomocí biotestů, což jsou procesy, při nichž se testovací systém vystavuje různým koncentracím testované látky za přesně stanovených podmínek. Biotesty se vyhodnocují pomocí sledovaných parametrů, tzv. endpointů, což jsou výsledky měření v průběhu nebo na konci biotestu, nebo hodnoty vypočtené z těchto měření. Biotestů existuje široká škála, přičemž jejich výsledky jsou druhově nepřenositelné [39, 40]. Látky se mohou v živých organismech bioakumulovat a transportovat [41, 42].

2.4.1 Testy ekotoxicity na rostlinách

Fytotoxicita, neboli toxicita pro rostliny, je dle americké agentury pro ochranu životního prostředí (EPA, z anglického Environmental Protection Agency) definována jako nežádoucí škodlivá odchylka od normálního vzhledu, vzrůstu a funkcionality v závislosti na vystavení pesticidům nebo jiným toxickým chemikáliím. Toxicita se může projevit v průběhu klíčení, růstu, diferenciaci nebo dospívání rostlin a může být dlouhodobého i krátkodobého rázu. Fytotoxická reakce rostlin se projevuje do takové míry, že je možné spolehlivě určit vztah mezi její příčinou a následkem [40].

Nejrozšířenější typy biotestů na rostlinách jsou test klíčivosti semen a sledování růstu po vyklíčení. Klíčivost bývá obvykle ovlivněna méně, protože toxikanty obecně do semene nepronikají a rostlina pro svůj počáteční růst využívá zásobní látky v semeni. Při sledování ovlivnění růstu po vyklíčení se kořen rostliny uvede do přímého kontaktu s kontaminantem, což je možno provést několika způsoby – hydroponicky nebo uložením na savý podklad (skleněné kuličky, filtrační papír, písek, ...). Testy toxicity rostlin se dají provádět i v zemině nebo půdním extraktu, přičemž výsledky pak mají sice vyšší vypovídací hodnotu, ale tento postup je příliš komplexní pro zavedení standardizovaných testů. Jako endpointy se při testech toxicity na rostlinách vyhodnocují nejčastěji parametry vzrůstu jako je výška a hmotnost vysušené rostliny, popřípadě nějaké její části, počet přeživších organismů nebo počet a velikost plochy listů. Tyto výsledky je třeba statisticky vyhodnotit se spolehlivostí 95 %. Další, méně standardizované, používané testy se soustředí na fyziologické procesy rostlin, jako je fotosyntéza nebo fluorescence chlorofylu. Vizualně se hodnotí i semikvitatativní parametry [39, 40].

Dle EPA jsou pro testování toxicity látek při testech klíčení a elongace kořene vhodné především rostliny: lilek rajče, okurka setá, locika setá, sója luštinatá, brukev zelná, oves setý, žito seté, cibule kuchyňská, mrkev obecná a kukuřice setá. Tento seznam je možné doplnit i o lokálně ekonomicky a ekologicky významné rostliny. Pro komplexní určení toxicity látky je třeba testovat minimálně 10 rostlinných druhů, mezi kterými se vyskytují rostliny z třídy jednoděložných i dvouděložných. Semena rostlin nesmí být ošetřena žádnými fungicidy či repelenty, mají pocházet ze stejné geografické oblasti a být přibližně stejně stará. Před testem je nutno vyřadit viditelně poškozená semena. Klíčení rostlin má, dle doporučení EPA, probíhat za konstantní teploty 25 ± 1 °C v Petriho miskách na inertním materiálu ve tmě. Veškeré laboratorní sklo musí být předem pečlivě očištěno, aby nedošlo ke kontaminaci a zkreslení výsledků. Rostliny musí být do Petriho misek umístěny takovým způsobem, aby

měly dostatek prostoru pro předpokládaný růst. Jsou-li testované kontaminanty rozpustné ve vodě, je vhodné pro jejich rozpuštění použít deionizovanou či destilovanou vodu. Pokud kontaminanty nejsou ve vodě rozpustné, mohou se do vodné suspenze zavést pomocí pro rostliny relativně netoxického nosiče (aceton, arabská guma, polytehylen glykol, ethanol a další). Neexistuje-li pro daný kontaminant žádný netoxický nosič, rozpustí se v jakémkoli vhodném rozpouštědle, které se nechá odpařit v rotační vakuové odparce, čímž se na povrchu substrátu utvoří rovnoměrná vrstva. Před samotným testem toxicity je třeba stanovit koncentraci a pH roztoků [43].

2.4.2 Toxicita kovů vzácných zemin

Mezi kovy vzácných zemin (RRE, z anglického Rare Earth Elements) se řadí skandium, yttrium a všechny lanthanoidy (lanthan, cer, praseodym, neodým, promethium, samarium, europium, gadolinium, terbium, dysprosium, holmium, erbium, thulium, ytterbium a lutecium). Ačkoli se RRE obecně považují za relativně netoxické prvky, mohou způsobovat řadu zdravotních problémů. Například chronické vystavení prachu RRE může vést k pneumonii a akutnímu zánětu. Při nitrožilní aplikaci chloridů RRE byly pozorovány biochemické změny na játrech a slezině, změny ve složení krve a v aktivitě některých enzymů. Výsledky se výrazně liší pro jednotlivé ionty RRE. Ve studii na kryse obecné při aplikaci citrátu ceritého březím či kojícím samicím byl pozorován úbytek průměrného množství mlád'at ve vrhu a jejich nižší hmotnost, nicméně nedocházelo k malformacím. Stejně tak nebyla ovlivněna ani spermatogeneze krysích samců. Tyto kovy se nepovažují za karcinogenní ani mutagení [44, 45].

V případě iontů kovů vzácných zemin vázaných v dielektrické mřížce UCNPs v podstatě nemůže dojít k jejich samovolnému úniku, pokud nedojde k rozpadu UCNPs *in situ* [44].

Fytotoxicita kovů vzácných zemin

Přestože jsou RRE poměrně běžnými prvky v zemské kůře, ve vyšších koncentracích se přirozeně objevují spíše vzácně. V posledních letech vzrůstá jejich těžba kvůli využití v průmyslu a v medicíně. Ekonomické způsoby likvidace jsou však limitované, proto se RRE dají považovat za relativně nový polutant, který může vést ke kontaminaci životního prostředí [46].

Zdrojem RRE v půdě je kromě kontaminace průmyslovým odpadem i hnojení. V Číně se RRE v podobě dusičnanů používají jako hnojiva v průběhu posledních čtyř dekad [47]. Do půdy se během hnojení mohou dostávat i přirozeně jako součást běžných fosforečných hnojiv. Při testech na kukuřici seté (*Zea mays*) a vigně zlaté (*Vigna radiata*) trvajících čtrnáct dní v živném roztoku bylo prokázáno, že pokud jsou RRE pro rostliny prospěšné, děje se tak až při koncentraci pod 0,2 μM . Ve studii byl testován lanthan a cer a oba prvky ve všech testovaných koncentracích vykazovaly toxické účinky [45, 46, 48, 49]. Tento závěr podporuje i studie, ve které byly stejné rostliny exponovány lanthanu opět po dobu čtrnácti dní, ale v nižší koncentraci od 0 do 1,37 μM . Zde bylo prokázáno, že pozitivní vliv na růst kukuřice se projeví při koncentraci 0,63 μM , kdy se délka kořene oproti kontrole zvýší o 36 %, a délka kořene vigny se zvýší při koncentraci 0,19 μM o 21 %. Z výsledků však plyne, že na míru toxicity RRE má vliv i přítomnost a koncentrace dalších iontů, jmenovitě manganu [49, 50].

Příjem RRE je dán podobností jejich atomů s atomy vápníku. Přestože se liší svým nábojem, mají velmi podobný poloměr. Bylo prokázáno, že ze všech RRE se nejvíce

vstřebává cer, který má poloměr nejpodobnější vápníku. Navíc bylo prokázáno, že RRE, konkrétně gadolinium, dokáže blokovat vápníkové kanály a snížit tak celkový příjem vápníku. V přítomnosti fosforečnanů mohou RRE v rostlinách tvořit komplexy. Toxický efekt RRE pro rostliny tak může být zapříčiněn nedostatkem vápníku a fosforečnanů [51]. Ve studii na pšenici (*Triticum aestivum*), při sedmidenní a šestnáctidenní hydroponické expozici lanthanu a ceru v koncentracích 0,5–25 mg/l, bylo dokázáno, že RRE v rostlinách bioakumulují převážně v kořeni a nedochází k translokaci do zbytku organismu [52].

2.4.3 Toxicita foton-upkonverzních nanočástic

Nanočástice se mohou do těl živých organismů dostat dvěma způsoby: záměrně (jako součást léčby, v kosmetice, ...) nebo neúmyslně (důsledkem znečištění životního prostředí). Stanovení toxicity všech typů nanočástic, včetně UCNPs je komplexní problém, ztížený velkým množstvím fyzikálně-chemických proměnných, jako jsou složení, velikost, tvar, povrchový náboj, navázané funkční skupiny a ligandy. Pro jejich chování jsou významné i parametry okolního prostředí, jako je pH, teplota, přítomnost dalších chemikálií nebo elektromagnetického pole. Jednotlivé parametry se navíc navzájem ovlivňují. Kvůli složitosti problematiky nejsou doposud zavedeny standardní operační protokoly pro stanovení toxicity nanočástic [11, 44]. Například stále diskutovaným tématem je i jejich samotná kvantifikace. Stále nevyřešenou otázkou zůstává, zda je určující počet nebo hmotnost nanočástic či velikost jejich povrchu [44].

Toxicita UCNPs se nejčastěji sleduje s odkazem na jejich možné využití v medicíně. Proběhly již studie *in vivo* na myši domácí, kryse obecné, embryích dania pruhovaného a háďátka obecném, stejně jako *in vitro* studie na buněčných kulturách s různými typy UCNPs. Ze studií toxicity injekčně podaných UCNPs obecně vyplývá, že UCNPs se dají považovat za v podstatě stabilní netoxické látky, které velmi rychle vymizí z krevního oběhu a bioakumulují se v játrech a slezině, ve výrazně nižší míře pak v plicích, srdci a ledvinách. Jejich lokalizace je ovlivněna povrchovým nábojem [44]. Jen ve výjimečných případech byl zaznamenán rozpad UCNPs spojený s úbytkem zaznamenané luminescence, toxicita však ani tehdy nebyla pozorována [44, 53]. Při orálním podání UCNPs myši domácí pak nedocházelo k bioakumulaci a velmi rychle došlo k eliminaci UCNPs vylučovací a trávicí soustavou, přičemž nedošlo k žádným histologickým změnám ve sledovaných orgánech [44].

Studie sledující působení UCNPs na háďátka obecné stanovila nulovou toxicitu sledovaných nanočástic ve vybraných koncentracích (0,5; 2 mg UCNPs/l) bez jakéhokoliv negativního vlivu na oogenezi, kvalitu vajíček, vývoj embrya či délku života a vzrůst testovaných jedinců [32, 54]. Výsledky studií toxicity UCNPs na embryích dania pruhovaného se od ostatních uvedených liší, protože poukazují na toxicitu UCNPs. Po injekci UCNPs do vajíčka bylo s rostoucí koncentrací pozorováno několik nežádoucích účinků, jako opožděný embryonální a larvální vývoj, abnormality v délce těla. Bylo však rovněž potvrzeno, že UCNPs jsou odolné vůči působení trávicích enzymů a neprostupují přes střevní buněčnou stěnu [55]. Další studie na daniu pruhovaném potvrdila snížení růstu jedinců vystavených působení vybraných UCNPs a dále i negativní vliv na jejich krevní oběh. I přesto však byly UCNPs desetkrát méně toxické než kvantové tečky [56].

Fytotoxicita foton-upkonverzních nanočástic

S rostoucím využitím foton-upkonverzních nanočástic současně roste i obava o jejich vliv na životní prostředí. Po úniku do přírody UCNPs mohou pronikat do rostlin, ať už skrze kořeny nebo nadzemní část rostliny, odkud se dostanou do potravního řetězce živočichů i lidí, kde se mohou dále bioakumulovat. V těle rostliny může docházet i k transformaci UCNPs, přičemž biologické i abiotické transformace mají vliv na toxicitu a chování nanočástic. Transformace nanočástic za účasti kořenového systému rostliny již byla pozorována u jiných typů nanočástic (např. ZnO, CeO₂, Ni(OH)₂, La₂O₃ [57–59]). I přesto však fytotoxicita foton-upkonverzních nanočástic nebyla prozatím předmětem mnoha studií [30, 60].

Studie na tykvi velkoplodé (*Cucurbita maxima*) [61] se zabývala pouze zobrazováním UCNPs *in vivo*, přičemž bylo zjištěno, že UCNPs se nejvíce nachází v kořeni, dále se dokáží snadno translokovat do stonků rostlin, ale do listů se dostávají již zcela minimálně. Dalším závěrem studie bylo, že rychlost pohybu v rostlině závisí na velikosti částice – menší se pohybují rychleji [62]. Další práce se zabývala zobrazováním UCNPs v huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*) a v orchideji (*Phalaenopsis spec.*). Během šestidenní expozice pronikly UCNPs do kořene, stonku i listů [63].

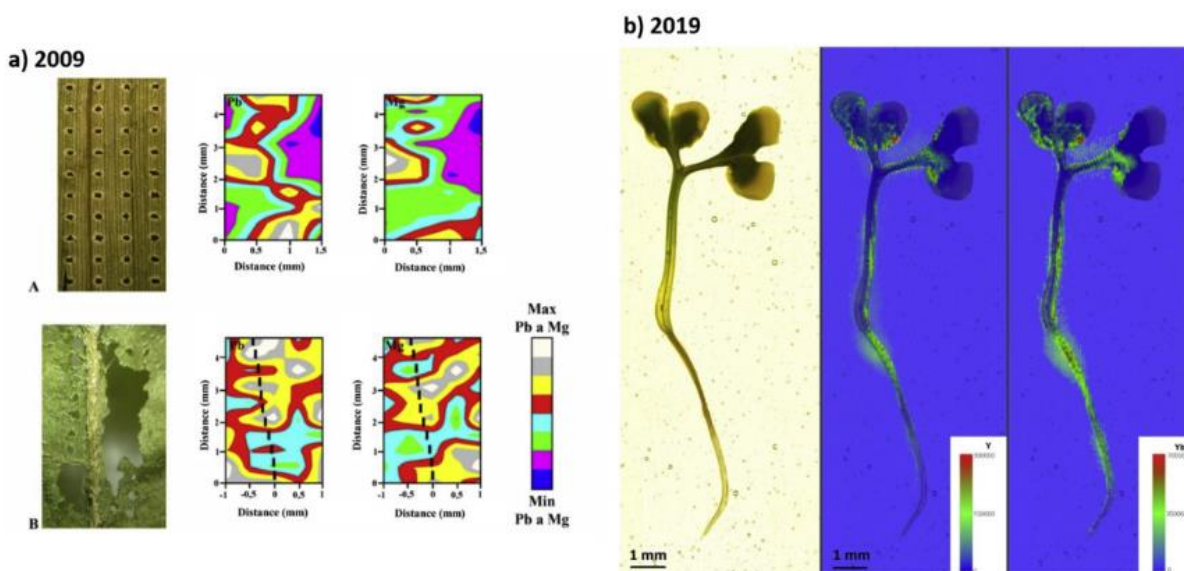
Ve studii z roku 2012 na modelové rostlině vigně zlaté (*Vigna radiata*) byl zkoumán vliv UCNPs na růst rostlin. V hydroponickém uspořádání byly otestovány dvě koncentrace, 10 a 100 mg UCNPs /l, přičemž nižší koncentrace růst podporovala a vyšší naopak inhibovala [64]. K podobným závěrům došel i výzkum na sóji luštinaté. Z pěti otestovaných koncentrací (10, 50, 100, 500 a 1000 mg UCNPs/l) při expozici v hydroponických podmínkách pouze koncentrace 10 mg UCNPs/l podporovala růst rostlin. S prodlužující se dobou expozice (1, 4 a 8 dní) se zvyšovala i tendence UCNPs agregovat a aglomerovat [61].

Toxicita foton-upkonverzních nanočástic byla zatím dvakrát vyhodnocována v kombinaci se sledováním prostorového rozložení metodou LIBS [11, 25]. V první z těchto dvou studií byly působení UCNPs v koncentracích 10, 100 a 1000 mg/l vystaveny rostliny okřehku menšího (*Lemna minor*) a ředkve seté (*Raphanus sativus*). V případě okřehku byla jako toxikologický endpoint vyhodnocována velikost plochy listu. V nejnižší koncentraci nedošlo ke statisticky významnému snížení plochy, ve dvou nejvyšších koncentracích pak ano. Nicméně toxicita UCNPs byla ve všech případech nižší než toxicita iontů v korespondující koncentraci. V případě ředkve seté, kdy byly jako toxikologické endpointy vyhodnocovány délka kořene a hypokotylu, byl trend stejný. Jediný detekovaný rozdíl byl, že pro délku hypokotylu byla toxická i nejnižší testovaná koncentrace. V případě ředkve pronikaly UCNPs skrze celou rostlinu, avšak místa bioakumulace se lišila dle testované koncentrace. V nejnižší testované koncentraci (10 mg/l) se UCNPs bioakumulovaly především v kořeni, přičemž pro obě dvě vyšší koncentrace (100 a 1000 mg/l) byla preferována translokace UCNPs do listů [25]. Studie na brukvi zelné vykazuje mírně odlišný trend. V tomto případě UCNPs v koncentracích 50 a 500 mg/l nejsou vůbec toxické pro žádný zvolený endpoint (délka, kořene, stonku, celé rostliny), ale do nadzemní části pronikají v mnohem menší míře. Preferovaným místem bioakumulace pro obě koncentrace byl jednoznačně kořen [11]. V obou výše zmíněných studiích byly UCNPs stabilní a v průběhu expozic a jejich přímého kontaktu s rostlinou nedocházelo ke změně jejich velikosti, k nežádoucí agregaci či aglomeraci [11, 23].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Studium rostlin metodou LIBS

Prostorová analýza rostlin metodou LIBS sahá až do roku 2006. První experimenty se zabývaly studiem rozložení biogenních prvků a nutrientů, případně běžných kontaminantů typu olova nebo kadmia. V současné době se výzkum soustředí především na stanovení prostorové distribuce nanočástic. V prvopočátcích rostlinného výzkumu metodou LIBS se mapovaly pouze malé části rostlin a vytvářely se mapy skládající se z několika desítek spekter. V současnosti jsou standardem mapy s několika desítkami tisíc spekter, přičemž největší dosud publikované mapy jsou složeny až z 66 000 datových bodů [8, 11]. Výrazný pokrok je graficky znázorněn na Obrázku 10. Výzkum mapování rostlin metodou LIBS byl v roce 2020 sumarizován v přehledovém článku od Modlitbové a kol. [8]. Níže uvedené studie obvykle kromě techniky LIBS také zahrnovaly analýzu rostlin další (referenční či komplementární) analytickou metodou, jejich seznam je uvedený v přehledové Tabulce 1. Tato tabulka dále obsahuje detaily všech publikovaných studií, kde byla metoda LIBS použita pro prostorové mapování rostlin či jejich částí.



Obrázek 10: Pokrok prvkového mapování rostlin metodou LIBS, a) mapy prostorového prvkového rozložení olova a hořčíku v rostlinách (A: kukuřice setá, B: slunečnice roční), b) mapy prvkového rozložení yttria a ytterbia v ředkvi seté, převzato a upraveno [1]

Tabulka 1: Přehled publikovaných prací zabývajících se prostorovou analýzou rostlin metodou LIBS společně s vybranými parametry měření: druh rostliny, analyzovaná část, sledované prvky, příprava rostlin před měřením, parametry LIBS map – prostorové rozlišení (μm) a počet bodů (pixelů) v mapě, použitá referenční metoda a příslušná citace.

rostlina		2D LIBS mapa		sledované prvky	příprava vzorků	referenční/komplementární metoda	citace
druh	část	rozlišení [μm]	počet bodů				
slunečnice roční	Listy	100	–	Pb, Cd	sušení	rentgenová radiografie	[66]
slunečnice roční	Část listů	500	80	Pb	lisování, sušení	–	[67]
slunečnice roční	Část listů	500	77	Ag, Cu	lisování, zmrazení	LA-ICP-MS	[65]
slunečnice roční, locika setá	Část listů	500	50	Pb, Mg	sušení	LA-ICP-MS	[68]
slunečnice roční	Část listů	200	400	Pb, Mg, Cu	sušení	LA-ICP-MS	[69]
paprika setá	Část listů	500	504	Pb, K, Mn	lisování, sušení, zmrazení	LA-ICP-MS	[70]
smrk ztepilý	Jehličí	150	514	Cu, Ca	řezy	ICP-MS, fluorescenční mikroskopie	[71]
třtinovec cukrový	Část listů	750	100	P, Ca, Mg, Fe, Mn, Si	sušení	EDXRF	[72]
kukuřice setá	Část listů	200	400	Cl, P, Mg, K	<i>in situ</i>	–	[16]
bob obecný	Kořen	50	4 773	Cu, Ag	řezy	ICP-OES	[17]
okřehek menší	Listy	200	375	Cd	lisování, sušení, epoxid	ICP-OES, TEM	[73]
<i>podocarpus macrophyllus</i>	Listy	256	12 000	Li, Ca	čerstvé	–	[74]
rýže setá	Listy	-	540	Cr	sušení	ICP-MS	[75]
locika setá, pažitka pobřežní	Část listů, stonek	300	25	P, Cl, Cd	sušení, lepicí páska	–	[76]
ředkev setá, okřehek menší	Celá rostlina	100	35 073	Y, Yb	lisování, sušení, epoxid	ICP-OES, foton-upkonverzní mikroskenování	[25]
proso prutnaté	Kořen	100	1681	Al, Ba, C, Ca, Cu, Fe, H, K, Mg, Mn, Na, O, P, Si, Sr, Ti, Zn	zmrazení	–	[77]
hořčice bílá	Celá rostlina	100 25	66 000 40 000	Cd	lisování, sušení, epoxid	ICP-OES	[78]
brukev zelná	Celá rostlina	100	40 584	Y, Yb, Tm	lisování, sušení, epoxid	foton-upkonverzní mikroskenování	[11]

Makronutrienty, mikronutrienty a běžné kontaminanty

První výzkum využívající metodu LIBS pro prvkové mapování rostlin představil v roce 2006 Kaiser a kol. Studie byla zaměřena na bioakumulaci iontů olova a kadmia rostlinami slunečnice roční (*Helianthus annuus*), která je známým hyperakumulátorem obou prvků. Rostliny slunečnice byly pěstovány v hydroponické kultuře po dobu 3, 5 a 10 dní, přičemž byly exponovány octanu olovnatému a chloridu kademnatého v různých koncentracích: 0,1; 2; 5 a 10 mM kadmia/olova. Před LIBS analýzou byly rostliny vysušeny. Pro LIBS měření byl použit titan-safírový laser s vlnovou délkou 795 nm. Energie laserového pulzu byla 100 mJ a prostorové rozlišení 100 μm . Přestože se jednalo o prostorově rozlišenou analýzu, samotný článek neobsahuje zkonstruované prvkové mapy, ani informaci o jejich velikosti [66].

Několik následujících studií se i nadále věnovalo rostlinám slunečnice. Galiová a kol. se v roce 2007 v navazující práci věnovala opět prostorové detekci olova. Expozice slunečnice roční probíhala hydroponicky po dobu 10 dní, ionty olova byly přidány v podobě octanu olovnatého v koncentracích 5 a 10 mM olova. Vysušené rostliny byly při analýze upevněny na manipulátor lepicí páskou. Z měření byly sestaveny prvkové mapy [67]. Další studie od Galiové a kol. v roce 2008 zabývala rozložením iontů mědi a stříbra v rostlinách slunečnice roční. Měď je rostlinný mikronutrient, který hraje roli při fotosyntéze, dýchání nebo metabolismu buněčných stěn. Stříbro bylo rostlinám dodáno hydroponicky v podobě dusičnanu stříbrného v koncentraci stříbra 1 mM po dobu pěti dní. Čerstvé rostliny byly zamrazeny a LIBS analýza probíhala na zmražených vzorcích listů slunečnice. Výsledná mapa prokázala přítomnost stříbra především v rostlinných cévách, kdežto biogenní měď byla rozložena homogenně [65]. Na tuto práci navázala Galiová a kol. v roce 2009 s další detekcí olova ve slunečnici roční, kde se soustředila především na změny v obsahu chlorofylu *a* a *b*. Hydroponická expozice probíhala opět 5 dní, olovo bylo dodáno v podobě komplexu olova s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (Pb-EDTA), koncentrace olova byla 100, 250 a 500 μM . Metodou LIBS byly kromě olova současně detekovány i biogenní prvky hořčik a měď [69].

Studie z roku 2009 od Kryštofové a kol. byla zaměřena na sledování morfologických změn, změny obsahu proteinů a enzymatické aktivity rostlin kukuřice seté (*Zea mays*), lociky seté (*Lactuca sativa*) a slunečnice roční způsobených expozicemi iontům olova. Hydroponická expozice iontům olova v podobě Pb-EDTA v koncentracích 10, 50, 100 a 500 μM probíhala po dobu 8 dní. Měření metodou LIBS na vysušených listech se zaměřila na detekci olova a hořčiku [68]. Doposud poslední studie zaměřující se na detekci olova metodou LIBS proběhla v roce 2011 na rostlinách papriky roční (*Capsicum annuum*). Ionty olova byly hydroponicky dodány v koncentracích 0,5; 1; 2; a 10 mM v podobě dusičnanu olovnatého. Po sedmidenní expozici byly některé rostliny vysušeny a jiné zmrazeny, při LIBS analýze byl zaznamenán lepší signál z vysušených vzorků. Detekováno bylo olovo jakožto kontaminant, makronutrient draslík a mikronutrient mangan. Metodou LIBS byly prokázány změny v bioakumulaci draslíku v kontrolních rostlinách a rostlinách exponovaných iontům olova [70].

Výše uvedené studie, které proběhly mezi lety 2007 až 2011, byly obvykle doplněny o mapy prostorového rozložení vybraných prvků získané další technikou, metodou LA-ICP-

MS. Pro LIBS analýzu využívaly Nd:YAG laser o vlnové délce 532 nm, energii laserového paprsku volily 10 mJ. Byl kladen důraz na informaci o rozložení kontaminantů (olova, kadmia a stříbra) vůči ostatním prvkům (např. makronutrientům draslíku a hořčíku nebo mikronutrientům mědi a manganu). Kvůli technickým omezením měřicí aparatury v tomto časovém rozmezí (např. dosažitelná opakovací frekvence měření) nebylo možné mapovat celé rostliny, měření proto probíhala jen na částech listů s poměrně malým prostorovým rozlišením 500 μm . Velikost prvkových map se pohybovala mezi 50 [68] a 504 [70] body. Prováděná příprava vzorků nebyla dobře optimalizovaná. I přesto jsou to právě tyto práce, které položily základ využití metody LIBS jako užitečného nástroje vyhodnocení fyto toxicity [1].

Následující studie pochází z roku 2013 od Krajcarové a kol., která se dosavadním studiím vymyká v provedení expozice. Kontaminantu CuCl_2 v koncentracích 1, 5, 10 a 50 mM bylo po dobu jednoho dne vystaveno pouze jehličí smrku ztepilého (*Picea abies*), a ne celé rostliny. Do roztoku byla vždy ponořena jedna třetina celkové délky jehlice a sledovala se difuze kontaminantu jehličím. Řezy exponovaného jehličí byly analyzovány metodou DP LIBS, což je poprvé, kdy se dvoupulzní uspořádání využilo pro mapování rostlin. Toto uspořádání bylo použito v postablačním režimu s lasery typu Nd:YAG o vlnových délkách 266 nm (první laserový pulz o energii 10 mJ) a 1064 nm (druhý laserový pulz o energii 100 mJ). Prostorové rozlišení se podařilo snížit na 150 μm a bylo sledováno rozložení mědi a vápníku [71].

Detekcí biogenních prvků se ve své práci zabýval Guerra a kol., který analyzoval listy třtinovce cukrového (*Saccharum officinarum*) nasbírané na poli ve městě Piracicaba v Brazílii. Rostliny byly před analýzou vysušeny při 60 °C. Metodou LIBS pak byly detekovány biogenní prvky fosfor, vápník, mangan, železo a bor, z neesenciálních prvků pak křemík. S Nd:YAG laserem o vlnové délce 1064 nm a energií laserového pulzu 50 J/cm² bylo dosaženo prostorového rozlišení 750 μm . Jedná se o studii, která je významná zemědělsky, ale nenesení toxikologický význam [72]. Zemědělskému výzkumu se věnuje i studie od Zhao a kol. z roku 2016, kdy byly metodou LIBS analyzovány rostliny kukuřice seté přímo *in situ* a *in vivo*. Vzorky listů byly narovnány a lepicí páskou uchyceny na pevnou podložku a měření proběhlo pomocí přenosného LIBS zařízení vybaveného Nd:YAG laserem o vlnové délce 1064 nm. Detekovány byly biogenní prvky fosfor, chlor, hořčík a draslík. Pomocí fosforu a chloru se sledovalo rozložení insekticidu chlorpyrifos, které bylo naneseno přímo na listy. Rostlina byla postupně ablatována laserovými pulzy o energii 90 mJ v několika vrstvách, což umožnilo tvorbu 3D modelu a pozorování difuze insekticidu do listu. Prostorové rozlišení prvkových map bylo 200 μm . Do současnosti se jedná o jediné využití metody LIBS pro *in situ* analýzu rostlin [16]. V roce 2019 Singh a kol. analyzovali listy *Podocarpus macrophyllus*. Expozice iontů, lithia byla provedena stejným způsobem jako ve výše uvedeném případě smrkových jehlic. Listy byly ponořeny do roztoku LiCl o koncentraci 1000 mg/l po dobu 8, 16, 24 a 48 hodin a byla pozorována difuze lithia skrz list rostliny v závislosti na čase. Analýza metodou LIBS byla provedena Nd:YAG laserem (vlnová délka 266 nm) s energií laserového pulzu 15 mJ. Prostorové rozlišení bylo odlišné v osách *x* a *y*, 256 a 600 μm . Měření distribuce lithia ukázalo, že jeho difuze probíhá rostlinnými cévami [74]. Studie od autorů Peng a kol. sledovala prostorové rozložení chromu z $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ v listech rýže seté (*Oryza sativa*). Ionty chromu byly rostlinám podávány hydroponicky po dobu

dvanácti týdnů v koncentracích 25, 50, 75 a 100 μM . Po ukončení expozice byly vzorky 3 hodiny sušeny a listy byly poté analyzovány metodou LIBS v dvoupulzním uspořádání s postablačním ohřevem plazmatu. Oba lasery byly typu Nd:YAG, přičemž první měl vlnovou délku 532 nm (laserový pulz o energii 60 mJ) a druhý 1064 nm (laserový pulz o energii 60 mJ) [75].

Zhao a kol. roku 2019 využili metodu nanočásticemi zesílený LIBS (NELIBS, z anglického Nanoparticle Enhanced LIBS) k detekci insekticidu chlorpyrifos na listech pažitky pobřežní (*Allium schoenoprasum*). Na vysušené listy pažitky byla nakapána disperze stříbrných nanočástic, jejichž přítomnost zvyšuje signál sledovaných prvků chlóru a fosforu, jejich limity detekce se zlepšily až o dva řády. Funkčnost metody NELIBS se ve stejné práci potvrdila znovu, když bylo s lepším signálem detekováno kadmium v locice seté. K měření byl využit Nd:YAG laser (vlnová délka 1064 nm), energie laserového pulzu byla 160 mJ a prostorové rozlišení 300 μm . Metodu NELIBS nelze využít *in situ*, protože by mohlo dojít ke kontaminaci rostlin nanočásticemi [76]. Ilhardt a kol. v roce 2019 použili metodu LIBS k mapování kořene prosa prutnatého (*Panicum virgatum*). Expozice probíhala přímo v půdě podobu devíti týdnů. Metodou LIBS byla sledována komplexní distribuce nutrientů v rostlině, jejich seznam je uveden v Tabulce 1. Dosažené prostorové rozlišení bylo 100 μm při energii laserového pulzu 20–25 mJ s Nd:YAG laserem o vlnové délce 266 nm [77].

Nanočástice

První detekci nanočástic v rostlinách metodou LIBS provedla Krajcarová a kol. roku 2017. Studie se zabývala rozdíly v bioakumulaci stříbrných iontů (AgNO_3) a stříbrných nanočástic v bobu obecném (*Vicia faba*). Po dvou dnech klíčení byly semenáčky bobu obecného přesunuty do hydroponické kultury s koncentrací stříbra 10 μM . Po sedmidenní expozici byl experiment ukončen, k další analýze byly použity pouze kořeny rostlin. Pro LIBS měření byly otestovány dva způsoby přípravy řezů kořene – kryorezy a uchycení v parafínu. Byla testována i různá tloušťka řezů: 15, 20, 40, 80 a 100 μm . Analýza proběhla v ortogonálním dvoupulzním uspořádání s postablačním ohřevem plazmatu. Lasery typu Nd:YAG s vlnovými délkami 266 a 1064 nm a energie laserových pulzů byla 5 mJ a 100 mJ. Dosažené prostorové rozlišení bylo 50 μm . Optimální tloušťka řezu pro měření byla stanovena na 40 μm . Rozložení stříbra v kořenech rostlin se výrazně lišilo v závislosti na zdroji – ionty stříbra byly homogenně rozloženy skrze celý řez, stříbrné nanočástice byly zaznamenány pouze ve vnější vrstvě v okolí krycího pletiva. Tento výsledek naznačuje velmi nízký příjem nanočástic rostlinou [17].

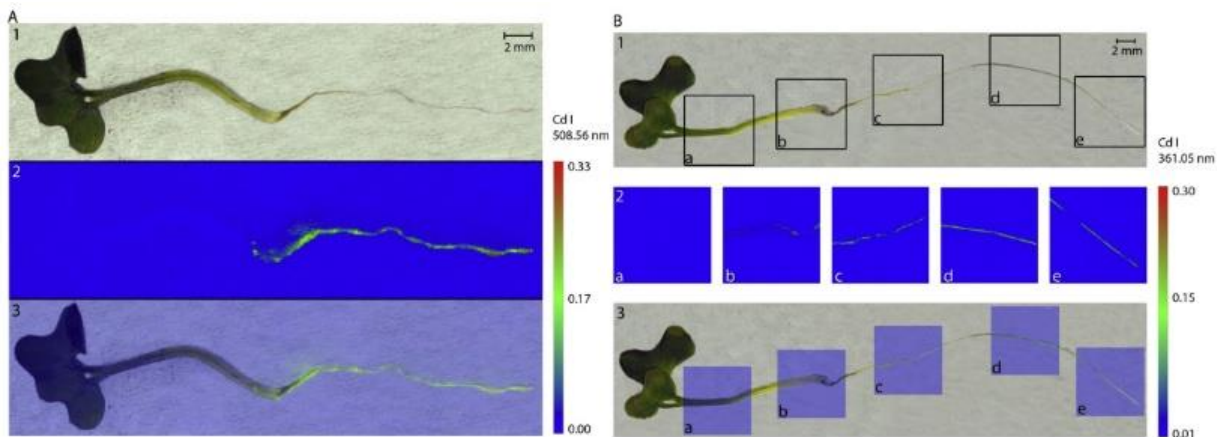
Další studie zabývající se detekcí nanočástic v rostlinách metodou LIBS je od Modlitbové a kol. z roku 2018. V této práci je porovnáno prostorové rozložení kadmia v závislosti na zdroji na vodní rostlině okřehku menším (*Lemna minor*). Jako kontaminant byly použity dva různé typy kvantových teček – CdTe s glutathioninem a CdTe s 3-merkaptopropionovou kyselinou. Jako pozitivní kontrola a zdroj iontů kadmia byl použit chlorid kademnatý. Koncentrace kadmia byly 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 a 15 mg/l. Expozice trvala sedm dní. Po umytí, vysušení a vylisování byly listy okřehku epoxidovou pryskyřicí připevněny na podložní sklíčko a analyzovány metodou LIBS v postablačním ortogonálním dvoupulzním uspořádání. První laser Nd:YAG (266 nm) měl energii laserového pulzu 10 mJ, druhý o vlnové délce 1064 nm měl 100 mJ. Prvkové mapy kadmia byly sestaveny

s prostorovým rozlišením 200 μm . Jelikož byly kvantové tečky ve vodě a v kontaktu s rostlinami nestabilní, výsledky neprokázaly žádný rozdíl v rozložení kadmia mezi nanočásticemi a pozitivní kontrolou. Kromě rozložení byla vyhodnocována i toxicita všech zdrojů kadmia, přičemž jako dva toxikologické endpointy byly zvoleny inhibice růstu a hmotnost. Bylo prokázáno, že kademnaté ionty jsou výrazně více toxické než oba druhy testovaných kvantových teček [73].

Další studie od Modlitbové a kol. z roku 2019 proběhla na dvou rostlinách, na ředkvi seté (*Raphanus sativus*) a na sladkovodní vodní rostlině okřehek menším (*Lemna minor*). Testovány byly foton-upkonverzní nanočástice $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Er}^{3+}@\text{SiO}_2\text{-COOH}$ a ionty yttria a ytterbia (chlorid yttritý a ytterbitý – pozitivní kontrola) ve třech koncentracích - 10, 100 a 1000 mg UCNPs/l. Expozice probíhala v hydroponických podmínkách po dobu tří (okřehek) a sedmi (ředkev) dní. Po ukončení expozice byly rostliny umyty, vysušeny a vylisovány. Jako toxikologické endpointy byly pro ředkev zvoleny délka kořene stonku a pro okřehek velikost plochy listu. Před LIBS analýzou byly vysušené rostliny upevněny epoxidovou pryskyřicí na podložní mikroskopické sklíčko. Měření byly celé rostliny a sledované prvky byly yttrium a ytterbium. Obě rostliny byly analyzovány Nd:YAG laserem o vlnové délce 532 nm, použitá energie laserového pulzu se však lišila. Pro okřehek menší byla energie laserového pulzu 10 mJ, pro ředkev setou 20 mJ. Rozdílné energie byly zvoleny v důsledku různé tloušťky a pevnosti obou druhů rostlin. Prostorové rozlišení prvkových map bylo 100 μm . Kromě metody LIBS bylo prostorové rozložení UCNPs potvrzeno i metodou foton-upkonverzního mikroskenování, která dokáže potvrdit přítomnost prvků v podobě nanočástice. V této studii se UCNPs projeví jako stabilní a málo toxické. Toxicitu vykazovaly UCNPs ve dvou nejvyšších koncentracích (100 a 1000 mg UCNPs/l). Yttrium a ytterbium bylo více toxické ve formě iontů než ve formě nanočástic, navíc UCNPs prostupovaly skrze celou rostlinu až do listů, jejich bioakumulace byla však výrazně nižší než u pozitivní kontroly. V této práci byla navíc prokázána schopnost UCNPs adsorbovat se na povrchu rostlin [25].

Na svou práci navázali Modlitbová a kol. i v roce 2020. V publikované studii byla tentokrát vyhodnocována toxicita, bioakumulace a translokace kadmia z různých zdrojů v rostlině hořčice bílé (*Sinapis alba*). Expozice probíhala tři dny v hydroponických podmínkách. Zdroje kadmia představovaly dva druhy kvantových teček (QDs, z anglického Quantum Dots) – bez a s povrchovou vrstvou oxidu křemičitého (CdTe QDs, respektive CdTe/SiO₂ QDs). Jako zdroj iontů kadmia a pozitivní kontrola sloužil chlorid kademnatý. Koncentrace kadmia byly 20 a 200 μM pro všechny typy expozice. Usušené a vylisované rostliny upevněné v epoxidové pryskyřici byly měřeny metodami LIBS, (A) LIBS analýza celé rostliny s prostorovým rozlišením 100 μm (laser Nd:YAG o vlnové délce 532 nm s energií laserových pulzů 20 mJ) a (B) μLIBS mapování s prostorovým rozlišením 25 μm (laser Nd:YAG o vlnové délce 266 nm s energií laserových pulzů 3 mJ) (Obrázek 11). Pomocí μLIBS byly analyzovány pouze nejdůležitější části rostliny, jako přechod kořene a stonku nebo kořenová čepička, a to z důvodu velké časové náročnosti analýzy. Bioakumulace kadmia byla závislá na koncentraci expozičního roztoku/disperze a v rostlinách klesala v pořadí $\text{CdCl}_2 > \text{CdTe QDs} > \text{CdTe/SiO}_2 \text{ QDs}$. Prostorové rozložení kadmia bylo identické pro pozitivní kontrolu a CdTe QDs, protože z jejich jádra mohou unikat ionty kadmia. Kadmium ze všech zdrojů se akumulovalo

převážně v kořeni. Toxicita QDs byla vyhodnocena pomocí toxikologických endpointů délky kořene a fluorescence chlorofylu. Nejvyšší toxicitu vykazovaly CdTe/SiO₂ QDs [78].



Obrázek 11: Rozložení kadmia v rostlině hořčice bílé exponované CdTe v koncentraci 200 μM kadmia, detekované A) metodou LIBS, B) metodou μLIBS , přičemž 1) fotografie rostliny, 2) LIBS (prostorové rozlišení 100 μm)/ μLIBS (prostorové rozlišení 25 μm) mapy rozložení kadmia, 3) přeložená fotografie rostliny a prvkové mapy, převzato z [78]

Nejnovější studie zabývající se detekcí nanočástic metodou LIBS je z roku 2021 rovněž od Modlitbové a kol. a je zaměřena na detekci UCNPs v brukvi zelné (*Brassica oleracea*). Rostliny byly hydroponicky exponovány nanočásticím NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺@SiO₂-COOH a iontům yttria a ytterbia v podobě směsi chloridu yttritového a ytterbitového (pozitivní kontrola) v koncentraci 50 a 500 mg UCNPs/l po dobu tří dnů. Metodou LIBS byly detekovány kovy vzácných zemin: yttrium, ytterbium a thulium s prostorovým rozlišením 100 μm . Měření proběhlo s Nd:YAG laserem o vlnové délce 532 nm a s energií laserového pulzu 20 mJ. Jako referenční metoda k metodě LIBS bylo použito foton-upkonverzní mikroskenování, které potvrdilo přítomnost UCNPs. Toxicita byla vyhodnocována porovnáním délky kořene, stonku a celé rostliny. Potvrdila se stabilita UCNPs v krátkodobé expozici při kontaktu s rostlinou. Sledované prvky byly více toxické v iontové podobě, UCNPs pro brukev zelnou neprokázaly toxicitu ve sledovaných koncentracích. Ačkoli UCNPs v omezené míře pronikaly až do listů, bioakumulace UCNPs probíhala především v kořeni [11].

V posledních letech se pro analýzu rostlin metodou LIBS používají téměř výhradně lasery typu Nd:YAG v různých harmonických frekvencích. Celkově je snaha především o zlepšení prostorového rozlišení a citlivosti. V dnešní době je velmi běžné mapování listů nebo celých menších rostlin s prostorovým rozlišením 100 μm . Ačkoli oba parametry zaznamenaly za poslední roky velký posun (například nejlepší doposud dosažené publikované prostorové rozlišení rostlinných vzorků metodou LIBS je 25 μm pro části rostlin), v porovnání s dalšími analytickými metodami je LIBS stále v nevýhodě. V úsilí o zlepšení těchto parametrů se využívají různá uspořádání měřicích sestav (DP LIBS, μLIBS), nebo speciální příprava vzorků (NELIBS). Metoda LIBS může, díky své rychlosti, posloužit jako způsob rychlé předběžné analýzy, přičemž je dostačující pro sledování trendů distribuce prvků v rostlině, ale není vhodná na analýzu dějů na buněčné úrovni.

3.2 Další analytické metody prostorově rozlišené analýzy rostlin

Z dalších analytických metod využívaných pro prostorovou analýzu rostlin je pravděpodobně nejčastěji využívaná metoda LA-ICP-MS. Oblíbenosti při analýze biologických vzorků dosáhla především díky vysoké citlivosti (až v řádu ng/g) a širokému rozsahu prostorového rozlišení 0,3–500 μm [1]. Konkrétní příklady využití LA-ICP-MS pro analýzu rostlin jsou sledování prostorového rozložení selenu a síry v rostlinách slunečnice roční s prostorovým rozlišením 22,05 μm [79], nebo k analýze distribuce železa v sóji luštinaté (*Glycine max*) s prostorovým rozlišením 16,2 μm [80]. Metoda LA-ICP-OES byla pro analýzu použita zatím pouze jednou, pro sledování distribuce vápníku, sodíku a draslíku v rostlinách tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) s prostorovým rozlišením 15 μm [20].

Z ostatních metod bylo například metodou PIXE analyzováno prostorové rozložení niklu, kobaltu, arsenu, manganu, zinku a kadmia v rostlině *Berkheya coddii* [81]. Metodou XRF byl s krokem 2 μm detekován nikl v rostlině *Rinorea javanica* [21] a metodou SIMS byl v rýži seté sledován arsen, železo, zinek a mangan s prostorovým rozlišením na subcelulární úrovni [82].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- chlorid erbitý hexahydrát (CAS 10025-75-9)
chlorid yttritý hexahydrát (CAS 10035-01-5)
chlorid thulitý hexahydrát (CAS 1331-74-4)
oxid gadolinitý (CAS 12064-62-9)
kyselina chlorovodíková (CAS 7647-01-0)
 - Sigma Aldrich, St. Louise, Spojené státy americké
- $\text{NaY}_{0,6}\text{Yb}_{0,2}\text{Er}_{0,2}\text{F}_4@ \text{SiO}_2\text{-COOH}$ (hydrodynamický průměr 58,2 nm)
 $\text{NaY}_{0,6}\text{Yb}_{0,2}\text{Er}_{0,2}\text{F}_4@ \text{SiO}_2\text{-COOH}$, (hydrodynamický průměr 28,8 nm)
 $\text{NaY}_{0,6}\text{Yb}_{0,2}\text{Gd}_{0,18}\text{Tm}_{0,02}\text{F}_4@ \text{SiO}_2\text{-COOH}$, (hydrodynamický průměr 25,9 nm)
 - Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Brno, Česká republika, syntézu a charakterizaci provedl Mgr. Antonín Hlaváček, Ph.D.
- Milli-Q voda (Purite Neptune, Suez, Paříž, Francie), epoxidová pryskyřice (Bison, Goes, Nizozemí), Parafilm (Merck, St. Louis, USA), semena kukuřice seté (Sema, Smržice, Česká republika)

4.2 Použité přístroje a software

4.2.1 Přístroje

- LIBS Discovery systém (CEITEC, Brno, Česká republika)
 - ablační komora s pohyblivým stolcem (CEITEC, Brno, Česká republika)
 - sběrná optika F2 (SOL instruments, Minsk, Bělorusko)
 - optické vlákno (ThorLabs, Newton, USA)
 - spektrometr Shamrock (typ Czerny-Turner, LOT Oriel, Darmstadt, Německo)
 - laser CFR 400, Nd:YAG 532 nm, doba laserového pulzu 10 ns, průměr paprsků 7 mm (Quantel, Lannion, Francie)
 - ICCD detektor iStar 734 (Andor, Belfast, Spojené království)
- FireFly systém (Lightigo, Brno, Česká republika)
 - ablační klec s pohyblivým stolcem (CEITEC, Brno, Česká republika)
 - optické vlákno (ThorLabs, Newton, USA)
 - laser Sta-01, Nd:YAG 1064 nm, doba laserového pulzu 0,9 ns, průměr laserového svazku 0,2 mm (Standa, Vilnius, Litva)
 - spektrometr AvaSpec s CCD detektorem (typu Echelle, Starline, Avantes, Apeldoorn, Nizozemí)
- Foton-upkonverzní mikroskenner (Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Brno, Česká republika)
 - laserová dioda, 976 nm, 1 W (Laserland, Oakville, Kanada)
 - dichroické zrcadlo (Thorlabs, Newton, USA)
 - objektiv mikroskopu (Olympus, Šindžuku, Japonsko)
 - laserový skener PharosFX (Bio-Rad, Hercules, USA)

- optické vlákno (ThorLab, Newton, USA)
- CCD spektrometr QE65000 (Ocen Optics, Duiven, Nizozemí)
- pH metr Lab 870 (Schott Instruments, Mainz, Německo)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, Velká Británie)
- ICP-OES spektrometr iCAP 6500 Duo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- optický mikroskop (Pomeas, Kuang-Tung, Čína)

4.2.2 Software

- LIBSNavigator (CEITEC, Brno, Česká republika)
- Andor Solis (Andor, Belfast, Spojené království)
- Spectra Controller (Lightigo, Brno, Česká republika)
- Pylon Viewer (Basler, Ahrensburg, Německo)
- LIBSAnalyzer (CEITEC, Brno, Česká republika)
- ImageJ Fiji (National Institute of Health, Bethesda, USA)
- Photoshop CC (Adobe, San Jose, USA)
- Origin 2019 (OriginLab, Northampton, USA)
- Lightigo ImageLab (Lightigo, Brno, Česká republika)

4.3 Test toxicity

4.3.1 Testované látky

Kukuřice setá (*Zea mays* L.) byla vystavena působení disperzí několika druhů UCNPů ve třech různých koncentracích. Množství nanočástic bylo korigováno pomocí obsahu yttria tak, aby výsledné disperze byly v koncentracích 0,5; 5 a 25 mg Y/l. Jako pozitivní kontrola byly použity chloridy příslušných RRE (YCl_3 , $YbCl_3$, $ErCl_3$, $GdCl_3$ a $TmCl_3$) v korespondujících koncentracích.

V Tabulce 2 jsou podrobně rozepsané jednotlivé typy expozic. Kukuřice byla exponována jak každému jednotlivému typu UCNPů zvlášť, tak jejich kombinacím. Pro lepší orientaci v následujícím textu bylo ke každému druhu UCNPů přiřazeno schematické označení, v němž číslice značí hydrodynamický průměr nanočástice před expozicí. Koexpozice, tedy expozice rostliny dvěma druhům UCNPů ve stejný čas, jsou označeny dvěma číslicemi a znaménkem plus.

Tabulka 2: Podrobný rozpis druhů disperzí/roztoků expozice kukuřice

expozice	druh nanočástic/iontů	velikost částic [nm]	označení v textu práce
UCNPs: samostatná expozice	$\text{NaY}_{0,6}\text{Yb}_{0,2}\text{Gd}_{0,18}\text{Tm}_{0,02}\text{F}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$	25,9	UCNPs-26
	$\text{NaY}_{0,6}\text{Yb}_{0,2}\text{Er}_{0,2}\text{F}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$	28,8	UCNPs-29
	$\text{NaY}_{0,6}\text{Yb}_{0,2}\text{Er}_{0,2}\text{F}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$	58,2	UCNPs-58
UCNPs: koexpozice	$\text{NaY}_{0,6}\text{Yb}_{0,2}\text{Gd}_{0,18}\text{Tm}_{0,02}\text{F}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$ $\text{NaY}_{0,6}\text{Yb}_{0,2}\text{Er}_{0,2}\text{F}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$	25,9; 28,8	UCNPs-26+29
	$\text{NaY}_{0,6}\text{Yb}_{0,2}\text{Gd}_{0,18}\text{Tm}_{0,02}\text{F}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$ $\text{NaY}_{0,6}\text{Yb}_{0,2}\text{Er}_{0,2}\text{F}_4@\text{SiO}_2\text{-COOH}$	25,9; 58,2	UCNPs-26+58
pozitivní kontrola	ionty Y^{3+} , Yb^{3+} , Er^{3+} , Gd^{3+} , Tm^{3+}	–	směs chloridů
kontrola	Milli-Q voda	–	voda

Provedeny byly dvě koexpozice. V první z nich byl studován vliv složení UCNPs na jejich příjem a následnou biodistribuci v rostlině. Pro tuto koexpozici byly zvoleny UCNPs-26 a UCNPs-29, které mají velmi podobnou velikost. Složení mřížky je totožné, ale liší se druhem obsažených dopantů. Právě různé prvkové složení umožňuje monitorovat přítomnost různých typů nanočástic metodami foton-upkonverzního mikroskenování a LIBS.

Ve druhé koexpozici byl studován vliv velikosti UCNPs na jejich biodistribuci. Experiment probíhal s kombinací UCNPs-26 a UCNPs-58, jež se opět liší v charakteru dopantů. Koncentrace vztažené k jednotlivým prvkům jsou vypsány v Tabulce 3. Před samotnou expozicí byly všechny zásobní disperze UCNPs proměřeny na ICP-OES, kde byla stanovena koncentrace jednotlivých prvků. Chemický vzorec UCNPs vychází z navážky jednotlivých chemikálií pro syntézu. Jestliže však nezreaguje veškerý obsah reakční směsi do podoby nanočástic, přebytečné nenavázané ionty RRE se při čištění vymyjí. Proto se reálný obsah Yb, Er, Gd, a Tm pro jednotlivé typy nanočástic liší, ačkoli má být dle vzorce totožný. Pro přípravu pozitivní kontroly byla jako navážka volena jejich průměrná koncentrace ze všech druhů UCNPs. Koncentrace yttria byla stanovena pro všechny typy UCNPs pevně.

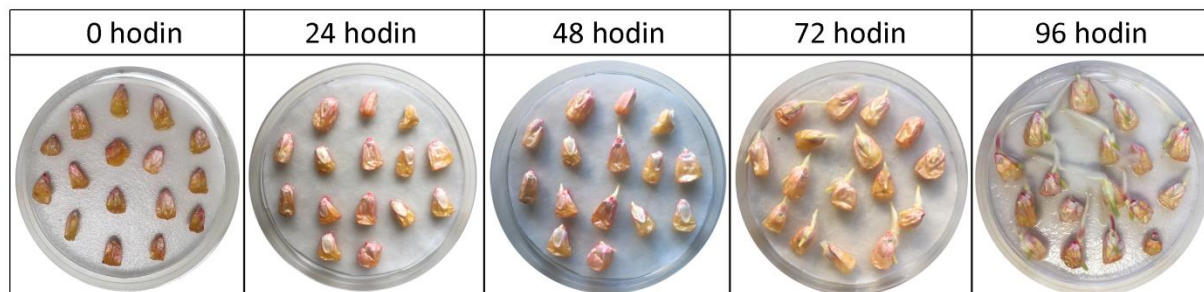
U všech typů disperzí i roztoků byly po expozici opět změřeny koncentrace yttria, ytterbia, erbia, gadolinia a thulia metodou ICP-OES. Dále bylo změřeno pH všech roztoků a disperzí před a po expozici. U disperzí UCNPs byl změřen i hydrodynamický průměr nanočástic metodou DLS, ve skleněné kyvetě s optickou dráhou 10 mm, a foton-upkonverzní maxima tak, že 100 μl příslušné disperze bylo nakapáno do jamek mikrotitrační destičky a spektra byla automaticky nasnímána pomocí foton-upkonverzního mikroskenru.

Tabulka 3: Nominální koncentrace kovů vzácných zemin a UCNPs v expozičních disperzích/roztocích

druh disperze/roztoku	nominální koncentrace [mg/l]					
	Y ³⁺	Yb ³⁺	Er ³⁺	Gd ³⁺	Tm ³⁺	UCNPs
UCNPs-26	0,5	0,22	–	0,25	0,02	2,72
	5	2,25	–	2,52	0,25	27,17
	25	0,45	–	12,60	1,23	135,83
UCNPs-29	0,5	0,29	0,30	–	–	3,21
	5	2,87	2,96	–	–	32,05
	25	14,35	14,78	–	–	160,25
UCNPs-58	0,5	0,21	0,24	–	–	2,80
	5	2,07	2,40	–	–	28,02
	25	10,33	12,00	–	–	140,08
UCNPs-26+29	0,5	0,26	0,15	0,13	0,01	2,96
	5	2,56	1,48	1,26	0,12	29,61
	25	12,79	7,39	6,30	0,61	148,04
UCNPs-26+58	0,5	0,25	0,27	–	–	2,76
	5	2,47	2,68	–	–	27,59
	25	12,34	13,39	–	–	137,96
směs chloridů	0,5	0,24	0,27	0,25	0,02	–
	5	2,39	2,68	2,52	0,25	–
	25	11,97	13,39	12,6	1,23	–
voda	–	–	–	–	–	–

4.3.2 Naklíčení semen

Kultivace rostlin kukuřice seté (*Z. mays*) probíhala při laboratorní teplotě 22 °C a při světelném cyklu 16/8 (16 hodin světla, 8 hodin tmy). Devět set semen kukuřice seté bylo nejprve vysazeno do filtračním papírem vyložených a Milli-Q vodou navlhčených Petriho misek. V každé Petriho misce bylo umístěno cca 16 semen ve vzájemných rozestupech přibližně 1 cm. Při udržované dostatečné vlhkosti filtračního papíru zde semena klíčila po dobu 96 hodin. Růst rostlin byl každých 24 hodin monitorován, viz Obrázek 12.

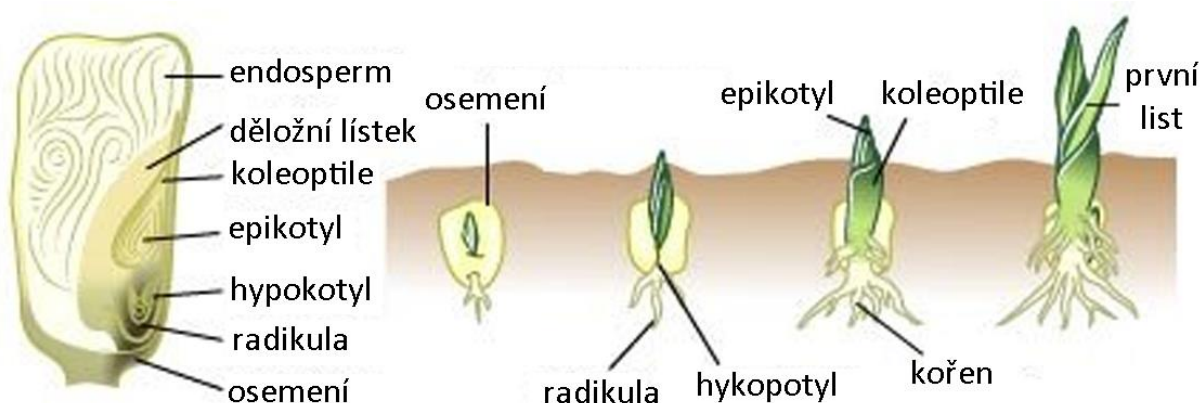


Obrázek 12: Klíčení semen kukuřice seté, foceno každých 24 hodin

Celkový počet vysazených semen výrazně převyšoval potřebný počet rostlin využitých pro expozici proto, aby bylo možné pro expozici kontaminantům vybrat pouze zdravé semenáčky s podobně dlouhým a silným kořenem. Přebytečné rostliny však byly využity pro optimalizaci podmínek měření metodou LIBS.

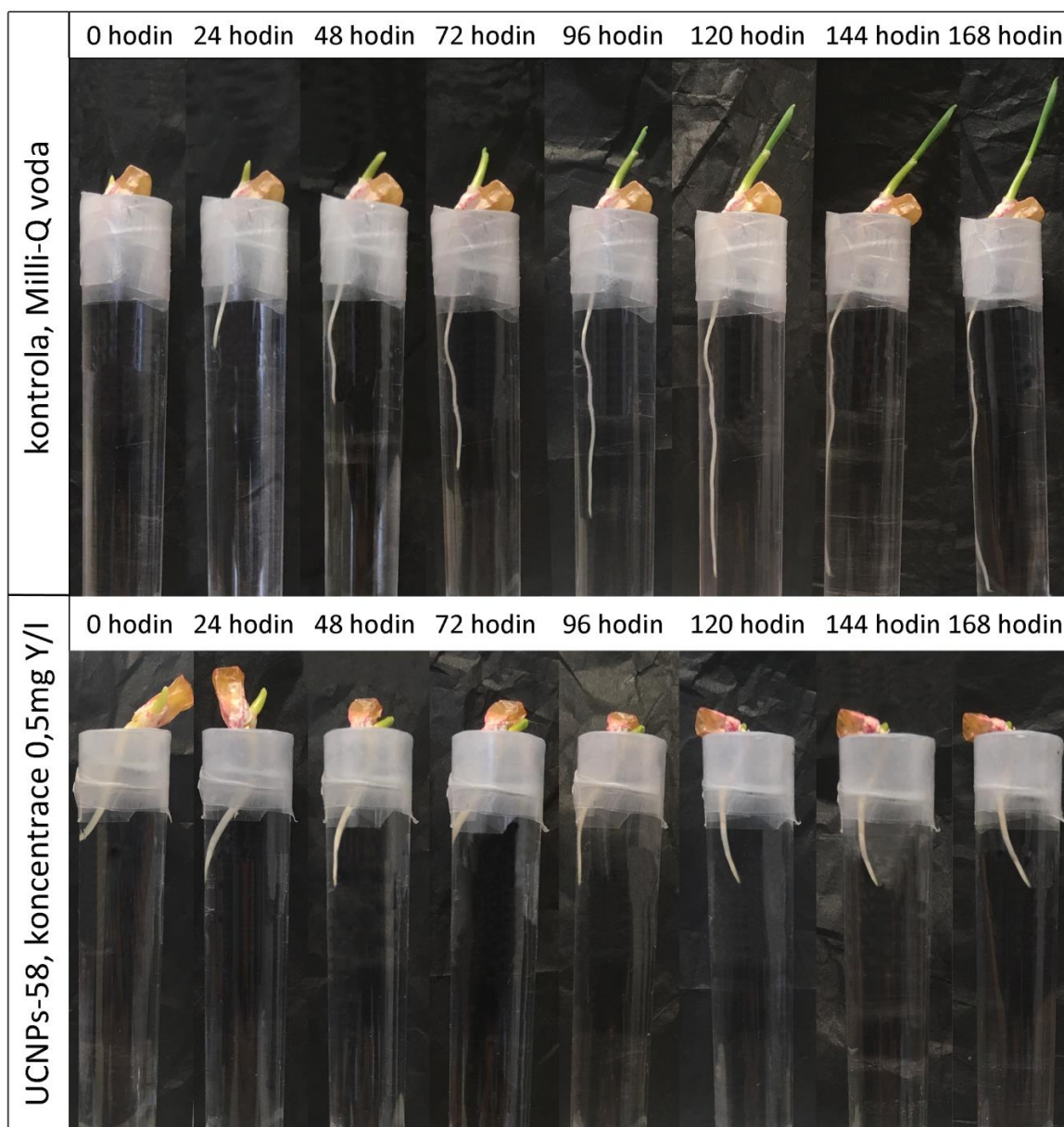
4.3.3 Expozice rostlin

Kukuřice setá patří mezi jednoděložné rostliny. Její klíčení a růst probíhají dle schématu uvedeném na Obrázku 13 [83]. Kořen a koleoptile jsou pro účely této práce označovány jako podzemní část rostliny, epikotyl a první listy jsou v rámci této práce označovány jako nadzemní část rostliny. K tvorbě prvních listů došlo pouze u kontrolních rostlin, rostliny exponované RRE v jakékoli podobě utvořily pouze epikotyl. V průběhu expozice byl v přímém kontaktu s disperzemi/roztoky testovaných látek pouze kořen rostlin a translokace tedy mohla probíhat v rámci podzemní části do koleoptily, nebo do epikotylu (nadzemní části rostlin).



Obrázek 13: Schéma klíčení a růstu jednoděložné rostliny kukuřice seté, převzato a upraveno [83]

Expozice rostlin kukuřice seté (*Z. mays*) probíhala ve 20 ml zkumavkách po dobu 168 hodin ve 25 opakováních pro každý typ expozice. Zkumavky byly naplněny vždy přesně 20 ml disperze nanočástic či roztoku směsi chloridů příslušných lanthanoidů (pozitivní kontrola), ve třech nominálních koncentracích: 0,5; 5 a 25 mg Y/l. Koncentrace roztoků i disperzí byla zvolena na základě údajů v literatuře [11, 25, 61, 64]. Zkumavky byly neprodyšně uzavřeny transparentní plastovou fólií, aby se v co největší míře zamezilo odpařování kapaliny. Do fólií byly následně vytvořeny dírký o průměru cca 2 mm, kterými byly provlečeny kořínky naklíčených rostlin kukuřice. Semeno i s nadzemní částí rostliny zůstalo nad fólií a s kapalinou nikdy nepřišlo do přímého kontaktu. Hladina kapaliny ve zkumavce dosahovala přibližně 3 mm pod její okraj, takže kořeny rostlin do ní byly od začátku ponořeny. Růst rostlin byl každých 24 hodin dokumentován a pro vybrané expozice je zobrazen na Obrázku 14.



Obrázek 14: Růst semenáčků kukuřice seté monitorován po 24 hodinách, v horní části obrázku jsou rostliny pěstované v Milli-Q vodě, ve spodní části obrázku rostliny exponované UCNPs-58 v koncentraci 0,5 mg Y/l

Expozice rostlin byla ukončena po 168 hodinách. Jednotlivé rostliny byly pečlivě omyty Milli-Q vodou a byla změřena délka jejich podzemní a nadzemní části jako toxikologické end-pointy. Statisticky významné rozdíly (označení p -hodnoty: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$) mezi kontrolní skupinou a jednotlivými expozicemi byly vyhodnoceny pomocí neparametrického Mann-Whitney testu. Na konci expozice byly také změřeny objemy testovaných disperzí a roztoků, typicky se odpařil z každé zkumavky objem v rozmezí 1 až 1,5 ml.

Z rostlin byl skalpelem opatrně odstraněn zbytek semene. Následně byly rostliny po dobu jednoho týdne sušeny a lisovány. Vždy minimálně deset reprezentativních vzorků rostlin z každé expoziční skupiny bylo čirou dvousložkovou epoxidovou pryskyřicí upevněno na podložní mikroskopické sklíčko. Příklad rostliny kukuřice seté (kontrolní rostlina exponovaná

pouze vodou) uchycené v epoxidové pryskyřici je uveden na Obrázku 15. Epoxidová pryskyřice se před uskladněním vzorků nechala důkladně zatvrdnout po dobu 24 hodin. Připravené vzorky byly vyfotografovány na optickém mikroskopu. Pro analýzu vlastností disperzí a roztoků (pH, velikost nanočástic, emisní maxima a koncentrace lanthanoidů) bylo uschováno vždy minimálně pět vzorků.



Obrázek 15: Rostlina kukuřice z kontrolní skupiny upevněná v epoxidové pryskyřici na podložním mikroskopickém sklíčku

4.4 Foton-upkonverzní mikroskenování

Jelikož je analýza foton-upkonverzním mikroskenováním zcela nedestruktivní, byla použita jako v pořadí první metoda analýzy rozložení UCNPs v rostlině. Ten stejný vzorek je následně možné analyzovat metodou LIBS, čímž se získá ověřená informace o stabilitě nanočástic v těle rostliny.

Měření mělo podobu postupného ozařování vzorku laserem s krokem 40 μm v osách x i y a probíhalo za tmy. Každému naměřenému spektru byly přiřazeny souřadnice, díky čemuž je v programu ImageJ možné vykreslit prostorové rozlišení do podoby 2D mapy. Doba skenování se výrazně lišila v závislosti na velikosti vzorku, od přibližně 20 minut až po dvě hodiny. Byla detekována emise aktivátorů erbia a thulia. Spektrum bylo snímáno v rozmezí vlnových délek 350 až 1130 nm, ale foton-upkonverzní maxima se nacházela ve viditelné (erbio – v okolí 660 nm) a infračervené (thulium – v okolí 800 nm) oblasti.

Emisní maxima disperzí UCNPs před a po expozici byla detekována na foton-upkonverzním mikroskenování tak, že disperze byly v objemu 100 μl nanoseny na dna jamek mikrotitrační destičky. Volbou vhodného kroku měření odpovídajícího vzdálenosti těchto jamek byl automatizován i proces snímání spekter z disperzí. Prázdňá jamka pak sloužila jako blank pro odečet pozadí.

4.5 Měření prostorového rozložení kontaminantů metodou LIBS

4.5.1 Optimalizace parametrů měření

Metoda LIBS je velmi výrazně ovlivněna matričním efektem, optimalizace parametrů měření proto probíhala na listech kukuřice seté vypěstované ve stejných podmínkách – stejné stáří, výživa i příprava vzorku. Jednalo se tedy o usušené a vylisované listy kukuřice seté upevněné v epoxidové pryskyřici. Oblast listu byla zvolena, protože představuje větší plochu. Pro

optimalizaci měření metodou LIBS byly zvláště připraveny roztoky směsi chloridů yttria, ytterbia, erbia, gadolinia a thulia ve vyšších, dobře detekovatelných koncentracích (500 mg Y/l, 239 mg Yb/l, 268 mg Er/l, 252 mg Gd/l, 25 mg Tm/l) tak, aby všechny prvky zůstaly v korespondujícím poměru jako v disperzích UCNPs. Z parametrů měření byly optimalizovány energie laserového pulzu, prostorové rozlišení, GD a výběr detekčního okna.

Optimalizace energie laserového pulzu a prostorového rozlišení byla provedena společně, protože tyto dva parametry jsou na sobě závislé. Velikost kráteru vytvořeného laserovým pulzem se zvyšuje se zvyšující se energií laseru, proto obecně platí, že při mapování je třeba volit kompromis mezi intenzitou signálu a prostorovým rozlišením. Postupně byla testována energie 10, 15, 20, 25 a 30 mJ. Velikost kráterů pak byla odečtena na optickém mikroskopu. Podle ní bylo zvoleno takové prostorové rozlišení a energie, aby byla detekována dostatečná intenzita signálu s co nejmenším krokem měření.

Optimalizace GD probíhala na předem připravených vysušených kapkách roztoků směsi chloridů RRE. Se zvolenou energií a prostorovým rozlišením byla tato kapka zmapována. Otestován byl GD od 250 do 2500 ns, přičemž krok měření se na základě předběžných výsledků v oblasti maximálního signálu snižoval, aby bylo možné zachytit maximum co nejpřesněji. Při vyhodnocení byl porovnáván průměrný signál na bod (akumulovaný signál yttria z celé kapky/počet bodů vysušené kapky). Signál se v programu LIBSAnalyzer počítal jako plocha pod emisní čarou Y II 412,029 nm.

Měření probíhala na spektrometru typu Czerny-Turner, který má oblast detekce vlnových délek omezenou na přibližně 40 nm. V databázi spektrálních čar [11] byly proto vyhledány emisní čáry yttria, ytterbia, erbia, gadolinia a thulia s vysokými pravděpodobnostmi spektrálního přechodu tak, aby nedocházelo k vzájemným interferencím, a to ani s jinými biogenními prvky přítomnými v rostlinách. Schopnost detekce zvolených spektrálních čar byla otestována s optimalizovanými ostatními parametry opět na zaschlých kapkách roztoku směsi chloridů RRE.

4.5.2 Analýza rostlin kukuřice seté

Rostliny kukuřice seté byly analyzovány s optimalizovanými parametry. Frekvence laserového pulzu byla 20 Hz a doba měření se pohybovala od 8 do 38 minut. Velikost map byla v rozmezí 9 840 až 45 024 bodů a celková plocha mapy se pohybovala v nižších jednotkách cm². Prvkové mapy vyjadřující rozložení analytu v rostlině byly sestaveny v programu Lightigo Imagelab. Jednotlivým bodům byly přiřazeny souřadnice a do 2D mapy byl vykreslen obsah plochy pod zvolenými emisními čarami. Přehled emisních čar i vykreslovaných rozmezí je přehledně vypsán v Tabulce 4.

Tabulka 4: Přehled sledovaných prvků, zvolených emisních čar a rozsahu vlnových délek pro vykreslení do mapy pro LIBS měření

sledovaný prvek	typ emisní čáry	vlnová délka emisní čáry [nm]	rozsah vlnových délek pro vykreslení do mapy [nm]
yttrium	Y I	412,830	412,5–413,6
ytterbium	Yb I	398,799	398,7–399,4
erbium	Er I	400,796	400,7–401,4
gadolinium	Gd I	368,413	368,4–368,7

4.6 Měření prostorového rozložení kontaminantů metodou μ LIBS

Celé rostliny byly analyzovány i metodou μ LIBS, která umožňuje dosažení lepšího prostorového rozlišení. Pro μ LIBS analýzu byly testovány dva systémy. První měření se uskutečnilo na sestavě LIBS Discovery, která byla modifikována přidáním filtru, který omezí průměr laserového paprsku ze 7 mm na 1 mm. Filtr zabránil přístupu většiny laserového záření. Spektra byla snímána spektrometrem typu Czerny-Turner Shamrock. Aby bylo možné detekovat signál, byla použita maximální možná energie laserového pulzu 91,2 mJ. Při μ LIBS měření se GD volí obvykle 0 ns, protože plazma je menší a rychleji vyhasíná. Prostorové rozlišení mapy bylo upraveno dle velikosti vznikajícího kráteru na 40 μ m v osách x i y , frekvence dopadu laserového pulzu byla 20 Hz. Zlepšením prostorového rozlišení se výrazně prodlouží doba měření, mapa se skládala 97 515 bodů a měření trvalo 81 minut. Otestován byl vzorek kukuřice exponovaný směsí chloridů v koncentraci 25 mg Y/l.

Druhý přístup k μ LIBS měření zahrnoval sestavu Lightigo Firefly, která je vybavena laserem s vyšší opakovací frekvencí laserových pulzů, až 100 Hz a fixní energií laserového pulzu 1 mJ. Mapy byly měřeny s prostorovým rozlišením 26 μ m v obou osách a GD byl opět nastaven na 0 ns. Spektra byla snímána na dvou spektrometrech současně: Czerny-Turner spektrometr Shamrock a Echelle spektrometr Avantes. Protože maximální snímací energie spektrometru Shamrock je limitovaná, bylo měření prováděno s frekvencí laserového pulzu 62,5 mJ. Mapy se skládaly z 341 638 až 1 166 725 bodů, měření trvala 91 až 311 minut. Následující volba sestavy pro realizaci μ LIBS měření závisela nejen na citlivosti, ale i na rychlosti měření a dosaženém prostorovém rozlišení.

Vyhodnocení výsledných prvkových map proběhlo rovněž v programu Lightigo Imagelab, ale, jelikož byla v obou případech zaznamenávána celá doba života plazmatu, bylo nutné při vyhodnocení provést odečet *baseline*. Další změnou byla volba emisní čáry yttria, pro μ LIBS měření byla vykreslována emisní čára Y II 371,029 nm, rozsah pro výpočet plochy pod křivkou byl 370,8–371,6 nm. Ostatní emisní čáry byly stejné jako v případě LIBS měření. Pro přehlednost jsou čáry pro μ LIBS uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Přehled sledovaných prvků, zvolených emisních čar a rozsahu vlnových délek pro vykreslení do mapy pro μ LIBS měření

sledovaný prvek	typ emisní čáry	vlnová délka emisní čáry [nm]	rozsah vlnových délek pro vykreslení do mapy [nm]
yttrium	Y II	371,029	370,8–371,6
ytterbium	Yb I	398,799	398,7–399,4
erbium	Er I	400,796	400,7–401,4
gadolinium	Gd I	368,413	368,4–368,7

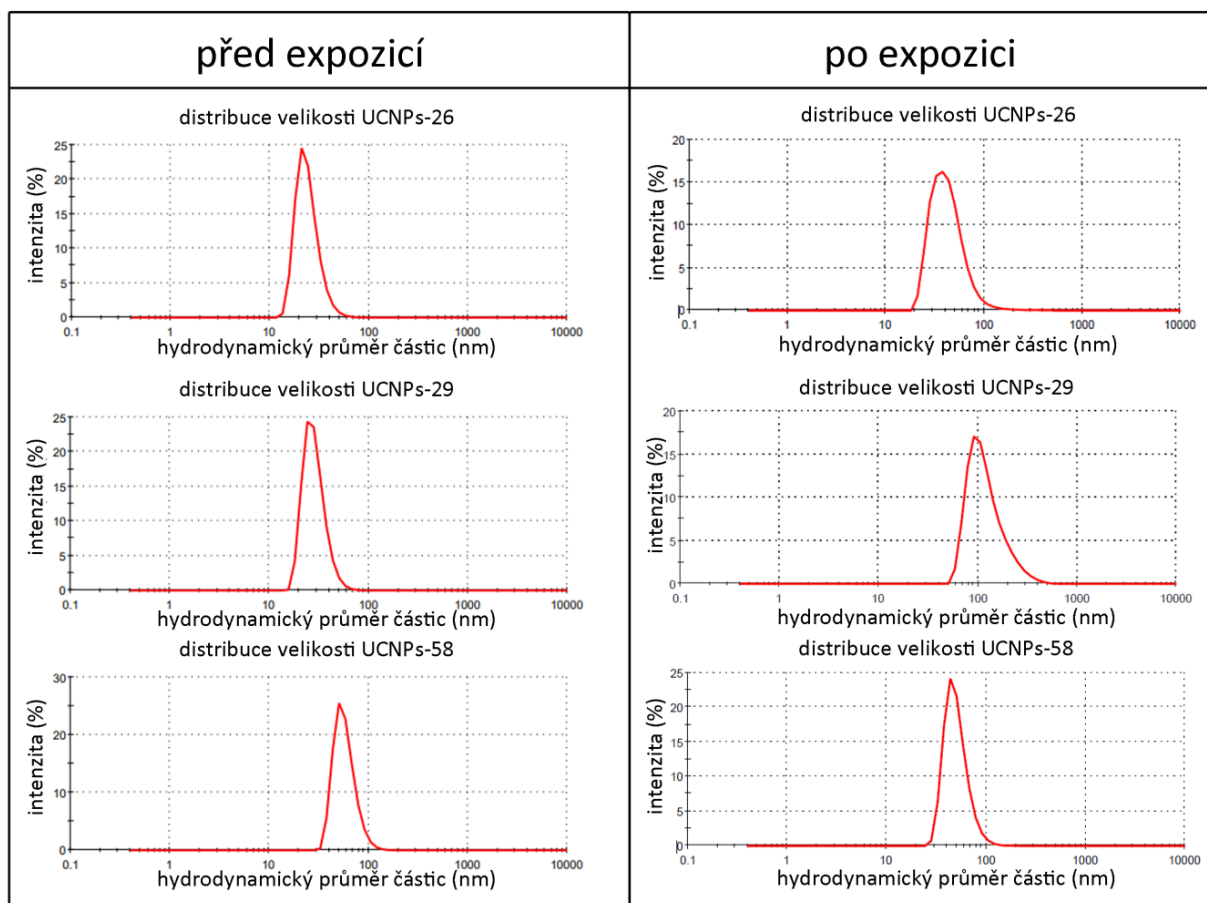
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vlastnosti disperzí a roztoků

Výsledky měření hydrodynamického průměru foton-upkonverzí nanočástic jsou vypsány v Tabulce 6. Pro koexpozici UCNP-26+58, lišící se velikostí UCNP, jsou uvedeny dvě hodnoty hydrodynamického průměru. Z měření vyplývá, že stabilní byly pouze UCNP-58. U ostatních dvou typů (UCNP-26 a UCNP-29) se výsledky měření před a po expozici výrazně liší, došlo k vysokému nárůstu hydrodynamického průměru UCNP. Z toho vyplývá, že s časem docházelo k agregaci/aglomeraci nanočástic, a to jak při kontaktu s kořenem rostliny, tak i v zásobních roztocích. To mohlo být způsobeno rozpouštěním obalu z oxidu křemičitého způsobeným použitím nízkých koncentrací UCNP v roztocích v kombinaci s relativně dlouhotrvající expozicí. Tuto teorii potvrzuje i fakt, že i stabilní UCNP-58 při nejnižší koncentraci 0,5 mg Y/l zvětšily svůj hydrodynamický průměr. Pro lepší stabilizaci by bylo vhodné použít větší vrstvu křemenného obalu, případně využít polymerizace [84]. Příklad graficky znázorněných výsledků měření hydrodynamického průměru je na Obrázku 16.

Tabulka 6: Hodnoty hydrodynamického průměru použitých UCNP před expozicí a po 168 hodinách v kontaktu s rostlinou a bez kontaktu s rostlinou, n představuje počet měření, v představuje počet vzorků (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka)

druh disperze	nominální koncentrace yttria [mg/l]	hydrodynamický průměr [nm] (n = 5)		
		před expozicí (v = 1)	po 168 hodinách expozice (v = 5)	po 168 hodinách bez kontaktu s rostlinou (v = 1)
UCNPs-26	0,5	25,9 ± 6,9	69,5 ± 22,3	26,3 ± 9,2
	5		122,8 ± 61,1	740,8 ± 146,2
	25		671,3 ± 194,4	574,8 ± 189,5
UCNPs-29	0,5	28,7 ± 7,6	122,5 ± 38,1	32,1 ± 6,7
	5		64,4 ± 25,4	656,3 ± 121,3
	25		883,0 ± 255,9	1050,0 ± 522,1
UCNPs-58	0,5	58,2 ± 15,2	67,9 ± 30,5	50,2 ± 16,6
	5		53,2 ± 15,6	53,5 ± 14,8
	25		53,7 ± 14,5	177,0 ± 99,6
UCNPs-26+29	0,5	25,9 ± 6,9	304,8 ± 83,5	26,6 ± 6,749
	5		27,7 ± 8,0	1229,0 ± 238,4
	25	28,7 ± 7,6	802,2 ± 251,1	610,4 ± 141,6
UCNPs-26+58	0,5	25,9 ± 6,9 58,2 ± 15,2	51,0 ± 10,1	44,6 ± 14,6
			350,4 ± 202,6	–
	5		43,7 ± 14,3	443,1 ± 119,4
		12,4 ± 2,1	–	
	25		59,0 ± 16,7	58,1 ± 16,5
			604,2 ± 234,3	–



Obrázek 16: Graficky znázorněné příklady výsledků měření DLS pro vybrané expozice UCNPs o nominální koncentraci 5 mg Y/l před a po testu toxicity. Na ose x je v logaritmickém měřítku znázorněn hydrodynamický průměr částic, na ose y intenzita signálu

Vlnové délky foton-upkonverzních maxim, uvedené v Tabulce 7, zůstávaly i přes agregaci/aglomeraci nanočástic poměrně stabilní. Nejznatelnější rozdíly se vyskytovaly u nejnižší nominální koncentrace, 0,5 mg Y/l, kdy se maxima posouvala k mírně vyšším vlnovým délkám. Průměrné hodnoty byly vypočteny z měření pěti vzorků disperzí odebraných po ukončení expozice.

Tabulka 7: Hodnoty vlnových délek foton-upkonverzních maxim pro disperze UCNPs před expozicí a po expozici, n představuje počet měření, v představuje počet vzorků (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka)

druh disperze	nominální koncentrace yttria [mg/l]	foton-upkonverzní maxima [nm] (n = 3)		
		před expozicí (v = 1)	po 168 hodinách expozice (v = 5)	po 168 hodinách bez kontaktu s rostlinou (v = 1)
UCNPs-26	0,5	801,1 ± 0,4	816,9 ± 1,1	816,7 ± 2,1
	5		800,9 ± 2,6	802,6 ± 1,6
	25		800,2 ± 0,3	800,7 ± 0,6
UCNPs-29	0,5	658,8 ± 0,3	680,8 ± 4,3	661,9 ± 8,6
	5		657,2 ± 3,0	655,4 ± 0,6
	25		654,7 ± 2,7	661,1 ± 2,1
UCNPs-58	0,5	659,6 ± 0,3	669,1 ± 7,4	661,5 ± 1,6
	5		659,1 ± 0,4	657,7 ± 3,7
	25		659,5 ± 0,6	659,2 ± 0,6
UCNPs-26+29	0,5	801,1 ± 0,4	662,6 ± 0,0; 816,2 ± 1,0	660,7 ± 2,7; 810,0 ± 7,4
	5	658,8 ± 0,3	658,5 ± 4,1; 802,0 ± 2,6	656,5 ± 3,3; 801,45 ± 2,6
	25		657,0 ± 3,5; 801,1 ± 0,9	654,6 ± 0,6; 800,7 ± 0,6
UCNPs-26+58	0,5	801,1 ± 0,4	659,2 ± 4,4; 816,6 ± 0,7	659,2 ± 4,8; 804,5 ± 0,5
	5	659,6 ± 0,3	659,6 ± 1,8; 802,0 ± 3,3	656,5 ± 3,3; 802,6 ± 1,6
	25		659,6 ± 0,0; 801,4 ± 0,9	656,5 ± 3,3; 800,7 ± 0,6

Dalším sledovaným parametrem roztoků a disperzí bylo pH, které bylo v čase poměrně stabilní. Před a po expozici nedocházelo k výrazným změnám pH. Největší změna pH byla vždy u nejnižší koncentrace 0,5 mg Y/l, zatímco pH u nejvyšší koncentrace 25 mg Y/l zůstávalo téměř neměnné. Naměřené hodnoty pH jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8: Hodnoty pH disperzí UCNPs a roztoků směsi chloridů před a po expozici, n představuje počet měření, v představuje počet vzorků (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka)

druh disperze/roztoku	nominální koncentrace yttria [mg/l]	pH (n = 3)	
		před expozicí (v = 1)	po 168 hodinách expozice (v = 5)
UCNPs-26	0,5	5,7 ± 0,2	6,4 ± 0,3
	5	5,9 ± 0,1	6,6 ± 0,3
	25	6,6 ± 0,1	6,8 ± 0,1
UCNPs-29	0,5	5,8 ± 0,1	6,6 ± 0,1
	5	6,0 ± 0,2	6,4 ± 0,1
	25	6,5 ± 0,1	6,7 ± 0,1
UCNPs-58	0,5	5,7 ± 0,1	6,7 ± 0,1
	5	6,1 ± 0,1	6,6 ± 0,1
	25	6,7 ± 0,1	6,7 ± 0,1
UCNPs-26+29	0,5	5,6 ± 0,2	6,5 ± 0,1
	5	6,2 ± 0,1	6,6 ± 0,1
	25	6,5 ± 0,1	6,8 ± 0,1
UCNPs-26+58	0,5	5,7 ± 0,2	6,5 ± 0,3
	5	6,2 ± 0,1	6,6 ± 0,1
	25	6,6 ± 0,1	6,8 ± 0,1
směs chloridů	0,5	5,8 ± 0,1	6,5 ± 0,1
	5	5,6 ± 0,2	5,9 ± 0,4
	25	5,4 ± 0,1	5,6 ± 0,1
voda	0	6,1 ± 0,1	5,9 ± 0,2

Před začátkem expozice byla metodou ICP-OES stanovena koncentrace yttria, ytterbia, erbia, gadolinia a thulia v zásobních roztocích a disperzích. Dále byla stanovena výtěžnost yttria oproti nominální hodnotě koncentrace. Výtěžnost se pohybovala mezi 74 a 111 %. Hodnoty koncentrací jsou uvedeny v Tabulce 9. Koncentrace yttria, ytterbia, erbia, gadolinia a thulia byla stanovena i po expozici, výsledky jsou uvedeny v Tabulce 10. Porovnání hodnot yttria před a po expozici je uvedeno v Tabulce 11. Zde je patrné, že v rámci jednotlivých typů expozice docházelo k navyšování příjmu sledovaných látek rostlinami s jejich rostoucí koncentrací, největší množství yttria tedy bylo rostlinou přijímáno v koncentraci 25 mg Y/l a nejmenší množství v koncentraci 0,5 mg Y/l. Obecně platilo, že příjem yttria byl vyšší pro UCNPs v porovnání se směsí chloridů v odpovídajících koncentracích. V koncentraci 25 mg Y/l byl nejvyšší příjem yttria rostlinami u testované směsi UCNPs-26+29 (naměřený úbytek yttria 264 µg) a nejnižší u směsi chloridů (naměřený úbytek yttria 32 µg), přičemž rozdíl byl přibližně osminásobný. Ve dvou zbylých koncentracích 0,5 a 5 mg Y/l byly rozdíly mezi druhy expozice nižší. Pro koncentraci 5 mg Y/l se úbytek yttria pohyboval mezi 13 a 33 µg a pro koncentraci 0,5 mg Y/l mezi 3 a 8 µg.

Zdánlivý nárůst koncentrace u směsi chloridů v nominální koncentraci 25 mg Y/l je způsoben odpařováním vody z roztoku a vstřebáváním rostlinou. I v tomto případě při přepočtu pro odpovídající objem došlo k poklesu koncentrace iontů yttria.

Tabulka 9: Hodnoty koncentrace yttria, ytterbia, erbia, gadolinia a thulia před začátkem expozice a vypočtená výtěžnost yttria oproti nominální koncentraci, n představuje počet měření, v představuje počet vzorků (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka)

druh disperze/roztoku	nominální koncentrace yttria [mg/l]	naměřená koncentrace před expozicí [mg/l] (n = 3, v = 1)					výtěžnost yttria [%]
		Y ³⁺	Yb ³⁺	Er ³⁺	Gd ³⁺	Tm ³⁺	
UCNPs-26	0,5	0,522 5 ± 0,001 0	0,239 7 ± 0,000 4	–	0,265 1 ± 0,001 0	0,025 5 ± 0,000 8	106
	5	4,116 6 ± 0,025 7	1,943 0 ± 0,006 5	–	2,175 4 ± 0,006 2	0,211 1 ± 0,001 2	82
	25	22,479 9 ± 0,021 8	10,308 7 ± 0,050 2	–	11,294 1 ± 0,040 8	1,077 4 ± 0,006 3	90
UCNPs-29	0,5	0,502 0 ± 0,002 8	0,295 5 ± 0,001 7	0,030 5 ± 0,000 2	–	–	100
	5	4,18 0 1 ± 0,028 6	2,530 5 ± 0,010 9	2,677 0 ± 0,014 3	–	–	84
	25	22,010 3 ± 0,083 1	12,954 4 ± 0,054 5	13,309 3 ± 0,074 0	–	–	88
UCNPs-58	0,5	0,524 9 ± 0,001 5	0,220 6 ± 0,000 8	0,026 1 ± 0,000 1	–	–	105
	5	4,548 1 ± 0,020 1	1,953 2 ± 0,005 2	2,352 4 ± 0,003 2	–	–	91
	25	22,098 3 ± 0,079 4	9,320 4 ± 0,010 7	10,840 4 ± 0,018 2	–	–	88
UCNPs-26+29	0,5	0,520 6 ± 0,000 7	0,274 4 ± 0,000 1	0,016 2 ± 0,000 1	0,132 3 ± 0,001 0	0,012 7 ± 0,00 2	104
	5	3,939 7 ± 0,017 0	2,112 4 ± 0,007 0	1,264 5 ± 0,004 6	0,998 5 ± 0,002 2	0,103 1 ± 0,000 2	79
	25	23,026 2 ± 0,143 1	12,116 5 ± 0,059 9	7,051 8 ± 0,044 0	5,880 1 ± 0,032 7	0,582 9 ± 0,004 3	92
UCNPs-26+58	0,5	0,531 7 ± 0,001 3	0,232 6 ± 0,000 7	0,013 8 ± 0,000 1	0,126 3 ± 0,001 7	0,011 5 ± 0,002 1	106
	5	3,719 7 ± 0,027 0	1,686 7 ± 0,005 5	0,940 9 ± 0,003 5	0,979 0 ± 0,003 8	0,100 9 ± 0,000 2	74
	25	23,282 9 ± 0,076 3	10,236 3 ± 0,018 3	5,820 1 ± 0,012 3	5,866 5 ± 0,008 0	0,577 4 ± 0,001 9	93
směs chloridů	0,5	0,557 1 ± 0,000 4	0,274 3 ± 0,000 7	0,031 4 ± 0,000 1	0,271 7 ± 0,001 6	0,029 2 ± 0,000 4	111
	5	5,097 4 ± 0,013 1	2,536 1 ± 0,015 5	2,998 0 ± 0,020 3	2,583 6 ± 0,013 0	0,277 9 ± 0,001 9	102
	25	24,651 2 ± 0,009 2	12,288 5 ± 0,048 5	13,995 2 ± 0,078 8	12,156 2 ± 0,039 8	1,317 5 ± 0,006 8	99

Tabulka 10: Hodnoty koncentrace yttria, ytterbia, erbia, gadolinia a thulia po ukončení expozice, *n* představuje počet měření, *v* představuje počet vzorků (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka)

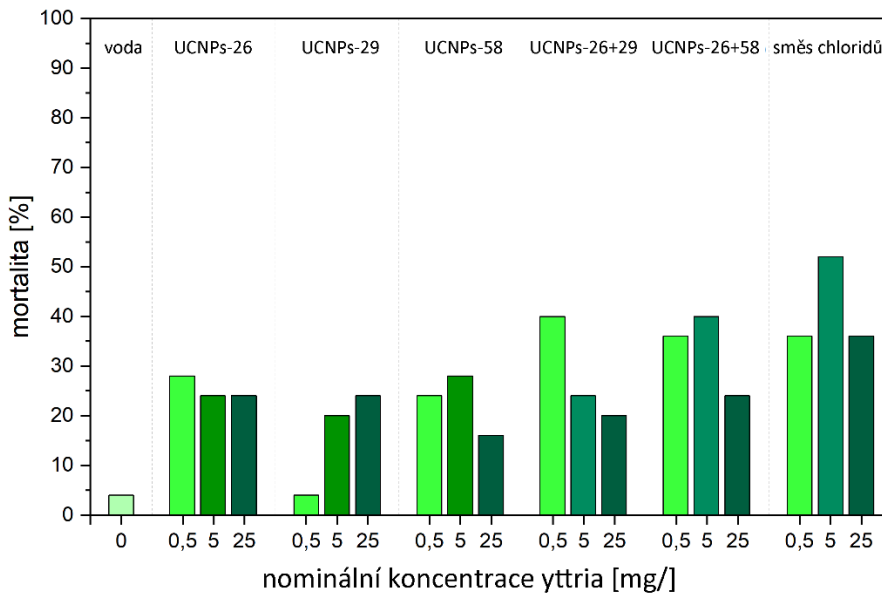
druh disperze/roztoku	nominální koncentrace yttria [mg/l]	naměřená koncentrace po expozici [mg/l] (<i>n</i> = 3, <i>v</i> = 5)				
		Y ³⁺	Yb ³⁺	Er ³⁺	Gd ³⁺	Tm ³⁺
UCNPs-26	0,5	0,363 0 ± 0,083 7	0,162 5 ± 0,038 1	–	0,168 7 ± 0,049 5	0,016 7 ± 0,004 3
	5	2,623 9 ± 1,861 2	1,235 1 ± 0,870 6	–	1,359 0 ± 1,025 2	0,134 2 ± 0,095 2
	25	22,064 8 ± 2,074 2	9,975 7 ± 0,930 3	–	10,996 4 ± 1,037 7	1,044 9 ± 0,094 0
UCNPs-29	0,5	0,328 0 ± 0,115 2	0,185 9 ± 0,064 4	0,019 1 ± 0,007 1	–	–
	5	3,071 5 ± 1,583 4	1,830 3 ± 0,959 4	1,948 8 ± 1,028 9	–	–
	25	18,160 4 ± 4,649 3	10,461 1 ± 2,803 7	10,686 7 ± 2,876 3	–	–
UCNPs-58	0,5	0,141 0 ± 0,035 9	0,067 0 ± 0,008 0	0,006 9 ± 0,001 4	–	–
	5	4,154 1 ± 0,120 1	1,760 6 ± 0,043 5	2,154 3 ± 0,058 4	–	–
	25	18,634 7 ± 5,928 0	7,665 7 ± 2,485 7	8,898 4 ± 2,883 8	–	–
UCNPs-26+29	0,5	0,289 6 ± 0,088 0	0,146 4 ± 0,041 9	0,008 6 ± 0,002 7	0,063 0 ± 0,026 1	0,005 9 ± 0,002 0
	5	3,315 7 ± 1,582 8	1,760 0 ± 0,844 1	1,021 4 ± 0,482 0	0,869 4 ± 0,436 2	0,088 0 ± 0,043 8
	25	10,642 2 ± 6,111 9	5,477 6 ± 3,165 3	3,198 2 ± 1,837 2	2,617 4 ± 1,582 8	0,259 5 ± 0,15 5
UCNPs-26+58	0,5	0,268 4 ± 0,154 5	0,113 9 ± 0,063 4	0,007 2 ± 0,003 8	0,057 4 ± 0,035 4	0,006 1 ± 0,003 9
	5	2,632 3 ± 1,786 0	1,165 4 ± 0,794 3	0,663 2 ± 0,526 1	0,655 2 ± 0,415 5	0,068 0 ± 0,040 5
	25	20,535 1 ± 3,671 1	8,994 4 ± 1,667 6	5,017 8 ± 0,888 2	5,238 0 ± 1,031 0	0,511 6 ± 0,101 1
směs chloridů	0,5	0,278 6 ± 0,106 1	0,137 7 ± 0,041 4	0,015 3 ± 0,005 6	0,123 6 ± 0,051 0	0,013 8 ± 0,004 9
	5	4,823 9 ± 0,236 1	2,326 6 ± 0,141 4	2,793 8 ± 0,162 5	2,328 0 ± 0,159 7	0,258 3 ± 0,014 6
	25	24,891 3 ± 0,175 6	12,336 6 ± 0,120 9	14,079 4 ± 0,113 3	12,162 0 ± 0,151 3	1,325 8 ± 0,009 2

Tabulka 11: Porovnání hodnot koncentrace yttria (*c*), hmotnosti yttria (*m*) a objemu disperze/roztoku před a po expozici (*V*), úbytek yttria je vyjádřen jako pokles koncentrace yttria v měřených roztocích a disperzích v procentech a jako úbytek hmotnosti yttria v μg a v procentech

druh disperze/roztoku	nominální koncentrace yttria [mg/l]	před expozicí			po expozici			porovnání množství yttria		
		<i>c</i> [mg Y/l]	<i>m</i> [μg]	<i>V</i> [ml]	<i>c</i> [mg Y/l]	<i>m</i> [μg]	<i>V</i> [ml]	pokles koncentrace yttria [%]	úbytek yttria [μg]	úbytek yttria [%]
UCNPs-26	0,5	0,52	10	20	0,36	7	19,09	31	3	34
	5	4,12	82	20	2,62	49	18,61	36	33	41
	25	22,48	450	20	22,06	415	18,78	2	35	8
UCNPs-29	0,5	0,50	10	20	0,33	6	19,02	35	4	38
	5	4,18	84	20	3,07	57	18,48	27	27	32
	25	22,01	440	20	18,16	337	18,56	17	103	23
UCNPs-58	0,5	0,53	11	20	0,14	3	18,96	73	8	75
	5	4,55	91	20	4,15	78	18,86	9	13	14
	25	22,10	442	20	18,63	344	18,44	16	98	22
UCNPs-26+29	0,5	0,52	10	20	0,29	6	19,29	44	4	46
	5	3,94	79	20	3,32	62	18,78	16	17	21
	25	23,03	461	20	10,64	197	18,67	54	264	57
UCNPs-26+58	0,5	0,53	11	20	0,27	5	18,79	50	6	53
	5	3,72	74	20	2,63	48	18,18	29	26	36
	25	23,28	466	20	20,54	389	18,94	12	77	16
směs chloridů	0,5	0,56	11	20	0,28	5	18,94	50	6	53
	5	5,10	102	20	4,82	89	18,47	5	13	12
	25	24,65	493	20	24,89	461	18,51	-1	32	7

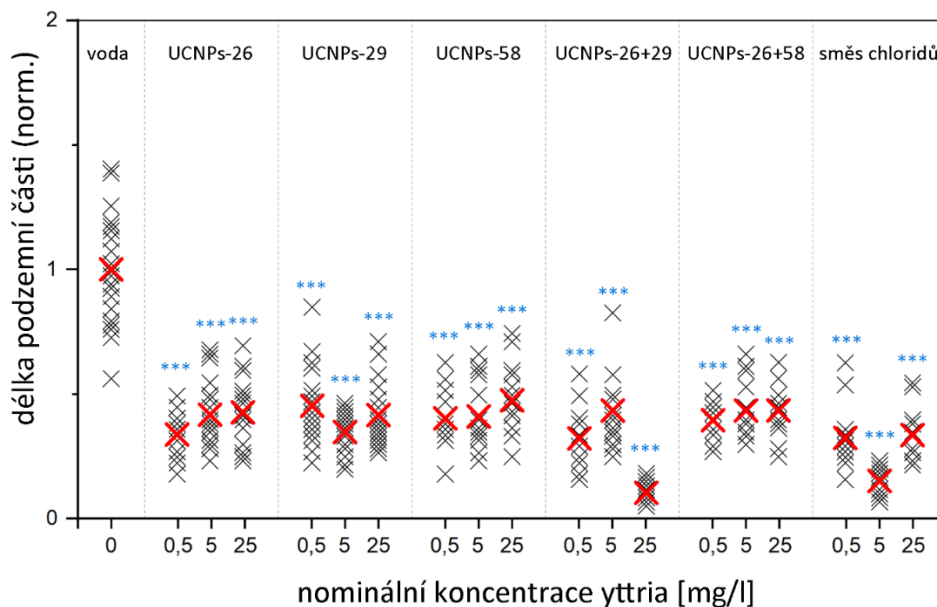
5.2 Výsledky testu toxicity

Vyhodnocení toxikologických endpointů ukázalo, že UCNPs i směs chloridů RRE jsou toxické ve všech testovaných koncentracích (0,5; 5 a 25 mg Y/l). Prvním sledovaným makroskopickým endpointem byla mortalita, která je procentuálně znázorněna v grafu na Obrázku 17. Mortalita rostlin ve zvoleném rozsahu koncentrací nebyla prokazatelně koncentračně závislá. Rostliny exponované pouze jednomu druhu UCNPs prosperovaly obecně lépe (mortalita od 4 do 28 %), než rostliny vystavené působení směsi UCNPs (mortalita od 24 do 40 %) a směsi chloridů (mortalita od 36 do 52 %).



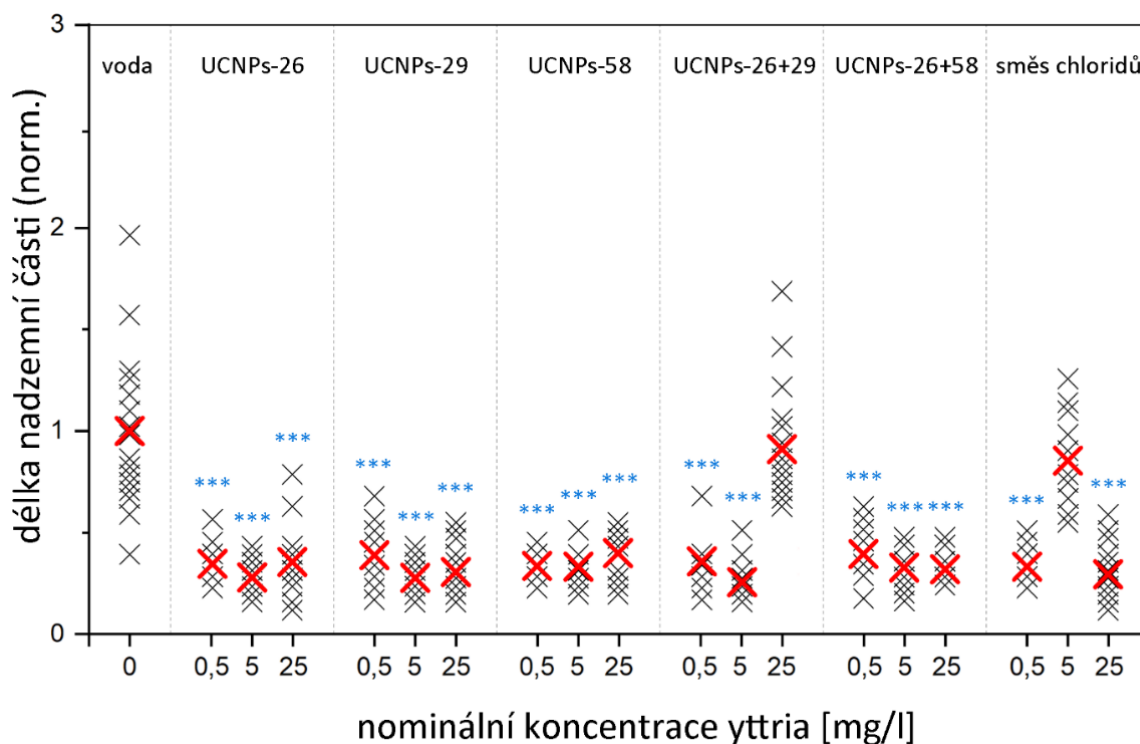
Obrázek 17: Mortalita kukuřice seté pro jednotlivé expozice, na ose x je nominální koncentrace yttria [mg/l], na ose y je vynesena mortalita rostlin [%]

Následující toxikologické endpointy se zabývají vyhodnocením růstu jednotlivých částí exponovaných rostlin. Vyhodnocení statistické významnosti rozdílů v toxikologických endpointech bylo určeno pomocí neparametrického Mann-Whitney testu, přičemž hladiny statistické významnosti byla stanoveny následovně: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. Normalizovaná délka podzemní části rostlin je znázorněna na Obrázku 18 a pro všechny koncentrace i všechny typy expozice je toxicita potvrzena na hladině statistické významnosti $p < 0,001$. Normalizace proběhla k průměrné hodnotě délky podzemní části rostlin exponovaných pouze vodě, tj. kontrolní skupině.



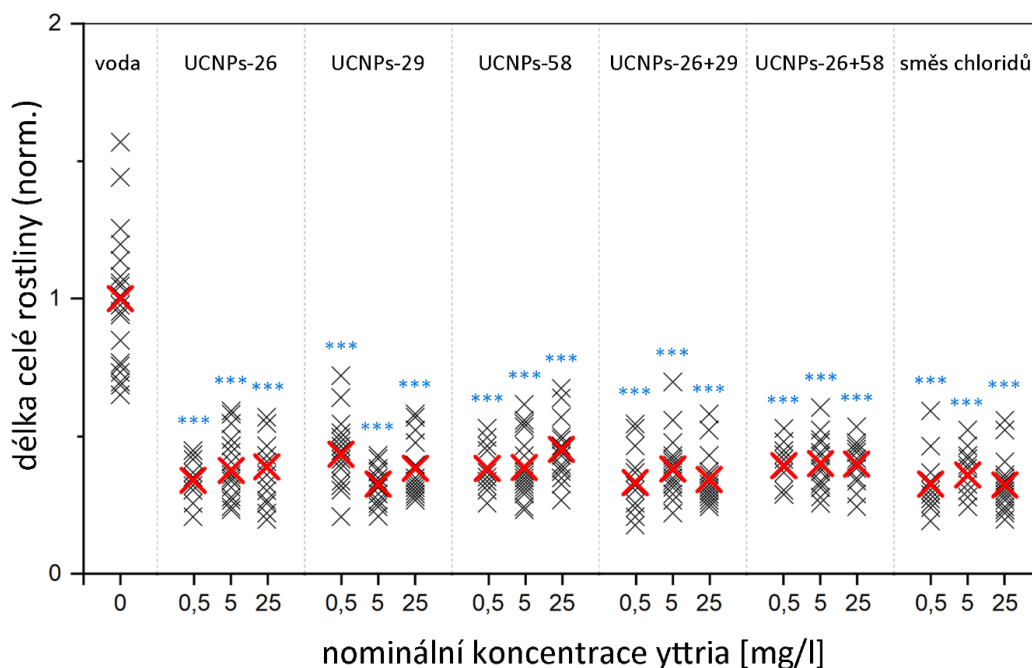
Obrázek 18: Normalizovaná délka podzemní části rostliny kukuřice seté pro jednotlivé expozice, červeně je označena průměrná délka podzemní části rostliny, na ose x je vynesena koncentrace yttria [mg Y/l], na ose y je vynesena normalizovaná délka podzemní části rostliny. Třemi modrými hvězdičkami je vyznačena hladina statistické významnosti $p < 0,001$.

Pro délku nadzemní části rostliny, jejíž normalizované hodnoty jsou znázorněny v grafu na Obrázku 19, je trend velmi podobný, UCNPs i směs chloridů jsou toxické na hladině významnosti $p < 0,001$. Jediné dvě výjimky tvoří UCNPs-26+29 v koncentraci 25 mg Y/l a směs chloridů v koncentraci 5 mg Y/l, kde nebyl pozorován statisticky významný vliv analytu na růst nadzemní části rostliny. Nicméně rostliny, kterým rostla nadzemní část zcela bez ovlivnění, byly právě o to více zasaženy působením testovaných látek v předchozím detektovaném parametru – růstu kořene, a to tak, že celková délka rostliny (Obrázek 20) nebyla touto anomálií ovlivněna.



Obrázek 19: Normalizovaná délka nadzemní části rostliny kukuřice seté pro jednotlivé expozice, červeně je označena průměrná délka nadzemní části rostliny, na ose x je vynesena koncentrace yttria [mg Y/l], na ose y je vynesena normalizovaná délka nadzemní části rostliny. Třemi modrými hvězdičkami je vyznačena hladina statistické významnosti $p < 0,001$.

Délka celé rostliny (graf hodnot normalizovaných k průměrné hodnotě vzrůstu kontrolních rostlin je znázorněn na Obrázku 20) byla ovlivněna pro všechny typy expozice. V porovnání s kontrolními rostlinami (exponované pouze Milli-Q vodou) byl tento rozdíl statisticky významný ($***p < 0,001$).



Obrázek 20: Normalizovaná délka celé rostliny kukuřice seté pro jednotlivé expozice, červeně je označena průměrná délka celé rostliny, na ose x je vynesena koncentrace yttria [mg Y/l], na ose y je vynesena normalizovaná délka celé rostliny. Třemi modrými hvězdičkami je vyznačena hladina statistické významnosti $p < 0,001$.

Podle současné literatury byla fytoxicita UCNPs očekávána pouze pro koncentrace vyšší než 50 mg, což v rámci této práce odpovídá pouze koncentraci 25 mg Y/l (přibližně 136–140 mg UCNPs/l) UCNPs/l [25]. Z koncentrací použitých v tomto experimentu tuto podmínku splňuje pouze nejvyšší nominální koncentrace 25 mg Y/l. Fytoxicita všech testovaných UCNPs se projevila i v obou nižších koncentracích, to může mít několik důvodů. Použitý druh modelového organismu, kukuřice setá, může být na působení UCNPs vysoce citlivý. Protože každý druh rostliny je jinak citlivý, výsledek testů toxicity je druhově nepřenositelný a v žádné předchozí studii toxicity UCNPs nebyla kukuřice setá použita, nemůžeme tento fakt vyloučit. Dalším důvodem může být únik iontů lanthanoidů z nanočástic do okolního prostředí, přičemž je známo, že ionty lanthanoidů jsou pro rostliny více toxické, než UCNPs. Výše uvedené výsledky měření hydrodynamického průměru UCNPs potvrdily nestabilitu použitých nanočástic v čase, únik iontů je tedy vysoce pravděpodobný.

5.3 Prostorově rozlišená analýza

5.3.1 Optimalizace parametrů měření

LIBS

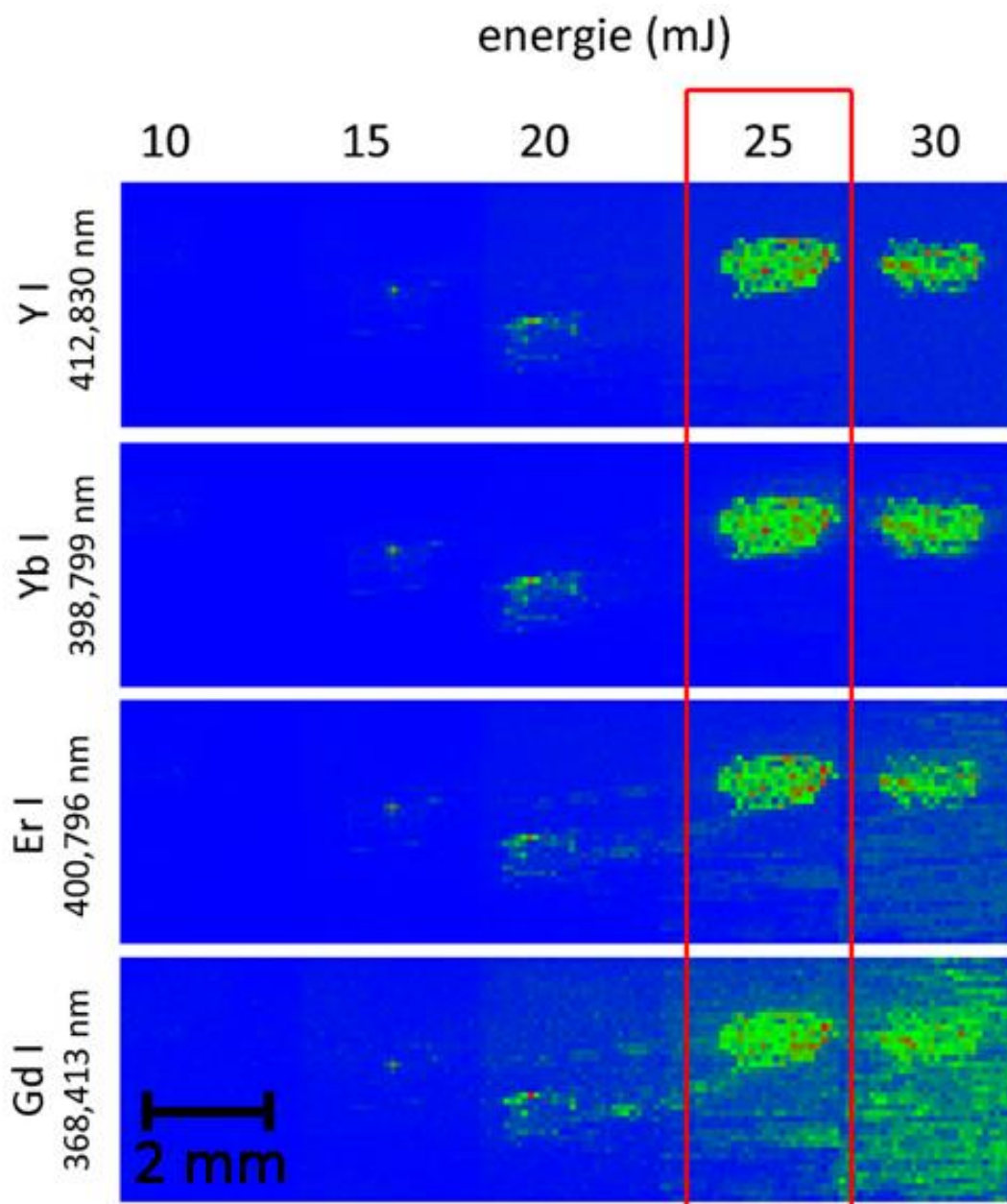
Prvními optimalizovanými parametry LIBS měření byly prostorové rozlišení (limitované velikostí kráteru) a energie laserového pulzu. Velikost kráteru pro různé energie laserového pulzu je znázorněna na Obrázku 21. Mezi 15 až 25 mJ je velikost podobná (od 90 do 100 μm), při 30 mJ se skokově zvyšuje na přibližně 200 μm . Z velikosti a tvaru kráterů vyplývá, že optimální prostorové rozlišení je 100 μm . Pro určení optimální energie byla provedena dodatečná měření, popsána níže.

velikost kráteru pro různé energie laserového pulsu (mJ)



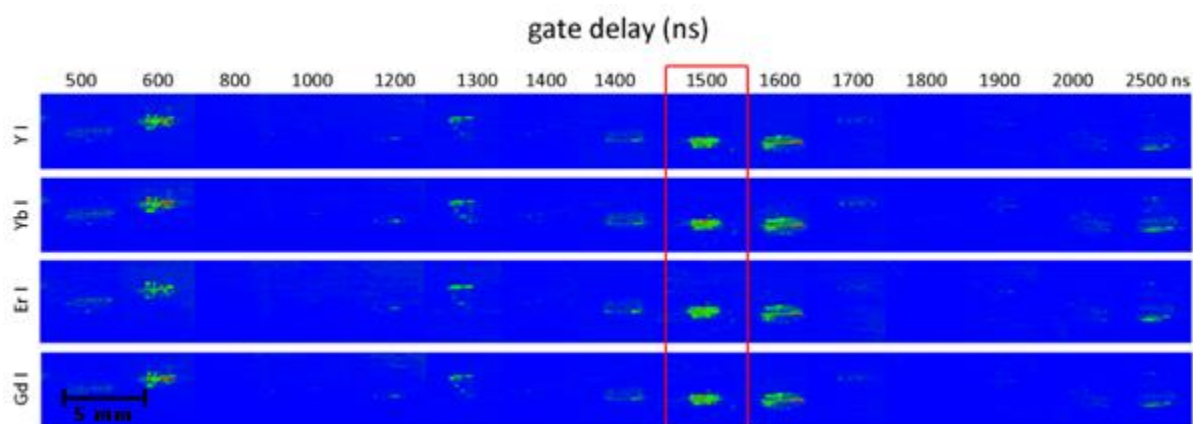
Obrázek 21: Velikost kráteru pro různé energie laserového pulsu, červeně je označena energie laserového pulsu vybraná pro další měření

Kvůli podobným výsledkům velikosti kráteru pro několik energií byly pro vyhodnocení mapovány zaschlé kapky směsi chloridů pro všechny výše uvedené energie s krokem 100 μm. Výsledky tohoto měření jsou znázorněny na Obrázku 22. Pro všechny sledované prvky jsou vykresleny LIBS mapy, ze kterých je patrné, že energie 10, 15 a 20 mJ jsou nedostatečné. Optimální signál je získán při 25 mJ, při 30 mJ dochází kromě nárůstu signálu i ke zvyšování signálu z pozadí. Pro další měření tedy byla zvolena energie 25 mJ.



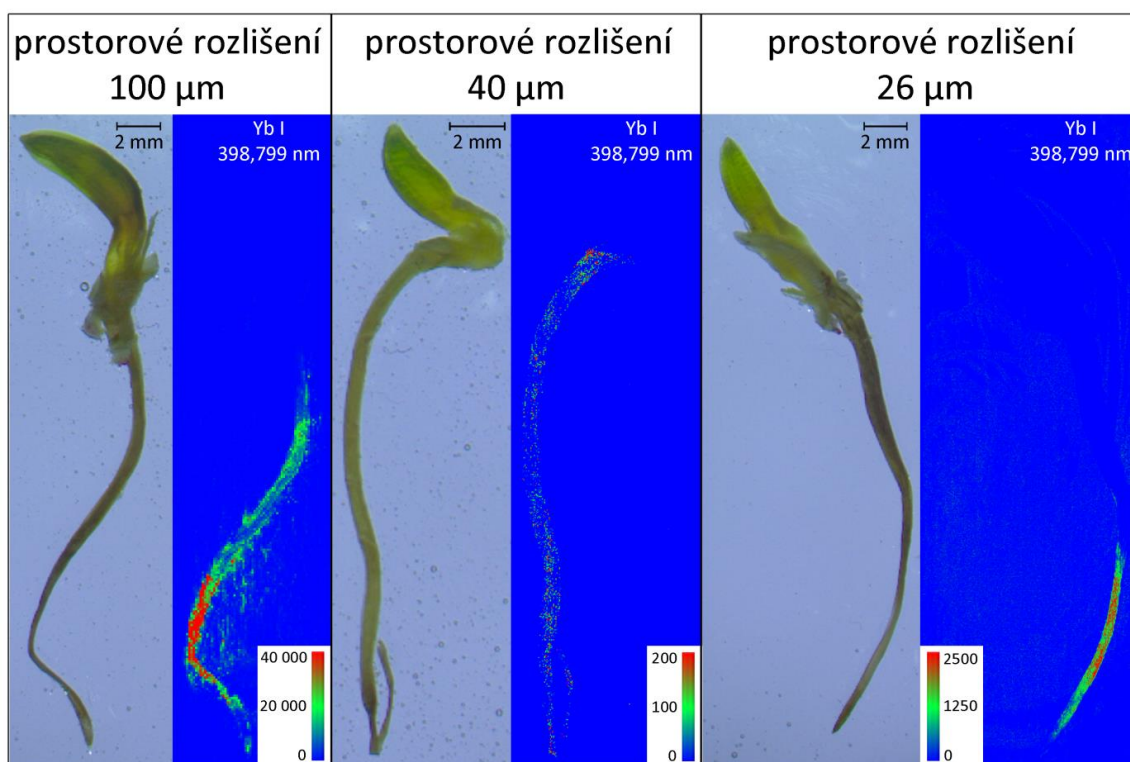
Obrázek 22: Vykreslená mapa kapky pro různé energie laserového pulzu, červeně je označena energie laserového pulzu zvolená pro další měření

Dalším parametrem pro optimalizaci LIBS měření byl GD. Pro výběr optimálního GD byly naměřeny vysušené kapky směsi chloridů s optimalizovaným prostorovým rozlišením (100 μm) a energií laserového pulzu (25 mJ). Průměrná hodnota signálu byla vypočtena jako podíl akumulované intenzity yttria a počtu bodů kapky. Dále byly z měření vykresleny prvkové mapy yttria, ytterbia, erbia a gadolinia, které jsou znázorněny na Obrázku 23. Na základě získaných výsledků byl pro další LIBS měření zvolen GD 1500 ns.



Obrázek 23: Vykreslené kapky yttria (Y I 412,830 nm), ytterbia (Yb I 398,799 nm), erbia (Er I 400,796 nm) a gadolinia (Gd I 368,413 nm) pro různé GD, červeně je označen GD zvolený pro další měření

Na Obrázku 24 je porovnání všech otestovaných sestav, přičemž každá z nich se lišila především možným krokem měření a energií laserového pulzu. Sestava s prostorovým rozlišením 100 μm byla použita pro měření LIBS. Pro analýzu μLIBS byly otestovány dvě experimentální sestavy, umožňující prostorové rozlišení 40 μm (sestava Discovery s filtrem omezujícím průměr laserového paprsku) s a 26 μm (sestava FireFly). Uspořádání s krokem 40 μm vykazovalo nižší citlivost. Pro další μLIBS měření byla proto zvolena sestava FireFly s krokem 26 μm .



Obrázek 24: Porovnání výsledků měření pro vzorek kukuřice seté exponované směsi chloridů v koncentraci 25 mg Y/l pro emisní čáru ytterbia Yb I 398,799 nm, zleva prostorové rozlišení 100 μm (systém Discovery), 40 μm (μLIBS úprava systému Discovery), 26 μm (systém FireFly)

μLIBS

Pro měření μ LIBS nebylo kvůli fixní energii laseru (1 mJ) a krátké době života plazmatu možné optimalizovat energii laserového pulzu, ani GD, který je fixně daný na hodnotě 0 ns. Velikost kroku měření byla přizpůsobena velikosti kráteru (přibližně 20 μ m) vznikajícího po dopadu laserového pulzu.

5.3.2 Prostorově rozlišená analýza rostlin

Prostorová analýza sestávala postupně ze dvou typů měření – foton-upkonverzní mikroskenování a měření LIBS/ μ LIBS. Pro znázornění výsledků foton-upkonverzního mikroskenování byla pro přehlednost každému typu nanočástic přiřazena barva (Tabulka 12), která se mezi vzorky nemění. U koexpozic je navíc pro přehlednost zobrazen i překryv nanočástic ve vzorku, kde se vybrané barvy překrývají. Protože metodami LIBS a μ LIBS se nedetekovaly různé typy UCNPs, ale pouze jednotlivé prvky, byla pro všechny sledované prvky zvolena stejná barevná škála.

Tabulka 12: Barevné označení jednotlivých typů nanočástic pro foton-upkonverzní mikroskenování.

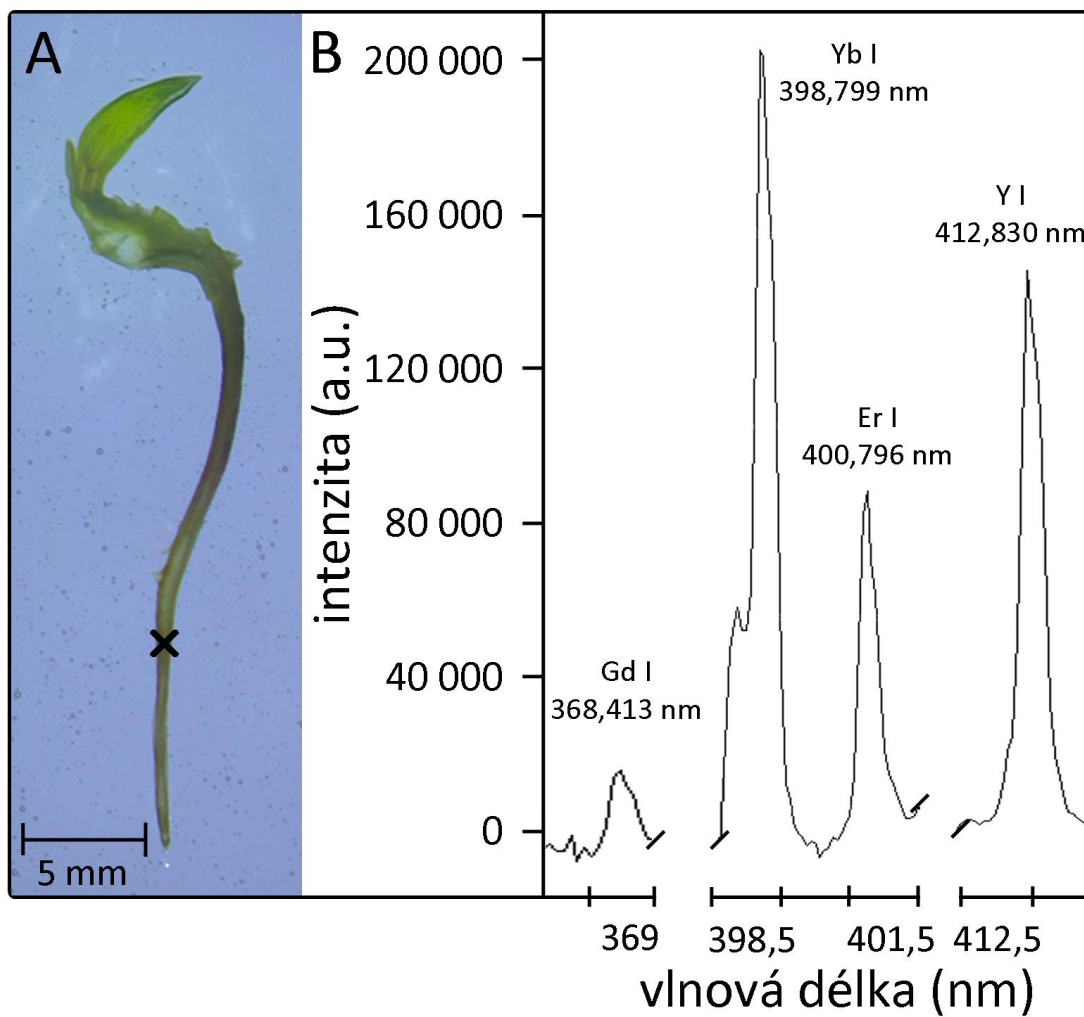
typ nanočástic	barva
UCNPs-26	modrá
UCNPs-29	červená
UCNPs-58	zelená

Metodou LIBS (prostorové rozlišení 100 μ m) byly změřeny distribuce kontaminantů u zástupců rostlin ze všech expozičních skupin. V rámci sekce výsledků v této diplomové práci jsou ukázány pouze vybrané příklady, konkrétně rostliny exponované disperzím UCNPs a roztoku směsi chloridů v koncentraci 5 mg Y/l a jeden příklad rostliny exponované UCNPs v nominální koncentraci 0,5 mg Y/l. Metodou LIBS byla analyzována i rostlina z kontrolní skupiny, dle očekávání v tomto vzorku nebyl detekován signál žádného z lanthanoidů.

Dále jsou v práci uvedeny výsledky měření získané metodou μ LIBS, u kterých se podařilo dosáhnout téměř čtyřikrát lepšího prostorového rozlišení (26 μ m), avšak za cenu snížené citlivosti. Metodou μ LIBS byly analyzovány vzorky exponované pouze dvěma nejvyšším nominálními koncentracím (5 a 25 mg Y/l) a v rámci této práce jsou jako příklad výsledků uvedeny rostliny exponované směsím UCNPs: UCNPs-26+29 a UCNPs-26+58 v koncentraci 25 mg Y/l. V rostlinách se podařilo detekovat pouze dva prvky nejvíce zastoupené ve všech typech UCNPs: yttrium a ytterbium. Erbium a gadolinium se detekovat nepodařilo. Metodou μ LIBS se proto nedá rozlišit mezi jednotlivými typy UCNPs a v rámci této práce je tedy tato metoda vhodná pouze pro detekci UCNPs v samostatné expozici.

Příklad naměřeného emisního spektra z rostliny exponované UCNPs-26+29 v koncentraci 25 mg Y/l pro metodu LIBS je uveden na Obrázku 25. Jsou zde rozeznatelné spektrální čáry všech sledovaných RRE (Gd I 368,413 nm, Yb I 398,799 nm, Er I 400,796 nm, Y I 412,830 nm).

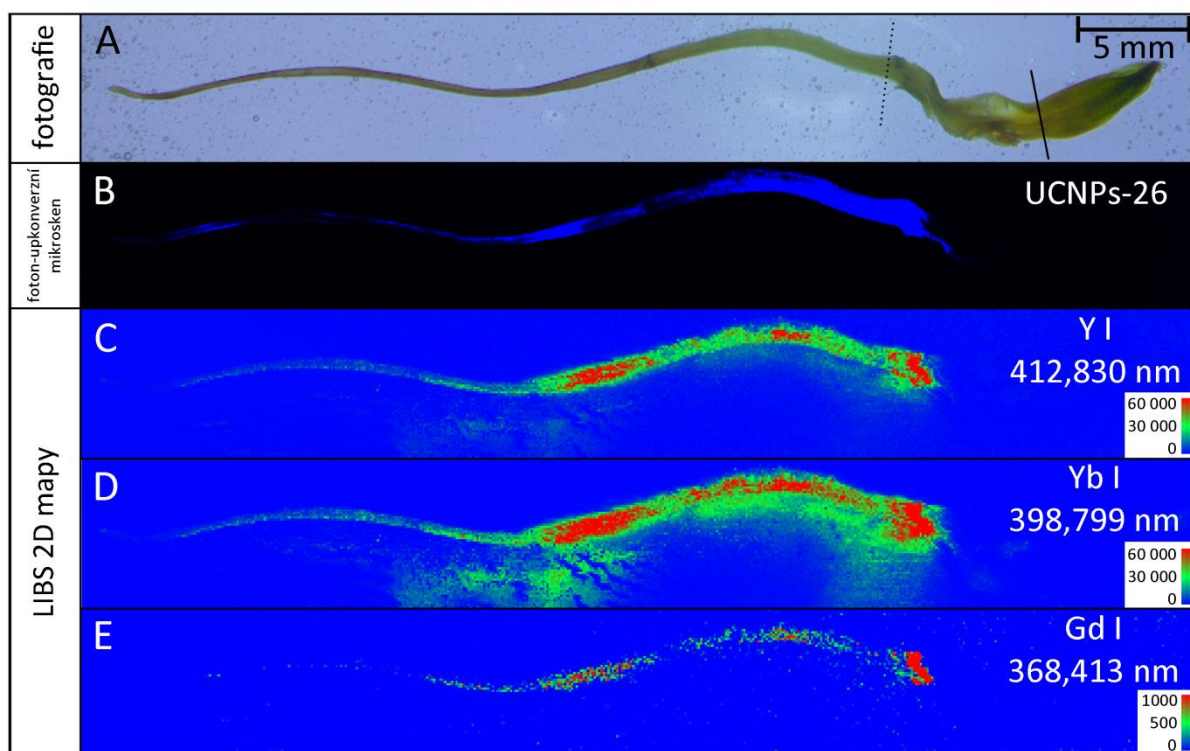
Prvkové mapy metod LIBS i μ LIBS jsou doplněny o foton-upkonverzní mikroskeny. Protože je metoda nedestruktivní, předcházela měření metodami LIBS a μ LIBS. Metodou foton-upkonverzního mikroskenování (prostorové rozlišení 40 μ m) byli analyzováni zástupci rostlin exponovaných UCNPs ve všech zvolených typech a koncentracích.



Obrázek 25: (A) Fotografie rostliny exponované UCNPs-26+29 v nominální koncentraci 25 mg Y/l, (B) emisní čáry gadolinia (Gd I 368,413 nm), ytterbia (Yb I 398,799 nm), erbia (Er I 400,796 nm) a yttria (Y I 412,830 nm) získané metodou LIBS, na ose x je znázorněna intenzita spektrálních čar (a.u.), na ose y vlnová délka (nm). Černým křížkem je označena poloha spektra v rostlině.

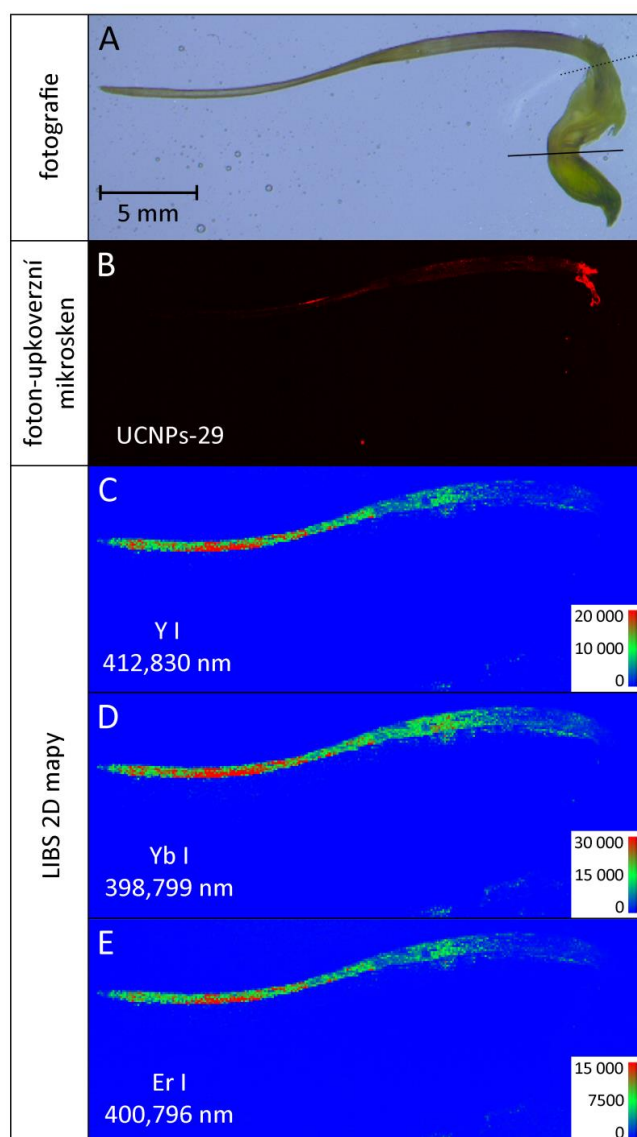
Mapování rostlin metodou LIBS

Mapy distribuce UCNPs z foton-upkonverzního mikroskenu a mapy distribuce prvků yttria (Y I 412,830 nm), ytterbia (Yb I 398,799 nm) a gadolinia (Gd I 368,413 nm) získané metodou LIBS v rostlině *Z. mays* exponované UCNPs-26 o nominální koncentraci yttria 5 mg/l jsou znázorněny na Obrázku 26. Rozměr map je $49,6 \times 6,5$ mm, LIBS mapy sestávaly z 496×63 bodů. Bioakumulace UCNPs-26 převládala v kořeni, v rámci podzemní části rostliny docházelo k translokaci do koleoptile, do nadzemní části rostliny (epikotylu) UCNPs translokovány nebyly. U vzorků exponovaných v nominální koncentraci 25 mg Y/l byla pozorována translokace UCNPs-26 do nadzemní části rostliny (epikotylu). V koncentraci 0,5 mg Y/l nebyla metodou foton-upkonverzního skenování potvrzena přítomnost UCNPs-26 v rostlině. Metodou LIBS byla potvrzena přítomnost yttria, ytterbia a gadolinia v rámci kořene. Translokace do koleoptile a nadzemní části rostliny v koncentraci 0,5 mg Y/l neprobíhala.



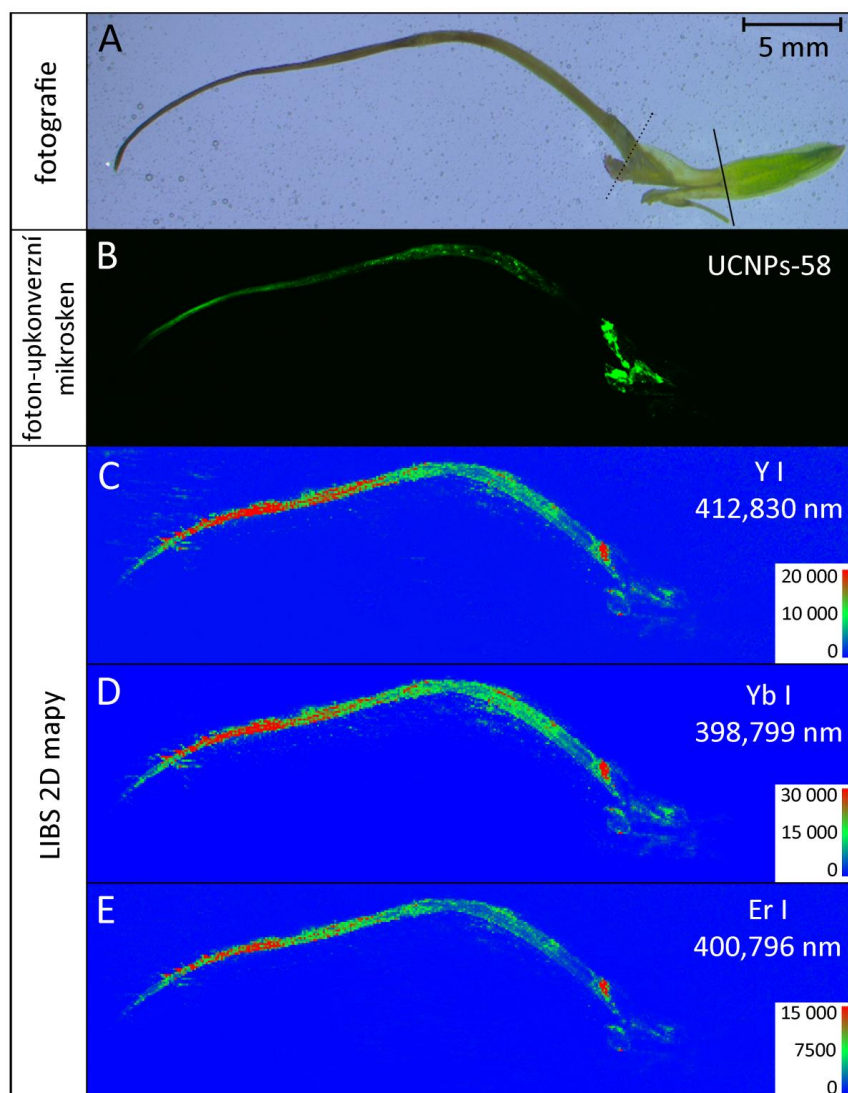
Obrázek 26: (A) Fotografie kukuřice seté exponované disperzi UCNPs-26 v koncentraci 5 mg Y/l, plná čára odděluje podzemní a nadzemní část rostliny, přerušovaná čára rozděljuje kořen a koleoptile (B) foton-upkonverzní mikrosken UCNPs-26 (modrá barva), LIBS mapy distribuce (C) yttria (Y I 412,830 nm), (D) ytterbia (Yb I 398,799 nm) a (E) gadolinia (Gd I 368,413 nm). Barevná stupnice znázorňuje intenzitu emisních čar (a.u.).

Mapy distribuce UCNPů z foton-upkonverzního mikroskenování a mapy distribuce prvků yttria (Y I 412,830 nm), ytterbia (Yb I 398,799 nm) a erbia (Er I 400,796 nm) získané metodou LIBS v rostlině *Z. mays* exponované UCNP-29 o nominální koncentraci yttria 5 mg/l jsou znázorněny na Obrázku 27. Rozměr map je 29,0 × 11,6 mm, LIBS mapy sestávaly z 290 × 116 bodů. Bioakumulace UCNP-29 převládala v kořeni, v rámci podzemní části rostliny docházelo k translokaci do koleoptile a v malé míře i do nadzemní části rostliny. U vzorků exponovaných v nominální koncentraci 25 mg Y/l byla opět pozorována translokace UCNP-29 do koleoptile a mírně i do nadzemní části rostliny (epikotylu). V koncentraci 0,5 mg Y/l nebyla metodou foton-upkonverzního skenování potvrzena přítomnost UCNP-26 v rostlině. Metodou LIBS byla potvrzena přítomnost yttria, ytterbia a erbia v rámci kořene. Translokace do koleoptile a nadzemní části rostliny v koncentraci 0,5 mg Y/l neprobíhala.



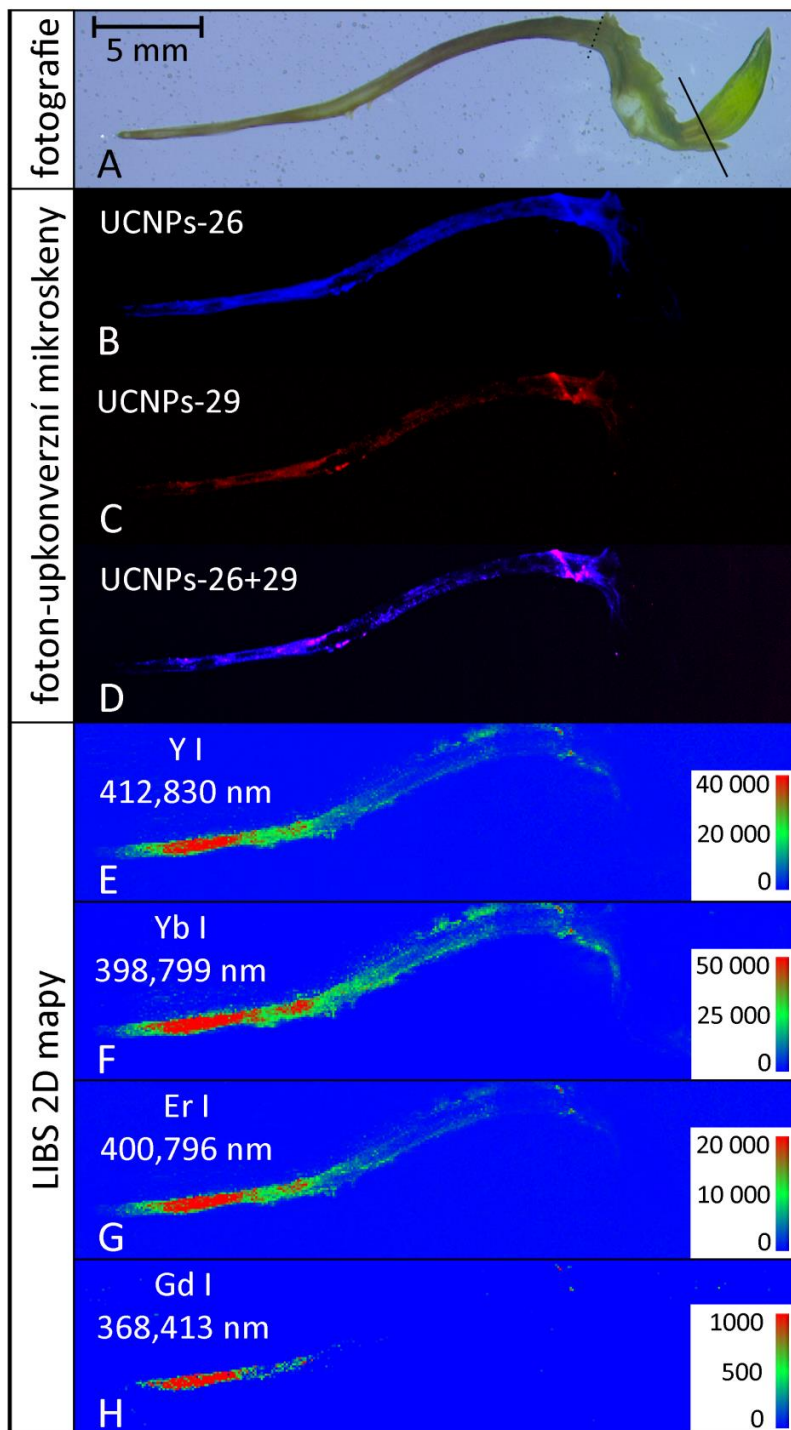
Obrázek 27: (A) Fotografie kukuřice seté exponované disperzi UCNP-29 v koncentraci 5 mg Y/l, plná čára odděluje podzemní a nadzemní část rostliny, přerušovaná čára rozděljuje kořen a koleoptile (B) foton-upkonverzní mikrosken UCNP-29 (červená barva), LIBS mapy distribuce (C) yttria (Y I 412,830 nm), (D) ytterbia (Yb I 398,799 nm) a (E) erbia (Er I 400,796 nm). Barevná stupnice znázorňuje intenzitu emisních čar (a.u.).

Mapy distribuce UCNPs z foton-upkonverzního mikroskenu a mapy distribuce prvků yttria (Y I 412,830 nm), ytterbia (Yb I 398,799 nm) a erbia (Er I 400,796 nm) získané metodou LIBS v rostlině *Z. mays* exponované UCNPs-58 o nominální koncentraci yttria 5 mg/l jsou znázorněny na Obrázku 28. Rozměr map je 40,2 × 11,2 mm, LIBS mapy sestávaly z 402 × 112 bodů. Bioakumulace UCNPs-58 převládala v kořeni, v rámci podzemní části rostliny docházelo k translokaci do koleoptile, do nadzemní části rostliny k translokaci nedocházelo. U vzorků exponovaných v nominální koncentraci 25 mg Y/l byla opět pozorována translokace UCNPs-58 do koleoptile, do nadzemní části rostliny (epikotylu) už nikoli. V koncentraci 0,5 mg Y/l nebyla metodou foton-upkonverzního skenování potvrzena přítomnost UCNPs-26 v rostlině. Metodou LIBS byla potvrzena přítomnost yttria, ytterbia a erbia v rámci kořene. Translokace do koleoptile a nadzemní části rostliny v koncentraci 0,5 mg Y/l neprobíhala.



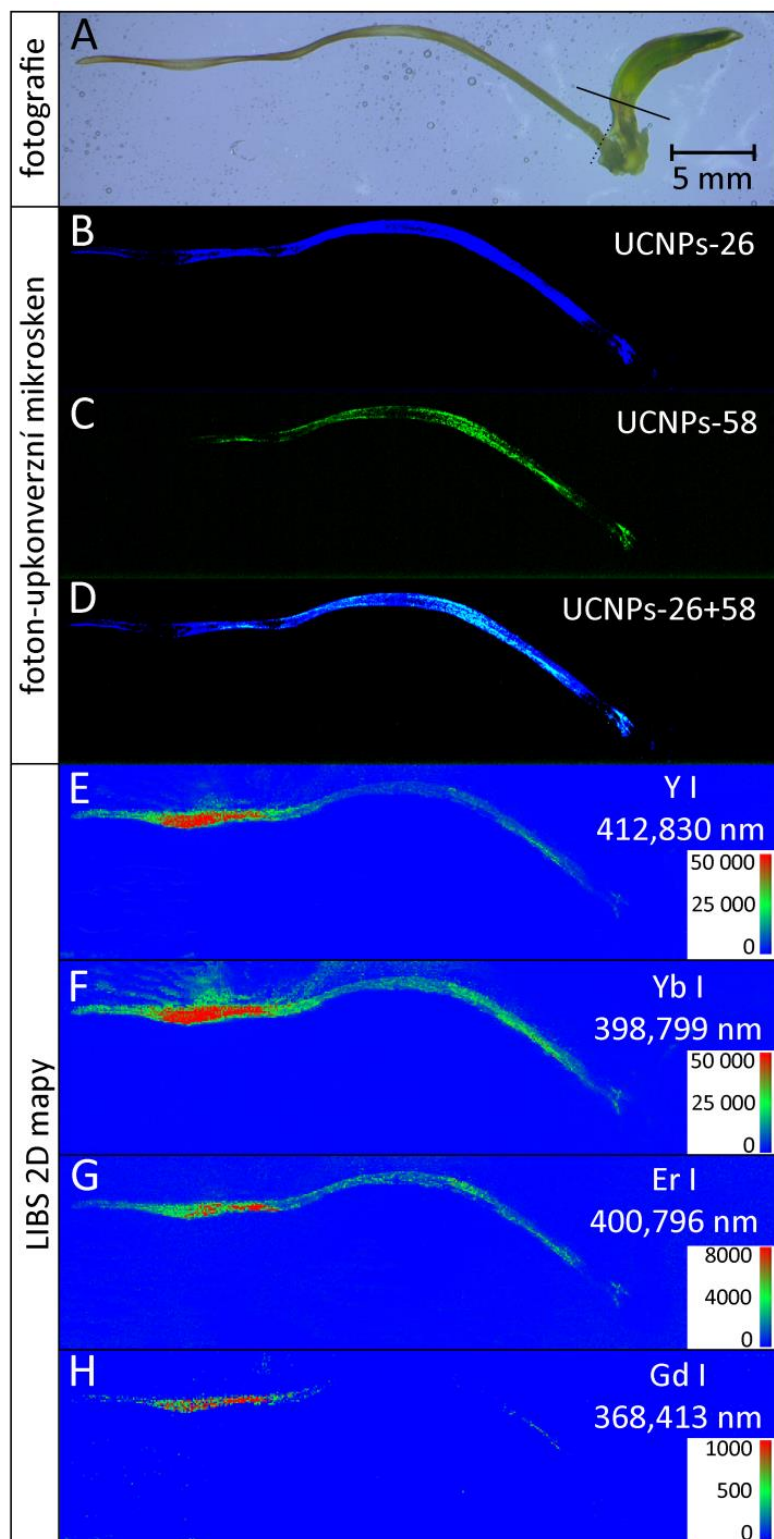
Obrázek 28: (A) Fotografie kukuřice seté exponované disperzi UCNPs-58 v koncentraci 5 mg Y/l, plná čára odděluje podzemní a nadzemní část rostliny, přerušovaná čára rozděljuje kořen a koleoptile (B) foton-upkonverzní mikrosken UCNPs-58 (zelená barva), LIBS mapy distribuce (C) yttria (Y I 412,830 nm), (D) ytterbia (Yb I 398,799 nm) a (E) erbia (Er I 400,796 nm). Barevná stupnice znázorňuje intenzitu emisních čar (a.u.).

Mapy distribuce UCNPs z foton-upkonverzních mikroskenů (modře UCNPs-26, červeně UCNPs-29) a mapy distribuce prvků yttria (Y I 412,830 nm), ytterbia (Yb I 398,799 nm), erbia (Er I 400,796 nm) a gadolinia (Gd I 368,413 nm) získané metodou LIBS v rostlině *Z. mays* exponované UCNPs-26+29 o nominální koncentraci yttria 5 mg/l jsou znázorněny na Obrázku 29. Rozměr map je 34,9 × 8,5 mm, LIBS mapy sestávaly z 349 × 85 bodů. Bioakumulace UCNPs-26 i UCNPs-29 převládala v kořeni, v rámci podzemní části rostliny docházelo k translokaci obou typů UCNPs do koleoptile a v malé míře i do nadzemní části rostliny. U vzorků exponovaných v nominální koncentraci 25 mg Y/l byla opět pozorována translokace UCNPs-26 i UCNPs-29 do koleoptile a mírně i do nadzemní části rostliny (epikotyly). V koncentraci 0,5 mg Y/l nebyla metodou foton-upkonverzního skenování potvrzena přítomnost UCNPs-26 ani UCNPs-29 v rostlině. Metodou LIBS byla potvrzena přítomnost yttria, ytterbia, erbia a gadolinia v rámci kořene. Translokace do koleoptile a nadzemní části rostliny v koncentraci 0,5 mg Y/l neprobíhala.



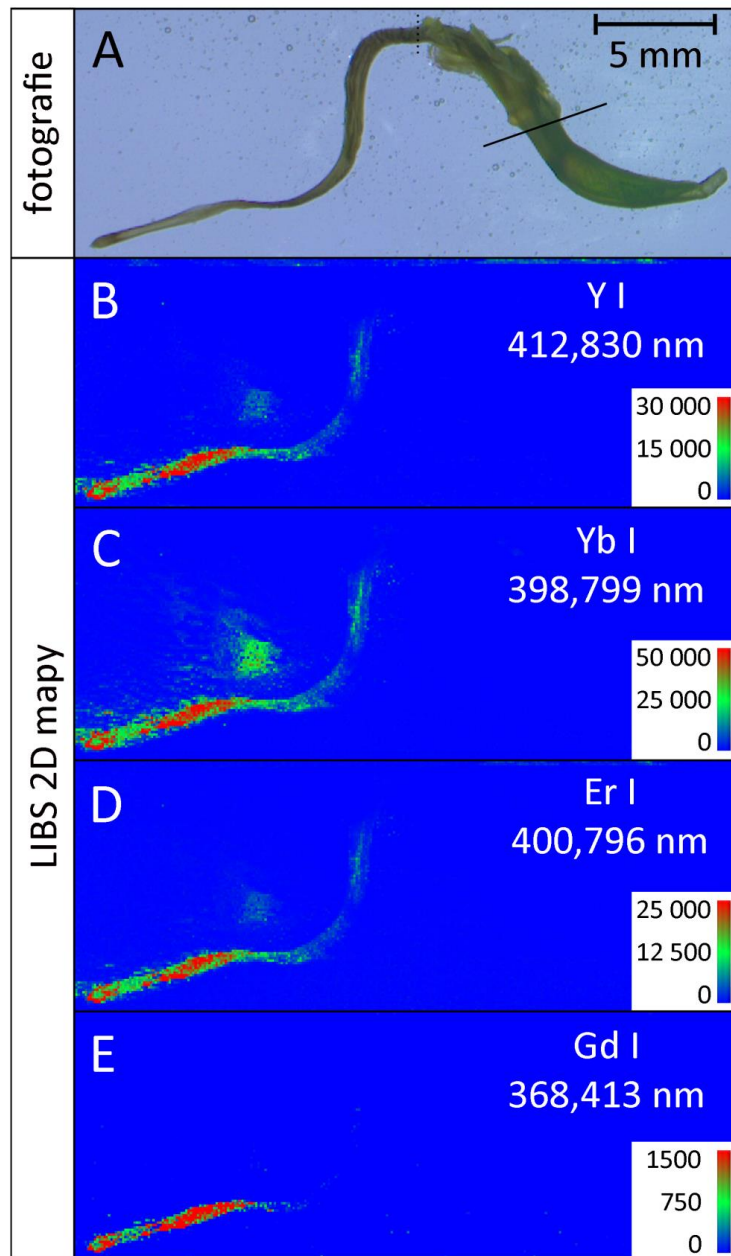
Obrázek 29: (A) Fotografie kukuřice seté exponované disperzi UCNPs-26+29 v koncentraci 5 mg Y/l, plná čára odděluje podzemní a nadzemní část rostliny, přerušovaná čára rozděljuje kořen a koleoptile (B) foton-upkonverzní mikrosken UCNPs-26 (modrá barva), (C) foton-upkonverzní mikrosken UCNPs-29 (červená barva), (D) překryv foton-upkonverzních mikroskenů UCNPs-26+29 (modrá + červená barva). LIBS mapy distribuce (E) yttria (Y I 412,830 nm), (F) ytterbia (Yb I 398,799 nm), (G) erbia (Er I 400,796 nm) a (H) gadolinia (Gd I 368,413 nm). Barevná stupnice znázorňuje intenzitu emisních čar (a.u.).

Mapy distribuce UCNPs z foton-upkonverzních mikroskenů (modře UCNPs-26, zeleně UCNPs-58) a mapy distribuce prvků yttria (Y I 412,830 nm), ytterbia (Yb I 398,799 nm), erbia (Er I 400,796 nm) a gadolinia (Gd I 368,413 nm) získané metodou LIBS v rostlině *Z. mays* exponované UCNPs-26+58 o nominální koncentraci yttria 5 mg/l jsou znázorněny na Obrázku 30. Rozměr map je 44,7 × 11,9 mm, LIBS mapy sestávaly z 447 × 119 bodů. Bioakumulace UCNPs-26 i UCNPs-58 převládala v kořeni, v rámci podzemní části rostliny docházelo k translokaci obou typů UCNPs do koleoptile. V malé míře docházelo k translokaci UCNPs-26 i do nadzemní části rostliny, pro UCNPs-58 nebyla translokace do nadzemní části rostliny pozorována. U vzorků exponovaných v nominální koncentraci 25 mg Y/l byla opět pozorována translokace UCNPs-26 i UCNPs-58 do koleoptile, pro UCNPs-26 mírně i do nadzemní části rostliny (epikotylu). V koncentraci 0,5 mg Y/l nebyla metodou foton-upkonverzního skenování potvrzena přítomnost UCNPs-26 ani UCNPs-58 v rostlině. Metodou LIBS byla potvrzena přítomnost yttria, ytterbia, erbia a gadolinia v rámci kořene. Translokace do koleoptile a nadzemní části rostliny v koncentraci 0,5 mg Y/l neprobíhala.



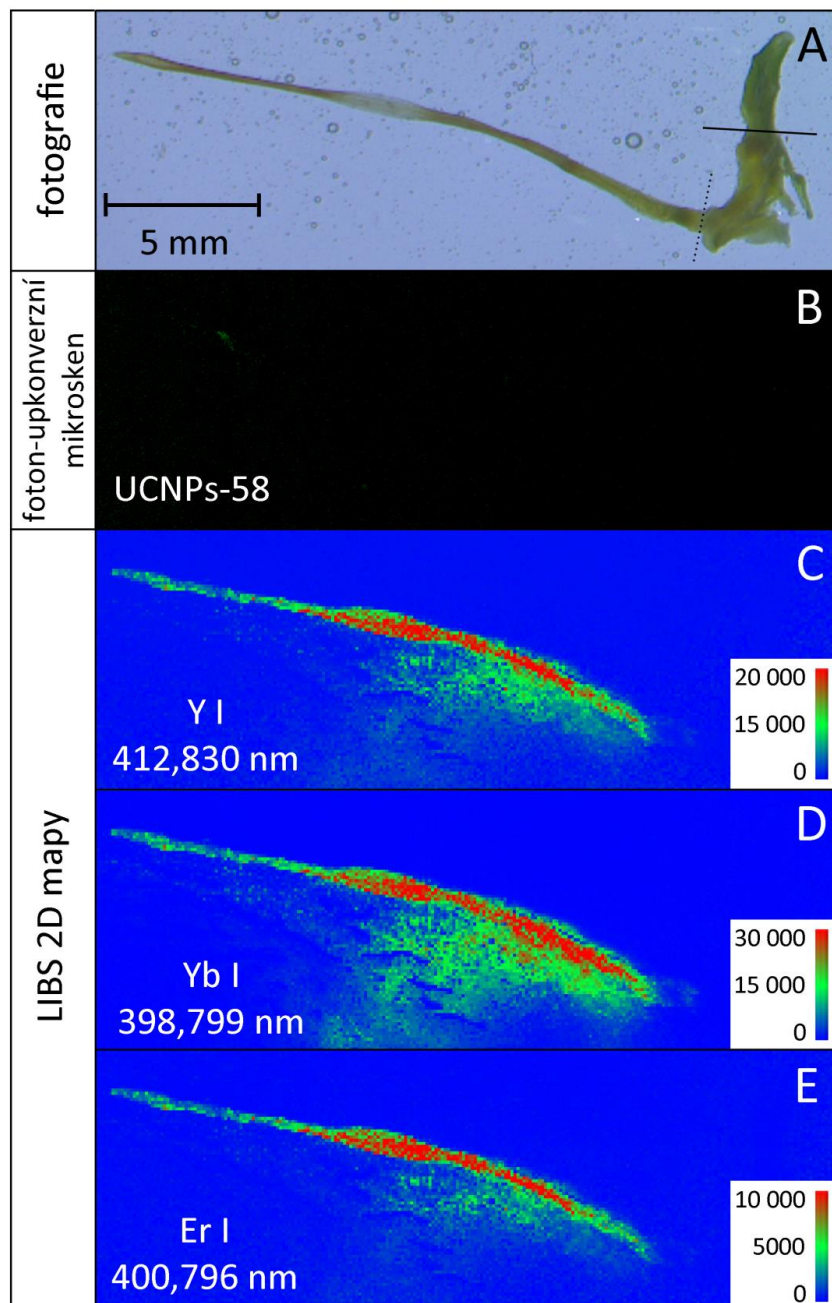
Obrázek 30: (A) Fotografie kukuřice seté exponované disperzi UCNP_s-26+58 v koncentraci 5 mg Y/l, plná čára odděluje podzemní a nadzemní část rostliny, přerušovaná čára rozděljuje kořen a koleoptile (B) foton-upkonverzní mikrosken UCNP_s-26 (modrá barva), (C) foton-upkonverzní mikrosken UCNP_s-58 (zelená barva), (D) překryv foton-upkonverzních mikroskenů UCNP_s-26+58 (modrá + zelená barva). LIBS mapy distribuce (E) yttria (Y I 412,830 nm), (F) ytterbia (Yb I 398,799 nm), (G) erbia (Er I 400,796 nm) a (H) gadolinia (Gd I 368,413 nm). Barevná stupnice znázorňuje intenzitu emisních čar (a.u.)

Mapy distribuce prvků yttria (Y I 412,830 nm), ytterbia (Yb I 398,799 nm), erbia (Er I 400,796 nm) a gadolinia (Gd I 368,413 nm) získané metodou LIBS v rostlině *Z. mays* exponované směsi chloridů o nominální koncentraci yttria 5 mg/l jsou znázorněny na Obrázku 31. Rozměr map je 28,5 × 10,8 mm, LIBS mapy sestávaly z 285 × 108 bodů. Bioakumulace iontů převládala ve spodní části kořene, k translokaci do koleoptile ani do nadzemní části rostliny nedocházelo. U vzorků exponovaných v nominální koncentraci 25 mg Y/l a 0,5 mg Y/l byl trend obdobný, rovněž docházelo k bioakumulaci pouze ve spodní části kořene a translokace do koleoptile ani do nadzemní části rostliny neprobíhala.



Obrázek 31: (A) Fotografie kukuřice seté exponované směsi chloridů v koncentraci 5 mg Y/l, plná čára odděluje podzemní a nadzemní část rostliny, přerušovaná čára rozděljuje kořen a koleoptile, LIBS mapy distribuce (B) yttria (Y I 412,830 nm), (C) ytterbia (Yb I 398,799 nm), (D) erbia (Er I 400,796 nm) a (E) gadolinia (Gd I 368,413 nm). Barevná stupnice znázorňuje intenzitu emisních čar (a.u.).

Příklad mapy distribuce UCNPs z foton-upkonverzního mikroskenu a mapy distribuce prvků yttria (Y I 412,830 nm), ytterbia (Yb I 398,799 nm) a erbia (Er I 400,796 nm) získané metodou LIBS v rostlině *Z. mays* exponované UCNPs-58 o nominální koncentraci yttria 0,5 mg/l jsou znázorněny na Obrázku 32. Rozměr map je 24,4 × 8,4 mm, LIBS mapy sestávaly z 244 × 84 bodů. Bioakumulace UCNPs-58 nebyla foton-upkonverzním skenováním pozorována. Distribuce yttria, ytterbia a erbia převládala v kořeni, k translokaci do koleoptile ani do nadzemní části rostliny nedocházelo.



Obrázek 32: (A) Fotografie kukuřice seté exponované disperzi UCNPs-58 v koncentraci 0,5 mg Y/l, plná čára odděluje podzemní a nadzemní část rostliny, přerušovaná čára rozděljuje kořen a koleoptile (B) foton-upkonverzní mikrosken UCNPs-58 (zelená barva), LIBS mapy distribuce (C) yttria (Y I 412,830 nm), (D) ytterbia (Yb I 398,799 nm) a (E) erbia (Er I 400,796 nm). Barevná stupnice znázorňuje intenzitu emisních čar (a.u.).

Pro nejnižší nominální koncentraci, 0,5 mg Y/l, se podařilo signál detekovat pouze metodou LIBS. Kvůli nízké koncentraci analytu, a tedy i nízkému signálu z emisních čar, byl však výraznější i signál z okolí rostliny způsobený redepozicí rostlinného materiálu. Jelikož se nepodařilo detekovat signál foton-upkonverzním mikroskenováním, UCNPs pravděpodobně nejsou v takto nízké koncentraci stabilní.

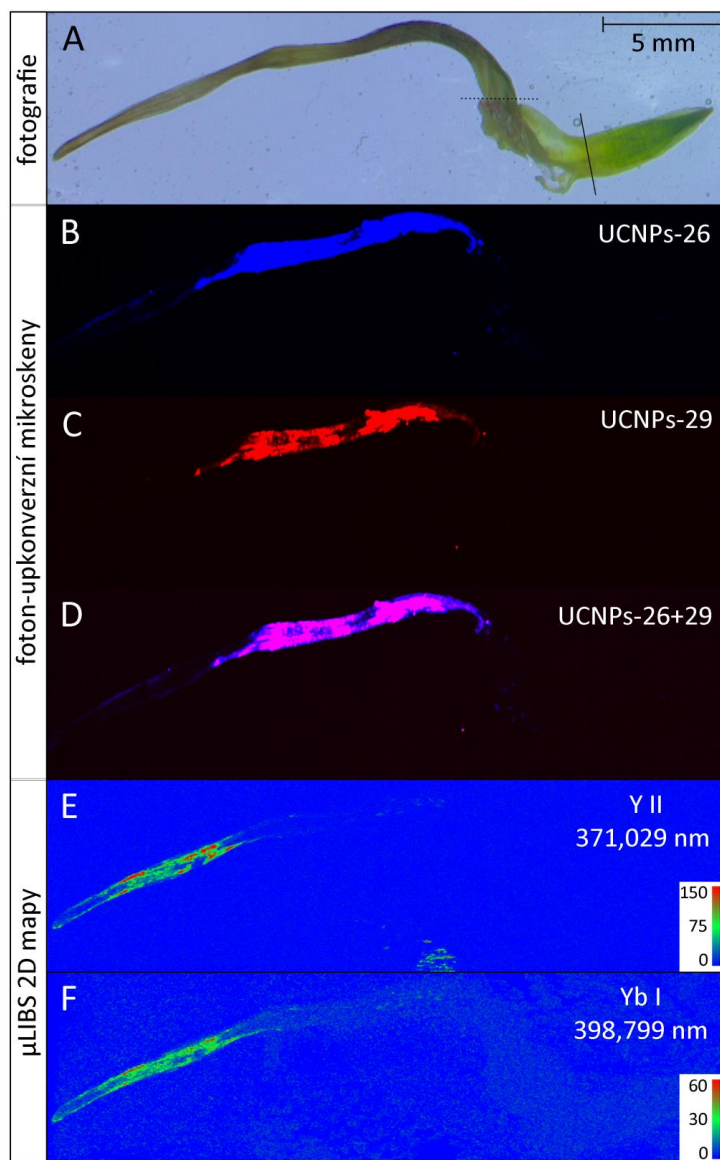
Jak vyplývá z výše uvedených map, všechny typy UCNPs se bioakumulovaly převážně v kořeni. Rovněž byla u všech typů UCNPs pozorována translokace do koleoptile. U UCNPs-26 a UCNPs-29 byla ve dvou nejvyšších testovaných koncentracích (5 a 25 mg Y/l) ve velmi malé míře detekována i translokace do nadzemní části rostliny a to jak pro samostatné expozice, tak i v koexpozicích. Rozložení UCNPs v rámci kořene bylo poměrně rovnoměrné. Z map distribuce různých typů UCNPs vyplývá, že jejich složení nemá na prostorové rozložení prokazatelný vliv. Naproti tomu velikost nanočástic ovlivňuje jejich schopnost translokace, přičemž menší částice pronikají v rostlině dále.

Naopak ionty yttria, ytterbia, erbia a gadolinia z pozitivní kontroly se bioakumulovaly převážně v nejnižší části kořene a nebyla pozorována žádná translokace do koleoptile ani do nadzemní části rostliny.

Preferovaná místa bioakumulace a potenciál pro translokaci UCNPs v rámci rostliny kukuřice seté je pouze v částečné shodě s dostupnou literaturou. Ve studiích od Modlitbové a kol. [11, 25] docházelo k výrazné translokaci UCNPs do stonku a listů rostlin ředkve seté i brukve zelné. V případě brukve zelné docházelo k translokaci do listů až v koncentraci 500 mg UCNPs/l, v nižší koncentraci 50 mg UCNPs/l pronikaly UCNPs pouze do stonku. V případě ředkve seté docházelo k translokaci až do listů v koncentracích 100 a 1000 mg UCNPs/ml. Tento rozdíl může být způsobený několika důvody, především pak druhem testované rostliny, přičemž kukuřice setá je jednoděložná rostlina a ředkev setá a brukev zelná jsou dvouděložné rostliny. Tyto dvě třídy rostlin se liší právě ve stavbě kořene, stonku a xylému rostliny, a tím tedy i v transportu vody a v ní rozpuštěných živin [79]. Výsledky v této práci korespondují s dostupnou literaturou. Například studie od Spielman-Sun a kol. potvrzuje, že u dvouděložných rostlin lociky seté a rajčete jedlého docházelo k translokaci nanočástic s obsahem ceru mnohem dále do těla rostliny, než u jednoděložných rostlin rýže seté a kukuřice seté [85]. Dále se pak v každé studii se lišil druh testovaného typu UCNPs a to jak velikostí, tak složením.

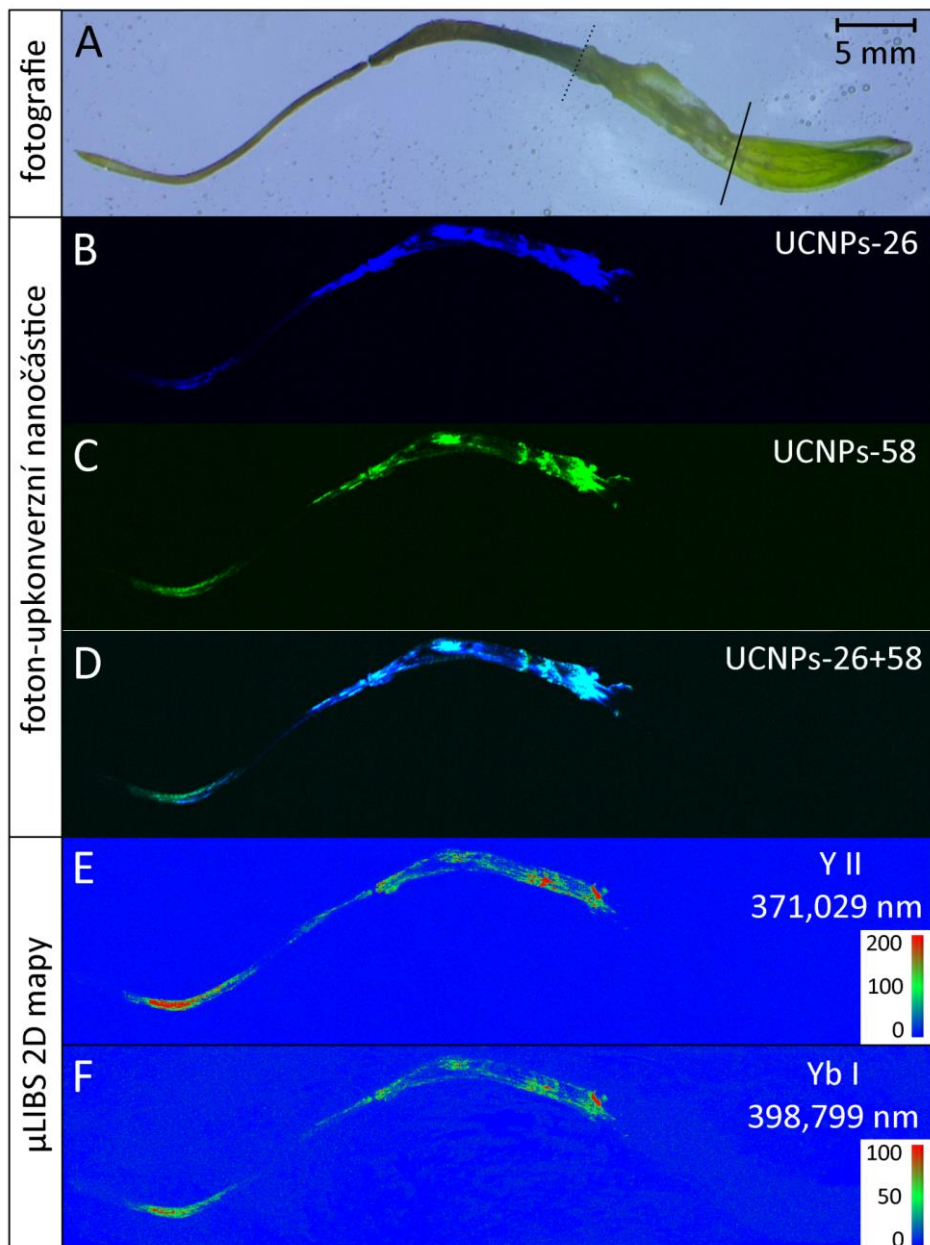
Mapování metodou μ LIBS

Mapy distribuce UCNPů z foton-upkonverzních mikroskenů (modře UCNP-26, červeně UCNP-29) a mapy distribuce prvků yttria (Y II 412,830 nm) a ytterbia (Yb I 398,799 nm), získané metodou μ LIBS v rostlině *Z. mays* exponované UCNP-26+29 o nominální koncentraci yttria 25 mg/l jsou znázorněny na Obrázku 33. Rozměr map je $28,4 \times 7,9$ mm, LIBS mapy sestávaly z $1\,091 \times 304$ bodů. Bioakumulace UCNP-26 i UCNP-29 převládala v kořeni, v rámci podzemní části rostliny docházelo k translokaci obou typů UCNPů do koleoptile a v malé míře i do nadzemní části rostliny.



Obrázek 33: (A) Fotografie kukuřice seté exponované disperzi UCNP-26+29 v koncentraci 25 mg Y/l, plná čára odděluje podzemní a nadzemní část, přerušovaná čára rozděljuje kořen a koleoptile (B) foton-upkonverzní mikrosken UCNP-26 (modrá barva), (C) foton-upkonverzní mikrosken UCNP-29 (červená barva), (D) překryv foton-upkonverzních mikroskenů UCNP-26+29 (modrá + červená barva), μ LIBS mapy distribuce (E) yttria (Y II 371,029 nm) a (F) ytterbia (Yb I 398,799 nm). Barevná stupnice znázorňuje intenzitu emisních čar (a.u.).

Mapy distribuce UCNPů z foton-upkonverzních mikroskenů (modře UCNP-26, zeleně UCNP-58) a mapy distribuce prvků yttria (Y II 412,830 nm) a ytterbia (Yb I 398,799 nm), získané metodou μ LIBS v rostlině *Z. mays* exponované UCNP-26+29 o nominální koncentraci yttria 25 mg/l jsou znázorněny na Obrázku 34. Rozměr map je 35,5 × 8,4 mm, LIBS mapy sestávaly z 1 366 × 322 bodů. Bioakumulace UCNP-26 i UCNP-58 převládala v kořeni, v rámci podzemní části rostliny docházelo k translokaci obou typů UCNPů do koleoptile. V malé míře docházelo i k translokaci UCNP-26 do nadzemní části rostliny.



Obrázek 34: (A) Fotografie kukuřice seté exponované disperzi UCNP-26+58 v koncentraci 25 mg Y/l, plná čára odděluje podzemní a nadzemní část, přerušovaná čára rozděljuje kořen a koleoptile (B) foton-upkonverzní mikrosken UCNP-26 (modrá barva), (C) foton-upkonverzní mikrosken UCNP-58 (zelená barva), (D) překryv foton-upkonverzních mikroskenů UCNP-26+58 (modrá + zelená barva), μ LIBS mapy distribuce (E) yttria (Y II 371,029 nm) a (F) ytterbia (Yb I 398,799 nm). Barevná stupnice znázorňuje intenzitu emisních čar (a.u.).

V této práci byla metoda μ LIBS použita jako doplňková analýza k metodě LIBS, která dokáže poskytnout podrobnější informace o prostorovém rozlišení analytu v rostlině. Metodou μ LIBS bylo stanoveno prostorové rozložení yttria a ytterbia v rostlinách, které korespondovalo s výsledky z měření metodou LIBS. Poprvé se podařilo analyzovat celé rostliny (vzorky o velikosti 2,2–7,9 cm²) s vysokým prostorovým rozlišením 26 μ m. Dosavadní μ LIBS měření, která probíhala s prostorovým rozlišením 25 μ m, vždy analyzovala pouze vybrané části rostlin (kořenová čepička, přechod mezi podzemní a nadzemní částí rostliny) [78]. Rovněž se podařilo sestavit doposud největší LIBS mapy (1 166 725 pixelů) rostlinných vzorků, přičemž v rámci této práce byla ukázána mapa s největším počtem pixelů na Obrázku 34 (439 852 pixelů) [1].

6 ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo vyhodnocení toxicity, příjmu, translokace a bioakumulace třech druhů foton-upkonverzních nanočástic ve třech nominálních koncentracích (0,5; 5 a 25 mg Y/l) v modelové rostlině kukuřici seté. Jako pozitivní kontrola sloužila směs chloridů yttritého, ytterbitého, erbitého, gadolinitého a thulitého v korespondujících koncentracích. Dále byl zkoumán vliv složení a velikosti UCNPs na prostorové rozložení v rámci rostliny v rámci dvou koexpozičních (UCNPs-26+29 testovala vliv složení, UCNPs-26+58 vliv velikosti UCNPs na biodistribuci). Test toxicity trval sedm dní, a po této době byla zhodnocena mortalita rostlin a změřeny délky rostlin a jejich částí (podzemní a nadzemní část). Vysušené rostliny byly upevněny do epoxidové pryskyřice a prostorové rozložení analytu bylo stavěno metodami foton-upkonverzního mikroskenování, LIBS a μ LIBS. Toxicita byla vyhodnocena na základě vybraných makroskopických endpointů (mortalita, délka podzemní části, nadzemní části a celé rostliny).

Byla prokázána toxicita všech testovaných typů UCNPs pro modelovou rostlinu kukuřice seté ve všech testovaných koncentracích v testu toxicity trvajícím sedm dní. Prostorové rozložení UCNPs bylo stanoveno nedestruktivní metodou foton-upkonverzního mikroskenování s prostorovým rozlišením 40 μ m. Přítomnost prvků yttria, ytterbia, erbia a gadolinia byla potvrzena metodami LIBS (s prostorovým rozlišením 100 μ m) a μ LIBS (s prostorovým rozlišením 26 μ m). Jelikož získané foton-upkonverzní mikroskeny UCNPs odpovídaly mapám distribuce jednotlivých prvků, bylo možné potvrdit, že prvky detekované metodou LIBS/ μ LIBS byly ve formě nanočástic. Nicméně, v rostlinách exponovaných nejnižší testované koncentraci (0,5 mg Y/l) nebyly technikou foton-upkonverzního mikroskenování UCNPs detekovatelné. Signál z prvků (yttrium a ytterbium) se však podařilo získat technikami LIBS a μ LIBS, tyto prvky tak nebyly v rostlinách obsaženy ve formě UCNPs ale ve formě iontů.

Pro všechny druhy UCNPs i směs chloridů probíhala bioakumulace převážně v podzemní části (kořen nebo koleoptile), translokace do nadzemní části rostliny byla minimální a byla detekována pouze metodou foton-upkonverzního mikroskenování pro expoziční UCNPs-26, UCNPs-29, UCNPs-26+29 a UCNPs-26+58 (velikost částic 25,8 a 28,7 nm) v koncentracích 5 a 25 mg Y/l. Složení UCNPs (dopanty erbium nebo gadolinium a thulium) nemělo na distribuci v rostlině žádný vliv. V této práci se také poprvé podařilo analyzovat celou rostlinu metodou μ LIBS s vysokým prostorovým rozlišením.

Kombinace metod LIBS/ μ LIBS a foton-upkonverzního mikroskenování přináší při analýze prostorového rozložení UCNPs výrazné výhody. Metody se vzájemně doplňují, zatímco LIBS poskytuje informaci o distribuci prvků, foton-upkonverzní mikroskenování informuje o formě, v jaké se prvek vyskytuje. Obě metody jsou rychlé, schopné analyzovat poměrně velké vzorky (v řádu jednotek cm^2) s dobrým prostorovým rozlišením a vyžadují stejnou přípravu vzorků. Spojením těchto metod se prohlubuje informace, kterou jsme o vzorku schopni získat, proto je pravděpodobné jejich společné využití pro analýzu i jiných biologických vzorků v budoucnosti.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MODLITBOVÁ, Pavlína, Pavel POŘÍZKA a Jozef KAISER. Laser-induced breakdown spectroscopy as a promising tool in the elemental bioimaging of plant tissues. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **122**, 115729. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.115729
- [2] DAVID, A. Cremers a J. Radziemski LEON. *History and Fundamentals of LIBS*. 2006. ISBN 9780511541261.
- [3] KRAMIDA, A., Yu RALCHENKO a J. READER. NIST Atomic Spectra Database (version 5.5.1). *National Institute of Standards and Technology* [online]. 2017. Dostupné z: <https://physics.nist.gov/asd>
- [4] NOVOTNÝ, Karel, Jozef KAISER, Aleš HRDLIČKA, Radomír MALINA, Tomáš VÉMOLA, David PROCHAZKA, Jan NOVOTNÝ a Viktor KANICKÝ. Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS). 2010, 280–285.
- [5] COTE, Kristen. *Study of micro-laser-induced breakdown spectroscopy (uLIBS) for applications in planetary exploration*. [online]. B.m., 2018. York University. Dostupné z: doi:10.13140/RG.2.2.13726.59201
- [6] THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. Bremsstrahlung. *Encyclopaedia Britannica* [online]. 2018. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/bremsstrahlung>
- [7] CHOI, Sung-Chul, Myoung-Kyu OH, Yonghoon LEE, Sungmo NAM, Do-Kyeong KO a Jongmin LEE. Dynamic effects of a pre-ablation spark in the orthogonal dual-pulse laser induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2009, **64**(5), 427–435. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2009.05.008
- [8] PROCHAZKA, David, Pavel POŘÍZKA, Jan NOVOTNÝ, Aleš HRDLIČKA, Karel NOVOTNÝ, Petr ŠPERKA a Jozef KAISER. Triple-pulse LIBS: laser-induced breakdown spectroscopy signal enhancement by combination of pre-ablation and re-heating laser pulses. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2020, **35**(2), 293–300. ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi:10.1039/C9JA00323A
- [9] BUSSER, Benoit, Samuel MONCAYO, Jean Luc COLL, Lucie SANCEY a Vincent MOTTO-ROS. Elemental imaging using laser-induced breakdown spectroscopy: A new and promising approach for biological and medical applications. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2018, **358**, 70–79. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2017.12.006
- [10] FORTES, Francisco J., Javier MOROS, Patricia LUCENA, Luisa M. CABALÍN a J. Javier LASERNA. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Analytical Chemistry* [online]. 2013, **85**(2), 640–669. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac303220r
- [11] MODLITBOVÁ, Pavlína, Sára STRÍTEŽSKÁ, Antonín HLAVÁČEK, David PROCHAZKA, Pavel POŘÍZKA a Jozef KAISER. Laser-induced breakdown spectroscopy as a straightforward bioimaging tool for plant biologists; the case study for assessment of photon-upconversion nanoparticles in Brassica oleracea L. plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2021, **214**, 112113. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112113
- [12] JOLIVET, L., M. LEPRINCE, S. MONCAYO, L. SORBIER, C.-P. LIENEMANN a V. MOTTO-ROS. Review of the recent advances and applications of LIBS-based imaging. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2019, **151**(November 2018), 41–53. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2018.11.008
- [13] LIMBECK, A., L. BRUNNBAUER, H. LOHNINGER, P. POŘÍZKA, P.

- MODLITBOVÁ, J. KAISER, P. JANOVSZKY, A. KÉRI a G. GALBÁCS. Methodology and applications of elemental mapping by laser induced breakdown spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2021, **1147**, 72–98. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2020.12.054
- [14] NOVOTNÝ, J., M. BRADA, M. PETRILAK, D. PROCHAZKA, K. NOVOTNÝ, A. HRDLIČKA a J. KAISER. A versatile interaction chamber for laser-based spectroscopic applications, with the emphasis on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2014, **101**, 149–154. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2014.08.004
- [15] RIFAI, Kheireddine, François DOUCET, Lütfü ÖZCAN a François VIDAL. LIBS core imaging at kHz speed: Paving the way for real-time geochemical applications. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2018, **150**, 43–48. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2018.10.007
- [16] ZHAO, Chunjiang, Daming DONG, Xiaofan DU a Wengang ZHENG. In-Field, In Situ, and In Vivo 3-Dimensional Elemental Mapping for Plant Tissue and Soil Analysis Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Sensors* [online]. 2016, **16**(10), 1764. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s16101764
- [17] KRAJCAROVÁ, L., K. NOVOTNÝ, M. KUMMEROVÁ, J. DUBOVÁ, V. GLOSER a J. KAISER. Mapping of the spatial distribution of silver nanoparticles in root tissues of *Vicia faba* by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). *Talanta* [online]. 2017, **173**(January), 28–35. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2017.05.055
- [18] BECKER, J. Sabine, Andreas MATUSCH a Bei WU. Bioimaging mass spectrometry of trace elements – recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2014, **835**, 1–18. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2014.04.048
- [19] ZHAO, Fang-Jie, Katie L. MOORE, Enzo LOMBI a Yong-Guan ZHU. Imaging element distribution and speciation in plant cells. *Trends in Plant Science* [online]. 2014, **19**(3), 183–192. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2013.12.001
- [20] THYSSEN, G. M., M. HOLTKAMP, H. KAULFÜRST-SOBOLL, C. A. WEHE, M. SPERLING, A. VON SCHAEWEN a U. KARST. Elemental bioimaging by means of LA-ICP-OES: investigation of the calcium, sodium and potassium distribution in tobacco plant stems and leaf petioles. *Metallomics* [online]. 2017, **9**(6), 676–684. ISSN 1756-5901. Dostupné z: doi:10.1039/C7MT00003K
- [21] VAN DER ENT, Antony, Wojciech J. PRZYBYŁOWICZ, Martin D. DE JONGE, Hugh H. HARRIS, Chris G. RYAN, Grzegorz TYLKO, David J. PATERSON, Alban D. BARNABAS, Peter M. KOPITKE a Jolanta MESJASZ-PRZYBYŁOWICZ. X-ray elemental mapping techniques for elucidating the ecophysiology of hyperaccumulator plants. *New Phytologist* [online]. 2018, **218**(2), 432–452. ISSN 0028646X. Dostupné z: doi:10.1111/nph.14810
- [22] FÄLTHAMMAR, Carl-Gunne. *The Fourth State of Matter, An Introduction to the Physics of Plasma* [online]. 1992. ISSN 0263-0346. Dostupné z: doi:10.1017/S026303460000433X
- [23] ČMELÍK, Jiří, Pavlína HÁJKOVÁ a Petr KOUTNÍK. *Pokročilé laboratorní metody* [online]. Ústí nad Labem: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, 2014. ISBN 978-80-7414-849-1. Dostupné z: http://envimod.fzp.ujep.cz/sites/default/files/skripta/30e_final_tisk.pdf
- [24] CHEN, Guanying, Hailong QIU, Paras N. PRASAD a Xiaoyuan CHEN. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chemical Reviews* [online]. 2014, **114**(10), 5161–5214. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr400425h

- [25] MODLITBOVÁ, Pavlína, Antonín HLAVÁČEK, Tereza ŠVESTKOVÁ, Pavel POŘÍZKA, Lucie ŠIMONÍKOVÁ, Karel NOVOTNÝ a Jozef KAISER. The effects of photon-upconversion nanoparticles on the growth of radish and duckweed: Bioaccumulation, imaging, and spectroscopic studies. *Chemosphere* [online]. 2019, **225**, 723–734. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.03.074
- [26] HAASE, Markus a Helmut SCHÄFER. Upconverting nanoparticles. *Angewandte Chemie - International Edition* [online]. 2011, **50**(26), 5808–5829. ISSN 15213773. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201005159
- [27] WANG, Meng, Gopal ABBINENI, April CLEVENGER, Chuanbin MAO a Shukun XU. Upconversion nanoparticles: Synthesis, surface modification and biological applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* [online]. 2011, **7**(6), 710–729. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2011.02.013
- [28] SINGH, Raminder, Gokhan DURLUPINAR, Stefan ANDERSSON-ENGELS a Silvia MELGAR. Emerging applications of upconverting nanoparticles in intestinal infection and colorectal cancer. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2019, **14**, 1027–1038. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S188887
- [29] CHATTERJEE, Dev K., Abdul J. RUFAlHAH a Yong ZHANG. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. *Biomaterials* [online]. 2008, **29**(7), 937–943. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.051
- [30] YIN, Wenyan, Liangjun ZHOU, Yuhui MA, Gan TIAN, Jiating ZHAO a Liang YAN. Phytotoxicity, Translocation, and Biotransformation of NaYF₄ Upconversion Nanoparticles in a Soybean Plant [online]. 2015, (36), 4774–4784. Dostupné z: doi:10.1002/sml.201500701
- [31] SEDLMEIER, Andreas, Antonín HLAVÁČEK, Lucia BIRNER, Matthias J. MICKERT, Verena MUHR, Thomas HIRSCH, Paul L. A. M. CORSTJENS, Hans J. TANKE, Tero SOUKKA a Hans H. GORRIS. Highly Sensitive Laser Scanning of Photon-Upconverting Nanoparticles on a Macroscopic Scale. *Analytical Chemistry* [online]. 2016, **88**(3), 1835–1841. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.5b04147
- [32] CHEN, Jing, Changrun GUO, Meng WANG, Lei HUANG, Liping WANG, Congcong MI, Jing LI, Xuexun FANG, Chuanbin MAO a Shukun XU. Controllable synthesis of NaYF₄: Yb,Er upconversion nanophosphors and their application to in vivo imaging of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2011, **21**(8), 2632. ISSN 0959-9428. Dostupné z: doi:10.1039/c0jm02854a
- [33] PECORA, R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2000, 123–131. Dostupné z: doi:10.1023/A:1010067107182
- [34] KIM, Hyun-A, Jung-Kwan SEO, Taksoo KIM a Byung-Tae LEE. Nanometrology and its perspectives in environmental research. *Environmental Health and Toxicology* [online]. 2014, **29**, e2014016. ISSN 2233-6567. Dostupné z: doi:10.5620/eh.t.e2014016
- [35] BAALOUSHA, M. a J. R. LEAD. Rationalizing Nanomaterial Sizes Measured by Atomic Force Microscopy, Flow Field-Flow Fractionation, and Dynamic Light Scattering: Sample Preparation, Polydispersity, and Particle Structure. *Environmental Science & Technology* [online]. 2012, **46**(11), 6134–6142. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es301167x
- [36] GOLDBURG, W. I. Dynamic light scattering. *American Journal of Physics* [online]. 1999, **67**(12), 1152–1160. ISSN 0002-9505. Dostupné z: doi:10.1119/1.19101
- [37] LTD, Malvern Instrumenst. *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 minutes* [online]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/MRK656.pdf>

- [38] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří KREJČÍ a Pavlína VLTAVSKÁ. DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA V ANALÝZE KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ. *Chemické Listy* [online]. 2014, **108**, 479–482. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_05_479-482.pdf
- [39] PAVLÍKOVÁ, Daniela, Milan PAVLÍK, Ladislava MATĚJŮ a Jiří BALÍK. *Ekotoxikologie*. 2. doplněn. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2009. ISBN 978-80-213-1843-4.
- [40] TEST, Ecological Effects a Plant TESTING. & EPA Ecological Effects Test Guidelines Background — Nontarget Plant Testing. 1996.
- [41] HORÁK, Josef, Igor LINHART a Petr KLUSOŇ. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky* [online]. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. ISBN 80-7080-548-X. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-548-X/pages-img/001.html
- [42] GALAL, Tarek M a Hanaa S SHEHATA. Bioaccumulation and translocation of heavy metals by *Plantago major* L. grown in contaminated soils under the effect of traffic pollution. *Ecological Indicators* [online]. 2015, **48**, 244–251. ISSN 1470-160X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ecolind.2014.08.013](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.08.013)
- [43] *Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4200 Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test Public Draft* [online]. B.m.: EPA USA. 1996. Dostupné z: <https://1url.cz/ZKwPI>
- [44] GNACH, Anna, Tomasz LIPINSKI, Artur BEDNARKIEWICZ, Jacek RYBKA a John A. CAPOBIANCO. Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity. *Chemical Society Reviews* [online]. 2015, **44**(6), 1561–1584. ISSN 0306-0012. Dostupné z: [doi:10.1039/C4CS00177J](https://doi.org/10.1039/C4CS00177J)
- [45] D'AGOSTINO, Rosemary B., Bradley A. LOWN, John B. MORGANTI a Edward J. MASSARO. Effects of in utero or suckling exposure to cerium (citrate) on the postnatal development of the mouse. *Journal of Toxicology and Environmental Health* [online]. 1982, **10**(3), 449–458. ISSN 0098-4108. Dostupné z: [doi:10.1080/15287398209530267](https://doi.org/10.1080/15287398209530267)
- [46] SAATZ, Jessica, Hryhoriy STRYHANYUK, Doris VETTERLEIN, Niculina MUSAT, Matthias OTTO, Thorsten REEMTSMA, Hans H. RICHNOW a Birgit DAUS. Location and speciation of gadolinium and yttrium in roots of *Zea mays* by LA-ICP-MS and ToF-SIMS. *Environmental Pollution* [online]. 2016, **216**, 245–252. ISSN 02697491. Dostupné z: [doi:10.1016/j.envpol.2016.05.069](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.069)
- [47] PANG, Xin, Decheng LI a An PENG. Application of rare-earth elements in the agriculture of China and its environmental behavior in soil. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2002, **9**(2), 143–148. ISSN 0944-1344. Dostupné z: [doi:10.1007/BF02987462](https://doi.org/10.1007/BF02987462)
- [48] VOLOKH, A.A., A.V. GORBUNOV, S.F. GUNDORINA, B.A. REVICH, M.V. FRONTASYEVA a CHEN SEN PAL. Phosphorus fertilizer production as a source of rare-earth elements pollution of the environment. *Science of The Total Environment* [online]. 1990, **95**, 141–148. ISSN 00489697. Dostupné z: [doi:10.1016/0048-9697\(90\)90059-4](https://doi.org/10.1016/0048-9697(90)90059-4)
- [49] DIATLOFF, E., F. W. SMITH a C. J. ASHER. Effects of Lanthanum and Cerium on the Growth and Mineral Nutrition of Corn and Mungbean. *Annals of Botany* [online]. 2008, **101**(7), 971–982. ISSN 0305-7364. Dostupné z: [doi:10.1093/aob/mcn021](https://doi.org/10.1093/aob/mcn021)
- [50] DIATLOFF, E., F.W. SMITH a C. J. ASHER. Rare earth elements and plant growth: II. Responses of corn and mungbean to low concentrations of lanthanum in dilute, continuously flowing nutrient solutions. *Journal of Plant Nutrition* [online]. 1995, **18**(10), 1977–1989. ISSN 0190-4167. Dostupné z: [doi:10.1080/01904169509365038](https://doi.org/10.1080/01904169509365038)

- [51] RUIZ-HERRERA, León F., Lenin SÁNCHEZ-CALDERÓN, Luis HERRERA-ESTRELLA a José LÓPEZ-BUCIO. Rare earth elements lanthanum and gadolinium induce phosphate-deficiency responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Soil* [online]. 2012, **353**(1–2), 231–247. ISSN 0032-079X. Dostupné z: doi:10.1007/s11104-011-1026-1
- [52] HU, Xin, Zhuhong DING, Yijun CHEN, Xiaorong WANG a Lemei DAI. Bioaccumulation of lanthanum and cerium and their effects on the growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Chemosphere* [online]. 2002, **48**(6), 621–629. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/S0045-6535(02)00109-1
- [53] CHENG, Liang, Kai YANG, Mingwang SHAO a Xinhua LU. In vivo pharmacokinetics, long-term biodistribution and toxicology study of functionalized upconversion nanoparticles in mice. *Nanomedicine* [online]. 2011, **6**(8), 1327–1340. Dostupné z: <https://www.proquest.com/docview/1922805901/fulltext/CD86F86EF76F4D14PQ/1?accountid=17115>
- [54] ZHOU, Jia-Cai, Zheng-Lin YANG, Wei DONG, Ruo-Jin TANG, Ling-Dong SUN a Chun-Hua YAN. Bioimaging and toxicity assessments of near-infrared upconversion luminescent NaYF₄:Yb,Tm nanocrystals. *Biomaterials* [online]. 2011, **32**(34), 9059–9067. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.038
- [55] WANG, Kan, Jiebing MA, Meng HE, Guo GAO, Hao XU, Jie SANG, Yuxia WANG, Baoquan ZHAO a Daxiang CUI. Toxicity Assessments of Near-infrared Upconversion Luminescent LaF₃:Yb,Er in Early Development of Zebrafish Embryos. *Theranostics* [online]. 2013, **3**(4), 258–266. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.5701
- [56] HYUK, Gun, Mintai P HWANG, Su YEON, Ho SEONG a Kwan HYI. Biomaterials A systematic in-vivo toxicity evaluation of nanophosphor particles via zebra fish models. *Biomaterials* [online]. 2014, **35**(1), 440–449. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.054
- [57] LÓPEZ-MORENO, Martha L., Guadalupe DE LA ROSA, José Á. HERNÁNDEZ-VIEZCAS, Hiram CASTILLO-MICHEL, Cristian E. BOTEZ, José R. PERALTA-VIDEA a Jorge L. GARDEA-TORRESDEY. Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO₂ Nanoparticles on Soybean (*Glycine max*) Plants. *Environmental Science & Technology* [online]. 2010, **44**(19), 7315–7320. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es903891g
- [58] PARSONS, Jason G., Martha L. LOPEZ, Christina M. GONZALEZ, Jose R. PERALTA-VIDEA a Jorge L. GARDEA-TORRESDEY. Toxicity and biotransformation of uncoated and coated nickel hydroxide nanoparticles on mesquite plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2010, n/a-n/a. ISSN 07307268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.146
- [59] MA, Yuhui, Xiao HE, Peng ZHANG, Zhiyong ZHANG, Zhi GUO, Renzhong TAI, Zijian XU, Lijuan ZHANG, Yayun DING, Yuliang ZHAO a Zhifang CHAI. Phytotoxicity and biotransformation of La₂O₃ nanoparticles in a terrestrial plant cucumber (*Cucumis sativus*). *Nanotoxicology* [online]. 2011, **5**(4), 743–753. ISSN 1743-5390. Dostupné z: doi:10.3109/17435390.2010.545487
- [60] ZHANG, Peng, Yuhui MA, Zhiyong ZHANG, Xiao HE, Zhi GUO, Renzhong TAI, Yayun DING, Yuliang ZHAO a Zhifang CHAI. Comparative toxicity of nanoparticulate/bulk Yb₂O₃ and YbCl₃ to cucumber (*Cucumis sativus*). *Environmental Science & Technology* [online]. 2012, **46**(3), 1834–1841. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es2027295
- [61] YIN, Wenyan, Liangjun ZHOU, Yuhui MA, Gan TIAN, Jiating ZHAO, Liang YAN, Xiaopeng ZHENG, Peng ZHANG, Jie YU, Zhanjun GU a Yuliang ZHAO.

- Phytotoxicity, Translocation, and Biotransformation of NaYF₄ Upconversion Nanoparticles in a Soybean Plant. *Small* [online]. 2015, **11**(36), 4774–4784. ISSN 16136810. Dostupné z: doi:10.1002/sml.201500701
- [62] NORDMANN, J., S. BUCZKA, B. VOSS, M. HAASE a K. MUMMENHOFF. In vivo analysis of the size- and time-dependent uptake of NaYF₄:Yb,Er upconversion nanocrystals by pumpkin seedlings. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2015, **3**(1), 144–150. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/C4TB01515K
- [63] HISCHEMÖLLER, Anja, Jörg NORDMANN, Pavel PTACEK, Klaus MUMMENHOFF a Markus HAASE. In-Vivo Imaging of the Uptake of Upconversion Nanoparticles by Plant Roots. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2009, **5**(3), 278–284. ISSN 15507033. Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2009.1032
- [64] PENG, Juanjuan, Yun SUN, Qian LIU, Yang YANG, Jing ZHOU, Wei FENG, Xianzhong ZHANG a Fuyou LI. Upconversion nanoparticles dramatically promote plant growth without toxicity. *Nano Research* [online]. 2012, **5**(11), 770–782. ISSN 1998-0124. Dostupné z: doi:10.1007/s12274-012-0261-y
- [65] GALIOVÁ, M., J. KAISER, K. NOVOTNÝ, J. NOVOTNÝ, T. VACULOVÍČ, M. LIŠKA, R. MALINA, K. STEJSKAL, V. ADAM a R. KIZEK. Investigation of heavy-metal accumulation in selected plant samples using laser induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Applied Physics A* [online]. 2008, **93**(4), 917–922. ISSN 0947-8396. Dostupné z: doi:10.1007/s00339-008-4747-0
- [66] KAISER, J., O. SAMEK, L. REALE, M. LIŠKA, R. MALINA, A. RITUCCI, A. POMA, A. TUCCI, F. FLORA, A. LAI, L. MANCINI, G. TROMBA, F. ZANINI, A. FAENOV, T. PIKUZ a G. CINQUE. Monitoring of the heavy-metal hyperaccumulation in vegetal tissues by X-ray radiography and by femto-second laser induced breakdown spectroscopy. *Microscopy Research and Technique* [online]. 2007, **70**(2), 147–153. ISSN 1059910X. Dostupné z: doi:10.1002/jemt.20394
- [67] GALIOVÁ, M., J. KAISER, K. NOVOTNÝ, O. SAMEK, L. REALE, R. MALINA, K. PÁLENÍKOVÁ, M. LIŠKA, V. ČUDEK, V. KANICKÝ, V. OTRUBA, A. POMA a A. TUCCI. Utilization of laser induced breakdown spectroscopy for investigation of the metal accumulation in vegetal tissues. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* [online]. 2007, **62**(12), 1597–1605. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2007.10.040
- [68] KRYSŤOFOVA, Olga, Violetta SHESTIVSKA, Michaela GALIOVA, Karel NOVOTNY, Jozef KAISER, Josef ZEHNALEK, Petr BABULA, Radka OPATRILOVA, Vojtech ADAM a Rene KIZEK. Sunflower plants as bioindicators of environmental pollution with lead (II) ions. *Sensors* [online]. 2009, **9**(7), 5040–5058. ISSN 14248220. Dostupné z: doi:10.3390/s90705040
- [69] KAISER, J., M. GALIOVÁ, K. NOVOTNÝ, R. ČERVENKA, L. REALE, J. NOVOTNÝ, M. LIŠKA, O. SAMEK, V. KANICKÝ, A. HRDLIČKA, K. STEJSKAL, V. ADAM a R. KIZEK. Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2009, **64**(1), 67–73. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2008.10.040
- [70] GALIOVÁ, Michaela, Jozef KAISER, Karel NOVOTNÝ, Martin HARTL, Rene KIZEK a Petr BABULA. Utilization of laser-assisted analytical methods for monitoring of lead and nutrition elements distribution in fresh and dried *Capsicum annuum* l. leaves. *Microscopy Research and Technique* [online]. 2011, **74**(9), 845–852. ISSN 1059910X. Dostupné z: doi:10.1002/jemt.20967

- [71] KRAJCAROVÁ, Lucie, Karel NOVOTNÝ, Petr BABULA, Ivo PROVAZNIK, Petra KUČEROVÁ, Vojtěch ADAM, Madhavi Z. MARTIN, René KIZEK a Jozef KAISER. Copper Transport and Accumulation in Spruce Stems (*Picea abies* (L.) Karsten) Revealed by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *International Journal of Electrochemical Science* [online]. 2013, **8**, 4485–4504. Dostupné z: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.658.4654&rep=rep1&type=pdf>
- [72] BUENO GUERRA, Marcelo Braga, Andressa ADAME, Eduardo DE ALMEIDA, Gabriel Gustinelli ARANTES DE CARVALHO, Marcos Augusto STOLF BRASIL, Dário SANTOS JR a Francisco José KRUG. Direct analysis of plant leaves by EDXRF and LIBS: microsampling strategies and cross-validation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2015, **30**(7), 1646–1654. ISSN 0267-9477. Dostupné z: [doi:10.1039/C5JA00069F](https://doi.org/10.1039/C5JA00069F)
- [73] MODLITBOVÁ, Pavlína, Karel NOVOTNÝ, Pavel POŘÍZKA, Jakub KLUS, Přemysl LUBAL, Helena ZLÁMALOVÁ-GARGOŠOVÁ a Jozef KAISER. Comparative investigation of toxicity and bioaccumulation of Cd-based quantum dots and Cd salt in freshwater plant *Lemna minor* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2018, **147**(March 2017), 334–341. ISSN 01476513. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ecoenv.2017.08.053](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.053)
- [74] SINGH, Vivek K., Durgesh Kumar TRIPATHI, Xianglei MAO, Richard E. RUSSO a Vassilia ZORBA. Elemental Mapping of Lithium Diffusion in Doped Plant Leaves Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). *Applied Spectroscopy* [online]. 2019, **73**(4), 387–394. ISSN 0003-7028. Dostupné z: [doi:10.1177/0003702819830394](https://doi.org/10.1177/0003702819830394)
- [75] PENG, Jiyu, Yong HE, Zhangfeng ZHAO, Jiandong JIANG, Fei ZHOU, Fei LIU a Tingting SHEN. Fast visualization of distribution of chromium in rice leaves by reheating dual-pulse laser-induced breakdown spectroscopy and chemometric methods. *Environmental Pollution* [online]. 2019, **252**, 1125–1132. ISSN 02697491. Dostupné z: [doi:10.1016/j.envpol.2019.06.027](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.027)
- [76] ZHAO, Xiande, Chunjiang ZHAO, Xiaofan DU a Daming DONG. Detecting and Mapping Harmful Chemicals in Fruit and Vegetables Using Nanoparticle-Enhanced Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1), 906. ISSN 2045-2322. Dostupné z: [doi:10.1038/s41598-018-37556-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-37556-w)
- [77] ILHARDT, Peter D., Jamie R. NUÑEZ, Elizabeth H. DENIS, Joshua J. ROSNOW, Eirik J. KROGSTAD, Ryan S. RENSLOW a James J. MORAN. High-resolution elemental mapping of the root-rhizosphere-soil continuum using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2019, **131**, 119–132. ISSN 00380717. Dostupné z: [doi:10.1016/j.soilbio.2018.12.029](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.12.029)
- [78] MODLITBOVÁ, Pavlína, Pavel POŘÍZKA, Sára STRÍTEŽSKÁ, Štěpán ZEZULKA, Marie KUMMEROVÁ, Karel NOVOTNÝ a Jozef KAISER. Detail investigation of toxicity, bioaccumulation, and translocation of Cd-based quantum dots and Cd salt in white mustard. *Chemosphere* [online]. 2020, **251**. ISSN 18791298. Dostupné z: [doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126174](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126174)
- [79] DA SILVA, Marcelo Anselmo Oseas a Marco Aurelio Zezzi ARRUDA. Laser ablation (imaging) for mapping and determining Se and S in sunflower leaves. *Metallomics* [online]. 2013, **5**(1), 62–67. ISSN 1756-5901. Dostupné z: [doi:10.1039/C2MT20154B](https://doi.org/10.1039/C2MT20154B)
- [80] OLIVEIRA, Silvana R. a Marco A. Z. ARRUDA. Application of laser ablation (imaging) inductively coupled plasma mass spectrometry for mapping and quantifying Fe in transgenic and non-transgenic soybean leaves. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2015, **30**(2), 389–395. ISSN 0267-9477. Dostupné z: [doi:10.1039/C4JA00276H](https://doi.org/10.1039/C4JA00276H)

- [81] MESJASZ-PRZYBYŁOWICZ, J. a W. J. PRZYBYŁOWICZ. PIXE and metal hyperaccumulation: from soil to plants and insects. *X-Ray Spectrometry* [online]. 2011, **40**(3), 181–185. ISSN 00498246. Dostupné z: doi:10.1002/xrs.1304
- [82] MOORE, Katie L., Yi CHEN, Allison M. L. MEENE, Louise HUGHES, Wenju LIU, Tina GERAKI, Fred MOSSELMANS, Steve P. MCGRATH, Chris GROVENOR a Fang-Jie ZHAO. Combined NanoSIMS and synchrotron X-ray fluorescence reveal distinct cellular and subcellular distribution patterns of trace elements in rice tissues. *New Phytologist* [online]. 2014, **201**(1), 104–115. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/nph.12497
- [83] ENCYCLOPAEDIA., T. Editors of. *Polyembryony*. B.m.: Encyclopedia Britannica. 2018. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/polyembryony>
- [84] LIANG, Sen, Xue ZHANG, Zhennan WU, Yi LIU, Hao ZHANG, Haizhu SUN, Hongchen SUN a Bai YANG. Decoration of up-converting NaYF₄:Yb,Er(Tm) nanoparticles with surfactant bilayer. A versatile strategy to perform oil-to-water phase transfer and subsequently surface silication. *CrystEngComm* [online]. 2012, **14**(10), 3484. ISSN 1466-8033. Dostupné z: doi:10.1039/c2ce06578a
- [85] SPIELMAN-SUN, Eleanor, Astrid AVELLAN, Garret D. BLAND, Ryan V. TAPPERO, Alvin S. ACERBO, Jason M. UNRINE, Juan Pablo GIRALDO a Gregory V. LOWRY. Nanoparticle surface charge influences translocation and leaf distribution in vascular plants with contrasting anatomy. *Environmental Science: Nano* [online]. 2019, **6**(8), 2508–2519. ISSN 2051-8153. Dostupné z: doi:10.1039/C9EN00626E

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

UCNPs	Photon-Upconversion Nanoparticles foton-upkonverzní nanočástice
IR	Infrared infračervený
LIBS	Laser Induced Breakdown Spectroscopy spektroskopie laserem buzeného plazmatu
NIST	National Institute of Standards and Technology Národní institut standardů a technologie
UV	Ultraviolet ultrafialová oblast
GD	Gate Delay doba zpoždění detektoru
GW	Gate Width integrační doba
DP LIBS	Double Pulse Laser Induced Breakdown Spectroscopy dvoupulzní spektroskopie laserem buzeného plazmatu
ICCD	Intensified Charge-Coupled Device intenzifikované zařízení s vázanými náboji
LA-ICP-MS	Laser-Ablation Inductively-Coupled Plasma Mass Spectroscopy laserová ablace s indukčně vázaným plazmatem a hmotnostně spektroskopickou detekcí
LA-ICP-OES	Laser-Ablation Inductively-Coupled plasma Optical Emission Spectroscopy laserová ablace s indukčně vázaným plazmatem a optickou emisní detekcí
SIMS	Secondary Ions Mass Spectroscopy hmotnostní spektroskopie sekundárních iontů
SEM-EDS	Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-Ray Emission skenovací elektronová mikroskopie s energiově disperzní rentgenovou spektroskopií
TEM-EDS	Transmission Electron Microscopy with Energy Dispersive X-Ray Emission transmisní elektronová mikroskopie s energiově disperzní rentgenovou spektroskopií
PIXE	Proton-Induced X-Ray Emission protony indukovaná rentgenová emise
XRF	X-Ray Fluorescence Rentgenová fluorescenční mikroskopie
XAS	X-Ray Absorption Spectroscopy rentgenová absorpční spektroskopie
XANES	X-Ray Absorption Near Edge Structure spektroskopie blízké struktury rentgenové absorpční hrany
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure spektroskopie jemné struktury daleké části absorpční hrany
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy

NIR	optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem Near Infrared blízká infračervená oblast
VIS	Visible viditelná oblast
ESA	Excited State Absorption absorpce v excitovaném stavu,
ETU	Energy Transfer Upconversion energetický transfer
CSU	Cooperative Sensitization Upconversion společná senzibilizace
CR	Cross Relaxation křížová relaxace
PA	Photon Avalanche fotonová lavina
DLS	Dynamic Light Scattering dynamický rozptyl světla
EPA	Environmental Protection Agency agentura pro ochranu životního prostředí
RRE	Rare Earth Elements kovy vzácných zemin
EDXRF	Energy Dispersive X-Ray Fluorescence energieově disperzní rentgenová spektroskopie
TEM	Transmission Electron Microscopy transmisní elektronová mikroskopie
NELIBS	Nanoparticle Enhanced Laser Induced Breakdown Spectroscopy nanočásticemi zesílená spektroskopie laserem buzeného plazmatu
QDs	Quantum Dots kvantové tečky
a.u.	Arbitrary Units libovolné jednotky